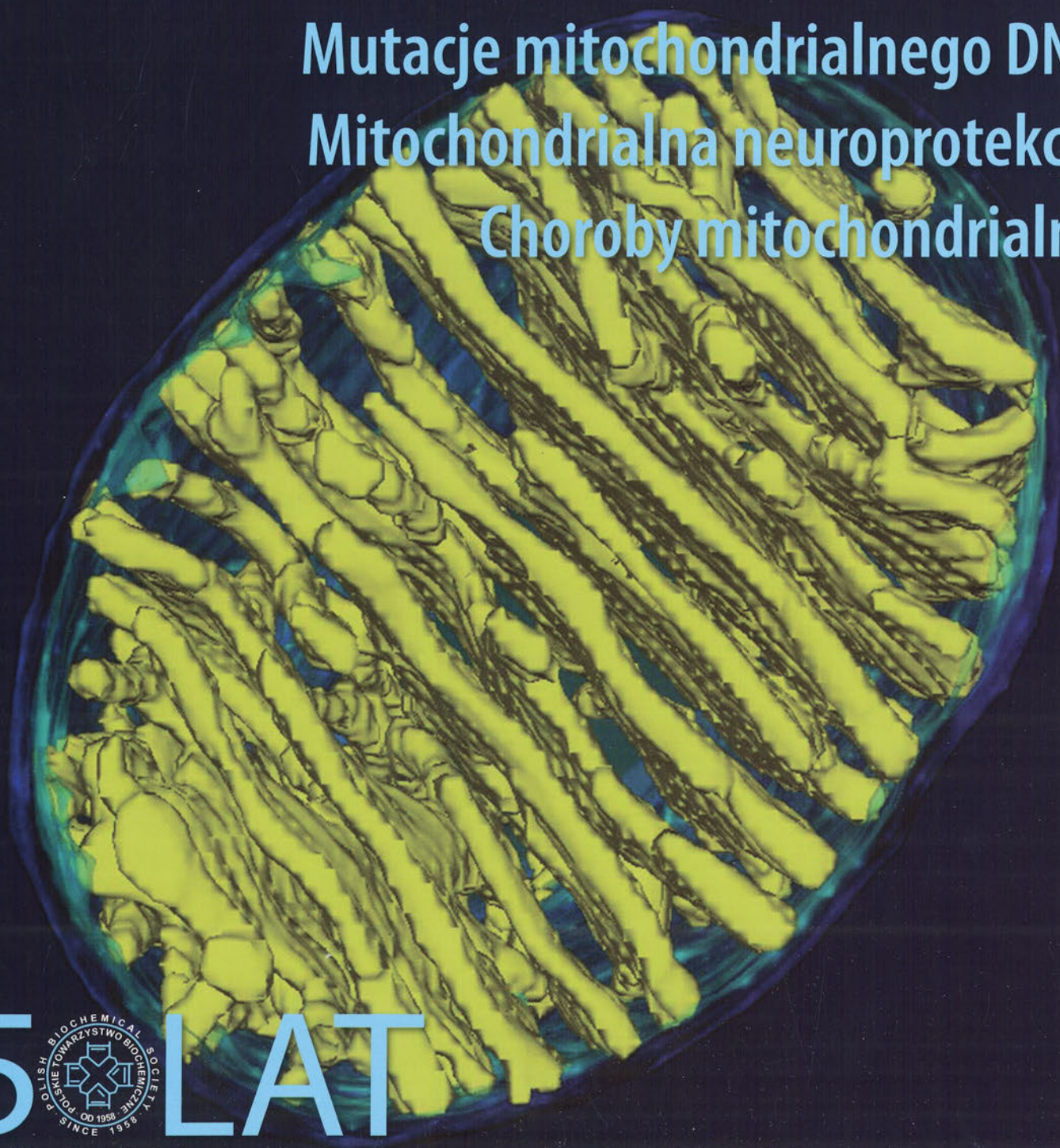


POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2008
TOM 54
NUMER 2

Mutacje mitochondrialnego DNA
Mitochondrialna neuroprotekcja
Choroby mitochondrialne



5 LAT



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

Numer specjalny poświęcony mitochondriom
przygotowany przez Polską Sieć Mitochondrialną

<http://rcin.org.pl>

MitoNet.pl



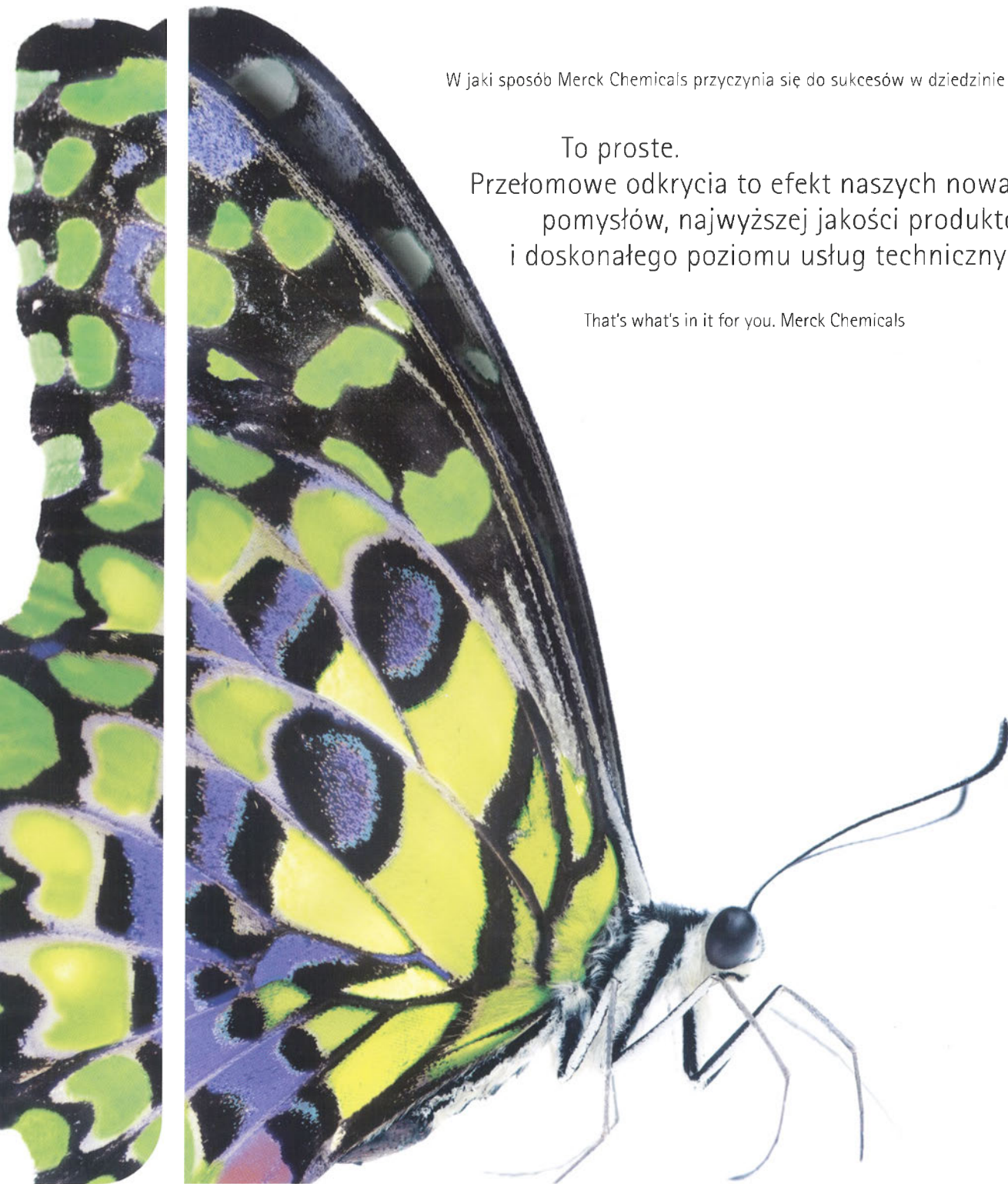
Merck Chemicals for Biosciences. Badania naukowe zostają uwieńczone sukcesem, gdy stają się źródłem innowacji i motorem postępu. Tak jest w przypadku badań prowadzonych w Merck Chemicals. Co roku opracowujemy setki nowych produktów stosowanych w biotechnologii. Jaki jest nasz cel? Chcemy pomóc naszym klientom

utrzymać przewagę nad konkurencją. Chcąc ułatwić prowadzenie badań, oferujemy szeroką gamę najwyższej jakości produktów i usług technicznych. Jak przystało na najlepszych naukowców myślimy przyszłościowo i torujemy innym drogę do sukcesu.
www.merck-chemicals.com

W jaki sposób Merck Chemicals przyczynia się do sukcesów w dziedzinie biotechnologii?

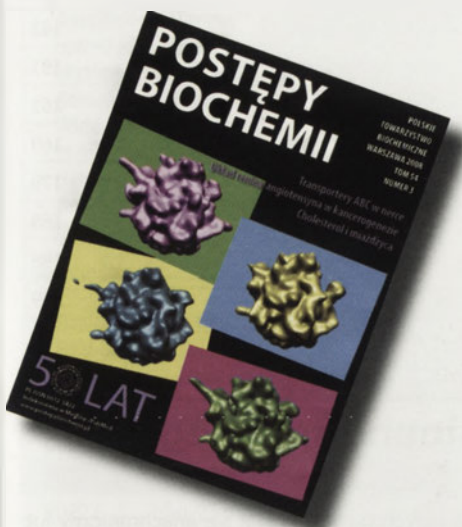
To proste.
Przełomowe odkrycia to efekt naszych nowatorskich pomysłów, najwyższej jakości produktów i doskonałego poziomu usług technicznych.

That's what's in it for you. Merck Chemicals



<http://rcin.org.pl>





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Transportery ABC w nerce
Agnieszka Piwkowska

Układ renina-angiotensyna w kancerogenezie

Kamila Domińska, Agnieszka Lachowicz-Ochędalska

Cholesterol i miażdżycę

Angelika Chachaj, Katarzyna Drożdż, Andrzej Szuba

Rysunek na okładce:

Front cover image „Mitochondrial tomogram showing the structural features of cristae junctions joining lamellar cristae to the inner boundary membrane” by T.G. Frey, San Diego State University, San Diego, CA (tfrey@sunstroke.sdsu.edu) and G.A. Perkins, University of California, San Diego, CA, with permission.

NUMER SPECJALNY „MITOCHONDRIA”
POD REDAKCJĄ ADAMA SZEWCZYKA

Polska sieć mitochondrialna
Adam Szewczyk

117

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe
pod red. Teresy Wesołowskiej

120

Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2008
Kraków 17–19.10.2008

126

Nowe geny związane z miażdżycą
Agnieszka Dettlaff-Pokora, Julian Świerczyński

127

TEMAT NUMERU – MITOCHONDRIA

Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki

Lech Wojtczak, Krzysztof Zabłocki

129

Ewolucja mitochondrialnego DNA i jego systemu ekspresji – porównanie królestwa zwierząt i roślin

Janusz Piechota, Hanna Jańska

142

Występowanie mutacji w mtDNA i ich potencjalny wpływ na strukturę białek w wybranych typach nowotworów

Katarzyna Plak, Wojciech Kukwa, Ewa Bartnik, Paweł Golik, Anna Ścińska, Tomasz Krawczyk, Anna M. Czarnecka

151

Choroby mitochondrialne u dzieci – podłoże molekularne i biochemiczne, ze szczególnym uwzględnieniem zespołu Leigha

Ewa Pronicka, Dorota Piekutowska-Abramczuk, Maciej Pronicki

161

Mitochondrialna neuroprotekcja

Marta Piwońska, Adam Szewczyk

169

Mitochondrialne białka rozprzegające – regulacja i ich rola fizjologiczna

Wiesława Jarmuszkiewicz, Andrzej Woyda-Płoszczyca

179

Udział białek rozprzegających w modulacji funkcji mitochondriów – perspektywy terapeutyczne

Andrzej Woyda-Płoszczyca, Wiesława Jarmuszkiewicz

188

Mitochondria śródbłonka – nowy cel dla farmakologii dysfunkcji śródbłonka

Antoni Wrzosek, Agnieszka Łojek, Iwona Stanisławska, Antonina Chmura-Skirlińska, Krzysztof Dołowy, Stefan Chłopicki, Adam Szewczyk

198

Kinazy białkowe w mitochondriach

Joanna Ewa Kowalczyk, Barbara Zabłocka

209

Zastosowanie elektroforezy „Blue Native” w badaniach mitochondrialnego łańcucha oddechowego w normie i patologii

Magdalena Lebedzińska, Jerzy Duszyński, Mariusz R. Więckowski

217

Czy zapłacicie już składkę członkowską Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za rok 2008?

Jeśli nie, wejdź na stronę www.ptbioch.edu.pl i dopełń swojego obowiązku.

Events/Opinions/Comments	117
REVIEWS	
Mitochondria in cell life, death and disease	129
Evolution of the mitochondrial DNA and its expression system – comparison between animal and plant kingdom	142
The impact of mtDNA mutations on proteins structure in selected types of cancer	151
Metabolic diseases in children including Leigh syndrome – biochemical and molecular background	161
Mitochondrial neuroprotection	169
Mitochondrial uncoupling proteins – regulation and physiological role	179
Uncoupling proteins in modulation of mitochondrial functions; therapeutic prospects	188
Endothelial mitochondria – a novel target for pharmacology of endothelial dysfunction	198
Protein kinases in mitochondria	209
Application of „Blue Native” electrophoresis in the studies of mitochondrial respiratory chain complexes in physiology and pathology	217

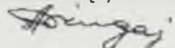
Apel Zarządu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Szanowna Koleżanko, Szanowny Kolego,
Statut Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od wielu lat pozostaje niezmienny i obecnie w niektórych punktach stał się anachroniczny lub wymaga zmian, które dostosowałyby go do współczesnych warunków funkcjonowania Towarzystwa. Niestety, paragraf 37 obecnego Statutu mówi, że wszelkie zmiany mogą być dokonane wyłącznie przez Walne Zebranie, przy obecności co najmniej połowy członków Towarzystwa. W całej historii naszego Towarzystwa taka frekwencja na Walnym Zebraniu zdarzyła się tylko raz, mianowicie na Pierwszym Walnym Zebraniu w 1958 r., kiedy Towarzystwo liczyło około 200 członków. Frekwencja na Walnych Zebraniach wynosi zawsze kilkadziesiąt osób, mimo że z biegiem lat Towarzystwo liczebnie wzrastało. Obecnie liczy około 1200 członków. Dlatego, po konsultacji z prawnikami, Zarząd Główny P.T.Bioch. postanowił spróbować zmienić Statut, wprowadzając na najbliższym Walnym Zebraniu, głosowanie przez pełnomocników. Zebranie to odbędzie się przy okazji 43. Zjazdu Towarzystwa w Olsztynie we wrześniu br. (o czym zawiadomimy szczegółowo we właściwym czasie). Każdy członek Towarzystwa, który nie będzie mógł uczestniczyć w tym Zebraniu, jest proszony o upoważnienie kogokolwiek z uczestników Zebrania do głosowania w jego imieniu, ale tylko w jednej, konkretnej, wymienionej w upoważnieniu sprawie, mianowicie zmianie §37 Statutu. Zmiana ta umożliwiłaby w przyszłości wprowadzanie innych niezbędnych zmian w Statucie przez członków, którzy będą uczestnikami przyszłych Walnych Zebrań, bez względu na frekwencję.

Zwracamy się zatem do Pani/Pana z gorącym apelem o wypełnienie załączonego pełnomocnictwa, wydrukowanie i niezwłoczne odesłanie na adres Zarządu Głównego lub na adres swojego Oddziału Towarzystwa. Prosimy przy tym o wpisanie swojego imienia, nazwiska i numeru PESEL oraz zaznaczenie, jak chce Pani/Pan głosować: za, czy przeciw proponowanej zmianie. Nie jest ważne natomiast, komu Państwo udzieli tego pełnomocnictwa, byleby była to osoba, która na pewno weźmie udział w Walnym Zebraniu. Dlatego proponujemy, aby pozostawić niewypełnioną rubrykę z imieniem i nazwiskiem osoby upoważnionej. Zostaną tam wpisane dane personalne jednej z osób obecnych na Walnym Zebraniu we wrześniu 2008 roku. Zwracamy uprzejmie uwagę, że sposób głosowania (TAK lub NIE) zaznaczy Pani/Pan w swoim pełnomocnictwie. A zatem osoba upoważniona, ktokolwiek nią będzie, nie będzie mogła głosować w Państwa imieniu inaczej, niż to będzie zaznaczone w upoważnieniu. Jeśli będzie Pani/Pan obecna(y) na Walnym Zebraniu, wówczas pełnomocnictwo to zostanie wycofane i głosować będzie Pani/Pan osobiście.

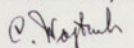
Bardzo liczymy na Pani/Pana zrozumienie wagi sytuacji i niezwłoczne odesłanie wypełnionego pełnomocnictwa, za co z góry dziękujemy.

Przewodniczącą Komisji Statutowej



Prof. Andrzej Dżugaj

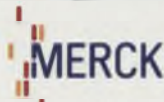
Prezes Towarzystwa



Prof. Lech Wojtczak

Pełnomocnictwo dodane do niniejszego numeru czasopisma prosimy odesłać na adres:
Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Zarząd Główny, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII



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: gbartoszb@biol.uni.lodz.pl

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

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

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

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

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

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

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

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

High specificity

All the advantages at a glance

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

Applications

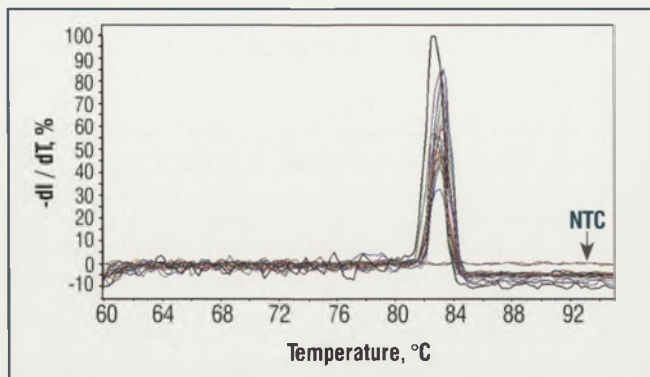
- Real-time PCR using SYBR Green dye.
- Real-time RT-PCR using SYBR Green dye.

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)

Cat. No. Appl.

K0221 2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 μ l)

K0222 10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 μ l)



Melting curve analysis confirms high qPCR specificity.

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

Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

High sensitivity

All the advantages at a glance

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

Applications

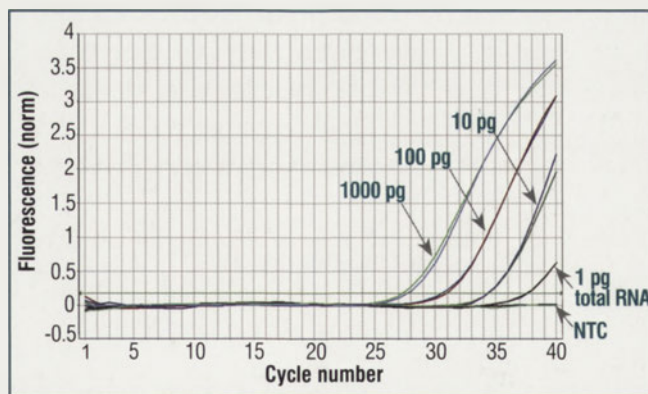
- Real-time PCR using sequence-specific probes.
- Real-time RT-PCR using sequence-specific probes

Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2X)

Cat. No. Appl.

K0231 2x1.25 ml (for 200 reactions of 25 μ l)

K0232 10x1.25 ml (for 1000 reactions of 25 μ l)



Highly sensitive two step qRT-PCR.

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

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



Fermentas
LIFE SCIENCES

21-st Wilhelm Bernhard Nuclear Workshop 31.08 - 04.09.2009 Ustroń, Poland

Dear Friends and Colleagues,

The Wilhelm Bernhard Workshop is a biennial event focusing on functional and structural aspects of the nucleus and its component structures. The Workshop fosters interaction and cooperation between scientists from all parts of the world and especially encourages active participation of young scientists. The major aim of the Workshop is to create a multidisciplinary meeting representing most research approaches used in studies on the cell nucleus structure, functions, and their relationships, as well as to give young scientists the opportunity to present their research within a fairly small circle of competent colleagues and to meet experienced colleagues in their field of research.

We have the pleasure to announce that the 21st Wilhelm Bernhard International Workshop on the Cell Nucleus will be held in Ustroń, Poland, from the 31 August to the 4 September 2009.

The Sessions will cover the following topics:

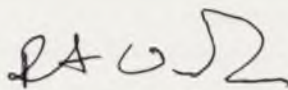
- nuclear structure and dynamics
- nucleolus and ribosome biogenesis
- chromatin structure and regulation of its functions
- nuclear/nucleolar proteins and RNA
- regulation of gene expression
- the nucleus in stress, death and pathology
- DNA damage and repair
- new technologies and bioinformatics

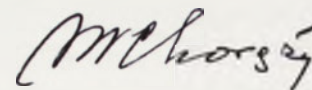
The Workshop registration fee is 1400 Polish zlotys (which at the current exchange rate is 400 €). The fee includes meals, accommodation, conference materials and social program. A limited number of grants will be available for PhD students and young investigators to cover the workshop fee.

The registration starts January 1st, 2009. Because of a limited space at the workshop venue the "first come-first served" method will be used.

We hope to see you in Ustroń!

On behalf of the Organizing Committee


prof. Piotr Widtak


prof. Mieczysław Chorąży

Adam Szewczyk✉

✉Polska Sieć Mitochondrialna MitoNet.pl, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel.: (022) 659 85 71, faks: (022) 822 53 42, e-mail: mitonet@nencki.gov.pl, www.mitonet.pl

Mitochondria stanowią podstawowe źródło energii wszystkich komórek.¹ Organelle te są zaangażowane w tak złożone zjawiska biologiczne, jak apoptoza i wewnątrzkomórkowa homeostaza wapnia. Mitochondria są także jednym z ważniejszych miejsc powstawania wolnych rodników w komórce. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów mogą stanowić podłoże chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Huntingtona i choroba Alzheimera. Z drugiej strony, mitochondria mogą pełnić dobroczynne funkcje w organizmie, w ochronie komórek mięśniowych i nerwowych przed skutkami stresu oksydacyjnego (kardio- i neuroprotekcja). Na podkreślenie zasługuje fakt, że ostatnie lata to prawdziwy renesans badań nad genetyką mitochondriów, szczególnie mitochondriów roślin i drożdży.

Polska Sieć Mitochondrialna MitoNet.pl, której działania są koordyno-

wane przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, została zawiązana w 2006 roku. Stanowi ona unikalną platformę integrującą dotychczas rozproszone w polskim środowisku naukowym badania poświęcone mitochondriom. Realizowane wspólnie przez członków sieci badania pozwalają stworzyć nie tylko warunki dla rozwoju badań podstawowych w obszarze tzw. *frontier science*, ale także mogą wyjść na przeciw zapotrzebowaniu społeczeństwu w zakresie diagnostyki medycznej. Przykładem wspólnego działania członków sieci jest publikacja z 2007 roku w renomowanym czasopiśmie amerykańskim *Journal of Biological Chemistry*.² Badacze trzech pracowni działających w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej: z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, zidentyfikowali w wewnętrznej błonie mitochondrialnej *Acanthamoeba castellanii* kanał potasowy regulowany przez ATP. Przeprowadzenie tych badań było możliwe dzięki integracji doświadczenia różnych grup badawczych działających w ramach jednej sieci naukowej.

Głównym celem działania Polskiej Sieci Mitochondrialnej MitoNet.pl jest konsolidacja, wspomaganie rozwoju potencjału intelektualnego i material-

nego jednostek naukowych tworzących sieć oraz integracja badań podstawowych w zakresie bioenergetyki mitochondrialnej (w obrębie biologii molekularnej, biochemii i farmakologii), z potencjalnymi możliwościami ich wykorzystania w diagnostyce i w terapii medycznej. Próbowujemy to osiągnąć przez koordynację współpracy jednostek naukowych tworzących sieć MitoNet.pl, prowadzących badania dotyczące mitochondriów.

Realizowane cele powinny doprowadzić do podniesienia poziomu krajowych badań w zakresie szeroko rozumianej bioenergetyki i ich znaczenia w Europejskiej Przestrzeni Badawczej. Powinno nastąpić także wzmocnienie międzynarodowej współpracy, konkurencyjności i integracji badań w zakresie bioenergetyki mitochondrialnej. W roku 2010 członkowie Sieci (przy współpracy Sekcji Bioenergetycznej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) zorganizują 16-tą Europejską Konferencję Bioenergetyczną (EBEC – *European Bioenergetic Conference*). Będzie to bardzo dobra okazja do zaprezentowania osiągnięć Polskiej Sieci Mitochondrialnej.

Cele szczegółowe Polskiej Sieci Mitochondrialnej obejmują:

- wspieranie współpracy jednostek naukowych zajmujących się badaniami mitochondriów przez inicjowanie, realizację wspólnych przedsięwzięć badawczych oraz edukację młodych pracowników naukowych w zakresie zgodnym z obszarami merytorycznymi Sieci;
- stworzenie forum dla wymiany informacji, promocji osiągnięć i upowszechniania wyników prac naukowo-badawczych dotyczących biochemii, farmakologii oraz biologii molekularnej mitochondriów; grupą

¹Rycinę pod tytułem "Mitochondrion Revealed" udostępnił jej autor, Eric Robert Russell, Bellingham, WA, USA (www.eBioMEDIA.com)

²Kicińska A, Swida A, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dołowy K, Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W (2007) ATP-sensitive potassium channel in mitochondria of the eukaryotic microorganism *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 282: 17433-17441

docelową dla informacji będą też osoby zagrożone chorobami mitochondrialnymi;

- wspieranie uczestnictwa jednostek naukowych, będących członkami sieci Mitonet.pl w projektach realizowanych w ramach funduszy krajowych i europejskich;

- podniesienie poziomu i znaczenia w Europejskiej Przestrzeni Badawczej, polskich badań mitochondrialów ze szczególnym uwzględnieniem badań podstawowych oraz ich potencjalnych zastosowań;

- identyfikacja obszarów tematycznych Sieci przydatnych dla społeczeństwa i gospodarki w zakresie



Fotografia 1. Uroczystość wręczenia Nagrody Polskiej Sieci Mitochondrialnej na XLII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie w 2007 roku. Od lewej stoją: Adam Szewczyk, Lech Wojtczak, Danuta Haertle (Olympus), Andrzej M. Woyda-Płoszczyca (laureat nagrody) oraz Zygmunt Machoy.

Komisji Nagrody był prof. Lech Wojtczak z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego.³

Prace sieci Mitonet.pl są koordynowane przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN. W ramach Sieci działają dwie pracownie Instytutu (Zakład Biochemii): Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych kierowana przez prof. Jerzego Duszyńskiego (Fot. 2) oraz Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych kierowana przez prof. Adama Szewczyka.

Ponadto członkami



Fotografia 2. Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych (Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN) kierowana przez prof. Jerzego Duszyńskiego.

diagnostyki medycznej (identyfikacja tzw. chorób mitochondrialnych);

- propagowanie badań mitochondrialnych w Polsce. Przykładem takiej działalności jest ustanowienie nowej nagrody naukowej dla młodego badacza za szczególnie dobre i interesujące przedstawienie wartościowej pracy bioenergetycznej na corocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Po raz pierwszy Nagrodę Polskiej Sieci Mitochondrialnej przyznano na XLII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 2007 roku w Szczecinie (Fot. 1). Przewodniczącym

kami Sieci są Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie reprezentowany przez doc. Barbarę Zabłocką (kierującą Pracownią Biologii Molekularnej), Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie reprezentowany przez prof. Magdę Bogutę, Instytut „Pomnik-Dziecka” w Warszawie reprezentowany przez

prof. Ewę Pronicką, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medium w Krakowie reprezentowany przez prof. Stefana Chłopickiego, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie reprezentowane przez prof. Andrzeja Beręsewicza, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu reprezentowany przez prof. Wiesławę Jarmuszkiewicz, Uniwersytet Wrocławski reprezentowany przez prof. Hannę Jańską, Uniwersytet Warszawski reprezentowany przez prof. Piotra Sępnia oraz Szkoła Główna Go-

sponderstwa Wiejskiego w Warszawie reprezentowana przez prof. Krzysztofa Dołowego. Członkiem stowarzyszonej Sieci jest Uniwersytet Gdański reprezentowany przez prof. Jarosława Marszałka. W ramach Sieci działa także laboratorium kierowane przez prof. Ewę Bartnik z Uniwersytetu Warszawskiego.

W niniejszym numerze kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii” przedstawiono różnorodnie, a zarazem kompleksowo zainteresowania naukowe członków Polskiej Sieci Mitochondrialnej. Zapraszamy do współpracy grupy badawcze zainteresowane badaniami mitochondrialów. Więcej informacji o działaniach Sieci Mitochondrialnej na stronie www.mitonet.pl.



Fotografia 3. Członkowie sieci organizowali w roku 2006 kurs eksperymentalny dotyczący biochemii mitochondrialów.

³W 2007 roku nagrodę ufundowaną przez firmę Olympus otrzymał mgr Andrzej M. Woyda-Płoszczyca z pracowni prof. Wiesławy Jarmuszkiewicz (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) za prezentację pod tytułem „Regulation of the energy-dissipating systems in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria by purine nucleotides”

EBEC2010

**16th European Bioenergetic Conference
Warsaw, 17-22 July 2010**

WWW.EBEC2010.PL



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



W roku 2007 Profesor Tadeusz Chojnacki wyróżniony został nagrodą Prezesa Rady Ministrów za wybitny dorobek naukowy. Prof. Tadeusz Chojnacki (Fot. 1) uzyskał dyplom lekarza w 1955 r. na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie; w latach 1953–1957 był asystentem w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie, a od 1958 r. jest pracownikiem Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (IBB). Prof. Chojnacki jest promotorem 9 ukończonych prac doktorskich. Trzy osoby spośród współpracowników uzyskały tytuł profesora. Laureat ma w dorobku około 170 prac doświadczalnych, kilkanaście artykułów przeglądowych, kilka rozdziałów w opracowaniach monograficznych oraz jest autorem dwóch zgłoszeń patentowych. Prof. Chojnacki był jednym z założycieli IBB, pełnił także funkcję Zastępcy Dyrektora ds. Naukowych Instytutu. Prof. Chojnacki odznaczony został odznaczeniami państwowymi, m.in. Krzyżem Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski (1999). Za osiągnięcia naukowe był wielokrotnie wyróżniany nagrodami, m.in. Sekretarza Naukowego PAN, Wydziału Nauk Biologicznych, a także nagrodami Rady Naukowej IBB za publikacje. W 2002 r. otrzymał medal im. L. Marchlewskiego Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN. Prof. Chojnacki jest członkiem rzeczywistym PAN. Uzyskał tytuł doktora *honoris causa* (1987) oraz tytuł „Foreign Adjunct Professor” (1992) Królewskiego Instytutu Medyczno-Chirurgicznego w Sztokholmie. W 1998 r. otrzymał medal im. M. Łomonosowa Rosyjskiej Akademii Nauk. Do 1995 r., przez kilka kadencji, pełnił funkcję Zastępcy Sekretarza Wydziału Nauk Biologicznych PAN, a w latach 1996–98 kierował tym Wydziałem, natomiast w latach 1992–95 był Przewodniczącym Komitetu Biochemii i



Fotografia 1. Prof. Tadeusz Chojnacki.

Biofizyki PAN. Prof. Chojnacki był i jest członkiem szeregu Rad Naukowych, członkiem redakcji czasopism naukowych. Prof. Chojnacki był twórcą i wieloletnim kierownikiem Zakładu Fosfolipidów, a następnie Zakładu Biochemii Lipidów (do 2003 r.). Prof. Chojnacki jest inicjatorem oryginalnej tematyki badawczej, dotyczącej badań nad strukturą, występowaniem w przyrodzie i funkcją biologiczną związków poliprenoidowych. Pierwsze prace naukowe Jego autorstwa dotyczące tej tematyki ukazały się w 1972 r. Manuskrypt najnowszej pracy jest przyjęty do druku. Wiele z tych pionierskich prac zyskało szeroki rozgłos w literaturze światowej. Do najczęściej cytowanych należy klasyczna już praca doświadczal-

na opisująca chemiczną metodę fosforylacji dolicholi (FEBS Lett, 131, 310–312, 1981), praca przeglądowa (Biochem J, 251, 1–9, 1988) cytowana w podręcznikach biochemii Lehningera, a także dwa rozdziały w powszechnie znanym wydawnictwie monograficznym *Methods in Enzymology* (1969, 2004). Odkrycia naukowe prof. Chojnackiego były punktem wyjścia do badań kontynuowanych przez Jego współpracowników w IBB PAN, a także w kilku laboratoriach zagranicznych, z którymi Profesor od wielu lat współpracuje. Wiele znakomitych prac powstało i nadal powstaje w wyniku współpracy z laboratorium prof. Gustava Dallnera (Department of Biochemistry & Biophysics, University of Stockholm). Prof. Chojnacki współpracował także z laboratorium Prof. Shibayewa (Zielinski Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moskwa). W IBB prof. Chojnacki utworzył i nadal kieruje działalnością „Kolekcji Poliprenoli” wytwarzającej unikatowe biopreparaty udostępniane zainteresowanym badaczom w ramach bezpośredniej współpracy na-

ukowej, jak i za pośrednictwem firm komercyjnych.

Związki poliizoprenoidowe, którymi od końca lat 60. XX wieku zajmuje się prof. Chojnacki są substancjami naturalnymi, występującymi powszechnie w przyrodzie. Alkohole poliizoprenoidowe są polimerami wielu (od 5 do ponad 130) pięciowęglowych reszt izoprenowych. Uderzające podobieństwo strukturalne poliizoprenoidów z jednej strony do kauczuku naturalnego (stopień polimeryzacji wynosi najczęściej kilka tysięcy), z drugiej do lotnych mono, seskwi i diterpenów (składników olejków eterycznych), nie jest przypadkowe. Wszystkie te związki powstają w komórkach w wyniku aktywności *cis*- i/lub *trans*-prenylotransferaz. Badania prof. Chojnackiego prowadzone od ponad 40 lat koncentrowały się na poznaniu struktury polioizoprenoidów, a także ich roli biologicznej i mechanizmów biosyntezy (natura dostarcza poliizoprenoidów o sporym stopniu różnorodności strukturalnej). Czynnikiem różnicującym są długość łańcucha węglowego, izomeria geometryczna podwójnego wiązania (występuje jedno takie wiązanie w każdej niemal reszcie izoprenowej), uwodorowanie wiązań podwójnych i, rzadko, obecność dodatkowych podstawników. Obserwacją pochodzącą z lat 60. było odkrycie, że rośliny i bakterie syntetyzują poliizoprenoidy, których wszystkie reszty izoprenowe posiadają zachowane jedno podwójne wiązanie – mówimy o nich „alkohole nie w pełni nasycone”, podczas gdy zwierzęta i grzyby, także drożdże, syntetyzują alkohole (nazywane są dolicholami) zawierające jedno podwójne wiązanie uwodorowane. Dość tajemnicza, jeszcze nie do końca wyjaśniona, sprawa długości łańcucha poliizoprenoidowego była od lat tematem poszukiwań prof. Chojnackiego. Okazuje się, że o ile dolichole występują w formie mieszaniny homologów o niezbyt szerokim spektrum długości łańcucha (u ludzi cząsteczka dominującego w mieszaninie dolicholu składa się z 19 reszt izopre-

nowych, a wszystkich homologów w mieszaninie występuje ok. 5–6), o tyle poliprenole roślinne przedstawiają sobą olbrzymią różnorodność, gdyż zarówno długość dominującego w mieszaninie związku, jak i ich liczba zmienia się zależnie od gatunku rośliny. Dla przykładu rodzina betulaprenoli z brzozy zawiera zaledwie 4 homologi (dominuje ilościowo prenil zbudowany z 7 reszt izoprenowych), a rodzina prenil wyizolowanych z liści pięciornika złotego zawiera 30 homologów (dominuje prenil-18). Od tego schematu całkowicie odbiegają bakterie, które syntetyzują zwykle pojedynczy prenil zbudowany z 11 reszt (baktoprenil). Badania przesiewowe mające na celu ocenę różnorodności występujących w przyrodzie struktur poliprenoli są od lat prowadzone przez zespół prof. Chojnackiego we współpracy z wieloma specjalistami w zakresie botaniki i fizjologii roślin i obejmują rośliny pochodzące z różnych grup systematycznych, stref klimatycznych i nisz ekologicznych. Obok analizy strukturalnej prof. Chojnacki pracuje od wielu lat nad uzyskiwaniem chemicznie zmodyfikowanych poliizoprenoidów. Ten kierunek badań wiąże się z dobrze opisaną funkcją fosforanów alkoholi poliizoprenoidowych jako kofaktorów w procesie glikozylacji i glicyacji (syntezy kotwicy GPI) białek u eukariontów; u bakterii fosforan baktoprenolu jest kofaktorem biosyntezy peptydoglikanu i O-antygeny. Niezwykle intensywny rozwój badań nad glikozylacją białek wymagał dostępności fosforanów poliizoprenoidów, podczas gdy w tkankach roślin i zwierząt gromadzone są (niekiedy w znacznych zresztą ilościach) wolne alkohole lub ich estry z kwasami tłuszczowymi. Olbrzymią zasługą prof. Chojnackiego było opracowanie bardzo wydajnej metody fosforylacji dolicholi, do dziś powszechnie stosowanej i cytowanej. W ostatnim czasie prof. Chojnacki zainteresował się możliwością przekształcenia poliizoprenoidów w formy kationowe użyteczne w medycynie lipofekcji, a badania te zaowocowały opublikowaną w ubiegłym roku pracą doświadczalną. Prof. Chojnacki wraz z zespołem opracował także metody chemicznej syn-

tezy radioizotopowo znakowanych poliizoprenoidów i ich prekursorów; związki te dały asumpt wielu badaniom dotyczącym metabolizmu poliizoprenoidów, a ostatnio – ubichinonu (zawierającego poliizoprenoidowy łańcuch boczny). Stworzona przez prof. Chojnackiego unikalna w skali światowej „Kolekcja Poliprenoli” dała początek wielu badaniom prowadzonym dziś w Zakładzie Biochemii Lipidów IBB PAN w Warszawie, w Laboratorium Arrheniusa na Uniwersytecie w Sztokholmie, a także w wielu laboratoriach europejskich i amerykańskich (przygotowano na podstawie informacji opracowanej przez prof. dr hab. Ewę Świeżewską).

Prof. Jerzy Duszyński, biochemik z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, został powołany na stanowisko podsekretarza stanu w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Prof. Duszyński (Fot. 2) jest specjalistą w dziedzinie nauk biologicznych. Ukończył Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UW w 1971 r. W 1975 roku uzyskał stopień doktora, a w 1983 – doktora habilitowanego. W 1993 roku otrzymał nominację profesorską z rąk prezydenta Lecha Wałęsy. Prof. Jerzy Duszyński jest członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk, a od 2005 r. krajowym delegatem do prac zespołu biomedycznego European Strategy Forum for Research Infrastructures. Od 2006 r. jest także przewodniczącym Zespołu ds. Infrastruktury Badawczej przy MNiSW. Nowy wiceminister przez wiele lat był przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu im. Marcelego Nenckiego PAN, a także

dyrektorem tej placówki. Obecnie kieruje w Instytucie Pracownią Bioenergetyki i Błon Biologicznych. Jest autorem lub współautorem wielu publikacji naukowych, artykułów prasowych popularyzujących współczesną naukę, a także serii podręczników z dziedziny biologii. Odbył liczne staże zagraniczne, m.in. w laboratoriach J. R. Williamsona w Pennsylvania University oraz K. F. LaNoue w PennState University. Prof. Duszyński będzie odpowiadał w resorcie za sprawę nauki (wg PAP, Nauka w Polsce).

Rada do Spraw Edukacji i Badań Naukowych została powołana 11 lutego br., a 19 lutego 2008 roku w Pałacu Prezydenckim odbyło się uroczyste spotkanie Prezydenta RP z członkami nowo powołanej Rady. Rada (Fot. 3) stanowi forum konsultacyjne i organ opiniotawczo-doradczy Prezydenta RP. W skład Rady weszli przedstawiciele PAN, PAU, znakomitych

polskich uczelni, przewodniczący konferencji rektorów oraz rektorzy najbardziej znanych (w ocenie Prezydenta RP najlepszych) uczelni prywatnych w Polsce. Reguła powoływania członków Rady nie ma



Fotografia 2. Prof. Jerzy Duszyński.



Fotografia 3. Rada Programowa Prezydenta RP, ds. Edukacji i Badań Naukowych.

charakteru personalnego; łączy się z określonymi stanowiskami. Przewodniczącym Rady został prof. dr hab. Ryszard Legutko, wybitny przedstawiciel polskiej filozofii społecznej i politycznej, a także w ostatnich latach czynny polityk. W skład Rady weszli prof. dr hab. inż.

Jerzy Błażejowski, Przewodniczący Rady Głównej Szkolnictwa Wyższego, prof. dr hab. inż. Tadeusz Luty, Przewodniczący Konferencji Rektorów Akademickich Szkół Polskich, prof. dr hab. inż. Tomasz Borecki, Rektor SGGW w Warszawie, prof. dr hab. Andrzej Białas, Prezes PAU, prof. dr hab. Adam Budnikowski, Rektor Szkoły Głównej Handlowej, prof. dr hab. Katarzyna Chałasińska-Macukow, Rektor Uniwersytetu Warszawskiego, prof. dr hab. Andrzej Elias, Rektor Szkoły Wyższej Psychologii Społecznej, prof. dr hab. inż. Michał Kleiber, Prezes PAN, prof. dr hab. Andrzej K. Koźmiński,

Rektor Wyższej Szkoły Przedsiębiorczości i Zarządzania im. Leona Koźmińskiego, prof. dr hab. inż. Włodzimierz Kurnik, Rektor Politechniki Warszawskiej, prof. dr hab. Stanisław Lorenc, Rektor Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, prof. dr hab. Karol Musioł, Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. dr

hab. Michał Szulczewski, Przewodniczący Rady Nauki i Szkolnictwa Wyższego, prof. dr hab. inż. Antoni Tajduś, Rektor Akademii Górniczo-Hutniczej, ks. prof. dr hab. Stanisław Wilk, Rektor Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego im. Jana Pawła II oraz prof. dr hab. Edmund Wnuk-Lipiński, Rektor Collegium Civitas.

Akademia Medyczna w Białymstoku (Fot. 4), Lublinie i Warszawie może używać nazwy Uniwersytet Medyczny. Ustawy zmieniające nazwę trzech uczelni medycznych podpisane przez Prezydenta RP, w dniu 27 lutego br., opublikowano w dzienniku Ustawa dnia 7 marca 2008 r.

Naczynia krwionośne – sprawa życia i śmierci. W najnowszym zeszycie *Circulation* (15 stycznia), uznawanego za najlepsze czasopismo z dziedziny kardiologii i biologii naczyniowej, ukazał się artykuł, którego współautorami są prof. dr hab. Józef Dulak (Fot. 5) i dr hab. Alicja Józkowicz z Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiel-

lońskiego [1]. W pracy tej, przygotowanej wraz z prof. Anupamem Agarwalem i dr Jessy Deshane z University of Alabama w Birmingham, USA, autorzy podsumowują wyniki swoich kilkuletnich badań dowodzących kluczowej roli oksygenazy hemowej-1 (HO-1) w angiogenezie, czyli powstawaniu nowych naczyń krwionośnych. HO-1 to enzym, który, rozkładając hem do zielonej biliwerdyny, przekształcaney następnie w żółtą bilirubinę, przyczynia się do zaniku siniaka oraz odpowiada za zażółcenie skóry podczas żółtaczki. Osiągnięciem krakowskich naukowców jest odkrycie nieznaney dotąd funkcji HO-1, niezbędnej w syntezie i aktywności czynników stymulujących angiogenezę, które odgrywają ważną rolę w procesach naprawczych, takich jak gojenie ran, ale także przyczyniają się do wzrostu nowotworów. W jednej z najnowszych prac

[2] badacze z Birmingham i Krakowa wykazali udział HO-1 w aktywności komórek macierzystych śródbłonna; w kolejnej publikacji [3] krakowski zespół udowodnił, iż HO-1 przyczynia się do wzrostu czerniaka, m.in. poprzez stymulację angiogenezy. Lepsze poznanie mechanizmów powstawania naczyń krwionośnych jest warunkiem ulepszenia istniejących

i opracowania nowych strategii przeciwnowotworowych, a także terapii ograniczających niedokrwienie serca lub pobudzających gojenie ran u pacjentów z cukrzycą. Publikacje w tych uznanych czasopismach stanowią potwierdzenie rangi badań prowadzonych przez naukowców z Zakładu Biotechnologii Medycznej UJ, którzy we wrześniu byli również organizatorami V Międzynarodowego Kongresu na temat Oksygenaz Hemowych. Konferencja ta odbyła się na Uniwersytecie Jagiellońskim w dniach od 5 do 9 września 2007 roku. Uczestniczyło w niej ponad 230 naukowców z 24 krajów świata. Konferencja odbyła się pod patronatem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Podczas konferencji przedstawiono kilkadziesiąt wykładów i krótkich wystąpień ustnych, odbyły się także sesje posterowe. Program konferencji dostępny jest na stronie <http://biotka.mol.uj.edu.pl/ho-conference/html/abstracts-program.html>. Jednym z owoców przygotowań do konferencji jest zeszyt czasopisma *Antioxidants & Redox Signaling* (IF = 4.49), zawierający 14 artykułów (w tym 4 prace oryginalne, 9 przeglądowych i komentarz redaktora), poświęconych biochemii i znaczeniu fizjologicznemu oksygenaz hemowych. Swoje prace w tym zeszycie zamieścili najwybitniejsi specjaliści zajmujący się oksygenazą hemową, w tym m.in. Mahin

Maines, Nader Abraham, Shigeki Shibahara i inni. Redaktorem całości był prof. Józef Dulak. Badania nad rolą oksygenazy hemowej-1 stanowią część tematyki badawczej Zakładu Biotechnologii Medycznej, koncentrującej się na poznaniu molekular-



Fotografia 4. Godło Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.



Fotografia 5. Zespół Zakładu Biotechnologii Medycznej UJ z prof. Józefem Dulakiem (po prawej).

larnych mechanizmów tworzenia i funkcjonowania naczyń krwionośnych. W swoich badaniach badacze krakowscy stosują m.in. techniki transferu genów przy wykorzystaniu wektorów plazmidowych i wirusowych. Zagadnieniu temu poświęcony jest zeszyt „Biotechnologii” (nr 3/2007) zawierający prace przygotowane przez pracowników i doktorantów Zakładu.

- [1] Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A (2008) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology; focus on angiogenesis. *Circulation* 117: 231-241
- [2] Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, Lach R, Hock TD, Chen B, Hill-Kapturczak N, Siegal GP, Dulak J, Jozkowicz A, Grant MB, Agarwal A (2007) Stromal cell-derived factor-1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase-1 dependent pathway. *J Exp Med* 204: 605-618
- [3] Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, Leger JJ, Lackowska B, Grochot A, Bojkowska K, Ratajska A, Kieda C, Szala S, Dulak J, Jozkowicz A (2006) Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* 169: 2181-2198

Zespół dr Macieja Łazarczyka podczas badań prowadzonych dzięki wsparciu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w Instytucie Pasteura, odkrył nieznaną naturalny mechanizm obrony przed wirusami powodującymi m.in. raka szyjki macicy. Członkowie zespołu badali pacjentów z bardzo rzadką chorobą *epidermodysplasia verruciformis* (EV), która związana jest z występowaniem mutacji w genie kodującym białka Ever1 i Ever2, uczestniczącymi w tworzeniu bariery przed atakującymi komórki wirusami. Nosiciele takich mutacji są niezwykle podatni na zakażenia onkogennymi wirusami ludzkiego brodawczaka (HPV) (wirusy EV-HPV). Te powszechne w przyrodzie wirusy nie powodują zazwyczaj żadnych problemów u osób z prawidłowym, a niezmutowanym genem *EVER*. U podatnych na zachorowanie pacjentów cierpiących na EV pojawiają się zmiany skórne, utrzymujące się przez całe życie, w obrębie których rozwija się rak skóry. Zespół dr Łazarczyka

odkrył, że białka Ever uczestniczą w kontroli wewnątrzkomórkowej homeostazy cynku; zaburzenie tej równowagi jest kluczowe dla rozwoju zakażenia HPV. Mechanizm ten nie dotyczy jednak tylko rzadkiej choroby jaką jest EV. Ma również istotne znaczenie w zakażeniach genitalną odmianą HPV. Zakażenia odmianą EV-HPV należą do najczęstszych chorób przenoszonych drogą płciową, a niektóre HPV powodują raka szyjki macicy u kobiet. Naukowcy wykazali, że wirusy wywołujące raka szyjki macicy w drodze ewolucji wykształciły mechanizm blokujący działanie białek Ever, umożliwiając wirusom naśladowanie skutków, jakie wywołuje mutacja w genie *EVER*. Wskazuje to, że zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy cynku stanowią kluczowy etap w zakażeniu HPV i odgrywają rolę w ujawnieniu onkogennej natury wirusa. Choć odkrycie ma na razie znaczenie przede wszystkim poznawcze, identyfikuje ono nieznaną dotąd mechanizm ochronny, którego blokada jest bardzo ważna w cyklu życiowym tych wirusów (Łazarczyk M, Pons C, Mendoza JA, Cassonnet P, Jacob Y, Favre M (2008) Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J Exp Med* 205: 35-42) (wg PAP, Nauka w Polsce).

Nieobserwowany od 100 lat w wodach Morza Bałtyckiego gatunek zwierzęcia odkryła Marta Ronowicz, doktorantka w Zakładzie Ekologii Morza Instytutu Oceanologii PAN, podczas nurkowania swobodnego. *Tenellia adspersa* jest ślimakiem nagoskrzelnym o ogólnosiwiatowym zasięgu występowania zamieszkującym wody zarówno oceaniczne, jak i słodkie, jednak po raz pierwszy zanotowano jego obecność w polskiej strefie Bałtyku. Mgr Ronowicz wśród kolonii stłubioślaków z gatunku *Gonothrya loveni* znalezionych w 2006 r. wśród roślin porastających kamienie w przybrzeżnych wo-

dach Helu, zauważyła żerującego ślimaka nagoskrzelnego o długości 3 mm. Rok później ślimak tego samego gatunku został znaleziony w wodach w rejonie Sopotu. Jest to zwierzę o bardzo dużych zdolnościach adaptacyjnych, które toleruje szeroki zakres warunków środowiskowych. Rozmnaża się w temperaturze 15–25°C i przy zasoleniu 8–30 psu. Żeruje na różnych gatunkach bentosowych stłubioślaków. Odkryty został w 1845 roku w Morzu Czarnym i od tego czasu był spotykany w wodach okalających Wyspy Brytyjskie, w Morzu Bałtyckim, w Morzu Północnym, a także w północno-wschodnim Atlantyku. W Bałtyku obserwowano go od 1865 do 1907 roku, a następnie przez prawie 100 lat nie pojawiały się żadne wzmianki o jego istnieniu w tym akwenie. Dopiero w 2004 roku ukazała się publikacja fińskich naukowców informujących o licznych występowaniu ślimaka u wybrzeży Archipelagu Fińskiego. Metoda nurkowania swobodnego jest skutecznym sposobem pewnego znalezienia organizmów drobnych. Według Marty Ronowicz gatunek ślimaka mógł zostać zawleczony z Morza Czarnego na kadłubach statków wraz z fauną stowarzyszoną. Niewykluczone, że organizm dostał się do Bałtyku z wodami balastowymi statków. Odkrycie to pozwala poszerzyć wiedzę o zbiorowiskach fauny Morza Bałtyckiego. Z czasem okaże się, czy nowo odkryty mały ślimak będzie miał wpływ na ekosystem Bałtyku (wg PAP, Nauka w Polsce).

Nowa umowa o Komisji Fulbrighta została podpisana przez Stany Zjednoczone i RP 10 marca 2008 r. w związku z oficjalną wizytą Premiera RP w Waszyngtonie. Nowa umowa znacznie zwiększa finansowy udział strony polskiej w Programie Fulbrighta, co wpłynie na rozszerzenie wymiany studentów, naukowców i nauczycieli pomiędzy oboma krajami. W ceremonii podpisania w Sali Traktatowej Departamentu Stanu udział wzięli

p.o. zastępcy sekretarza Biura ds. Edukacji i Kultury Departamentu Stanu USA, C. Miller Crouch oraz charge d'affaires a.i. Ambasady RP Wojciech Flera. W 2009 r. przypada 50. rocznica istnienia programu stypendialnego Fulbrighta w Polsce (www.fulbright.edu.pl).

Możliwości finansowania działalności naukowo-badawczej z Funduszu Nauki i Technologii Polskiej. Szczegółowe zasady gospodarki finansowej Funduszu Nauki i Technologii Polskiej określa Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 marca 2007 r. (www.mnisw.gov.pl), akty prawne, nauka (Biuletyn Informacji Publicznej). Fundusz Nauki i Technologii Polskiej gromadzi na koncie 2% przychodów uzyskanych z prywatyzacji w danym roku budżetowym oraz odsetki od tych środków, z przeznaczeniem na cele związane z rozwojem nauki i technologii polskiej, obejmujące wspieranie uznanych za szczególnie ważnych kierunków badań naukowych kraju lub prac rozwojowych określanych w założeniach polityki naukowo-technicznej państwa, wspieranie inwestycji służących potrzebom badań naukowych lub prac rozwojowych oraz promocję i upowszechnianie nauki. Zgodnie z ustawą z Funduszu mogą być finansowane m. in.: projekty badawcze, inwestycje służące potrzebom badań naukowych (inwestycje aparaturowe lub budowlane), działalność wspomagająca badania (ekspertyzy, konferencje). Wnioski sporządza się według odpowiednich wzorów stanowiących załączniki do rozporządzenia. Zgodnie z rozporządzeniem środkami Funduszu dysponuje minister właściwy do spraw nauki. Wnioski mogą być składane w ciągu całego roku. Pismo (wniosek), zawierające uzasadnienie celowości wystąpienia o finansowanie wymienionego zadania oraz załącznik w postaci wniosku, należy kierować na adres: Minister prof. Jerzy Duszyński, Departament Bazy Badawczej

Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, ul. Wspólna 1/3, 00-529 Warszawa. Wnioski, na które nie przyznano środków finansowych w danym roku, nie są rozpatrywane w roku następnym.

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCiBR) poszukuje ekspertów, którzy będą opiniować projekty realizowane w ramach strategicznych programów badawczych. Przedstawiciel NCBiR poinformował, że realizacja zadań Narodowego Centrum Badań i Rozwoju wymaga stworzenia bazy ekspertów, zarówno z obszaru nauki, jak i gospodarki. Najważniejszym zadaniem ekspertów będzie opiniowanie projektów w ramach strategicznych programów badawczych. Zainteresowane osoby proszone są o zarejestrowanie się i wypełnienie formularza internetowego. Po zaakceptowaniu aplikacji i wpisaniu do bazy ekspertów, dyrektor Centrum będzie, w miarę pojawiających się potrzeb, zapraszać ekspertów do sporządzenia opinii lub ekspertyz. Określi także szczegółowe warunki związane z pracą ekspertów (www.ncbir.gov.pl).

Powstała seria 10 filmów, w wyniku wspólnej inicjatywy Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, MNiSW oraz TVP 2, ukazujących sylwetki wybitnych osobistości polskiej nauki, zatytułowana „Młodzi twórcy – mistrzom”. O realizację filmów poproszono absolwentów łódzkiej „Filmówki”. Sami wybierali bohaterów, konwencję i tematykę swoich filmów. Jedynym wymogiem było, aby przedstawiana osoba była laureatem tzw. polskiego Nobla lub dorocznej nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia w badaniach na rzecz rozwoju nauki, społeczeństwa i gospodarki. Serię 10 obrazów rozpoczyna film „Między złem a złem”. Twórcą (scenariusz i reżyseria) filmu jest 25-letni Jakub Kossakowski. Bohaterem pierwszego filmu (emisja 3 stycznia 2008 r.) jest wielki humanista, wybitny onkolog, autor pierwszego w Polsce udanego przeszczepu szpiku,

prof. dr hab. med. Wiesław Wiktor Jędrzejczak (Fot. 6). Prof. Jędrzejczak kieruje Kliniką Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w War-



Fotografia 6. Prof. Wiesław Wiktor Jędrzejczak.

szawie, jest także konsultantem krajowym w zakresie hematologii. Prof. Jędrzejczak w 1993 roku został laureatem prestiżowej nagrody Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w dziedzinie nauk przyrodniczych i medycznych. Wyróżniono go za cykl prac na temat molekularnych i komórkowych mechanizmów powstawania komórek krwi. Jest autorem ponad 160 publikacji naukowych, w tym w najbardziej prestiżowych czasopiśmie na świecie, takich jak Science, Journal of Experimental Medicine, Blood i British Medical Journal. Pozostałe miniatury dokumentalne ukazują prof. Lecha Leciejewicza z Instytutu Archeologii i Etnologii PAN, prof. Henryka Skarżyńskiego z Międzynarodowego Centrum Słuchu i Mowy w Kajetanach koło Warszawy, prof. Zygmunta Pejsaka z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, prof. Edwarda Wnuka-Lipińskiego, Rektor Collegium Civitas w Warszawie, prof. Karola Myśliwca z Zakładu Archeologii Śródziemnomorskiej PAN, prof. Stefana Zawadzkiego z UAM w Poznaniu, prof. Zofię Kielan-Jaworowską z Instytutu Paleobiologii PAN, prof. Jadwigę Staniszkis z Instytutu Socjologii UW i prof. Krzysztofa Matyjaszewskiego z Wydziału Chemii Carnegie Mellon University (USA) oraz Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Polskie uczelnie techniczne będą współpracować z ukraińskimi; porozumienie w tej sprawie zostało zawarte w Warszawie, o czym poinformował Rektor Politechniki Łódzkiej, prof. Jan Krysiński. Porozumienie między Konferencją Rektorów Polskich Uczelni Technicznych, której prof. Krysiński przewodniczy, a Stowarzyszeniem Rektorów Uczelni Technicznych Ukrainy jest wstępem do współpracy poszczególnych uczelni, zarówno przy wymianie studentów i wykładowców, jak i przy badaniach naukowych.

Politechniki zobowiązały się też do dwustronnej wymiany informacji. Poszczególne uczelnie krajowe będą teraz na tej podstawie nawiązywały kontakty z uczelniami ukraińskimi.

Centrum Nauki „Kopernik” zorganizuje jedno z największych wydarzeń w środowisku centrów nauki i muzeów na świecie, konferencję ECSITE (European Network of Science Centres & Museums) w 2011 roku. Uczestniczy w niej co roku blisko tysiąc osób, dyrektorów i przedstawicieli muzeów i centrów nauki z całego świata oraz firmy projektujące i wytwarzające wystawy do centrów „Kopernika”. Polskie centrum nauki rywalizowało z pięcioma centrami z całej Europy. Dyrektor ECSITE, Vincenzo Lipardi, poinformował o sukcesie Polaków 27 marca 2008 r. Centrum Nauki „Kopernik” planuje połączenie konferencji z Piknikiem Naukowym, który współorganizuje z Polskim Radiem. To największa w Europie impreza plenerowa tego typu, w której uczestniczą setki instytucji z Polski i świata. Konferencja ECSITE będzie promocją dla polskich naukowców i popularyzatorów nauki. Będą oni mieli okazję obejrzeć także to, co pokażą uczestnicy konferencji z zagranicy. Z konferencji powinny skorzystać interaktywne centra nauki. Przewodniczącym Rady Programowej Centrum Nauki „Kopernik” oraz pomysłodawcą Pikniku Naukowego jest prof. Łukasz Turski.

Centoną na świecie nagrodę im. Christopha Schmelzera odebrała 30 listopada 2007 r. w Darmstadt Katarzyna Psonka, stypendystka prowadzonego w CITTRU projektu stypendialnego „Akademicka Innowacyjność dla Małopolski”. Nagroda, nazwana imieniem pierwszego dyrektora naukowego i założyciela Towarzystwa na Rzecz Badań Ciężkich Jonów, jest wręczana corocznie przez **Stowarzyszenie na rzecz promocji Ciężkojonowej Terapii Nowotworowej** za wybitne prace z zakresu terapii nowotworowej wiązkami jonowymi. Do tej pory wśród osób nagrodzonych znaleźli się młodzi naukowcy z Niemiec, Francji, Szwajcarii, Szwecji i Japonii. Wręczenie nagrody odbyło się ośrodku naukowym, który

prowadzi pilotażowy projekt terapii nowotworowej jonami węgla. W projekcie CITTRU Katarzyna Psonka zajmowała się **badaniami uszkodzeń DNA, wykorzystując mikroskopię atomową.** Katarzyna Psonka jest związana z Wydziałem Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, a jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół radiobiologii.

Nagrodę Naukową Miasta Gdańska im. Jana Heweliusza otrzymał prof. Marcin Pliński w dziedzinie nauk ścisłych, za rozwinięcie unikatowych badań nad zmianami ekologicznymi w Bałtyku, a zwłaszcza za poszukiwanie przyczyn regularnych zakwitów sinic. Prof. Pliński kieruje Zakładem Biologii i Ekologii Morza w Instytucie Oceanografii UG, był założycielem Centrum Biologii Morza PAN w Gdyni. Nagroda im. Jana Heweliusza jest najstarszym naukowym wyróżnieniem przyznawanym przez samorządy w Polsce. Ustanowiła ją w 1987 roku Miejska Rada Narodowa na wniosek gdańskiego oddziału PAN. W kapitule nagrody zasiadają Prezes Gdańskiego Towarzystwa Naukowego, Prezes gdańskiego oddziału PAN, Rektorzy gdańskich szkół wyższych i przedstawiciel Prezydenta Gdańska. W przyszłym roku w gremium zasiądą również dotychczasowi laureaci nagrody.

Wspólną budowę pomnika we Lwowie, upamiętniającego zamordowanych profesorów Uniwersytetu Lwowskiego, zapowiedzieli Prezydent Wrocławia Rafał Dutkiewicz i Prezydent Lwowa Andriy Sadovyy. List intencyjny w tej sprawie podpisany został we Wrocławiu w marcu 2008 r. Intencją uzgodnienia ma być upamiętnienie ofiar zbrodni dokonanej przez niemieckich nazistów w 1941 r., poprzez wzniesienie pomnika we Lwowie, na miejscu mordu profesorów Uniwersytetu Lwowskiego. Projekt pomnika zostanie wyłoniony w drodze konkursu, a wszelkie napisy będą wykonane w dwóch językach. Pomnik ma powstać do końca 2009 r. Strona polska zobowiązała się do poniesienia wszystkich kosztów związanych z realizacją przedsięwzięcia. Część finansów będzie prawdopodobnie

pochodzić z budżetu Wrocławia, ale władze miasta mają też nadzieję pozyskać sponsorów. Prezydenci obu miast zapowiedzieli także wspólne ubieganie się o organizację w 2016 r. Europejskiej Stolicy Kultury. Pierwotnie idea Europejskiego Miasta Kultury powstała w Parlamencie Europejskim w 1985 r. z zamysłem zbliżania narodów Europy. W 1999 r. przyjęto nową nazwę projektu Europejska Stolica Kultury. Aktualnie Europejska Stolica Kultury jest wskazywana co roku przez Radę na zalecenie Komisji, uwzględniając opinię Parlamentu Europejskiego i jury, w skład którego wchodzi siedmiu wybitnych przedstawicieli świata kultury (wg PAP, Nauka w Polsce).

Nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie ukazała się książka „Mało znane rośliny sadownicze”. Autorzy, profesor Zdzisław Kawecki, dr hab. Romuald Łojko i dr Bolesław Pilarek, zamieścili w niej opisy i zdjęcia 22 mało znanych roślin sadowniczych oraz omówili możliwości ich uprawy i wykorzystania w przetwórstwie i ziołolecznictwie. Większość przepisów została opracowana albo udoskonalona przez autorów. Niektóre z podanych w książce receptur znano już w okresie średniowiecza, a później stosowano nawet na magnackich dworach. Prawie wszystkie przepisy zostały sprawdzone w Zakładzie Przetwórstwa Instytutu Sadownictwa w Samochwałowiczach koło Mińska na Białorusi przez nieżyjącego już współautora, Polaka z pochodzenia, dr. hab. Romualda Łojkę, pracownika naukowego tego instytutu. Książkę poleca się szczególnie studentom Ogrodnictwa, Rolnictwa, Architektury Krajobrazu, Kształtowania i Ochrony Środowiska, Agroturystyki oraz Technologii Żywności i Żywnienie Człowieka. Książka zawiera wiele cennych wiadomości i mogą z niej korzystać nie tylko studenci, ale wszyscy, którzy chcą upiększyć swoje ogrody lub działki oraz wzbogacić swoją dietę i zadbać o zdrowie.

POD REDAKCJĄ TERESY WESOŁOWSKIEJ

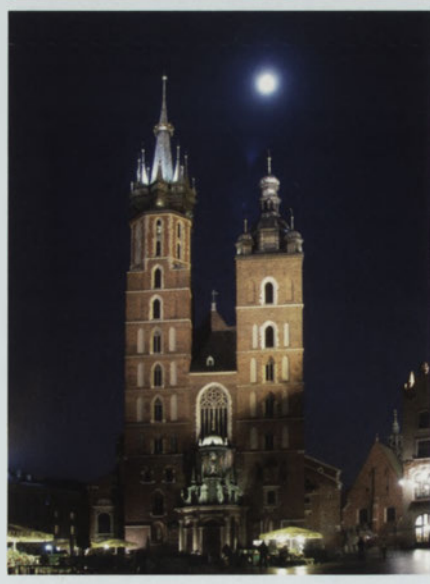
CENTRAL EUROPEAN CONGRESS OF LIFE SCIENCES EUROBIOTECH 2008 KRAKÓW, 17-19.10.2008

Central European
Congress of Life Sciences
Eurobiotech 2008

Leading Area: Red Biotechnology
Kraków, Poland, 17-19 October 2008



Na jesieni tego roku organizowany jest **Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2008**, którego tematem przewodnim będzie tzw. „czerwona biotechnologia”; na kongresie zostaną poruszone tematy związane z biotechnologią medyczną i farmaceutyczną, biofar-



macją, biomateriałami i żywieniem. Kongres zostanie zorganizowany

wspólnie przez: Polską Federację Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Collegium Medicum), Akademię Rolniczą w Krakowie oraz Targi

w Krakowie sp. z o.o. Do współpracy przyłączyło się również Jagiellońskie Centrum Innowacji oraz Krakowski Klaster Life Science.

W kwietniu 2007 roku, odbyła się w Krakowie I Międzynarodowa Konferencja i Targi Biotechnologia w Rolnictwie **EUROBIOTECH 2007**. Konferencja ta okazała się dużym sukcesem; wzięło w niej udział prawie 400 uczestników z kraju i zagranicy oraz 30 firm z branży biotechnologicznej. Mając na uwadze powodzenie pierwszej edycji oraz coraz większe zainteresowanie tematem w kraju i na świecie, organizatorzy postanowili ten projekt rozwijać. Organizatorzy pragną włączyć do współpracy najważniejsze ośrodki biotechnologiczne z Europy Środkowej i stworzyć prawdziwą platformę spotkań z partnerami z innych krajów. Swoją aktywny udział w imprezie zapowiedziała Słowacka Akademia Nauk oraz środowiska biotechnologiczne z Czech, Litwy i Ukrainy.

W zamyśle Organizatorów Kongres będzie połączeniem nauko-

wych wykładów i prezentacji z biznesem. W wystawie towarzyszącej, oprócz firm z sektora „Biotech”, wezmą również udział firmy patentowe, firmy doradcze, fundusze inwestycyjne. Naukowym wykładom towarzyszyć będą również panele dyskusyjne, spotkania i warsztaty biznesowe.

Tematy dyskutowane w trakcie Kongresu i Targów będą zorganizowane w 7 panelach:

- Biotechnologii Medycznej,
- Biotechnologii Farmaceutycznej,
- Nutrigenomiki (Jedzenie dla życia),
- Biomateriałów,
- Biotechnologii Zwierząt,
- Praw własności intelektualnej i czerwonej biotechnologii,
- Finansowania badań naukowych ze źródeł prywatnych.

Zapraszamy do Krakowa. Szczegółowe informacje można znaleźć na stronie internetowej www.bio-



[technologia.krakow.pl](http://www.technologia.krakow.pl) lub www.eurobiotech.krakow.pl.

Agnieszka Dettlaff-Pokora 

Julian Świerczyński

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-811 Gdańsk, tel. 058 349 14 60; e-mail: agnieszka_dettlaff-pokora@amg.gda.pl

Artykuł nadesłano i przyjęto do druku 21 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: miążdżycza, polimorfizm

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji pracy statutowej ST-41

Jednym z głównych czynników rozwoju miążdżycy jest akumulacja lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) w ścianach naczyń krwionośnych prowadząca do powstawania blaszki miążdżycowej, a w konsekwencji – do zawału mięśnia sercowego. Ryzyko zawału mięśnia sercowego jest bezpośrednio związane ze stężeniami lipoprotein w osoczu. Wysokie stężenie cholesterolu LDL jest czynnikiem ryzyka rozwoju choroby wieńcowej, a wysokie stężenie cholesterolu HDL zmniejsza to ryzyko. Zmiana stężenia cholesterolu LDL we krwi o 1%, zwiększa o 1% ryzyko choroby wieńcowej. Z kolei wyższe stężenie cholesterolu HDL we krwi o 1% powoduje obniżenie ryzyka choroby wieńcowej o 2%. Tak silna zależność pomiędzy stężeniem cholesterolu (HDL i LDL) a ryzykiem choroby wieńcowej sprawia, że wszelkie czynniki wpływające na stężenie cholesterolu w lipoproteinach osocza mają duże znaczenie w rozwoju choroby wieńcowej. Oprócz cholesterolu do podstawowych czynników ryzyka choroby wieńcowej najczęściej zalicza się wysokie stężenie triacylogliceroli w osoczu. Do podstawowych czynników etiologicznych wpływających na stężenia triacylogliceroli i cholesterolu (LDL i HDL) w osoczu należą: palenie papierosów, wysokokaloryczna dieta i mała aktywność fizyczna. Obserwuje się także rodzinne skłonności do występowania choroby wieńcowej, determinowane przez czynniki genetyczne. Przykładem tego może być genetycznie uwarunkowana nieprawidłowa funkcja receptora LDL, lipazy lipoproteinowej oraz warianty polimorficzne

nowych zaangażowanych w metabolizm lipidów [1].

Jak dotąd poszukiwania nowych wariantów polimorficznych koncentrowały się na badaniu pojedynczych genów i były prowadzone na stosunkowo niedużych populacjach. W lutym numerze czasopisma *Nature Genetics* ukazały się trzy prace, w których przeanalizowano około 50 000 osób pod kątem setek tysięcy pojedynczych polimorfizmów genowych (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) [2-4]. Analizie poddano wyselekcjonowane polimorfizmy, położone w obrębie genów związanych z metabolizmem lipidów oraz polimorfizmy związane z patogenezą chorób metabolicznych. Wyniki te zestawiono z danymi klinicznymi pacjentów, takimi jak stężenia cholesterolu HDL, cholesterolu LDL i stężenia triacylogliceroli we krwi. Analizy statystyczne potwierdziły udział SNP-ów w ponad tuzinie genów już wcześniej podejrzewanych o związek ze zmianami stężeń cholesterolu HDL i cholesterolu LDL oraz stężeniami triacylogliceroli w osoczu. Ponadto, odkryto związek pomiędzy stężeniami cholesterolu LDL i cholesterolu HDL oraz triacylogliceroli w osoczu a polimorfizmem siedmiu nowych genów przedstawionych w Tabeli. Odkrycie to otwiera na nowo dyskusję nad wpływem dziedziczenia skłonności do zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe (Tabela 1).

Jednym z tych genów jest *MLXIPL* (ang. *Max Like Protein Interacting Protein-Like*), kodujący czynnik transkrypcyjny ChREBP (ang. *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*), należący do rodziny bHLHZ (ang. *basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper*). Aktywność tego czynnika jest zależna od jego możliwości transportu do jądra komórkowego. W formie ufosforylowanej czynnik ten jest nieaktywny, ponieważ nie przechodzi do jądra komórkowego. Z kolei defosforylacja tego czynnika powoduje jego aktywację (transport do jądra komórkowego). Defosforylacja ChREBP jest katalizowana przez fosfatazę białek 2A (PP2A) aktywowaną wysokimi stęże-

niami glukozy, a precyzyjniej – przez powstający z glukozy ksylulozo 5-fosforanu. Nieufosforylowany ChREBP przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie ulega dimeryzacji, a następnie wiąże się z sekwencją ChoRE (ang. *Carbohydrate Response Element*), obecną w promotorach genów kodujących enzymy lipogenezy, glikolizy i sekrecji lipoprotein. Wydaje się, że jeden wariantów polimorficznych (rs799160 Gln241His) w obrębie genu *MLXIPL* może aktywować transkrypcję genów enzymów lipogennych, a w konsekwencji – wpływać na stężenie triacylogliceroli oraz cholesterolu HDL w osoczu jak również prowadzić do otyłości.

Ze stężeniem cholesterolu LDL powiązано także gen *SORT1*, kodujący sortilinę, białko zaangażowane w procesy sortowania białek w aparacie Golgiego. Sortilina bierze udział w procesach endocytozy i degradacji lipazy lipoproteinowej, katalizującej rozkład triacylogliceroli zawartych w lipoproteinach (głównie w chylomikronach i VLDL), co sugerowałoby raczej związek genu *SORT1* ze zmianami stężeń triacylogliceroli w osoczu, a nie stężeniem cholesterolu LDL (Tabela 1).

Geny *MVK* i *MMAB*, kodujące odpowiednio kinazę mewalonianu i adenozylotransferazę ATP:kobalamina, pozostają pod kontrolą wspólnego promotora, aktywowanego przez czynnik transkrypcyjny SREBP-2 (ang. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 2*). Czynnik transkrypcyjny SREBP-2 kontroluje syntezę genów związanych przede wszystkim z syntezą cholesterolu. Gen *GALNT2* koduje galaktozoaminotransferazę (UDP-N-acetylo- α -D-galaktozoamino: N-acetylogalaktozoamino transferazę polipeptydową 2), katalizującą procesy glikozylacji apolipoprotein, receptorów lipoprotein i lipaz. Lipaza nabłonkowa (EL), jeden z substratów galaktozyloaminotransferazy, jest glikozylowana w kilku miejscach. Glikozylacja EL zmienia jej aktywność i specyficzność wobec poszczególnych frakcji HDL (HDL₁, HDL₂, HDL₃). Gen *ANGPTL3* koduje białko podobne do

Tabela 1. Nowe geny, w których znaleziono SNP, związane ze stężeniami triacylogliceroli i lipoprotein.

Najbliższy gen (geny)	Polimorfizm	Lokalizacja SNP	Powiązanie ze	Funkcja białka	
<i>MLXIPL</i> , (<i>BCL7B</i> , <i>TBL2</i>)	rs17145738	międzygenowy	stężeniem triacylogliceroli stężeniem cholesterolu HDL	czynnik transkrypcyjny, aktywuje geny związane z lipogenezą, glikolizą i sekrecją lipoprotein	[2,3]
	rs799160	eksonowy			
<i>SORT1</i> , (<i>CELSR2</i> , <i>PSRC1</i>)	rs646776 rs599838	międzygenowe	stężeniem cholesterolu LDL	białko uczestniczące w procesie sortowania białek w aparacie Golgiego	[3,4]
<i>MVK</i> , <i>MMAB</i>	rs2338104	intronowy	stężeniem cholesterolu HDL	MVK – kinaza mewalonianu, enzym szlaku syntezy cholesterolu MMAB – adenozylotransferaza ATP:kobalamina	[3]
<i>GALNT2</i>	rs4846914	intronowy	stężeniem triacylogliceroli stężeniem cholesterolu HDL	galaktozoaminotransferaza glikozylująca apolipoproteiny, receptory lipoprotein i lipazy	[3,4]
<i>ANGPTL3</i> , (<i>DOCK7</i> , <i>ATG4C</i>)	rs12130333	międzygenowy	stężeniem triacylogliceroli	hormon peptydowy obniżający aktywność lipaz endotelialnej i lipoproteinowej	[3,4]
<i>NCAN</i> , (<i>CLIP2</i> , <i>PBX4</i>)	rs16996148	międzygenowy	stężeniem triacylogliceroli stężeniem cholesterolu LDL	proteoglikan występujący w centralnym układzie nerwowym	[3,4]
<i>TRIB1</i>	rs17321515	poniżej 3'	stężeniem triacylogliceroli	receptor sprzężony z białkami G	[3,4]

angiopoetyny-3, związane z metabolizmem lipidów. Białko to jest syntetyzowanym i wydzielanym przez wątrobę hormonem regulującym oprócz metabolizmu lipidów, homeostazę glukozy i wrażliwość na insulinę. Obniża ono aktywność lipazy lipoproteinowej i EL. Obniżenie aktywności obu lipaz prowadzi do wzrostu stężenia triacylogliceroli w osoczu.

Związek dwóch kolejnych białek z patogenezą chorób sercowo-naczyniowych jest niejasny. Gen *NCAN* koduje neurocan, proteoglikan występujący w dużych ilościach w ośrodkowym układzie nerwowym i zaangażowany w procesy adhezji i migracji komórek. Gen *TRIB1* koduje sprzężony z białkami G receptor, zaangażowany w regulację kinaz białkowych uczestniczących w procesie mitozy. Nie jest znany mechanizm wpływu tych białek na metabolizm lipidów i węglowodanów. Nie ulega jednak wątpliwości, że polimorfizmy położone w pobliżu kodujących je genów są związane w obu przypadkach ze zmianami stężenia triacylogliceroli we krwi. Polimorfizm położony blisko genu *NCAN* jest ponadto związany ze stężeniem cholesterolu LDL.

Podsumowując, dane przedstawione we wspomnianych pracach opublikowanych w *Nature Genetics* wskazują, że ciągły rozwój technik biologii molekularnej w powiązaniu z poznaniem związków pomiędzy materiałem genetycznym, a skłonnością do zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe, daje nadzieję na ich wczesne wykrycie. Z kolei wczesne wykrycie tych zaburzeń może w znacznym stopniu przyczynić się do zapobiegania wystąpienia skutków tych zaburzeń (np. zawału mięśnia sercowego). Zaprezentowane w wymienionych pracach wyniki powinny być jednak traktowane ostrożnie, gdyż konieczne jest zbadanie występowania tych samych związków na różnych populacjach ludzkich. W obecnych czasach z uwagi na duże migracje jest to bardzo trudne do oceny. Otwiera się również na nowo dyskusja na temat wpływu polimorfizmów na funkcję powstających białek (w wypadku siedmiu opisanych powyżej białek polimorfizmy w większości są położone poza sekwencjami kodującymi).

PIŚMIENNICTWO

1. Ordovas J (2002) Mini-symposium: Lipid and protein disorders: biochemistry and

molecular genetics. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 16: 273-281

2. Kooner J, Chambers J, Aguilar-Salinas C, Hinds D, Hyde C, Warnes G, Gomez Perez F, Frazer K, Elliot P, Scott J, Milos P, Cox D, Thomson J (2008) Genome-wide scan identifies variation in *MLXIPL* associated with plasma triglycerides. *Nat Gen* 40: 149-151
3. Willer C, Sanna S, Jackson A, Scuteri A, Bonnycastle L, Clarke R, Heath A, Timpson N, Najjar S, Stringham H, Strait J, Duren W, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift A, Morken M, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott L, Scheet P, Sundvall J, Watanebe R, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor D, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner A, Collins R, Bergman R, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins F, Lakatta E, Lathrop G, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke K, Abecasis G (2008) Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Gen* 40: 161-169
4. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt N, Rieder M, Cooper G, Roos C, Voight B, Havulinna A, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai E, Ordovas J, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler D, Orho-Melander M (2008) Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Gen* 40: 189-197

STRESZCZENIE

W komórce zwierzęcej mitochondria są głównym miejscem produkcji ATP niezbędnego dla potrzeb energetycznych, a zatem prawidłowego przebiegu podstawowych funkcji życiowych. Z drugiej strony, mitochondria odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu programowanej śmierci komórki (apoptozie). Ponadto, wady w genomie mitochondrialnym lub genomie jądrowym kodującym białka mitochondrialne mogą być przyczyną poważnych zaburzeń funkcji mitochondriów i w efekcie – podłożem chorób całego organizmu. Artykuł zawiera opis podstawowych procesów biochemicznych związanych z oksydacyjną fosforyzacją oraz tworzeniem wolnych rodników tlenowych. Przedstawia również mechanizmy inicjowania apoptozy na poziomie mitochondrialnym i opisuje najczęściej spotykane wady genetyczne warunkujące występowanie „chorób mitochondrialnych”.

WPROWADZENIE

Mitochondria opisywane były już przez cytologów w drugiej połowie XIX wieku jako wewnątrzkomórkowe ziarnistości o zmiennym kształcie i wielkości. Ich współczesna nazwa wywodzi się z połączenia dwóch greckich słów *mitos*, czyli nić, i *chondrion*, czyli ziarno. Obserwacja Leonora Michaelisa (1898), że barwią się one zielenią janusową, barwnikiem zmieniającym zabarwienie po utlenieniu, zwróciły uwagę na udział tych organelli w komórkowych procesach oksydacyjnych. Potwierdziły to kilkanaście lat później badania Otto Warburga nad zużyciem tlenu przez frakcję ziarnistości komórkowych. Jednakże dopiero opisana po raz pierwszy przez Alberta Claude'a (1940) metoda izolowania względnie czystych frakcji mitochondriów przez homogenizację tkanek i frakcjonowanie wirowanie tak otrzymanego materiału otworzyła szerokie możliwości dla badań nad biochemicznymi właściwościami tych organelli i ich rolą w funkcjonowaniu komórki.

Począwszy od tych wczesnych prac na przełomie XIX i XX stulecia mitochondria identyfikowane są głównie z ich funkcją w oddychaniu komórkowym, a od czasu wykrycia oksydacyjnej fosforylacji (lata 30. i 40. XX wieku) – także jako główne miejsce syntezy ATP, niezbędnego dla potrzeb energetycznych komórki. Dość wcześnie wykryto także, że mitochondria są miejscem niektórych ważnych procesów metabolicznych, np. mitochondria wątroby – niektórych etapów syntezy glukozy i mocznika. W ten sposób przez cały niemal wiek XX traktowano mitochondria jako organella niezwykle istotne dla życia komórki. Jakież było zatem nasze zdumienie, gdy w ostatnich dosłownie latach minionego stulecia okazało się, że mitochondria są także niezbędne, by komórka mogła w sposób zaprogramowany... umrzeć! A jeszcze nieco wcześniej zidentyfikowano mitochondria jako źródło, na szczęście rzadkich, lecz niezwykle groźnych i dotychczas nieuleczalnych chorób o podłożu genetycznym. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie podstawowej wiedzy na temat tej trojakiej funkcji mitochondriów.

MORFOLOGIA

Mikroskopia elektronowa zarówno ultracienkich skrawków tkanek, jak i izolowanych mitochondriów, pokazuje je jako okrągłe lub owalne struktury o rozmiarach od ułamka mikrometra do kilku mikrometrów. Zewnętrzna błona oddziela mitochondrium od cytosolu, wewnętrzna zaś tworzy liczne wpuklenia zwane grzebieniami mitochondrialnymi (łac. *cristae*). W ten sposób zostają wyodrębnione dwie przestrzenie, przestrzeń międzybłonowa i przestrzeń wewnętrzną, zawierająca macierz mitochondrialną. Kształt grzebieni i sposób ich „upakowania” bywa różny i często charakterystyczny dla danej tkanki [1]. Ta różnorodność jest odzwierciedleniem roli, jaką mitochondria odgrywają w konkretnej tkance. Tam, gdzie są one głównie dostarczycielami energii pod postacią ATP (np. w mięśniach i nerce), błona wewnętrzna i grzebień zajmują pokazałą

Lech Wojtczak[✉]

Krzysztof Zabłocki

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

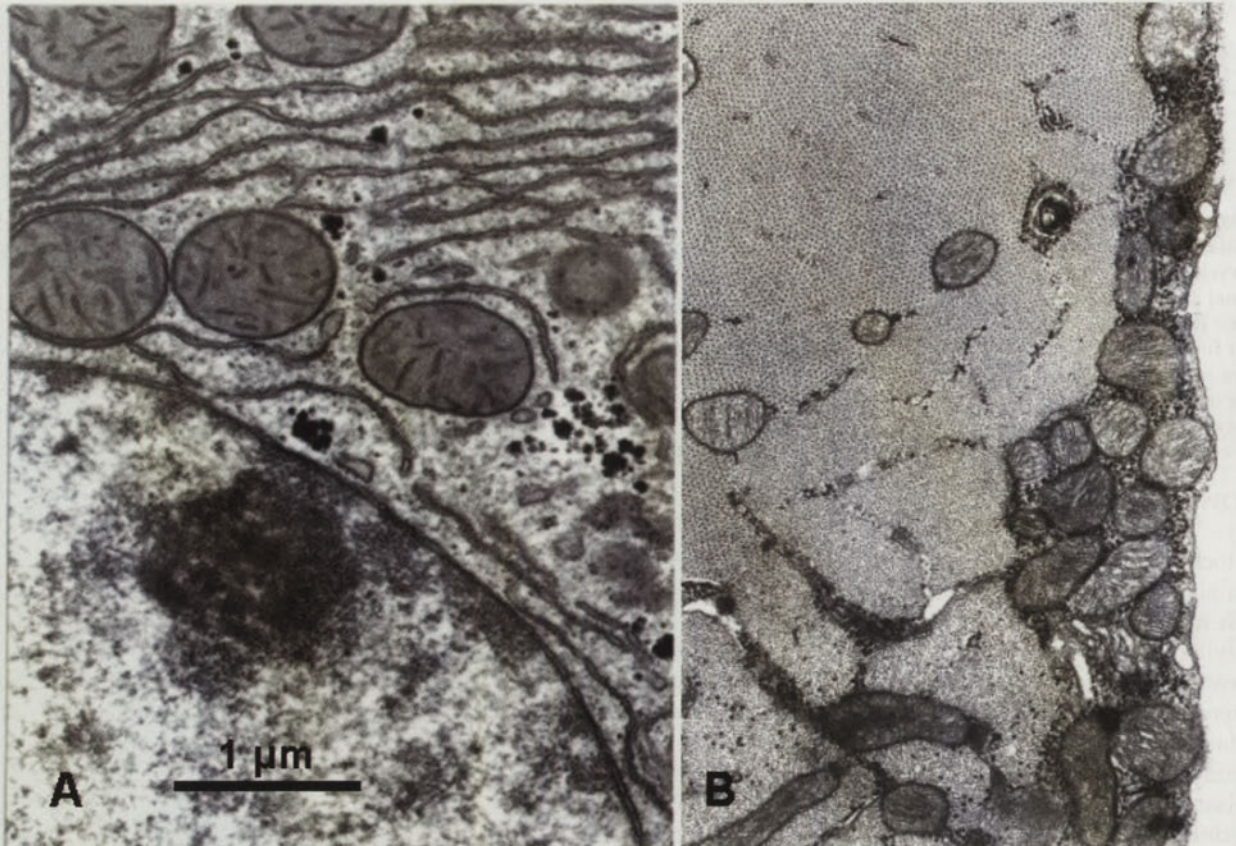
[✉]Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel. (022) 589 23 15; e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 2 kwietnia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 21 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: apoptoza, choroby mitochondrialne, łańcuch oddechowy, mitochondria, oksydacyjna fosforylacja, reaktywne formy tlenu, syntaza ATP

Wykaz skrótów: P_i – fosforan nieorganiczny; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; Δp – różnica elektrochemicznego potencjału protonowego (siła protonomotoryczna); ΔpH – gradient pH; Δψ – różnica potencjału elektrycznego



Rycina 1. Porównanie ultrastruktury mitochondriów wątroby i mięśnia. **A**, Wątroba szczura. Grzebienie mitochondrialne nieliczne. Ponadto widoczne są: fragment jądra i siateczka śródplazmatyczna. **B**, Mięsień szkieletowy szczura. Całe wnętrze mitochondriów wypełniają liczne, gęsto upakowane grzebienie. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykonane przez (A) prof. Elżbietę Wyrobę, (B) dr hab. Annę Jakubiec-Pukę (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa).

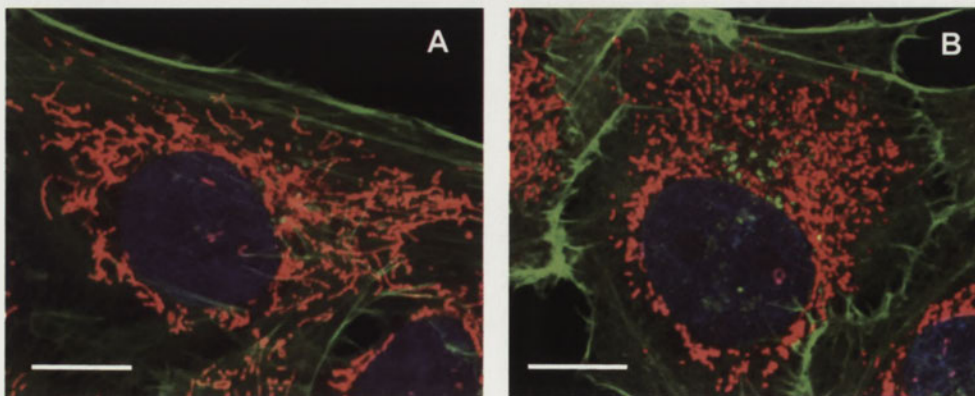
część przestrzeni organelli. Natomiast w tkankach, w których mitochondria włączają się w różne procesy metaboliczne, jak na przykład w wątrobie, grzebienie są nieliczne, natomiast prawie całą objętość organelli wypełnia macierz (Ryc. 1).

Dwuwymiarowy obraz, jaki z natury rzeczy uzyskujemy przy pomocy mikroskopu elektronowego, jest odbiciem bardziej skomplikowanej sytuacji w żywej komórce. Po

pierwsze, liczne profile, dające wrażenie odrębnych mitochondriów, mogą w istocie być przekrojami rozgałęzień tego samego organellum. Dopiero tak zwane „skrawki seryjne” mogą ujawnić ich wzajemne powiązanie. Uważa się nawet, że niektóre drożdże i pierwotniaki mogą zawierać jedno gigantyczne, rozgałęzione mitochondrium. Po drugie, przyżyciowe obserwacje, w szczególności z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych, wykazały, że mitochondria są strukturami niezwykle dynamicznymi, zmieniającymi swój kształt, a co więcej – wykazującymi tendencję do łączenia się i rozdzielania. W rezultacie można mówić raczej o dynamicznej, będącej w nieustannym ruchu, bogato rozgałęzionej sieci mitochondrialnej (Ryc. 2).

OKSYDACYJNA FOSFORYLACJA

Jako główną funkcję mitochondriów uważa się powszechnie produkcję ATP, a ściślej – zamianę swobodnej energii procesów utleniania na energię wiązania bezwodnikowego pomiędzy dwiema resztami kwasu fosforowego w cząsteczce adenozyntrifosforanu (ATP) [2,3].



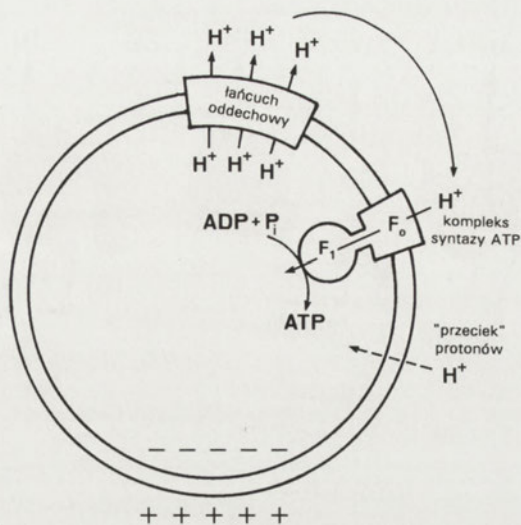
Rycina 2. Sieć mitochondrialna. Komórki ludzkiego nowotworu, osteosarcoma, barwione znacznikami fluoryzującymi: na mitochondria (czerwonym – MitoTracker CMXRos), na włókna aktyny (zielonym – phalloidin-FITC) i na jądro (niebieskim – DAPI). Odcinek odpowiada 12 μm. **A**, Linia komórkowa normalna (szczep „dziki”). **B**, Linia komórkowa σ^0 (pozbawiona mitochondrialnego DNA). Widoczne różnice w strukturze sieci mitochondrialnej. Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane przez dr J. Szczepanowską (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa).

Oksydacyjną fosforylację można rozpatrywać jako dwa odrębne procesy biochemiczne: utlenianie substratów oddechowych i fosforylację ADP do ATP przy udziale fosforanu nieorganicznego. Pierwszy z tych procesów dostarcza energii chemicznej, drugi ją zużywa. Materialnym podłożem obu jest wewnętrzna błona mitochondrialna wraz z jej wpukleniami do przestrzeni wewnętrznej, czyli „grzebieniami”. Błona ta wyróżnia się spośród innych błon biologicznych wysoką zawartością białka (80%) w stosunku do fosfolipidów. A wśród tych ostatnich zwraca uwagę znaczna zawartość kardiolipiny, fosfolipidu występującego w zasadzie tylko w błonie wewnętrznej mitochondriów. Jego cząsteczka zawiera trzy reszty glicerolu i cztery reszty kwasów tłuszczowych, głównie linolenowego.

Wewnętrzna błona mitochondrialna charakteryzuje się bardzo ograniczoną przepuszczalnością dla większości występujących w komórce związków chemicznych. Swobodnie przechodzić przez nią mogą cząsteczki wody, słabe hydrofilne kwasy (np. octowy) i rozpuszczalne w wodzie gazy (np. tlen i amoniak), a także substancje lipofilne. Większość metabolitów komórkowych, w tym aniony kwasów di- i trikarboksylowych (a wśród nich również substraty oddechowe) oraz jony nieorganiczne, w tym jon fosforanowy oraz kationy K^+ i Na^+ , są przenoszone przez błonę wewnętrzną wyłącznie przez specjalne białka transportowe lub przenikają poprzez specyficzne kanały błonowe. Na podkreślenie zasługuje także wysoka nieprzepuszczalność wewnętrznej błony wobec jonu wodorowego H^+ , cecha szczególnie istotna z uwagi na rolę mitochondriów w przemianach energetycznych.

Oksydacyjną fosforylację możemy rozpatrywać jako współdziałanie dwóch pomp protonowych, zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Pompy te są zdolne transportować jony H^+ z przestrzeni macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej (skąd dalej mogą one dyfundować do cytosolu). Jedną z tych pomp jest łańcuch oddechowy jako całość, czyli zespół enzymów oksydoredukcyjnych, które – wraz z odpowiednimi koenzymami – biorą udział w transporcie elektronów z substratów oddechowych na tlen cząsteczkowy. Druga pompa, to mitochondrialna ATP-aza, która energię swobodną hydrolizy ATP wykorzystuje do wyprowadzenia jonów H^+ w tym samym kierunku, to jest z wnętrza mitochondriów na zewnątrz. Doniosłość odkrycia Petera Mitchella [4], twórcy chemiosmotycznej teorii oksydacyjnej fosforylacji (Nagroda Nobla w 1978 r.), polegała na zrozumieniu, że obie pompy są odwracalne. Inaczej mówiąc, odpowiednio wysoki gradient stężenia jonów H^+ jest zdolny odwrócić kierunek działania każdej z tych pomp. W przypadku pomp protonowych łańcucha oddechowego jest to tak zwany odwrotny transport elektronów, np. redukcja NAD^+ przez ubichinol (zredukowany koenzym Q), a w przypadku ATP-azy – synteza ATP z produktów jego hydrolizy, czyli ADP i P_i . Właśnie ta ostatnia pompa w normalnie funkcjonujących komórkach pracuje w trybie odwróconym, czyli syntetyzuje ATP kosztem elektrochemicznego potencjału protonowego. Działa więc nie jako hydrolaza ATP, lecz jako s y n t a z a ATP (Ryc. 3).

Wspomniany tu „elektrochemiczny potencjał protonowy” [2,3], inaczej zwany siłą protonomotoryczną (Δp), jest



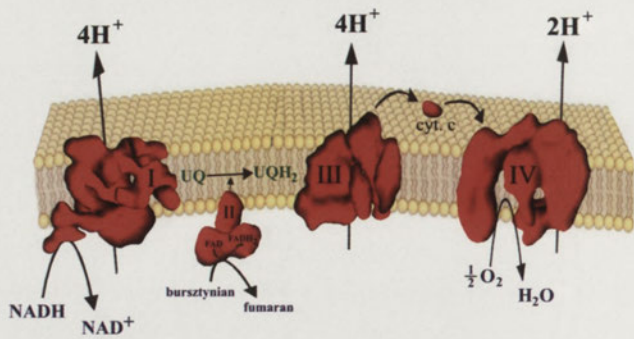
Rycina 3. Schematyczne odzwierciedlenie istoty „chemiosmotycznej” koncepcji oksydacyjnej fosforylacji. Pompy protonowe łańcucha oddechowego, działające w obrębie kompleksów oddechowych I, III i IV, budują elektrochemiczny gradient protonowy (siłę protonomotoryczną, Δp) po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. Gradient ten stanowi siłę sprawczą odwróconego działania ATP-azy F_1F_0 , czego efektem jest synteza ATP. Reprodukacja z [19] za zgodą redakcji.

sumą dwóch składowych, elektrycznej i stężeniowej (inaczej zwanej chemiczną). Chodzi o to, że strumień jonów H^+ , wpadający do wewnętrznej przestrzeni mitochondriów i dostarczający energii dla syntezy ATP, napędzany jest dwiema siłami, gradientem stężenia tych jonów (wyższe stężenia na zewnątrz wewnętrznej błony mitochondrialnej), inaczej mówiąc gradientem pH (ΔpH), i potencjałem elektrycznym ($\Delta \psi$, dodatnim na zewnątrz), co zapisujemy w postaci wzoru podanego poniżej.

$$\Delta p = \Delta \psi - \Delta pH$$

Znak minus przy ΔpH ma czysto formalne znaczenie, ponieważ różnica pH między przestrzenią zewnętrzną (niższe pH) a przestrzenią wewnątrzmitochondrialną (wyższe pH) jest liczbowo ujemna. W maksymalnie zenergizowanych mitochondriach zwierzęcych składowa elektryczna, $\Delta \psi$, wynosi zazwyczaj 180–200 mV, składowa chemiczna zaś tylko około 0,5 jednostki pH, co w przeliczeniu odpowiada około 30 mV. Próbowano ocenić wielkość energii zakumulowanej w mitochondriach w formie potencjału elektrochemicznego. Bardzo przybliżone obliczenia [5] dały dla mitochondriów wątroby wartość około 130 μ j (mikrodżuli) na mg białka mitochondrialnego, co odpowiada 3,3 nmoli ATP. Taką ilość ATP zdolne byłyby wyprodukować w pełni „zenergizowane” mitochondria, gdyby nagle pozbawić je dalszego dopływu substratów oddechowych lub tlenu.

W istocie oksydacyjna fosforylacja jest procesem ciągłym, a funkcjonujący łańcuch oddechowy utrzymuje siłę protonomotoryczną na stałym, w przybliżeniu, poziomie. Dzieje się to za sprawą pomp protonowych napędzanych energią procesów oksydoredukcyjnych, czyli transportem elektronów wzdłuż elementów łańcucha oddechowego. Badania ostatnich kilkadziesiąt lat pozwoliły wyróżnić w łańcuchu oddechowym cztery wieloenzymatyczne komplek-



Rycina 4. Mitochondrialny łańcuch oddechowy i związane z nim pompy protonowe. Rysował dr M. R. Więckowski (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa). Reprodukacja z [6] za zgodą wydawcy.

sy, stanowiące zarazem integralne jednostki funkcjonalne (Ryc. 4).

Kompleks I, określany również jako oksydoreduktaza NADH-ubichinon, jest największym i najbardziej złożonym kompleksem łańcucha oddechowego [7]. Składa się on z 43 łańcuchów peptydowych, a jego centrum katalityczne zawiera mononukleotyd flawinowy (FMN) i kilka kompleksów żelazowo-siarkowych. Kompleks I zawiąduje utlenianiem całej puli wewnątrzmitochondrialnego NADH, pochodzącego z działania rozmaitych dehydrogenaz. Akceptorem elektronów jest zaś ubichinon, utleniona forma koenzymu Q. Przeniesieniu pary elektronów przez kompleks I z NADH na koenzym Q towarzyszy wypompowanie 4 protonów z wnętrza mitochondrium do przestrzeni zewnętrznej.

Kompleks II, zlokalizowany po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej, jest również określany jako kompleks dehydrogenazy bursztynianowej [8]. Jest to jedyna dehydrogenaza uczestnicząca w cyklu kwasów trkarboksylowych (cyklu Krebsa), będąca białkiem błonowym, a nie rozpuszczalnym. Jego grupą prostetyczną jest dinukleotyd flawinowo-adeninowy (FAD). Ponadto zawiera centra żelazowo-siarkowe. Ten złożony układ przenosi atomy wodoru z bursztynianu na koenzym Q. Funkcjonowaniu kompleksu II nie towarzyszy pompowanie protonów.

Koenzym Q, czyli ubichinon, jest niskocząsteczkowym przenośnikiem równoważników redukcyjnych, który może się swobodnie przemieszczać w lipidowej warstwie wewnętrznej błony mitochondrialnej i w ten sposób pośredniczy w transporcie elektronów między kompleksami I i II, jako donorami, a kompleksem III, jako akceptorem elektronów. Ubichinon jest również akceptorem elektronów dla niektórych innych dehydrogenaz, jak na przykład dehydrogenazy α -glicerofosforanu i flawoproteiny przenoszącej elektrony, biorącej udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych.

Kompleks III, określana jako oksydoreduktaza ubichinol-cytochrom *c*, jest dimerem, w którym każdy monomer składa się z 11 podjednostek [9]. Zawiera również trzy grupy hemowe (dwie typu cytochromu *b* i jedną cytochromu *c*) oraz centrum żelazowo-siarkowe (białko Rieske'go). Redukcja ubichinonu do ubichinolu jest dwustopniowa.

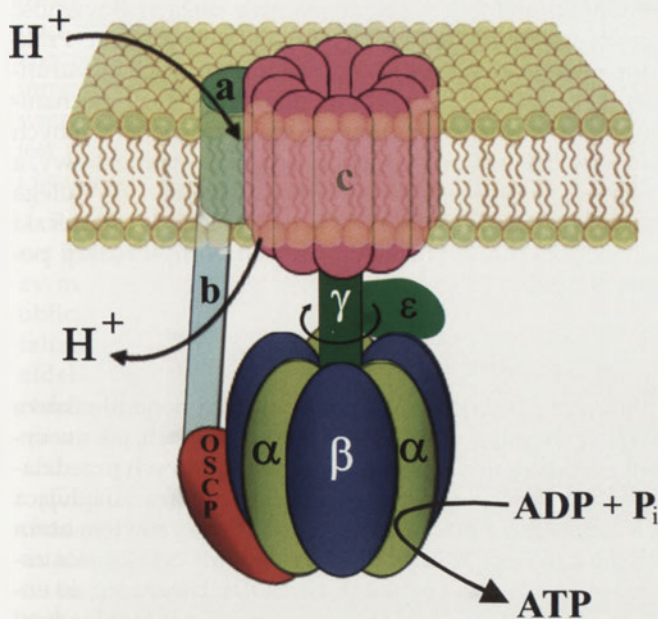
Produktem pośrednim jest ubisemichinon, wolnorodnikowy produkt jednoelektronowej redukcji ubichinonu, który ulega przemieszczeniu między zewnętrzną a wewnętrzną stroną wewnętrznej błony mitochondrialnej. Reakcji przeniesienia pary elektronów przez kompleks III towarzyszy wypompowanie 4 protonów.

Zredukowany na kompleksie III, cytochrom *c* ulega utlenieniu na kompleksie IV zwanym również oksydazą cytochromową [10-12]. W mitochondriach ssaków kompleks ten składa się z 13 podjednostek, przy czym tylko dwie z nich bezpośrednio uczestniczą w przeniesieniu elektronu. Zawierają one dwie grupy hemowe, cytochromy *a* i *a*₃, i dwa atomy miedzi. Przeniesieniu dwóch elektronów przez ten system towarzyszy wypompowanie tylko dwóch protonów. Jednakże owe dwa elektrony neutralizują pozostałe dwa protony po wewnętrznej stronie błony mitochondrialnej i, łącząc się z atomem tlenu, tworzą cząsteczkę wody. W ten sposób kończy się droga pary elektronów pochodzących z substratu oddechowego i następuje redukcja tlenu cząsteczkowego do wody, a jednocześnie po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzy się gradient stężenia jonów H⁺ i różnica ładunków elektrycznych, dając w sumie to, co wcześniej określiliśmy jako elektrochemiczny potencjał protonowy, Δp .

Syntazę ATP, wykorzystującą ten potencjał do tworzenia ATP, niektóre opracowania określają mianem kompleksu V, podkreślając tym samym jej funkcjonalny związek z pompami protonowymi kompleksów I, III i IV. Jest to okazałych rozmiarów kompleks białkowy, dający się obserwować w mikroskopie elektronowym jako „grzybkowate” struktury rozmieszczone gęsto po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej (Ryc. 5). Klasyczne już doświadczenia Efraima Rackera [13] (patrz również [14]) wykazały, że cząstki submitochondrialne pozbawione owych struktur traktowaniem trypsyną zachowują pełną aktywność oddechową, lecz nie są zdolne do syntetyzowania ATP. Natomiast izolowane struktury wykazują aktywność hydrolazy



Rycina 5. Fragment pękniętego mitochondrium. Widoczne są: fragmenty błony wewnętrznej zaznaczone białymi strzałkami oraz fragmenty grzebieni mitochondrialnych, na powierzchni których osadzone są kompleksy F₁ mitochondrialnej ATP-azy (syntazy ATP), przykładowo zaznaczone krótkimi czarnymi strzałkami. Średnica kompleksu F₁ wynosi około 10 nm. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego preparatu barwionego negatywowo molibdenianem amonu wykonane przez prof. Paulinę Włodawer (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa).



Rycina 6. Struktura podjednostkowa mitochondrialnej ATP-azy (syntazy ATP). Komplex F_0 zakotwiczony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, składa się z podjednostek a i b oraz tkwiących w lipidowej warstwie błony 10 kopii podjednostki c. Komplex F_1 znajduje się na powierzchni błony od strony macierzy mitochondrialnej. Jego głównymi składnikami są 3 kopie podjednostki α , 3 kopie podjednostki β oraz jedna kopia podjednostki γ . Strumień protonów, wpadający do wnętrza mitochondrium przez kanał protonowy utworzony przez podjednostki c, wywołuje ruch wirowy podjednostki γ , co z kolei powoduje zmiany konformacyjne podjednostek β i syntezę ATP. Rysował dr M. R. Więckowski (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nieckiego, Warszawa). Reprodukacja z [6] za zgodą wydawcy.

ATP. Kluczowym odkryciem było wykazanie, że ponowne przyłączenie grzybkowatych struktur do fragmentów błony przywracało im zdolność syntetyzowania ATP kosztem energii utleniania.

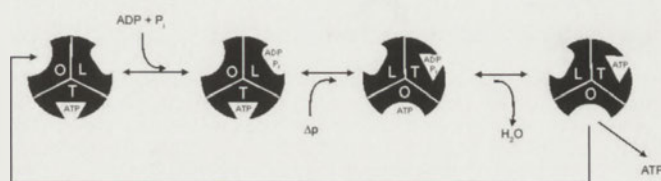
Obecnie wiemy [15-19], że kompleks syntazy ATP składa się z części hydrofilowej, właśnie owych „grzybków”, o masie około 370 kDa, określanych jeszcze przez Rackera jako „czynnik sprzęgający pierwszy” (F_1), i części zanurzonej w lipidowej warstwie wewnętrznej błony, oznaczanej jako F_0 . W skład F_1 wchodzi pięć rodzajów łańcuchów peptydowych, oznaczanych kolejnymi greckimi literami α , β , γ , δ i ϵ . Trzy podjednostki α i trzy β , usytuowane przemiennie wokół centralnie położonej podjednostki γ , są głównymi strukturalnymi cegiełkami „czynnika sprzęgającego” F_1 . Całość zakotwiczona jest w błonie przy udziale wysoce hydrofobowych podjednostek a, b i c, tej ostatniej występującej w 10 kopiach (Ryc. 6). Badania nad konformacją łańcuchów peptydowych wchodzących w skład F_1 , prowadzone głównie w laboratorium Johna E. Walkera [16,18], wykazały, że centrum katalityczne, odpowiedzialne zarówno za syntezę jak i hydrolizę ATP, zlokalizowane jest na podjednostce β . Podjednostka ta może przyjmować trzy różne konfiguracje przestrzenne charakteryzujące się różnym powinowactwem do ADP, P_i i ATP. Konformacja O (ang. *open*) wykazuje niskie powinowactwo do ATP. Konformacja L (ang. *loose*) wiąże słabo ADP i P_i . Natomiast konformacja T (ang. *tight*) mocno wiąże te dwie cząsteczki, prowadząc je do takiego zbliżenia, że łączą się one ze sobą, tworząc ATP (Ryc. 7). Ta sekwencja wydarzeń stanowi istotę tak zwanej konformacyjnej teorii

oksydacyjnej fosforylacji, zaproponowanej jeszcze w latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia przez Paula D. Boyera [17], lecz uaktualnionej badaniami J. E. Walkera.

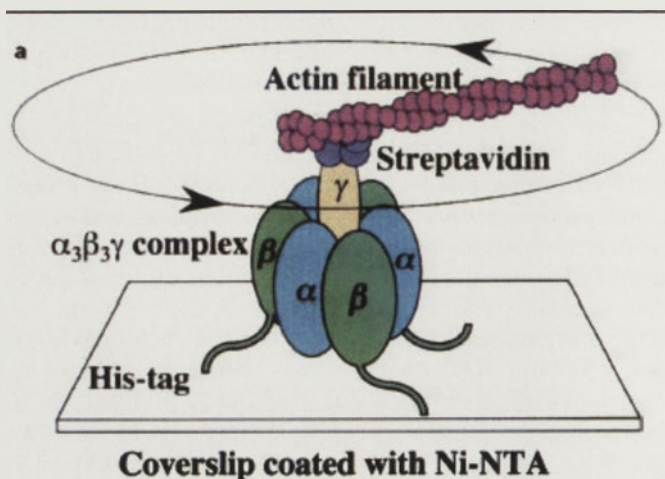
Dzięki tym odkryciom, za które obaj badacze wspólnie otrzymali w 1997 r. Nagrodę Nobla [20], dość dobrze możemy zrozumieć przebieg oksydacyjnej fosforylacji. Wysoka siła protonomotoryczna, wytworzona działaniem pomp protonowych łańcucha oddechowego, napędza powrót jonów H^+ do przestrzeni wewnętrznej mitochondriów. Jedyne miejsce, przez które taki powrót jest możliwy, jest kanał protonowy ulokowany w błonowym sektorze kompleksu syntazy ATP, mianowicie w obrębie kompleksu F_0 . Prawdopodobnie sekwencyjna protonacja i deprotonacja usytuowanych tam podjednostek c powoduje obrót zakotwiczonej tam jednym końcem wydłużonej podjednostki γ . Ta zaś, obracając się w przestrzeni utworzonej przez połączone ze sobą podjednostki α i β , wymusza zmiany przestrzennej struktury podjednostek β i związane z tym zmiany powinowactwa tychże do ADP i ATP. To zaś w efekcie prowadzi do syntezy ATP, jak opisano wyżej.

Jak to już podkreślano, synteza ATP jest procesem odwracalnym. Przy braku siły protonomotorycznej lub w przypadku jej niskiej wartości proces zaczyna przebiegać odwrotnie. ATP łączy się z podjednostką β , przez co wymusza jej odpowiednią konformację. Następuje przyłączenie cząsteczki wody i rozpad na ADP i P_i , czemu towarzyszy dalsza zmiana konformacji, powodująca obrót centralnie położonej podjednostki γ . To zaś, niby turbina, przepompowuje protony z wnętrza mitochondriów do przestrzeni zewnętrznej. Układ taki możemy traktować jako molekularny silnik obrotowy. Pomysłowości japońskich badaczy [21] zawdzięczamy to, że działanie takiego silnika dało się zaobserwować. Autorzy ci mianowicie unieruchomili kompleks F_1 na szkiełku mikroskopowym powleczonym solami niklu, wykorzystując wysokie powinowactwo reszt histydynowych do Ni. Następnie do końca podjednostki γ doczepili cząsteczkę aktyny, która ma formę długiego łańcucha i do której dołączono barwnik fluoryzujący (Ryc. 8). Dodanie ATP powodowało obrotowy ruch tego łańcucha aktynowego, co można było obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym (i na stronie internetowej www.k2.phys.waseda.ac.jp/F1movies/F1Prop.htm).

Pomysłowość autorów poszła dalej. Zamiast nici aktynowej doczepiono mikrogranulkę magnetyczną, a następnie przyłożono wirujące pole magnetyczne. W ten sposób wymuszono ruch obrotowy podjednostki γ . Zmuszając ją do wirowania w kierunku przeciwnym niż ten, jaki obserwowano przy hydrolizie ATP, wykryto powstawanie znikomych, lecz wykrywalnych ilości ATP [22].



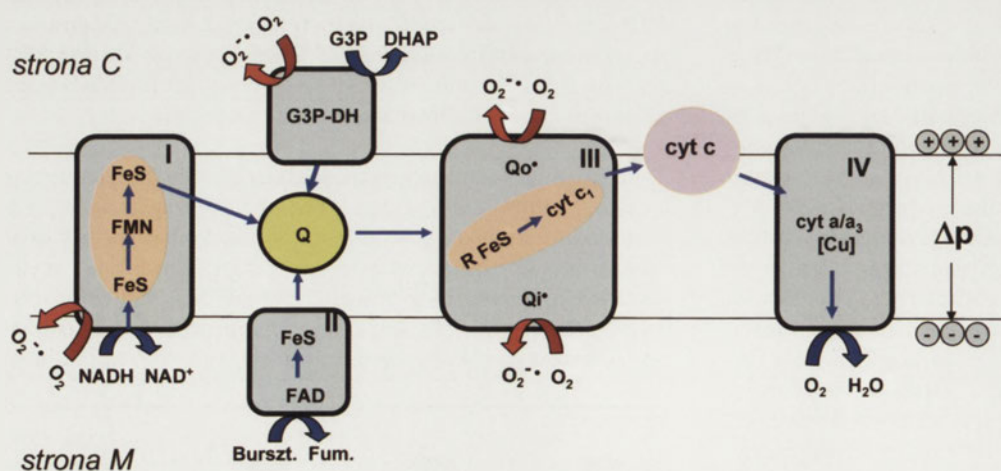
Rycina 7. Konformacyjny model oksydacyjnej fosforylacji P. D. Boyera [17]. Objasnienia w teście. Reprodukacja z [19] za zgodą redakcji.



Rycina 8. Modyfikacja kompleksu $\alpha_3\beta_3\gamma$ umożliwiającą bezpośrednią obserwację w mikroskopie fluorescencyjnym wirowania podjednostki γ podczas hydrolizy ATP. Reprodukacja z [16] za zgodą redakcji Nature, copyright (1997) Macmillan Magazines Ltd.

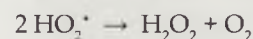
MITOCHONDRIA A REAKTYWNE FORMY TLENU

Opisany w poprzednim rozdziale łańcuch oddechowy prowadzi do zachodzącej na kompleksie IV dwuelektronowej redukcji atomu tlenu (ściślej – do czteroelektronowej redukcji cząsteczki O_2). Powstały hipotetyczny jon O^{2-} natychmiast łączy się z dwoma jonami H^+ , dając cząsteczkę wody. Jednakże niewielka ilość elektronów na swej długiej drodze od substratu oddechowego, poprzez kompleksy oddechowe, aż do oksydazy cytochromowej „wymyka się” z tego utartego szlaku, reagując z tlenem cząsteczkowym w mechanizmie redukcji jednoelektronowej. Powstaje w ten sposób cząsteczka zawierająca niesparowany elektron, czyli wolny rodnik $O_2^{\cdot-}$, określane chemicznym terminem *anionorodnika nadtlenkowego*. Przyjmuje się, że około 1% tlenu zużywanego przez tkanki zwierzęce ulega przemianie na tej drodze.



Rycina 9. Miejsca powstawania anionorodnika nadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$ w wyniku transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. Oznaczenia: FeS – grupy żelazowo-siarkowe; R FeS – białko Rieske’go z grupą żelazowo-siarkową; FMN – mononukleotyd flawinowy; FAD – dinukleotyd flawinowo-adeninowy; G3P – glicero-3-fosforan (α -glicerofosforan); DHAP – fosforan dihydroksyacetonu; G3P-DH – dehydrogenaza glicero-3-fosforanu; burszt. – bursztynian; fum. – fumaran; Q – pula mitochondrialnego ubichinonu (koenzymu Q); Qo^{\cdot} – ubisemichinon w pozycji o (po zewnętrznej stronie błony); Qi^{\cdot} – ubisemichinon w pozycji i (po wewnętrznej stronie błony); strona C – zewnętrzna strona wewnętrznej błony mitochondrialnej; strona M – wewnętrzna strona wewnętrznej błony mitochondrialnej. Niebieskie strzałki wskazują kierunek transportu elektronów; czerwone łukowate strzałki pokazują tworzenie anionorodnika nadtlenkowego. Rysował prof. Peter Schönfeld (Instytut Biochemii i Biologii Komórki, Uniwersytet Otto von Guericke, Magdeburg, Niemcy).

Anionorodnik, ze względu na swą dużą reaktywność chemiczną, jest związkiem wysoce cytotoksycznym. Praktycznie wszystkie komórki organizmów żyjących w warunkach tlenowych wytworzyły na drodze ewolucji mechanizmy ochronne, neutralizujące szkodliwe działanie wolnych rodników tlenowych. I tak anionorodnik nadtlenkowy, a ściślej – jego uprotonowana forma o wzorze HO_2^{\cdot} , ulega enzymatycznej dysmutacji (czyli redukcji jednej cząsteczki przy jednoczesnym utlenieniu drugiej) w myśl reakcji podanej poniżej.



Powyższą reakcję katalizuje dysmutaza nadtlenkowa (SOD), występująca zarówno w mitochondriach, jak i w cytosolu, w każdym z tych wewnątrzkomórkowych przedziałów w postaci innego izoenzymu. Dysmutaza znajdująca się w przestrzeni macierzy mitochondrialnej zawiera atom manganu (MnSOD), natomiast dysmutaza cytosolowa zawiera atomy miedzi i cynku (CuZnSOD). Uważa się, że enzym ten występuje również w przestrzeni międzybłonowej i to w formie identycznej jak w cytosolu, a więc CuZnSOD. Powstały w wyniku dysmutacji nadtlenek wodoru H_2O_2 nie jest wprawdzie wolnym rodnikiem, lecz z uwagi na swą reaktywność chemiczną zaliczany jest, łącznie z anionorodnikiem nadtlenkowym, do tak zwanych *reaktywnych form tlenu* (ang. *reactive oxygen species*, ROS) [23]. Do tej grupy związków należy również wolny rodnik hydroksylowy HO^{\cdot} . Powstaje on z nadtlenku wodoru w obecności dwuwartościowych jonów żelaza i jest chemicznie niezwykle agresywny. Do reaktywnych form tlenu zaliczamy także ozon O_3 oraz tlen singletowy 1O_2 . Ten ostatni powstaje w niektórych reakcjach fotochemicznych.

Głównymi miejscami powstawania anionorodnika nadtlenkowego są kompleksy oddechowe I i III [24-29]. W kompleksie I jest to prawdopodobnie jedno z ugrupowań żelazowo-siarkowych. Powstały anionorodnik ulega wydzieleniu do wewnętrznej przestrzeni mitochondrialnej. W kompleksie III utlenianie i redukcja koenzymu Q przebiega poprzez stadium semichinonu, który sam jest wolnym rodnikiem i, reagując z cząsteczką O_2 , może przyczynić się do tworzenia $O_2^{\cdot-}$. Ponieważ w obrębie kompleksu III ubisemichinon przemieszcza się między zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią wewnętrznej błony mitochondrialnej, tworzony przy jego udziale anionorodnik nadtlenkowy może uwalniać się również po obu stronach tej błony, jak to pokazano na Ryc. 9. Mniejsze znaczenie pod względem ilościowym ma produkcja wolnych rod-

ników tlenowych przez dehydrogenazy α -glicerofosforanu [30] i α -ketoglutaranu [31]. Ta pierwsza występuje w znaczących ilościach tylko w niektórych tkankach, między innymi w mięśni, i jest zlokalizowana na zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ta druga jest rozpuszczalnym enzymem macierzy mitochondrialnej i uczestniczy w cyklu Krebsa.

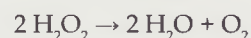
Ponadto, reaktywne formy tlenu powstają na zewnętrznej błonie mitochondrialnej w wyniku działania oksydazy monoaminowej [32]. Jest to flawoproteinowy enzym, obficie występujący szczególnie w tkance nerwowej. Katalizuje utlenianie biogennych amin do odpowiednich aldehydów lub ketonów, a wynikiem jednoelektronowej redukcji tlenu jest prawdopodobnie nadtlenek wodoru, a nie anionorodnik.

Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w mitochondriach pozostaje łańcuch oddechowy. Badania ostatnich lat zmierzają do ustalenia zależności intensywności tworzenia tych związków od stanu funkcjonalnego mitochondriów. Najważniejszym czynnikiem sprzyjającym jednoelektronowej redukcji tlenu wydaje się stan oksydoredukcji nośników elektronów w krytycznych miejscach łańcucha oddechowego. Można przyjąć jako regułę, iż im wyższy jest stopień redukcji, tym intensywniejszy staje się „wyciek” elektronów z łańcucha oddechowego i reagowanie ich z tlenem cząsteczkowym w reakcji jednoelektronowej. Dotyczy to przede wszystkim kompleksu I. Tym tłumaczy się stymulujące działanie inhibitorów oddechowych, jak na przykład rotenonu (inhibitor kompleksu I) i antymycyny A (inhibitor kompleksu III), na produkcję anionorodnika nadtlenkowego przez oddychające mitochondria. Stopień redukcji nośników elektronów zależy również od stanu funkcjonalnego mitochondriów. Im wyższe zapotrzebowanie komórki na ATP, tym intensywniej przebiega oksydacyjna fosforylacja i tym szybszy jest transport elektronów. W tych warunkach stopień redukcji nośników elektronów obniża się. I rzeczywiście, mitochondria oddychające w obecności ADP i P_i , a więc intensywnie produkujące ATP (tak zwany stan 3), wytwarzają mniej wolnych rodników tlenowych niż mitochondria w stanie spoczynkowym, nie mogące syntetyzować ATP z powodu braku ADP (stan 4). Wiąże się to również z wartością siły protonomotorycznej (Δp) i jej główną składową, potencjałem błonowym mitochondriów, wysokimi w stanie spoczynkowym (4) i obniżającymi się w stanie aktywnym (3). Skrajnym przypadkiem jest zniesienie Δp działaniem substancji rozprzegających oksydacyjną fosforylację (protonoforów), które jednocześnie radykalnie obniżają wytwarzanie wolnych rodników tlenowych przez łańcuch oddechowy [33-35].

Rozważania powyższe zbliżają nas do zrozumienia mechanizmu stresu oksydacyjnego towarzyszącego czasowemu niedotlenieniu tkanki (ischemii i reperfuzji). Spowodowane czasowym zablokowaniem krążenia krwi niedotlenienie wprowadza nośniki elektronów łańcucha oddechowego w stan maksymalnej redukcji, a następujące po nim odblokowanie krążenia (reperfuzja) dostarcza tlenu. Powstają wówczas warunki dla intensywnej produkcji wolnych rodników tlenowych [36]. Tej wyso-

ce niebezpiecznej dla komórki i całego organu, sytuacji zapobiec może przyspieszenie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym przez częściowe rozprzężenie oksydacyjnej fosforylacji, na przykład działaniem protonoforów lub otwarciem mitochondrialnych kanałów potasowych [37].

Poza dysmutazą ponadtlenkową, komórki aerobowe wyposażone są w cały zestaw enzymów i związków drobnocząsteczkowych chroniących je przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu [26,27,38]. Należy tu przede wszystkim katalaza, katalizująca rozpad nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego.



Katalaza charakteryzuje się niezwykle wysoką liczbą obrotów, jedną z najwyższych wśród enzymów. Jedna cząsteczka enzymu może przereagować z kilkoma milionami cząsteczek substratu, nadtlenu wodoru, w ciągu sekundy. Enzym ten w komórce zlokalizowany jest głównie w peroksysomach.

Z H_2O_2 reagują również liczne peroksydazy, redukujące nadtlenek wodoru do wody kosztem różnych związków organicznych. W macierzy mitochondrialnej znajduje się wysoce aktywna peroksydaza glutationowa. Zawiera ona w swym centrum aktywnym selenocysteinę i katalizuje redukcję H_2O_2 przez zredukowany glutation. Ważną rolę w ochronie przed oksydacyjnym uszkodzeniem błon biologicznych odgrywa inna peroksydaza glutationowa, specyficznie redukująca produkty peroksydacji fosfolipidów.

Reaktywne formy tlenu usuwane są również nieenzymatycznie w reakcji z drobnocząsteczkowymi reduktorami: kwasem askorbinowym (witaminą C), α -tokoferolem (witaminą E), β -karotenem (prowitaminą A) oraz ze zredukowanym glutationem.

Mamy więc do czynienia w komórce, a także w samych mitochondriach, z procesami tworzącymi reaktywne formy tlenu i usuwającymi je. Równowaga między tymi procesami pozwala utrzymać optymalny dla komórki poziom tych reaktywnych form. Pełnią one bowiem niektóre istotne funkcje sygnałowe [38-40], a także uczestniczą w tworzeniu ważnych związków: prostaglandyn i leukotrienów. Jednakże zaburzenie tej równowagi, w sensie podwyższenia produkcji wolnych rodników tlenowych lub obniżenia ich usuwania, prowadzi do groźnego dla życia komórki stanu określanego jako stres oksydacyjny. Uważa się obecnie, że stres oksydacyjny leży u podłoża niektórych chorób neurodegeneracyjnych, jak choroba Parkinsona i choroba Alzheimera [41]. Być może, odgrywa także rolę w patogenezie niektórych typów cukrzycy [42]. Uważa się także, że jest on jednym z mechanizmów starzenia [43,44].

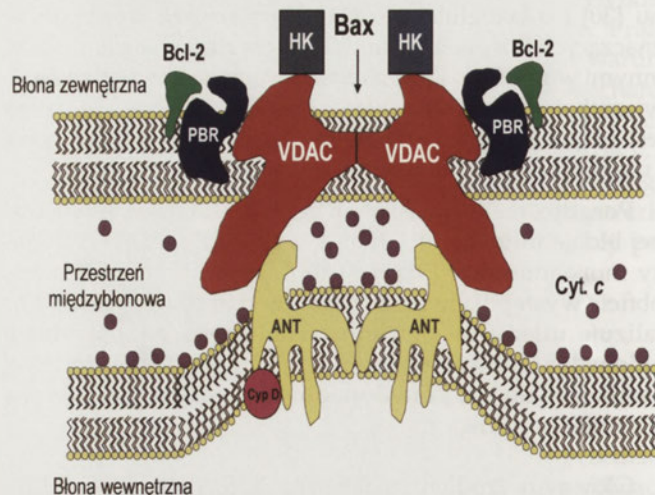
Na poziomie mitochondrialnym stres oksydacyjny zaliczany jest do głównych bodźców zapoczątkowujących skomplikowany mechanizm programowanej śmierci komórki, apoptozy [45-47].

ROLA MITOCHONDRIOW W APOPTOZIE

Może się wydać paradoksem natury, że mitochondria, będące organellami nieodzownymi dla życia komórki, stanowią zarazem narzędzie jej samobójczej śmierci. Apoptoza, będąca jedną z form programowanej śmierci komórki, stanowi skomplikowany ciąg wydarzeń pozwalający wielokomórkowemu organizmowi wyeliminować komórki, które bądź stały się zbędne w wyniku rozwoju osobniczego (np. w embriogenezie, selekcji klonalnej limfocytów, w trakcie przeobrażenia owadów), bądź uległy uszkodzeniu, mogącemu zagrażać całemu organizmowi. Między innymi przyjmuje się, że na drodze apoptozy niszczone są komórki, w których genomie nastąpiły nieodwracalne zmiany, potencjalnie prowadzące do przekształcenia ich w komórki nowotworowe. Apoptoza jest zatem jednym z naturalnych, być może głównych, procesów chroniących przed nowotworzeniem. Z drugiej strony, wzmożona apoptoza może być przyczyną niektórych chorób autoimmunologicznych oraz zachodzi w limfocytach zakażonych HIV.

Rozróżniamy w zasadzie dwie drogi apoptozy, które jednak w kilku punktach mogą się krzyżować [46]. Jedną z nich zapoczątkowuje pobudzenie odpowiednich receptorów na powierzchni komórki, przekazujących następnie sygnały do jądra. Drugą drogę inicjują zmiany w mitochondriach i temu mechanizmowi poświęcimy nasze rozważania. Jednym z najwcześniejszych zjawisk towarzyszących tej drodze jest uwolnienie do cytosolu cytochromu *c* i niektórych innych białek mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej. Białka te, a przede wszystkim sam cytochrom *c* i tzw. czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis-inducing factor*, AIF), w obecności ATP lub dATP, aktywują obecną w cytosolu kaspazę-9. Jest to jedna z proteaz cysteinowych rozrywających łańcuch peptydowy w sąsiedztwie kwasu asparaginowego, występujących w formie proenzymów. Ich proteolityczna aktywacja (w przypadku kaspazy-9 zainicjowana cytochromem *c*) uruchamia ciąg reakcji prowadzących do samostrawienia komórki. W procesie tym bierze także udział, uwalniany również z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, endonukleaza G, która degradowuje jądrowe DNA.

Cytochrom *c* jest w przeważającej masie związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną, gdzie – jak pisaliśmy wyżej – pełni funkcję przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. W równowadze z tą pulą znajduje się wolny cytochrom *c* w przestrzeni międzybłonowej. Przerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej powoduje wyciek do cytosolu tego wolnego cytochromu *c*. A że jest on w równowadze z cytochromem *c* związanym z wewnętrzną błoną, prowadzi to w końcu do prawie całkowitego uwolnienia do cytosolu mitochondrialnego cytochromu *c*. Początkowo zakładano, iż taki jest właśnie mechanizm uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów zapoczątkowujący apoptozę. Późniejsze badania wykazały jednak, że zerwanie ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej wcale nie jest niezbędne dla uwolnienia mitochondrialnego cytochromu *c* do cytosolu i że w czasie apoptozy przeważnie nie ma ono miejsca, co najwyżej w późnych jej stadiach. Musi być zatem inny mechanizm, dzięki któremu cytochrom *c* wycieka na zewnątrz z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej.



Rycina 10. Struktura miejsca kontaktowego między zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną, tworzącego "kanał wysokiej przepuszczalności" (megakanal). Oznaczenia: ANT – translokaza nukleotydów adeninowych; VDAC – poryna mitochondrialna; PBR – receptor benzodiazepinowy; HK – heksokinaza; Cyp D – cyklofilina D; cyt c – cytochrom c; Bcl-2 – białko antyapoptotyczne Bcl-2; Bax – białko proapoptotyczne Bax, którego przyłączenie do pokazanej struktury powoduje wypływ cytochromu *c*. Rysował dr M. R. Więckowski (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa). Reprodukacja z [54].

Według obecnych poglądów [47-50] w uwalnianiu mitochondrialnego cytochromu *c* biorą udział: z jednej strony tak zwany *kanal wysokiej przepuszczalności*, tworzący się w określonych warunkach w miejscach kontaktu między zewnętrzną a wewnętrzną błoną mitochondrialną, z drugiej strony – proapoptotyczne białka z rodziny białek Bcl-2, w szczególności białka Bid, Bax i Bak. Kanał wysokiej przepuszczalności, zwany również megakanalem, otwiera się, między innymi, wskutek przeładowania mitochondriów jonami wapnia. Łączy on bezpośrednio przestrzeń macierzy mitochondrialnej z przestrzenią cytosolową i powoduje uwolnienie do przestrzeni zewnętrznej nadmiaru Ca^{2+} , ale również umożliwia przechodzenie jonów H^+ , co daje w efekcie deenergizację mitochondriów. Budowa megakanalu jest wielce złożona [51,52]. Składa się on zarówno z białek błony wewnętrznej, przede wszystkim transportera nukleotydów adeninowych, jak i typowego białka błony zewnętrznej, mitochondrialnej poriny, określanej również skrótem VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) [53]. Więcej szczegółów budowy megakanalu pokazuje Ryc. 10. Sam megakanal nie jest jednak tą strukturą, przez którą cytochrom *c* miałby wyciekać z mitochondriów, a to z dwóch podstawowych powodów. Po pierwsze, łączy on bezpośrednio wewnętrzną przestrzeń mitochondrialną, przestrzeń macierzy, z przestrzenią cytosolową, podczas gdy wolny cytochrom *c* zlokalizowany jest w przestrzeni międzybłonowej. Po drugie, megakanal ma średnicę pozwalającą na swobodny przepływ cząsteczek o rozmiarach do 1,5 kDa, podczas gdy cząsteczka cytochromu *c* jest prawie dziesięciokrotnie większa (masa cząsteczkowa 13 kDa). Natomiast nowsze badania wykazały, że dopiero połączenie megakanalu z obecnymi normalnie w cytosolu białkami Bax i Bak sprawia, że zewnętrzna błona mitochondrialna staje się przepuszczalna dla cytochromu *c*, AIF i innych pro-

apoptotycznych czynników przestrzeni międzybłonowej. Wyrażano również przypuszczenie [50,55], że pierwszą, najwcześniej uwalnianą porcją cytochromu *c* jest tenże związany ze strukturą megakanalu.

A zatem według obecnie przyjętych poglądów mechanizm zapoczątkowujący mitochondrialną drogę apoptozy wygląda następująco. Pod wpływem odpowiedniego sygnału występujące w cytosolu proapoptotyczne białko Bid ulega proteolitycznej aktywacji, co z kolei indukuje oligomeryzację, obecnych również w cytosolu lub luźno związanych z zewnętrzną błoną, białek Bax i Bak. W formie oligomerów białka te silniej wiążą się z zewnętrzną błoną mitochondrialną, umożliwiając utworzenie kanału dla wycieku cytochromu *c*. Temu procesowi z kolei przeciwdziałają białka antyapoptotyczne, Bcl-2 i Bcl-X_L. Tak więc subtelna równowaga między tymi pro- i antyapoptotycznymi białkami i ich oddziaływanie z megakanalem decyduje o przeżyciu lub „samobójczej” śmierci komórki. Sytuację komplikuje dodatkowo fakt, że również niektóre białka szoku cieplnego, w szczególności białko HSP70, mogą przeciwdziałać uwalnianiu cytochromu *c* do cytosolu lub zapobiegać opisanemu wyżej działaniu już uwolnionego cytochromu [56,57]. Działają zatem antyapoptotycznie.

Obecne w cytosolu prokaspazy mogą stanowić poważne zagrożenie dla komórki. Ich aktywacja wskutek przypadkowej proteolizy mogłaby bowiem uruchomić nieodwracalny proces prowadzący nieuchronnie do śmierci komórki. By temu zapobiec, komórka wyposażona jest również w białka hamujące kaspazy. A zatem dla skutecznego uruchomienia ciągu reakcji zainicjowanych aktywacją kaspazy-9 przez cytochrom *c* potrzebne jest jeszcze jedno białko zwane Smac (ang. *second mitochondrial activator of caspases*) lub DIABLO, które neutralizuje inhibitory kaspaz [46,58]. Jest ono uwalniane razem z cytochromem *c* z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej.

Jednym z bodźców zapoczątkowujących mitochondrialny szlak apoptozy, są reaktywne formy tlenu [38,46,47]. Ich działanie jest wielorakie. Uważa się obecnie, iż jednym z mechanizmów jest potęgowanie uwalniania cytochromu *c*. Częsteczką cytochromu *c* jest bogata w reszty lizyny, ma zatem charakter polikationu. Dzięki temu wykazuje wysokie powinowactwo do, obecnej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ujemnie naładowanej, kardiolipiny. Jest to jeden z głównych czynników determinujących równowagę między związaną a wolną formą cytochromu *c*. Z drugiej strony kardiolipina, bogata w trójnienasycony kwas linolenowy, stanowi jeden z pierwszych celów peroksydatywnego ataku wolnych rodników tlenowych. Zniszczenie kardiolipiny przesuwa równowagę w kierunku wolnego cytochromu *c* i sprzyja jego uwalnianiu do cytosolu w warunkach uprzepuszczenia błony zewnętrznej, jak to opisano wyżej.

W komórkach podlegających apoptozie zaobserwowano rozpad sieci mitochondrialnej na mniejsze jej fragmenty [59,60]. Nie jest jednak do końca jasne, czy to właśnie ta zmiana morfologii mitochondriów jest w jakiś sposób związana z uwalnianiem cytochromu *c* i innych białek indukujących apoptozę [61].

CHOROBY MITOCHONDRIALNE

Mitochondria zawierają swój własny DNA (mtDNA). Jest to kolistą cząsteczką o wielkości około 16 tysięcy par zasad (u człowieka 16 569 par zasad), w której skład wchodzi dwie nici, ciężka i lekka. Mitochondrialny kod genetyczny wykazuje niewielkie odstępstwa od kodu właściwego dla genomu jądrowego. Np. kodon UAA, oznaczający zakończenie translacji cytosolowej, w mitochondriach jest kodonem dla tryptofanu. Podobnie kodon UGA, zamiast zakończenia syntezy łańcucha polipeptydowego, w mitochondriach oznacza dołączenie selenocysteiny. Geny w mtDNA zwierząt nie zawierają intronów, a DNA nie jest upakowane w postaci chromatyny. W mitochondriach nie ma białek histonowych, co nie oznacza, że mtDNA nie jest związany z żadnymi innymi białkami.

Mitochondrialny genom ssaków i prawie wszystkich innych zwierząt zawiera 37 genów. Kodują one 13 białek, 2 rodzaje rRNA i 22 rodzaje tRNA. Wszystkie białka kodowane w genomie mitochondrialnym są związane z oksydacyjną fosforylacją. Jedenaście z nich to białka wchodzące w skład łańcucha oddechowego (Ryc. 11) [62,63], siedem współtworzy kompleks oddechowy I, jedno wchodzi w skład kompleksu III i cztery w skład kompleksu IV. Pozostałe dwa białka kodowane w mtDNA wchodzi w skład podjednostki F₀ mitochondrialnej syntazy ATP (F₁F₀-ATP-azy; są to tzw. peptydy a i b, Ryc. 6). Pozostałe białka (a jest ich około dziewięćdziesiąt) bezpośrednio związane z oksydacyjną fosforylacją, tworzące łańcuch oddechowy i mitochondrialną ATP-azę, są kodowane w genomie jądrowym, syntetyzowane w cytoplazmie i następnie importowane do mitochondriów. W sumie w mitochondriach jest około 1000 białek. Należą do nich m.in. enzymy cyklu kwasów trkarboksylowych, β-oksydacji kwasów tłuszczowych, pierwszych etapów glukoneogenezy (w wątrobie i korze nerki) oraz cyklu mocznikowego (w wątrobie), a także niektórych etapów steroidogenezy i metabolizmu aminokwasów. Ponadto, w macierzy mitochondrialnej znajdują się białka związane z replikacją mtDNA i ekspresją genów mitochondrialnych oraz białka opiekuńcze. W obu błonach mitochondrialnych występują białkowe systemy transportujące jony, metabolity i białka. Synteza tych wszystkich białek wymaga udziału ok. 3000 genów kodowanych przez jądrowy DNA. A zatem mitochondria jako całość, ich biogeneza i funkcjonowanie, są pod kontrolą dwóch genomów: dominującego ilościowo genomu jądrowego i bardzo ograniczonego ilościowo, ale niezwykle istotnego ze względu na udział mitochondriów w energetyce komórki – genomu mitochondrialnego. Mutacje w każdym z nich mogą być przyczyną wrodzonych poważnych chorób [63].

Pierwszy przypadek choroby o podłożu endogennym, spowodowanej zaburzoną organizacją enzymów łańcucha oddechowego, został opisany w 1962 r. [64]. Jej objawami było przyspieszone zużycie tlenu, osiągające wartość bliską maksymalnej, oraz obniżona kontrola oddechowa. Zmieniony był także obraz mitochondriów w mikroskopie elektronowym. Odkrycie to zwróciło uwagę na fakt, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów mogą być przyczyną zaburzeń metabolicznych u ludzi, chociaż podłoże molekularne tej patologii nie zostało wówczas ustalo-

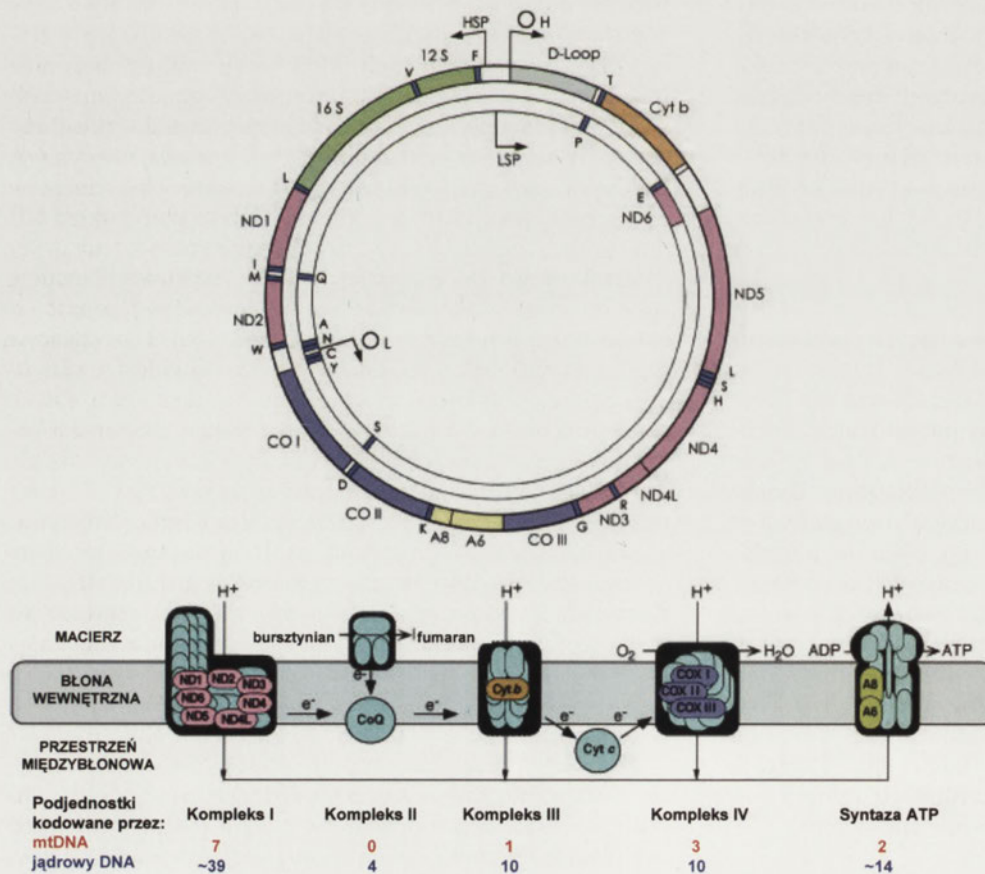
ne. Natomiast w 1988 roku opisano przypadek schorzenia spowodowanego zaburzeniami w obrębie mtDNA [65]. Odkrycie to zapoczątkowało erę intensywnych poszukiwań patogennych mutacji w mtDNA i stało się przełomowe dla zdefiniowania nowej klasy chorób metabolicznych, tzw. chorób mitochondrialnych. Obecnie kategoria ta została poszerzona i obejmuje nie tylko zaburzenia spowodowane mutacjami w mtDNA, ale także mutacjami w jądrowym DNA, w genach kodujących białka mitochondrialne zarówno związane z procesami metabolicznymi jak i z biogenezą tych organelli. Tak rozumiane choroby mitochondrialne są najczęściej występującymi wrodzonymi anomaliami, pojawiającymi się z częstością szacowaną na 1 na 10 000 żywych urodzeń [66].

Dziedziczenie chorób spowodowanych zmianami w jądrowym DNA podlega prawom Mendla i przez to jest stosunkowo łatwe do śledzenia i przewidywania prawdopodobieństwa wystąpienia objawów choroby w pokoleniu potomnym. Natomiast ocena szans pojawienia się skutków mutacji w mtDNA, zaburzających działanie systemu oksydacyjnej fosforylacji, jest o wiele trudniejsza. Po pierwsze, dziedziczenie cech kodowanych w mtDNA odbywa się po linii matczynej, ponieważ mitochondria obecne w plemniku są bardzo nieliczne w porównaniu z liczbą mitochondriów oocyty i zaraz po zapłodnieniu ulegają eliminacji [67]. A

zatem dziedziczenie to ma charakter niemendłowski. Po drugie, w przeciwieństwie do genomu jądrowego występującego w niedzielającej się komórce w postaci jednej kopii, mtDNA w przeciętnej komórce ssaków występuje średnio w kilku tysiącach kopii, a w oocytach liczba ta osiąga ok. 100 tysięcy. W warunkach normy wszystkie kopie mtDNA są identyczne i prawidłowe. Stan taki określany jest jako homoplazmia. W przypadku wystąpienia mutacji w mtDNA udział cząsteczek zmutowanych może wynosić od bliskiego zera do 100% w stosunku do całkowitego mtDNA (w tym drugim skrajnym przypadku też można mówić o homoplazmii). Stan, w którym tylko część cząsteczek mtDNA w komórce jest zmutowana, nazywamy heteroplazmą. Objawy choroby mitochondrialnej pojawiają się zazwyczaj dopiero wtedy, gdy udział zmutowanego mtDNA (stopeń heteroplazmii) przekracza pewną krytyczną wartość. Zazwyczaj mieści się ona w przedziale 50–80% całego mtDNA w komórce, w zależności od typu mutacji [68]. Niejednakowa wrażliwość różnych typów komórek na zaburzenia oksydacyjnej fosforylacji spowodowane zmianami w mtDNA zależy przede wszystkim od intensywności ich metabolizmu i zapotrzebowania energetycznego. Dlatego choroby mitochondrialne dotyczą w pierwszej kolejności tkanek o najbardziej aktywnym metabolizmie energetycznym, takich jak tkanka mięśniowa i nerwowa. Wydaje się,

że do momentu osiągnięcia krytycznego poziomu heteroplazmii komórki potrafią skutecznie bronić się przed niedoborem ATP.

Mutacje występujące u danego osobnika zarówno w DNA jądrowym, jak i mitochondrialnym mogą mieć także charakter sporadycznych zmian, które są przyczyną wystąpienia chorób nie wykrywanych wcześniej u członków danej rodziny. Szczególnie dotyczy to mutacji w mtDNA. Mitochondrialne DNA jest narażone na stałe działanie stosunkowo wysokich stężeń reaktywnych form tlenu [69] oraz nie jest osłonięte przez białka histonowe, co sprawia, że częstość mutacji pojawiających się w obrębie mtDNA jest nawet 100-krotnie wyższa niż obserwowana w DNA jądrowym [68]. Każda z mutacji w mtDNA dotyczy bezpośrednio (mutacje w genach kodujących polipeptydy) lub pośrednio (mutacje w genach kodujących mitochondrialne tRNA) białek związanych z oksydacyjną fosforylacją. A zatem mutacje te mogą upośledzać wydolność ener-



Rycina 11. Mapa genomu mtDNA człowieka. Geny kodujące określone podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego i syntazy ATP zaznaczono różnymi kolorami: siedem podjednostek kompleksu I – różowym, cytochrom *b* wchodzący w skład kompleksu III – pomarańczowym, trzy podjednostki kompleksu IV (oksydazy cytochromowej) – niebieskim, dwie podjednostki syntazy ATP – żółtym. Tymi samymi kolorami są zaznaczone odpowiednie podjednostki na schemacie błony wewnętrznej w dolnej części rysunku. Ponadto, na modelu mtDNA geny kodujące dwa rybosomalne RNA, 12S i 16S, zaznaczono kolorem zielonym, a kodujące 22 rodzaje tRNA – kolorem granatowym. Pętla D kontrolująca inicjację replikacji i transkrypcji mtDNA, zaznaczona jest na szaro. Według [62]; reprodukcja za zgodą wydawcy.

getyczną mitochondriów, a w efekcie funkcjonowanie komórek i tkanek.

Dziedziczone po matce mutacje w mtDNA, podobnie jak dziedziczone mutacje w DNA jądrowym, powinny być wykrywalne we wszystkich tkankach organizmu. Natomiast mutacje nabyte w różnych fazach rozwoju embrionalnego oraz w okresie postnatalnym są ograniczone do wybranych tkanek i narządów. Jednakże nie do końca zrozumiałe mechanizmy segregacji mitochondriów w czasie dojrzewania oocytów oraz niejednakowa wrażliwość różnych komórek na zaburzenia oksydacyjnej fosforylacji sprawiają, że przewidywanie stopnia heteroplazmii mtDNA w różnych tkankach organizmu, a także nasilenia objawów chorobowych jest niezwykle trudne. Uważa się, że rozprzestrzenianie się mutacji i rozkład heteroplazmii w organizmie potomnym są zdeterminowane już na pierwszych etapach oogenezy podczas rozwoju embrionalnego zarodka żeńskiego. Wtedy może dojść do niejednakowego rozkładu heteroplazmii podczas podziału komórek i powstania linii komórkowych różniących się stopniem zmutowania mtDNA [70].

Dodatkowym utrudnieniem w przewidywaniu rozwoju i przebiegu chorób mitochondrialnych spowodowanych zmianami w mtDNA jest występowanie niejednakowych objawów wśród należących do jednej rodziny nosicieli tej samej mutacji, a także zmieniający się obraz choroby i zazwyczaj nasilenie się jej objawów w ciągu życia osobniczego. Co więcej, mutacje w obrębie różnych genów mogą prowadzić to takich samych objawów chorobowych. Innymi słowy, ważną cechą chorób mitochondrialnych jest brak wyraźnej zależności między zmianami genotypowymi i ich manifestacją fenotypową.

Anomalie występujące w mtDNA dzieli się na trzy kategorie. Są to: mutacje punktowe, przearanżowanie dużych fragmentów genów (delecje, duplikacje) oraz zmniejszenie liczby kopii mtDNA (deplecje). Wśród mutacji punktowych można wyróżnić mutacje dotyczące genów kodujących białka oraz genów kodujących tRNA [71]. Ważnym przykładem należącym do tej drugiej podkategorii jest mutacja A3243G w genie kodującym tRNA^{Leu}. Skutkiem tej mutacji jest zespół zwany MELAS (ang. *Myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*) [72]. Co ciekawe, ta sama mutacja może być przyczyną innego zespołu zwanego MIDD (ang. *Mitochondrial inherited deafness and diabetes*), którego objawem jest obustronne upośledzenie słuchu i cukrzyca spowodowana zaburzeniami wydzielania insuliny przez komórki beta trzustki [73]. Przykład ten ilustruje brak ścisłego związku między zaburzeniem na poziomie genów a fenotypem. Inna mutacja punktowa (A8344G), również dotycząca genu tRNA^{Leu}, jest główną przyczyną zespołu zwanego MERRF (ang. *Myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) [74]. O ile mutacje w genach dotyczących poszczególnych tRNA mogą wpływać na ekspresję wszystkich genów mitochondrialnych, to mutacje genów kodujących białka powodują ściśle określone defekty. Ich skutkiem może być wybiórcze zaburzenie funkcji kompleksów oddechowych I, III i IV oraz ATP-azy. Takie zmiany leżą u podstaw poważnych patologii związanych z upośledzeniem oksydacyjnej fosforylacji, w tym zespołu LHON (ang. *Leber hereditary optic neuropathy*), spowodowanego mutacjami dotyczącymi

białek kompleksu I. Mutacja w genie kodującym jedno z białek wchodzących w skład mitochondrialnej ATP-azy jest przyczyną zespołu NARP (ang. *Neurogenic muscle weakness-ataxia-retinitis pigmentosa*), charakteryzującego się miopatią, ataksją i zwyrodnieniem siatkówki, połączonymi z demencją i napadami epileptycznymi. Jeżeli stopień heteroplazmii NARP przekracza 90%, rozwija się tzw. choroba Leigh'a, będąca najpoważniejszym i letalnym skutkiem tej mutacji. Warto tu zaznaczyć, że jest to zespół objawów klinicznych, który może być także wynikiem mutacji w genomie jądrowym (patrz niżej).

Przearanżowania dużych fragmentów mtDNA (sporadyczne delecje lub duplikacje) następują zazwyczaj na bardzo wczesnym etapie rozwoju zarodkowego i rozprzestrzeniają się podczas embriogenezy. Zmiany te są przyczyną sporadycznych chorób mitochondrialnych, chociaż w rzadkich przypadkach sugerowana jest możliwość ich dziedziczenia po linii matczynej [71]. Zmniejszenie liczby kopii mtDNA jest stosunkowo rzadką, letalną anomalią, która objawia się poważnymi zaburzeniami oddechowymi oraz dysfunkcją mięśni, wątroby i nerek [71,75]. Jedną z cech chorób mitochondrialnych spowodowanych mutacjami w mtDNA jest nasilenie się lub wręcz pojawianie się objawów w miarę starzenia się organizmu. Wydaje się, że może być to spowodowane postępującymi uszkodzeniami mtDNA w wyniku nieuniknionej ekspozycji na reaktywne formy tlenu [69].

Choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mtDNA stanowią tylko 10% wszystkich genetycznie uwarunkowanych zaburzeń dotyczących tych organelli. Pozostałe 90% jest skutkiem mutacji w genach znajdujących się w jądrowym DNA. Mutacje te mogą bezpośrednio dotyczyć nie tylko genów kodujących białka wchodzące w skład łańcucha oddechowego i ATPazy, ale także genów kodujących białka odpowiedzialne za prawidłową aranżację łańcucha oddechowego. Przykładem takiej choroby jest zespół Leigh'a spowodowany mutacją w genie *SURF1*, kodującym białko opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe składanie oksydazy cytochromowej czyli kompleksu IV. W efekcie dochodzi do poważnej, letalnej w skutkach, dysfunkcji łańcucha oddechowego [76,77].

Fakt, że zespół Leigh'a może być skutkiem różnych mutacji (np. *SURF1* lub *NARP* albo *COX III* dotyczącej białek oksydazy cytochromowej), dobrze ilustruje trudność postawienia właściwej diagnozy na podstawie objawów. Podobieństwo objawów towarzyszących różnym mutacjom, a także zróżnicowanie fenotypowe przy tej samej zmianie na poziomie DNA nie pozwalają na ustalenie przyczyny choroby bez uciekania się do metod biologii molekularnej [71].

Istnieje też grupa chorób, określanych jako choroby mitochondrialne, spowodowanych mutacjami w genomie jądrowym dotyczącymi białek nie uczestniczących w oksydacyjnej fosforylacji, ale kluczowych dla prawidłowego działania tych organelli. Przykładem takiego schorzenia jest ataksja Friedreicha (zwyrodnienie mózdzkowo-rdzeniowe). Jest to choroba neurodegeneracyjna spowodowana mutacją w genie jądrowym kodującym frataksynę, której funkcja w mitochondriach polega na buforowaniu i magazynowaniu jonów

żelaza. Zmniejszenie ilości frataksyny powoduje wzrost stężenia wolnych jonów Fe^{2+} i w konsekwencji zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (w reakcji Fentona). Frataksyna jest też konieczna w tworzeniu kompleksów żelazowo-siarkowych (Fe/S) wchodzących, m.in., w skład kompleksów I, II i III łańcucha oddechowego oraz akonitazy (enzym cyklu kwasów trikarboksylowych). Skutkiem tych zaburzeń jest degeneracja neuronów czuciowych, kardiomiopatia oraz zwiększone prawdopodobieństwo wystąpienia cukrzycy typu 2 [78].

PIŚMIENNICTWO

- Tzagoloff A (1982) *Mitochondria*. Plenum Press, New York
- Nicholls DG (1987) *Bioenergetyka*. PWN, Warszawa
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) *Bioenergetics 3*. Academic Press, London
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148
- Wojtczak L, Żółkiewska A, Duszyński J (1986) Energy-storage capacity of the mitochondrial proton-motive force. *Biochim Biophys Acta* 851: 313-321
- Wojtczak L, Zabłocki K (2008) Basic mitochondrial physiology in cell viability and death. W: Dykens J, Will Y (red) *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. Wiley & Sons, w druku
- Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A (2006) Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1406-1420
- Ackrell BAC (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory complex II. *FEBS Lett* 466: 1-5
- Darrrouzet E, Moser CC, Dutton PL, Daldal F (2001) Large scale domain movement in cytochrome *bc₁*: a new device for electron transfer proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 445-451
- Capaldi R (1990) Structure and function of mitochondrial cytochrome *c* oxidase. *Annu Rev Biochem* 59: 569-596
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23: 331-366
- Babcock GT, Wikström M (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356: 301-309
- Racker E (1962) Studies of factors involved in oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1659-1663
- Ernster L, Schatz G (1981) Mitochondria: A historical review. *J Cell Biol* 91: 227s-255s
- Penefsky HS, Cross RL (1991) Structure and mechanism of F_0F_1 -type ATP synthesis and ATPases. *Adv Enzymol* 64: 173-214
- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628
- Boyer PD (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717-749
- Leslie AG, Abrahams JP, Braig K, Lutter R, Menz RI, Orriss GL, van Raaij MJ, Walker JE (1999) The structure of bovine mitochondrial F_1 -ATPase: an example of rotary catalysis. *Biochem Soc Trans* 27: 37-42
- Wojtczak L (2000) Siedemdziesiąt lat badań nad oksydacyjną fosforylacją, czyli od koncepcji chemicznego sprzężenia do wirującej ATP-azy. *Kosmos* 49: 467-479
- Wojtczak L (1998) Nagroda Nobla z chemii za 1997 rok – mitochondrialna syntaza ATP. *Postepy Biochem* 44: 2-5
- Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K jr (1997) Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase. *Nature* 386: 299-302
- Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K jr (2004) Mechanically driven ATP synthesis by F_1 -ATPase. *Nature* 427: 465-468
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EL (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-36031.
- Jeżek P, Hlavatá L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2478-2503.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70: 200-214
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharm Sci* 27: 639-645
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757: 553-561
- Drahota Z, Chowdhury SK, Floryk D, Mráček T, Wilhelm J, Rauchová H, Lenaz G, Houštěk J (2002) Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferrocyanide. *J Bioenerg Biomembr* 34: 105-113
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004) Mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24: 7779-7788
- Schnaitman C, Erwin VG, Greenawalt JW (1967) The submitochondrial localization of monoamine oxidase: An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* 32: 719-735
- Skulachev VP (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safety low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 29: 169-202
- Brand MD, Affouret C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37: 755-767
- Brookes PS (2005) Mitochondrial H^+ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 38: 12-23
- Chen O, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2007) Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C137-C147
- Brennan JP, Southworth R, Medina RA, Davidson SM, Duchon MR, Shattock MJ (2006) Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of K_{ATP} channel activation. *Cardiovasc Res* 72: 313-321
- Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postepy Biochem* 52: 145-156
- Dröge W (2002) Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- Stone JR, Yang SP (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8: 243-270
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583: 9-24
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581
- Lenaz G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G (1999) Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* 46: 1-21
- Newmeyer DD (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-490

46. Grądzka I (2006) Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórki. *Postępy Biochem* 52: 157-165
47. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2007) Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 143-183
48. VonAhsen O, Waterhouse NJ, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR (2000) The 'harmless' release of cytochrome *c*. *Cell Death Differ* 7: 1192-1199
49. Robertson JD, Zhivotovsky B, Gogvadze V, Orrenius S (2003) Outer mitochondrial membrane permeabilization: an open-and-shut case? *Cell Death Differ* 10: 485-487
50. Grimm S, Brdiczka D (2007) The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12: 841-855
51. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA (2006) The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS J* 273: 2077-2099
52. Więckowski MR (2008) Mitochondrialny megakanał w fizjologii i patologii komórki – nowe spojrzenie. *Postępy Biochem* 54: 71-81
53. Kmita H, Stobienia O (2006) Kanały VDAC jako regulator funkcji mitochondriów. *Postępy Biochem* 52: 129-136
54. Wojtczak L (2006) Dwa oblicza cytochromu *c*. *Postępy Biochem* 52: 122-128
55. Więckowski MR, Vyssokikh M, Dymkowska D, Antonsson B, Brdiczka D, Wojtczak L (2001) Oligomeric C-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome *c* but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes. *FEBS Lett* 505: 453-459
56. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome *c*. *Nat Cell Biol* 2: 645-652
57. Klein SD, Brüne B (2002) Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome *c* release. *Biochem J* 362: 635-641
58. Verhagen AM, Vaux DL (2002) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7: 163-166
59. Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 870-880
60. Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G (2005) Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15: 179-183
61. Arnoult D (2007) Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 17: 6-12
62. DiMauro S, Hirano M, Schon EA (2006) Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34: 265-283
63. Trębińska A, Golik P (2004) Choroby mitochondrialne wywołane zaburzeniami w komunikacji między genomem jądrowym i organellarnym. *Postępy Biochem* 50: 45-56
64. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius BA (1962) A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphology study. *J Clin Invest* 41: 1776-1804
65. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719
66. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Rev Gen* 2: 342-352
67. Sutovsky P, Van Lezen K, McCauley T, Daz BN, Sutovszk M (2004) Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* 8: 24-33
68. Kang D, Hamasaki N (2005) Mitochondrial DNA in somatic cells: A promising target of routine clinical tests. *Clin Biochem* 38: 685-695
69. Jurgowiak M, Oliński R (1997) Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się. *Postępy Biochem* 43: 30-40
70. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 16: 500-505
71. Rötig A, Munnich A (2003) Genetic features of mitochondrial respiratory chain. *J Am Soc Nephrol* 14: 2995-3007
72. Goto Y, Nonaka I, Horai S (1990) Mutation in the tRNA^{Leu} (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651-653
73. De Andrade PBM, Rubi B, Frigerio F, Van den Ouweland JMW, Massen JA, Maechler P (2006) Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia* 49: 1816-1826
74. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace CD (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Leu} mutation. *Cell* 61: 931-937
75. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprile JR, Andretta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S (1991) mtDNA depletion with variable tissue expression: A novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 48: 492-501
76. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA (1998) Surf-1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 20: 337-342
77. Chinnery PF, Schon EA (2003) Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1188-1199
78. Palau F (2001) Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis. *Int J Mol Med* 7: 581-589

Mitochondria in cell life, death and disease

Lech Wojtczak[✉], Krzysztof Zabłocki

Departement of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: l.wojtczak@nencki.gov.pl

Key words: apoptosis, ATP synthase, mitochondria, mitochondrial diseases, oxidative phosphorylation, reactive oxygen species, respiratory chain

ABSTRACT

In animal cell, mitochondria are the main sites of the synthesis of ATP required for cell functioning and survival. On the other hand, mitochondria play a key role in initiating cell programmed death (apoptosis). In addition, defects in the mitochondrial genome and in the nuclear genome encoding mitochondrial proteins may result in malfunctioning of these organelles and, as result, in diseases of the whole organism. This article contains basic information on the functioning of oxidative phosphorylation and on mitochondrial production of reactive oxygen species. It also describes initiation of apoptosis at the mitochondrial level. Finally, it briefly presents some most common genetic defects responsible for "mitochondrial diseases".

Janusz Piechota

Hanna Jańska

Zakład Biologii Molekularnej Komórki, Uniwersytet Wrocławski

Zakład Biologii Molekularnej Komórki, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 66/73, 51-148 Wrocław; tel. (071) 3756273; e-mail: Hanna.Janska@ibmb.uni.wroc.pl

Artykuł otrzymano 25 kwietnia 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 29 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: genom mitochondrialny, mtDNA, ewolucja, rośliny, zwierzęta

Wykaz skrótów: CMS – cytoplazmatyczna męskosterylność (ang. *cytoplasmic male sterility*); HSP – promotor nici H (ang. *H strand promoter*); LSP – promotor nici L (ang. *L strand promoter*); mtDNA – mitochondrialny DNA (ang. *mitochondrial DNA*); mTERF – mitochondrialny czynnik terminacji transkrypcji (ang. *mitochondrial termination factor*); TFAM, TFB1M, TFB2M – mitochondrialne czynniki transkrypcyjne A, B1, B2 (ang. *mitochondrial transcription factors A, B1, B2*)

STRESZCZENIE

Informacja o właściwościach komórek eukariotycznych jest zapisana nie tylko w jądrze komórkowym, ale także w genomach zlokalizowanych w mitochondriach i chloroplastach. Porównanie genomów mitochondrialnych roślin i zwierząt pozwala zauważyć dwie zupełnie odmienne strategie ewolucyjne. Zwierzęta cechuje wyraźne dążenie do maksymalnej redukcji wielkości genomu mitochondrialnego i uproszczenia odczytu zawartej w nim informacji genetycznej. U roślin, przeciwnie, obserwuje się znaczne zwiększenie wielkości tego genomu oraz nagromadzenie bardzo nietypowych rozwiązań dotyczących utrzymywania oraz ekspresji informacji genetycznej.

WSTĘP

Rośliny oraz zwierzęta są najbardziej uorganizowanymi organizmami wielokomórkowymi obecnymi na Ziemi. Te grupy organizmów realizują dwie zupełnie odmienne strategie ewolucyjne. Rośliny nie potrafią się przemieszczać i są organizmami autotroficznymi, czerpiącymi energię potrzebną do życia w procesie fotosyntezy. Natomiast zwierzęta, jako organizmy heterotroficzne, aktywnie poszukują pożywienia, co doprowadziło do pojawienia się takich cech, jak stałocieplność i złożony system nerwowy. Obydwie strategie ewolucyjne okazały się niezwykle efektywne, przez co rośliny i zwierzęta stały się dominującymi grupami organizmów na Ziemi.

Wymienienie i opis wszystkich cech różniących rośliny i zwierzęta wykracza poza ramy niniejszego artykułu. Informacja o tych różnicach zapisana jest w genomach poszczególnych organizmów. Używając słowa „genom”, zazwyczaj mamy na myśli DNA zlokalizowany w jądrze komórkowym. Warto jednak pamiętać, że niewielka, aczkolwiek bardzo ważna, część informacji genetycznej każdego organizmu eukariotycznego jest zapisana poza jądrem komórkowym. Tym dodatkowym miejscem występowania informacji genetycznej są mitochondria, a w przypadku roślin – także chloroplasty. Zatem oprócz genomu głównego, obecnego w jądrze komórkowym, typowa komórka eukariotyczna zawiera kilkaset-kilka tysięcy kopii znacznie mniejszych genomów obecnych na terenie cytoplazmy. Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie najistotniejszych i dobrze udokumentowanych różnic w strukturze i zawartości informacji genetycznej obecnej w genomach mitochondrialnych roślin i zwierząt. Przedstawione zostaną również najważniejsze różnice w systemie ekspresji tej informacji. Większość prezentowanych danych doświadczalnych dotyczy roślin okrytozalążkowych oraz ssaków, w szczególności człowieka. Wynika to z tego, że prowadzone badania koncentrują się głównie na tych dwóch grupach systematycznych.

POCHODZENIE I EWOLUCJA MITOCHONDRIÓW

Powszechnie uznawaną obecnie teorią wyjaśniającą pochodzenie mitochondriów jest teoria endosymbiozy [1-3]. Endosymbiotyczne pochodzenie mitochondriów potwierdzają w szczególności analizy porównawcze sekwencji genomów mitochondrialnych oraz genomów bakteryjnych. Ich wyniki dowodzą, że mitochondria wszystkich eukariotów wywodzą się od jednego wspólnego przodka, którym był organizm z grupy α -proteobakterii [1,2,4].

Powstałe w wyniku endosymbiozy protomitochondrium ulegało szybkiej ewolucji, dostosowując się do warunków panujących wewnątrz komórki gospodarza. Jednym z najważniejszych etapów tej ewolucji było przenoszenie genów z genomu protomitochondrium do jądra komórkowego. Prowadziło to do stopniowej redukcji genomu mitochondrialnego i tym samym – wzrostu zależności mitochondriów od genomu jądrowego [5]. Wewnątrzkomórkowy transfer genów zachodził szczególnie intensywnie w pierwszych etapach ewolucji mito-

chondriów. Liczba mitochondrialnych genów u kręgowców osiągnęła stałą wartość i obecnie nie ulega już większym zmianom [6]. Natomiast u roślin okrytozalążkowych znane są przykłady współcześnie zachodzącego transferu genów z mitochondriów do jądra komórkowego [7,8]. W toku ewolucji powstało szereg ścieżek sygnałowych zapewniających wzajemną komunikację pomiędzy genomem jądrowym i genomami zlokalizowanymi w organellach: mitochondriach i chloroplastach. Jej celem jest koordynacja ekspresji wszystkich genomów obecnych w komórce eukariotycznej [9-11].

ORGANIZACJA GENOMU MITOCHONDRIALNEGO

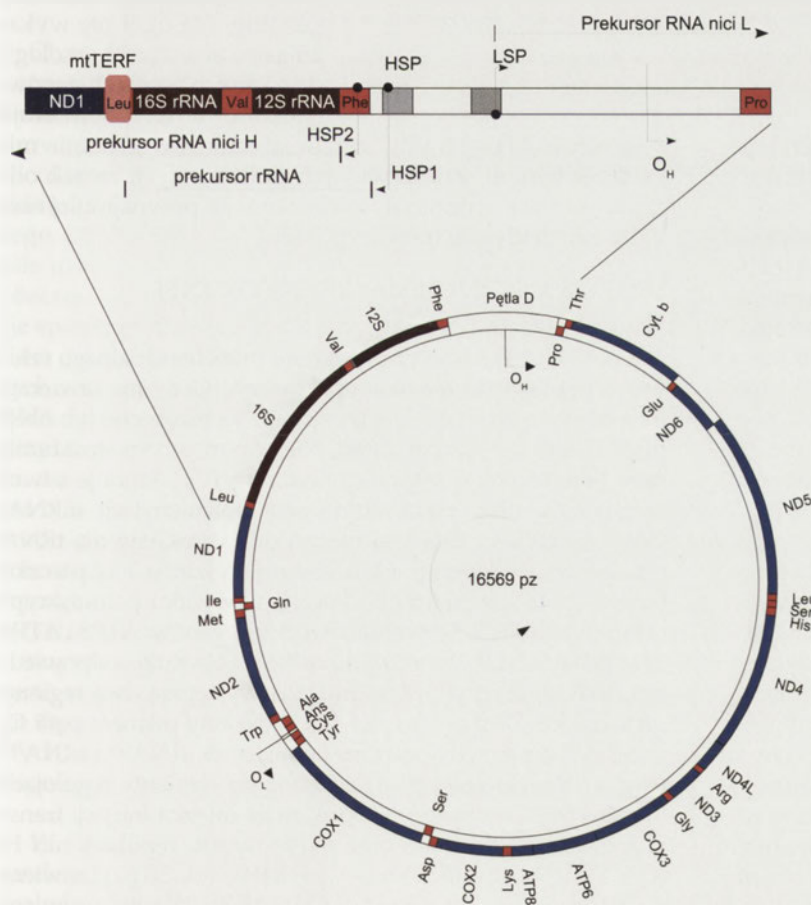
ZAWARTOŚĆ INFORMACJI GENETYCZNEJ

Obecnie znanych jest prawie 1300 pełnych sekwencji genomów mitochondrialnych, co umożliwia bardziej obszerną analizę porównawczą mitochondrialnego DNA (mtDNA) (baza OGMP, <http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp>). Wprawdzie większość z nich to genomy zwierzęce, ale obecnie poznano również sekwencje siedmiu genomów roślin wyższych, takich jak: burak cukrowy, kukurydza, tytoń, ryż, rzepak, pszenica oraz rzodkiewnik pospolity – *Arabidopsis thaliana* [12].

Jedną z najistotniejszych różnic pomiędzy genomami mitochondrialnymi roślin i zwierząt jest ich wielkość. Na ogół

genomy mitochondrialne zwierząt mają bardzo podobny rozmiar (15–20 kb) oraz zestaw genów [6]. Natomiast mitochondria roślinne zawierają olbrzymie genomy wielkości rzędu 200–2500 kb [12]. Cechą charakterystyczną genomów mitochondrialnych roślin jest nie tylko ich duży rozmiar, ale również duża zmienność ich wielkości, nawet w obrębie jednego gatunku. Na przykład, ekotyp NB kukurydzy zwyczajnej posiada genom mitochondrialny o wielkości 570 kb, podczas gdy w ekotypie CMS-C znaleziono genom o wielkości 740 kb [12].

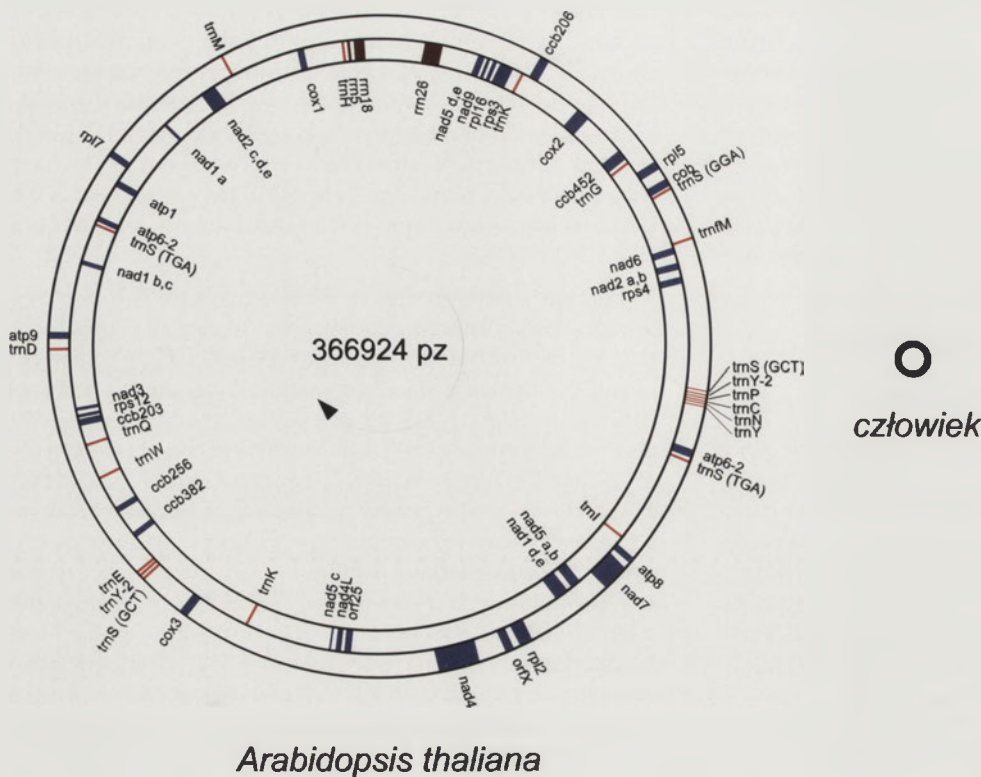
Pomimo dużych różnic w wielkości mitochondrialnych genomów roślin i zwierząt liczba genów obecnych w obydwu typach genomów nie różni się aż tak znacznie. Typowy zwierzęcy mtDNA zawiera ok. 37 genów [6]. W genomach mitochondrialnych roślin wyższych przeciętnie spotyka się ok. 50-60 genów. Informacja genetyczna zawarta w obu genomach obejmuje dwa lub trzy geny rRNA, zmienny zestaw genów tRNA i ograniczoną liczbę genów kodujących białka zaangażowane w proces fosforylacji oksydacyjnej [13]. Na „nadmiarowe” 20 genów u roślin składają się głównie białka wchodzące w skład mitochondrialnych rybosomów, kilka białek zaangażowanych w syntezę cytochromu c oraz dodatkowe podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego [12]. Zestawy genów obecnych w mitochondriach roślin i zwierząt zostaną bardziej szczegółowo omówione na przykładzie człowieka (Ryc. 1) [14] oraz rzodkiewnika *A. thaliana* (Ryc. 2) [15-17].



Rycina 1. Organizacja genomu mitochondrialnego człowieka. Powiększono obszar zawierający elementy istotne w procesie transkrypcji. Kolory: czerwony – geny tRNA, brązowy – geny rRNA, niebieski – geny kodujące białka, szary – sekwencje promotorowe. Dokładny opis w tekście.

W mtDNA *A. thaliana* występują trzy geny kodujące rRNA: 18S rRNA, budujące małą podjednostkę rybosomu, oraz 26 rRNA i 5S rRNA, wchodzące w skład dużej podjednostki rybosomu. Natomiast w mtDNA człowieka można znaleźć tylko dwa geny rRNA. Są to 12S rRNA i 16S rRNA, wchodzące w skład, odpowiednio, małej i dużej podjednostki rybosomalnej. Gen 5S rRNA jest nieobecny w genomie mitochondrialnym człowieka, ale koniec 3' ludzkiego 16S rRNA wykazuje 68% homologię sekwencji do 5S rRNA *Bacillus subtilis*. Sugeruje to, że w toku ewolucji doszło u zwierząt do połączenia dwóch genów rRNA w jeden [18].

W mitochondriach człowieka oraz rzodkiewnika *A. thaliana* zawarta jest informacja o 22 cząsteczkach tRNA [14,17]. W przypadku człowieka jest to zestaw w zupełności wystarczający do odczytania wszystkich kodonów obecnych w mitochondrialnych genach kodujących białka. Tak nie jest w przypadku *A. thaliana*. Osiemnaście z 22 genów tRNA obecnych w genomie rzodkiewnika to geny unikalne, pozostałe 4 to ich kopie [17]. Obecność osiemnastu różnych cząsteczek tRNA jest niewystarczająca do zakodowania wszystkich aminokwasów używanych do syntezy białek. Trzydzieści dodatkowych cząsteczek tRNA jest transportowanych do mitochondriów z cytoplazmy. Brak pełnego zestawu genów tRNA obserwuje się we wszystkich opisanych do tej pory genomach roślinnych [17].



Rycina 2. Organizacja genomu mitochondrialnego rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana*. Dla porównania umieszczono cząsteczkę mtDNA człowieka w skali 1:1. Kolory: czerwony – geny tRNA, brązowy – geny rRNA, niebieski – geny kodujące białka.

Następna różnica pomiędzy genami tRNA w genomie mitochondrialnym roślin i zwierząt dotyczy ich pochodzenia. U człowieka wszystkie geny tRNA, to geny wywodzące się od endosymbionta, który dał początek mitochondriom. U rzodkiewnika tylko 12 unikatowych genów tRNA to takie geny. Pozostałe 6 genów tRNA wykazuje największe podobieństwo do sekwencji genów tRNA obecnych w chloroplastach [17]. Ponadto, w genomie mitochondrialnym buraka cukrowego znaleziono gen tRNA, który nie wykazuje istotnej homologii do żadnej znanej sekwencji tRNA [12]. Obecność genów tRNA przejętych z innych systemów ekspresji, a zwłaszcza z chloroplastów, jest cechą charakterystyczną mitochondriów roślinnych.

Geny kodujące białka są ostatnią klasą genów występujących w genomach mitochondrialnych. Liczebność tej klasy genów wykazuje największe różnice pomiędzy roślinami i zwierzętami. Ludzki mtDNA koduje zaledwie 13 białek. Jedenaście z nich wchodzi w skład kompleksów łańcucha oddechowego, a 2 w skład syntazy ATP (Tabela 1). W mtDNA rzodkiewnika zidentyfikowano 32 geny. Osiemnaście z nich, czyli ponad połowa, koduje podjednostki czterech kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej. Siedem genów koduje białka rybosomalne, a 5 genów koduje białka zaangażowane w syntezę cytochromu c. Dwa pozostałe geny kodują białka zaangażowane w transport centrów żelazowo-siarkowych z mitochondriów (gen *mttB*) oraz matu-razę uczestniczącą prawdopodobnie w wycinaniu intronów (gen *mat-R* [19]). Zestawy genów kodujących białka w po-

zostałych 6 poznanych genomach mitochondrialnych roślin wyższych różnią się nieznacznie, w głównej mierze liczbą genów kodujących białka rybosomalne (od 6 do 11). Ponadto, w genomie mitochondrialnym tytoniu znaleziono 2 podjednostki kompleksu II (geny *sdh3* i *sdh4*), a gen *ccmFN* u rzepaku i *A. thaliana* został podzielony na 2 odrębne geny [12].

Jak widać z tego porównania, genom mitochondrialny rzodkiewnika, pomimo że jest 22-krotnie większy, koduje tylko 1,5 raza więcej genów (Ryc. 2). Liczba genów u tego gatunku może jeszcze ulec zwiększeniu. W jego genomie mitochondrialnym odnaleziono bowiem ponad 150 otwartych ramek odczytu, mogących kodować białka o długości ponad 100 aminokwasów [17]. Stanowią one łącznie ponad 10% genomu. Na ogół nie wykazują one znaczącej homologii do żadnych znanych genów. Niektóre z nich zawierają

fragmenty „klasycznych” genów obecnych w genomie mitochondrialnym. Znaczenie tych dodatkowych ramek odczytu pozostaje nieznane. Wykazano, że przynajmniej niektóre z nich ulegają transkrypcji [20].

UPAKOWANIE INFORMACJI GENETYCZNEJ

Cechą charakterystyczną genomu mitochondrialnego człowieka jest jego ekstremalne upakowanie. Geny nie zawierają intronów, a sekwencje międzygenowe są nieobecne lub obejmują zaledwie kilka par zasad. Niektórym genom strukturalnym brakuje pełnej sekwencji kodonu STOP, która jest tworzona w wyniku potranskrypcyjnej poliadenylacji mRNA. Geny dla rRNA i tRNA są niezwykle małe. Geny dla tRNA nie zawierają sekwencji -CCA obecnej na końcu 3' cząsteczki. Sekwencja ta jest później dodawana w wyniku potranskrypcyjnej modyfikacji. Sekwencje dwóch par genów: ATP8 i ATP6 oraz ND4L i ND4 zachodzą na siebie na obszarze, odpowiednio, 46 i 7 nukleotydów. W mtDNA występują dwa regiony niekodujące. Dłuższy (ok. 1,1 kb), określany mianem pętli D, znajduje się pomiędzy genami kodującymi tRNA^{Phe} i tRNA^{Pro} (Ryc. 1). W regionie pętli D znajdują się elementy regulujące transkrypcję i replikację mtDNA, m.in. miejsca inicjacji transkrypcji dla obydwu nici oraz miejsce startu replikacji nici H (O_H). Drugi obszar niekodujący jest krótki (ok. 30 pz) i zawiera miejsce startu replikacji nici L (O_L) [14,18,21]. W sumie sekwencje regulatorowe i niekodujące stanowią mniej niż 10%, co stawia zwierzęce genomy mitochondrialne wśród najbardziej „upakowanych” genomów występujących w przyrodzie.

Tabela 1. Porównanie genów obecnych w genomie mitochondrialnym człowieka i *A. thaliana*.

Rodzaj genu	Człowiek	<i>A. thaliana</i>
Geny rRNA	2	3
Geny tRNA	22	22 (18) ¹
Podjednostki systemu oksydacyjnej fosforylacji. W tym:	13	32
Kompleks I	7	9
Kompleks III	1	1
Kompleks IV	3	3
Kompleks V	2	5
Biogeneza cytochromu c	-	5
Białka rybosomalne	-	7
Transport białek	-	1
Inne	-	1

¹22 to całkowita liczba genów tRNA w mtDNA rzodkiewnika. 18 genów tRNA to geny unikatowe, pozostałe cztery to ich kopie.

Rośliny pod względem upakowania informacji genetycznej w genomach mitochondrialnych stanowią przeciwieństwo zwierząt. U roślin sekwencje mtDNA kodujące geny stanowią zaledwie kilkanaście procent całego genomu [12], np. u *A. thaliana* jest to 18% (Ryc. 2) [17]. Pozostałe 82% to sekwencje niekodujące. Wśród nich są m. in. introny, pseudogeny oraz sekwencje powtórzone. W omawianym genomie mitochondrialnym *A. thaliana* introny stanowią blisko 9% całej sekwencji mtDNA. Sekwencje powtórzone o różnej długości stanowią kolejne 7% genomu. Jak dotąd w mtDNA *A. thaliana* zidentyfikowano 3 pseudogeny [12].

Charakterystyczne dla roślin jest występowanie w genomach mitochondrialnych sekwencji nukleotydowych homologicznych do sekwencji występujących w DNA jądrowym i chloroplastowym. Obecność w mtDNA sekwencji obecnych w innych genomach jest związana z dużą skłonnością mitochondriów roślinnych do pobierania obcego DNA. Analizy porównawcze wykazały, że w genomie mitochondrialnym *A. thaliana* 4% stanowią sekwencje obecne również w jądrze komórkowym, a 1,2% to sekwencje spotykane również w chloroplastach. W mtDNA *A. thaliana* znaleziono także dwie otwarte ramki odczytu, których sekwencje przypominają polimerazy RNA zależne od RNA typowe dla wirusów RNA znalezionych u niektórych grzybów, będących roślinnymi patogenami [17]. Oznacza to, że do mitochondrialnych genomów roślin dostają się nie tylko fragmenty z genomów znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie (jądro komórkowe, chloroplasty), ale również z genomów organizmów, z którymi roślina miała styczność. Pochodzenie ponad połowy sekwencji niekodujących obecnych w genomie mitochondrialnym *A. thaliana* i innych roślin pozostaje nieznanie [17]. Przypuszczalnie są to również sekwencje nabyte w wyniku horyzontalnego transferu genów, ale prawdopodobnie w wyniku częstych rearanżacji mtDNA szybko utraciły podobieństwo do swych oryginałów.

W linii ewolucyjnej zwierząt wyraźnie zauważalna jest tendencja do zmniejszenia rozmiaru mtDNA oraz maksymalnego jego upakowania. W genomach mitochondrialnych roślin zaznacza się wprawdzie tendencja do eliminacji kolejnych genów [7,8], jednak presja selekcyjna, faworyzująca krótsze cząsteczki mtDNA, została wyraźnie utracona w

toku ewolucji. Najprawdopodobniej stało się to na etapie powstania roślin okrytozalążkowych. U tej grupy roślin obserwuje się bowiem gwałtowne zwiększanie się wielkości genomów mitochondrialnych [12]. Mitochondria roślin okrytozalążkowych utraciły kontrolę nad wielkością swojego genomu i chłoną jak gąbka wszelkiego rodzaju cząsteczki DNA, które znajdują się na ich terenie. Powiększaniu rozmiarów genomu mitochondrialnego sprzyja naturalna zdolność mitochondriów roślinnych do importu zarówno RNA [22], jak i DNA [23], co ułatwia dostawanie się do nich obcego materiału genetycznego.

STRUKTURA GENOMU MITOCHONDRIALNEGO

Genom mitochondrialny człowieka, podobnie jak innych zwierząt, jest niewielką kolistą cząsteczką DNA (Ryc. 1) [14]. Zwyczajowo genom mitochondrialny roślin wyższych również przedstawia się w postaci kolistej cząsteczki DNA zawierającej całość informacji genetycznej obecnej w mitochondriach. Taka cząsteczka nosi nazwę genomu głównego (ang. *master genome*). Jednak jak dotychczas nie udało się eksperymentalnie potwierdzić istnienia tak dużych cząsteczek w mitochondriach roślin. Postuluje się, że mogą one występować jedynie w komórkach merystematycznych [24]. W pozostałych komórkach genom mitochondrialny roślin jest złożony z wielu cząsteczek o różnym rozmiarze, utrzymywanych w dynamicznej równowadze w wyniku rekombinacji zachodzącej pomiędzy długimi sekwencjami powtórzonymi [25]. Cząsteczki te przedstawia się w modelach organizacji genomów roślinnych jako cząsteczki koliste, ale *in vivo* najprawdopodobniej mogą one przybierać również formę liniową. W mitochondriach roślin, obok cząsteczek kolistych i liniowych o różnej wielkości, ale mniejszej niż genom główny, mogą występować cząsteczki liniowe o długości przekraczającej kilkakrotnie wielkość genomu głównego. Prawdopodobnie są one wynikiem replikacji kolistego DNA według modelu toczącego się koła lub też mogą powstawać poprzez łączenie się krótszych cząsteczek w wyniku rekombinacji. W mitochondriach roślin obserwuje się również cząsteczki rozgałęzione lub w kształcie rozety, a także cząsteczki jednoniciowego mtDNA. Są one najprawdopodobniej stanami pośrednimi procesów replikacji i rekombinacji [25].

W mitochondriach roślin, jak również zwierząt, obok dominującego genomu mitochondrialnego występować mogą alternatywne genomy mitochondrialne. Stan organizmu, w którym występuje więcej niż jeden genom mitochondrialny nazywamy heteroplazmią. Stosunek alternatywnych genomów mitochondrialnych w heteroplazmatycznej populacji może być różny. Zazwyczaj jednak jeden z genomów wyraźnie dominuje i decyduje o fenotypie. U zwierząt pojawia się heteroplazmii wiązano z chorobami mitochondrialnymi i procesem starzenia, ale ostatnio wykryto ją również u ludzi zdrowych [26]. U roślin wykazano, że zmiany w heteroplazmatycznej populacji cząsteczek mtDNA mogą doprowadzać do zmian fenotypowych, np. pojawienia się cytoplazmatycznej męskosterylności (CMS, ang. *cytoplasmic male sterility*), polegającej na tym, że roślina nie jest w sta-

nie wytwarzać witalnego pyłku [27]. Pomimo że heteroplazmia jest stanem obecnym w obu grupach organizmów, to główne mechanizmy odpowiedzialne za jej powstawanie są różne. U roślin najczęstszym mechanizmem, który doprowadza do powstania alternatywnego genomu na poziomie substechiometrycznym, jest nieodwracalna rekombinacja nieuprawniona. Natomiast u zwierząt heteroplazmia jest najczęściej wynikiem błędów w czasie replikacji, nieefektywnych procesów naprawczych czy reakcji mtDNA z reaktywnymi formami tlenu. W wyniku tych procesów powstają alternatywne genomy różniące się od wzorcowego mutacjami punktowymi, małymi delecjami lub duplikacjami [26].

Oprócz genomu mitochondrialnego, w mitochondriach roślin mogą występować samoreplikujące się plazmidy liniowe o wielkości 2–13 kb. Obecność takich cząsteczek stwierdzono w mitochondriach 8 gatunków roślin, m.in. kukurydzy *Zea mays* [28]. Kodują one zazwyczaj polimerazę RNA lub polimerazę DNA grupy B, charakterystyczne dla niektórych wirusów i bakteriofagów. Ich budowa przypomina DNA transpozonów z charakterystycznymi krótkimi terminalnymi powtórzeniami. Analiza sekwencji wskazuje, że plazmidy liniowe obecne w mitochondriach roślin są spokrewnione z podobnymi plazmidami obecnymi w mitochondriach grzybów fitopatogennych i prawdopodobnie trafiły do roślin w wyniku horyzontalnego transferu genów [28]. Obecność plazmidów liniowych wskazuje, że obcy DNA, który dostał się do roślinnego mitochondrium jest nie tylko włączany do genomu mitochondrialnego, ale może utrzymywać się na terenie mitochondriów w postaci niezależnych replikonów.

REKOMBINACJA mtDNA

Obecność rekombinacji w mitochondriach ssaków, a zwłaszcza w mitochondriach człowieka, była poddawana bardzo wnikliwym analizom. Związane jest to z tym, że brak tego zjawiska zakładają wszelkie badania dotyczące ewolucji człowieka oparte o analizę sekwencji mtDNA. Obecnie dominuje pogląd, że w mitochondriach ssaków rekombinacja nie zachodzi. Sporadycznie pojawiają się pojedyncze doniesienia wskazujące na możliwość rekombinacji ludzkiego mtDNA. Jednak interpretacja tych doniesień bywa kontrowersyjna. Przykładem mogą być prace, które wskazywały, że przejawem rekombinacji mtDNA u człowieka jest zjawisko homoplazji, polegające na występowaniu tych samych mutacji w różnych liniach ewolucyjnych mtDNA [29]. Homoplazja w ludzkim mtDNA jest zjawiskiem dosyć powszechnym. Obserwowano ją m. in. w badaniach dotyczących populacji polskiej [30]. Jednak bardziej dokładne analizy wskazują, że zjawisko homoplazji jest wynikiem występowania w mtDNA tzw. gorących miejsc mutacji, czyli miejsc, w których mtDNA szczególnie często jest narażony na mutacje [30–32].

Zjawisko rekombinacji mtDNA jest jedną z najbardziej wyróżniających się cech mitochondriów roślinnych wpływającą pośrednio na wiele innych właściwości tych organelli. Rekombinacja pomiędzy powtarzającymi się sekwencjami DNA jest głównym czynnikiem wpływającym na obserwowaną strukturę genomu mitochondrialnego u roślin wyższych [33]. W mitochondriach roślin zachodzą dwa typy rekombinacji: homologiczna pomiędzy długimi sekwencjami powtórzonymi (ang. *long repeats*) i rekombinacja pomiędzy krótkimi sekwen-

cjami powtórzonymi (ang. *short repeats*) [34]. Rekombinacja homologiczna, charakteryzująca się wysoką częstotliwością i odwracalnością, jest odpowiedzialna za wielocząsteczkową strukturę genomu mitochondrialnego. Rekombinacja między krótkimi sekwencjami powtórzonymi zachodzi sporadycznie, jest nieodwracalna i odpowiada za powstawanie alternatywnych form genomu zwanych sublironami. Przebudowane w ten sposób cząsteczki mtDNA mogą być utrzymywane przez wiele pokoleń bez zmian lub ulec selektywnej amplifikacji, stając się formą dominującą mtDNA [35,36].

EKSPRESJA INFORMACJI GENETYCZNEJ W MITOCHONDRIACH

TRANSKRYPCJA GENÓW KODOWANYCH W mtDNA

Biorąc pod uwagę pochodzenie mitochondriów, można byłoby się spodziewać, że polimeraza RNA, występująca w mitochondriach, będzie typu bakteryjnego. Tymczasem za transkrypcję w mitochondriach zwierzęcych i roślinnych, i innych do tej pory zbadanych, odpowiedzialna jest polimeraza RNA wykazująca największe podobieństwo do polimeraz wirusów bakteryjnych [37,38]. Jedynym wyjątkiem jest pierwotniak *Reclinomonas americana* posiadający najbardziej pierwotny, z dotychczas opisanych, genom mitochondrialny [1]. W genomie tym występują geny kodujące wielopodjednostkową polimerazę podobną do polimeraz RNA eubakterii. Sugeruje się, że w toku ewolucji, na bardzo wczesnym etapie, doszło do wyeliminowania polimerazy RNA typu bakteryjnego i zastąpienia jej polimerazą RNA pochodzącą z wirusów bakteryjnych.

Główne różnice pomiędzy mitochondriami różnych grup systematycznych występują na etapie inicjacji i terminacji transkrypcji. W pewnym stopniu różnice te wynikają z odmiennej organizacji genomu mitochondrialnego. Proces transkrypcji w mitochondriach zwierzęcych został dopasowany do „kompaktowej” organizacji genomu mitochondrialnego i obejmuje praktycznie całą cząsteczkę DNA. W mtDNA człowieka znajdują się dwa promotory (LSP i HSP) zlokalizowane w obrębie pętli D (Ryc. 1). Każdy z nich służy do transkrypcji jednej z nici mtDNA (odpowiednio nici L i nici H). W obrębie promotora HSP występują dwa miejsca inicjacji transkrypcji (HSP1 i HSP2). Transkrypcja z miejsca HSP2 obiega prawie całą cząsteczkę mtDNA i ulega terminacji zaraz za genem tRNA^{Phe}. Prowadzi to do powstania długiego prekursora obejmującego całą nici H. Natomiast transkrypcja rozpoczęta w miejscu HSP1 ulega terminacji za genem 16S rRNA i służy do syntezy krótkiego transkryptu obejmującego głównie geny rRNA. Za terminację transkrypcji odpowiada białko mTERF wiążące się w obrębie genu tRNA^{Leu(UUR)} (Ryc. 1). Transkrypcja nici L, rozpoczęta w obrębie promotora LSP, obejmuje całą sekwencję mtDNA i ulega terminacji najprawdopodobniej w obrębie wiązania czynnika mTERF [39].

Ze względu na znacznie większe rozmiary genomu i rozproszenie genów w obrębie całej sekwencji mtDNA, u roślin występuje znacznie więcej promotorów. Dany promotor może kierować transkrypcją tylko jednego genu, ale czasami pojedynczy promotor służy do ekspresji kilku genów położonych blisko siebie [40–42]. Promotory dla różnych grup genów

(geny rRNA, tRNA oraz geny kodujące białka) są podobne [20,40]. Sekwencje promotorów w genomach mitochondrialnych są bardzo zmienne i słabo zachowane pomiędzy różnymi gatunkami roślin okrytozalążkowych [43,44]. Cechą unikalną procesu transkrypcji w roślinnych mitochondriach jest obecność kilku promotorów dla pojedynczego genu [44]. Znaczenie tego zjawiska jest nieznane. Jednym z możliwych jest regulacja poziomu transkrypcji poszczególnych genów.

Kolejną cechą charakterystyczną transkrypcji w mitochondriach roślin jest to, że transkrypcji ulegają nie tylko fragmenty mtDNA kodujące geny, ale również obszary niekodujące. Ekspresji mogą ulegać także nici antysensowe. Na przykład, dla 5 przebadanych genów u *A. thaliana* oprócz normalnych transkryptów znaleziono również ich antysensowe odpowiedniki [20]. Nie wiadomo natomiast, w jaki sposób przebiega terminacja transkrypcji w roślinnych mitochondriach, bowiem jak dotychczas nie zdefiniowano miejsc terminacji transkrypcji [20]. Niewykluczone, że takich miejsc nie ma, a terminacja transkrypcji jest wyznaczana określoną procesywnością polimerazy RNA.

Porównanie ekspresji genomu mitochondrialnego u roślin i zwierząt wskazuje, że przepisaniu na RNA ulega praktycznie cała, a przynajmniej znacząca część sekwencji mtDNA u obydwu grup organizmów. Jednak stan ten jest osiągnany w zupełnie odmienny sposób. U zwierząt obszary mtDNA ulegające transkrypcji są ściśle zdefiniowane. Natomiast wydaje się, że u roślin etap transkrypcji ma zapewnić syntezę cząsteczek RNA obejmujących duże i słabo zdefiniowane obszary mtDNA, a kontrola tego, które cząsteczki RNA są potrzebne zachodzi na etapach potranskrypcyjnych, przede wszystkim na poziomie degradacji RNA [20,42].

WYCINANIE INTRONÓW

Jednym z etapów potranskrypcyjnej obróbki RNA w mitochondriach roślinnych, nie występującym w mitochondriach zwierzęcych jest wycinanie intronów. Brak intronów w genomach mitochondriów zwierzęcych, jest związany zapewne z silną tendencją do eliminacji zbędnych sekwencji DNA z tych genomów. W genomie mitochondrialnym *A. thaliana* introny stanowią około 9% sekwencji mtDNA [17]. Geny znajdujące się w tym genomie zawierają 23 introny grupy II o długości od 485 do 4000 nukleotydów. Niektóre geny zawierają więcej niż jeden intron. Jeden z intronów w genie *nad1* koduje maturazę (gen *mat-R*) [15,19]. Zupełnie wyjątkowym zjawiskiem, które występuje w mitochondriach roślinnych jest obecność intronów ulegających wycinaniu z pozycji trans (ang. *trans-splicing introns*) [19]. W wyniku częstych rekombinacji występujących w mitochondrialnych genomach roślin może się zdarzyć, że gen zostanie rozerwany w obrębie intronu. Powstałe dwie oddalone od siebie części genu ulegają niezależnej transkrypcji. W procesie trans-wycinania dochodzi do złożenia dwóch transkryptów kodujących odpowiadające sobie połówki genu, odtworzenia odpowiedniej struktury rozerwanego intronu, a następnie do jego wycięcia. Przykładowo, w genomie mitochondrialnym *A. thaliana* i ryżu znaleziono odpowiednio 5 i 6 takich „trans-intronów”. Niektóre geny zawierają dwa lub trzy „trans-introny”, co oznacza, że ostateczne cząsteczki mRNA są składane z 3-4 niezależnie powstałych transkryptów [19].

REDAGOWANIE RNA

Jedną z najbardziej zdumiewających cech potranskrypcyjnej obróbki RNA w mitochondriach roślin jest wykorzystanie na szeroką skalę zjawiska redagowania RNA, którego nie obserwuje się w mitochondriach zwierząt. Redagowanie w mitochondriach roślinnych polega na zamianie U w C, albo C w U w RNA, przy czym ten drugi typ modyfikacji jest znacznie bardziej rozpowszechniony. Wykonane w 1999 roku porównanie sekwencji mitochondrialnego genomu *A. thaliana* z sekwencjami cDNA pozwoliło na zidentyfikowanie 441 miejsc ulegających redagowaniu [45], aczkolwiek od tamtego czasu ukazały się prace opisujące kolejne miejsca ulegające redagowaniu [20,41]. Redagowanie dotyczy głównie fragmentów RNA kodujących białka. Stosunkowo niewiele miejsc ulegających redagowaniu występuje w sekwencjach niekodujących, zaś redagowanie rRNA i tRNA zdarza się stosunkowo rzadko. Dokładna rola redagowania RNA nie jest znana. Jednak analizy wykonane dla *A. thaliana* sugerują, że redagowanie na ogół prowadzi do zwiększenia hydrofobowości białek mitochondrialnych. Przykładowo, spośród 425 kodonów ulegających redagowaniu u *A. thaliana* 41,5% koduje przed redagowaniem aminokwasu o charakterze hydrofobowym. Po ich przeredagowaniu udział aminokwasów hydrofobowych wzrasta do 85% [45]. W redagowaniu RNA uczestniczą białka z rodziny PPR kodowane w jądrze komórkowym [46]. Zatem, ostateczna sekwencja białek syntetyzowanych w mitochondriach roślin wyższych zależy nie tylko od sekwencji mtDNA, ale częściowo jest zapisana w DNA jądrowym w postaci białek odpowiedzialnych za redagowanie RNA.

DOJRZEWANIE KOŃCÓW 3' I 5' TRANSKRYPTÓW

W genomie mitochondrialnym człowieka geny rRNA i prawie wszystkie geny kodujące białka są otoczone genami kodującymi tRNA, które odgrywają kluczową rolę w obróbce policistronowych transkryptów RNA. Postuluje się, że transkrypty rRNA i mRNA są niejako ubocznymi produktami wycinania cząsteczek tRNA z policistronowych prekursorów [47]. W pierwszej kolejności jest uwalniany koniec 5' tRNA, a następnie jego koniec 3'. Za obróbkę końców 5' i 3' tRNA są odpowiedzialne, odpowiednio, rybonukleaza P oraz tRNAza Z [48,49]. Uwolnione cząsteczki rRNA są wbudowywane w rybosomy, natomiast cząsteczki tRNA i mRNA są poddawane dalszym obróbkom. W przypadku tRNA jest to dodanie sekwencji -CCA przez nukleotydylotransferazę ATP(CTP) specyficzną dla tRNA i modyfikacje określonych zasad azotowych. Natomiast ostatnim etapem obróbki cząsteczek mRNA jest ich poliadenylacja.

W mitochondriach roślin cząsteczki tRNA są syntetyzowane jako dłuższe, mono- lub policistronowe prekursorzy [40]. Nadmiarowe sekwencje po stronie 5' i 3' są następnie usuwane przez rybonukleazę P oraz RNAzę Z [38,50]. Następnie cząsteczka tRNA ulega dalszym modyfikacjom. Podobnie, jak w przypadku mitochondriów zwierzęcych jest to dodanie sekwencji -CCA oraz modyfikacje zasad azotowych. Niedawno okazało się, że w mitochondriach roślin rybonukleaza P oraz RNAza Z uczestniczą także w obróbce prekursorów cząsteczek mRNA [41]. Jak już wcześniej wspomniano, mitochondrialne transkrypty u roślin nie mają ściśle zdefiniowanych miejsc terminacji. Tymczasem okazało się, że cząsteczki mRNA u *A.*

thaliana mają ściśle zdefiniowany koniec 3'. Wykazano, że na końcach 3' transkryptów mRNA występują struktury w postaci jednej lub kilku tzw. szpilek do włosów (ang. *stem-loop structures*) lub tzw. elementy t, które swoją strukturą przypominają strukturę tRNA. Jedną z funkcji tych struktur jest nakierowywanie RNAzy P i/lub RNAzy Z w odpowiednie miejsce prekursora mRNA w celu utworzenia odpowiedniego końca 3'. Drugą istotną funkcją elementów t i szpilek do włosów na końcach 3', o której warto wspomnieć, jest regulacja stabilności cząsteczek mRNA [51]. Sugeruje się, że RNAzy P i Z uczestniczą także w formowaniu końca 5' mRNA w mitochondriach roślinnych [41]. Stwierdzono bowiem, że końce 5' niektórych dojrzałych cząsteczek mRNA nie pokrywają się z początkiem transkrypcji. Obecność na tych końcach elementów t, wskazuje, że najprawdopodobniej powstały one w wyniku endonukleolitycznego cięcia wykonywanego przez RNAzę P/RNAzę Z. Zatem uzyskane dotychczas wyniki pozwalają stwierdzić, że kluczową rolę w dojrzewaniu cząsteczek RNA w mitochondriach zwierzęcych, jak i roślinnych odgrywają dwa enzymy, RNAza P oraz RNAza Z.

POLIADENYLACJA CZĄSTECZEK mRNA

Ostatnim etapem obróbki mRNA spotykanym w mitochondriach roślin i zwierząt jest poliadenylacja, czyli dodanie fragmentu poli(A) na końcu 3' transkryptu, ale jej rola istotnie różni się u tych dwóch grup organizmów. W mitochondriach roślinnych dodanie „ogona” poli(A) kieruje transkrypt na drogę degradacji, podobnie jak to się dzieje u bakterii i w chloroplastach [52]. Z kolei, funkcja poliadenylacji w odniesieniu do stabilności transkryptów mRNA w mitochondriach ssaków nie jest całkowicie jasna. Usunięcie ogona poli(A) powoduje zmiany (wzrost lub spadek) w poziomie poszczególnych transkryptów mRNA, co sugeruje, że poliadenylacja może uczestniczyć w regulacji stabilności RNA w mitochondriach człowieka [53]. Jedyną dobrze udokumentowaną funkcją poliadenylacji w mitochondriach ssaków jest tworzenie kodonów STOP. Z powodu wysokiego upakowania informacji genetycznej niektóre transkrypty, takie jak ND1, ND2, ND3, ND4/4L, COX3 i Cyt. b posiadają tylko jedną lub dwie litery kodonu STOP zakodowane w mtDNA. Pełny kodon STOP UAA jest tworzony przez dodanie adenin do końca 3' powstałego transkryptu [47].

TRANSLACJA I KOD GENETYCZNY

Jedną z cech odróżniających system translacji w mitochondriach roślin od zwierząt jest wielkość rybosomów. Współczynnik sedymentacji rybosomów w mitochondriach roślinnych wynosi 70–80S i nie różni się znacząco od rybosomów bakteryjnych (ok. 70S). Natomiast rybosomy w mitochondriach zwierzęcych są zdecydowanie mniejsze (55–60S) [54]. Jednak najbardziej wyróżniającą się cechą systemu translacji w mitochondriach jest odmienne wykorzystanie niektórych kodonów. U zwierząt jest to przede wszystkim związane z wykorzystaniem odmiennego kodu genetycznego. W mtDNA zwierząt kodon TGA nie jest kodonem STOP, ale koduje tryptofan. Ponadto, kodon ATA koduje metioninę zamiast izoleucyny. Kodony AGA oraz AGG nie kodują argininy, lecz kodony STOP. Zmieniony kod genetyczny mitochondriów zwierzęcych jest konsekwencją maksymalnego uproszczenia dekodowania informacji genetycznej. To uproszczenie sprawia, że 18 aminokwasów posiada tylko po

jednym rodzaju tRNA, do którego może być przyłączone. Jedynie w przypadku leucyny i seryny występują po dwa rodzaje tRNA. Dzięki temu uproszczeniu możliwe było zmniejszenie liczby genów tRNA do absolutnego minimum, jakim jest liczba 22 genów obecnych w mtDNA zwierząt [18].

Kod genetyczny mitochondriów roślinnych nie odbiega od uniwersalnego kodu genetycznego, chociaż doszukano się kilku odstępstw dotyczących kodonu START. We wszystkich opisanych dotychczas systemach translacji pierwszym kodonem każdego białka jest kodon ATG kodujący metioninę. Tymczasem w genie *mttB* obecnym w mtDNA *A. thaliana* pierwszym kodonem jest kodon AAT, kodujący argininę, natomiast białko *mat-R* rozpoczyna się od kodonu GGG, białko *ccb203* – od kodonu GTG [17]. Kodon GTG służy również jako kodon start w genie *rpl16* w mitochondriach wiesiołka [55]. Odstępstwo od standardowego kodonu START zaobserwowano także w przypadku genu ND2 obecnego w mtDNA człowieka. Gen ten zaczyna się od kodonu ATT, jednak w przypadku mitochondriów zwierzęcych kodon ten koduje metioninę, będącą typowym aminokwasem, od którego zaczyna się synteza białka [56].

REGULACJA EKSPRESJI mtDNA

Główną funkcją genomu mitochondrialnego jest zapewnienie syntezy kilkunastu podjednostek kompleksów zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Pozostałe podjednostki tych kompleksów są kodowane w jądrze komórkowym i syntetyzowane w cytoplazmie. Zatem, jednym z ważnych elementów ekspresji genów w mitochondriach jest koordynacja ilości podjednostek kodowanych w mtDNA z ilością podjednostek importowanych z cytoplazmy. Ta kontrola może zachodzić na kilku poziomach. W mitochondriach zwierzęcych główna kontrola odbywa się na poziomie inicjacji transkrypcji [57,58]. Transkrypcja mtDNA jest regulowana przez szereg czynników, takich jak: TFAM, TFB1M, TFB2M i mTERF [57]. U roślin regulacja transkrypcji mtDNA jest nadal procesem mało zbadanym. Jednak sądzi się, że główna kontrola ekspresji genomu mitochondrialnego zachodzi na etapach potranskrypcyjnych, takich jak degradacja RNA oraz degradacja białek [20,42,59]. Degradacja białek jest procesem szczególnie istotnym dla biogenezy wysokocząsteczkowych kompleksów mitochondrialnych, złożonych z białek kodowanych w genomie mitochondrialnym i jądrowym [59]. Głównymi enzymami zaangażowanymi w usuwanie białek нефункциональных, bądź białek syntetyzowanych w nadmiarze są zależne od ATP proteazy. Degradacja z udziałem tych proteaz jest procesem specyficznym, co oznacza, że dany typ proteazy ma określone substraty. Zależne od ATP proteazy wykryto zarówno w mitochondriach zwierząt [60], jak i roślin [61,62]. Regulacja ekspresji genów na poziomie białka w mitochondriach roślin ma dodatkowy, unikalny aspekt związany z degradacją białek częściowo zredagowanych. Przeprowadzone badania wskazują bowiem, że wszystkie mRNA, niezależnie od ich stopnia zredagowania są matrycami do syntezy białek, ale tylko białka w pełni zredagowane są składnikami kompleksów mitochondrialnych [59]. Zatem, selekcja prawidłowych białek następuje na etapie potranslacyjnym.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w tym artykule przeglądowym różnice w sposobie przechowywania informacji genetycznej i jej odczytywania obrazują kierunek ewolucji mitochondriów roślinnych i zwierzęcych. Wyróżniającą się cechą mitochondriów zwierzęcych jest dążenie do maksymalnej redukcji informacji genetycznej. Wiąże się to z małą liczbą genów i eliminowaniem zbędnych sekwencji mtDNA. Dążenie do maksymalnego uproszczenia obserwuje się również na poszczególnych etapach ekspresji mtDNA. O sile tego dążenia świadczy zmiana kodu genetycznego, który jest jedną z najbardziej uniwersalnych cech wspólnych wszystkim organizmów żywych. Mitochondria roślin charakteryzują się nagromadzeniem nietypowych rozwiązań dotyczących przechowywania i ekspresji informacji genetycznej. Niektóre z nich (np. redagowanie RNA, występowanie „trans-intronów”, rekombinacja mtDNA) są wprawdzie spotykane w mitochondriach innych grup systematycznych, ale w żadnej z nich nie występują na tak szeroką skalę. Nieliczne dane dotyczące roślin niższych wskazują, że większość z tych nietypowych rozwiązań pojawiło się na etapie powstania roślin okrytozalążkowych. Bodźcem do wielu zmian mogło być zmniejszenie kontroli nad wielkością oraz strukturą genomu mitochondrialnego, w której utrzymaniu pierwszoplanową rolę odgrywa rekombinacja. Istotną cechą decydującą o wielu właściwościach mitochondriów roślinnych jest ich otwartość na informację genetyczną pochodzącą z zewnątrz. W mitochondrialnym genomie roślin identyfikowane są nie tylko cząsteczki DNA chloroplastowego czy jądrowego pochodzące z tego samego organizmu, ale również DNA gatunków niespokrewnionych. W niektórych przypadkach włączana informacja genetyczna może zostać zaadoptowana do pełnienia określonej funkcji. Stosunkowo mała zmienność struktury mtDNA u kręgowców, a zwłaszcza u ssaków, wskazuje, że główny cel ewolucyjny został przez nie osiągnięty i ich genomy mitochondrialne nie ulegają dużym zmianom ewolucyjnym. Porównanie opisanych dotychczas genomów mitochondrialnych różnych gatunków roślin okrytozalążkowych pokazuje, że różnią się one nie tylko wielkością, ale również zestawem genów i ich ułożeniem w genomie. Wskazuje to, że genomy mitochondrialne u roślin nadal podlegają intensywnej ewolucji.

PIŚMIENICTWO

1. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481
2. Gabaldón T, Huynen MA (2007) From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput Biol* 3: e219
3. Andersson SG, Kurland CG (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Opin Microbiol* 2: 535-541
4. Bullerwell CE, Gray MW (2004) Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol* 7: 528-534
5. Powolny A, Jańska H (2000) Wewnątrzkomórkowy transfer genów. *Postępy Biochem* 46: 227-233
6. Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767-1780
7. Nugent JM, Palmer JD (1991) RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66: 473-481
8. Wischmann C, Schuster W (1995) Transfer of *rps10* from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA-mediated

- transfer and exon shuffling at the integration site. *FEBS Lett* 374: 152-156
9. Rhoads DM, Subbiah CC (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7: 177-194
10. Pesaresi P, Schneider A, Kleine T, Leister D (2007) Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol* 10: 600-606
11. Leister D (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene* 18: 110-116
12. Kubo T, Newton KJ (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8: 5-14
13. Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19: 709-716
14. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465
15. Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 15: 57-61
16. Klein M, Eckert-Ossenkopp U, Schmiedeberg I, Brandt P, Unsel M, Brennicke A, Schuster W (1994) Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones. *Plant J* 6: 447-455
17. Marienfeld J, Unsel M, Brennicke A (1999) The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci* 4: 495-502
18. Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410: 103-123
19. Bonen L (2008) Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion* 8: 26-34
20. Holec S, Lange H, Kühn K, Alioua M, Börner T, Gagliardi D (2006) Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol* 26: 2869-2876
21. Clayton DA (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 141: 217-232
22. Salinas T, Duchêne AM, Delage L, Nilsson S, Glaser E, Zaepfel M, Marechal-Drouard L (2006) The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18362-18367
23. Koulintchenko M, Konstantinov Y, Dietrich (2003) Plant mitochondria actively import DNA *via* the permeability transition pore complex. *EMBO J* 22: 1245-1254
24. Arrieta-Montiel M, Lyžnik A, Wołoszyńska M, Jańska H, Tohme J, Mackenzie S (2001) Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. *Genetics* 158: 851-864
25. Backert S, Nielsen BL, Börner TC (1999) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 477-483
26. Kmiec B, Wołoszyńska M, Jańska H (2006) Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr Genet* 50: 149-159
27. Carlsson J, Leino M, Sohlberg J, Sundström JF, Glimelius K (2008) Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* 8: 74-86
28. Handa H (2008) Linear plasmids in plant mitochondria: peaceful co-existences or malicious invasions? *Mitochondrion* 8: 15-25
29. Eyre-Walker A, Smith NH, Smith JM (1999) How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci* 266: 477-483
30. Piechota J, Tońska K, Nowak M, Kabzińska D, Lorenc A, Bartnik E (2004) Comparison between the Polish population and European populations on the basis of mitochondrial morphs and haplogroups. *Acta Biochim Polon* 51: 883-895

31. Galtier N, Enard D, Radondy Y, Bazin E, Belkhir K (2006) Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res* 16: 215-222
32. Innan H, Nordborg M (2002) Recombination or mutational hot spots in human mtDNA? *Mol Biol Evol* 19: 1122-1127
33. Jańska H, Wołoszyńska M (1997) The dynamic nature of plant mitochondrial genome organization. *Acta Biochim Polon* 44: 239-250
34. Wołoszyńska M, Kieleczawa J, Ornatowska M, Woźniak M, Jańska H (2001) The origin and maintenance of the small repeat in the bean mitochondrial genome. *Mol Genet Genomics* 265: 865-872
35. Jańska H, Sarria R, Wołoszyńska M, Arrieta-Montiel M, Mackenzie SA (1998) Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10: 1163-1180
36. Abdelnoor RV, Yule R, Elo A, Christensen AC, Meyer-Gauen G, Mackenzie SA (2003) Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5968-5973
37. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, Zeviani M (1997) Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet* 6: 615-625
38. Barr CM, Neiman M, Taylor DR (2005) Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol* 168: 39-50
39. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 679-699
40. Binder S, Brennicke A (1993) A tRNA gene transcription initiation site is similar to mRNA and rRNA promoters in plant mitochondria. *Nucleic Acids Res* 21: 5012-5019
41. Forner J, Weber B, Thuss S, Wildum S, Binder S (2007) Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Res* 35: 3676-3692
42. Giegé P, Hoffmann M, Binder S, Brennicke A (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria. *EMBO Rep* 1: 164-170
43. Binder S, Brennicke A (1993) Transcription initiation sites in mitochondria of *Oenothera berteriana*. *J Biol Chem* 268: 7849-7855
44. Kühn K, Weihe A, Börner T (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 33: 337-346
45. Giegé P, Brennicke A (1999) RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15324-15329
46. Shikanai T (2006) RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol Life Sci* 63: 698-708
47. Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290: 470-474
48. Puranam RS, Attardi G (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol* 21: 548-561
49. Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Levinger L, Schiffer S, Marchfelder A (2004) Drosophila RNase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic Acids Res* 32: 255-262
50. Kunzmann A, Brennicke A, Marchfelder A (1998) 5' end maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 108-113
51. Kuhn J, Tengler U, Binder S (2001) Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol Cell Biol* 21: 731-742
52. Gagliardi D, Stepien PP, Temperley RJ, Lightowers RN, Chrzanowska-Lightowers ZM (2004) Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends Genet* 20: 260-267
53. Piechota J, Tomecki R, Gewartowski K, Szczęsny R, Dmochowska A, Kudła M, Dybczyńska L, Stępień PP, Bartnik E (2006) Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells. *Acta Biochim Polon* 53: 157-168
54. Leaver CJ, Harmey MA (1976) Higher-plant mitochondrial ribosomes contain a 5S ribosomal ribonucleic acid component. *Biochem J* 157: 275-277
55. Bock H, Brennicke A, Schuster W (1994) Rps3 and rpl16 genes do not overlap in *Oenothera* mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? *Plant Mol Biol* 24: 811-818
56. Peabody DS (1989) Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem* 264: 5031-5035
57. Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97: 673-683
58. Piechota J, Szczęsny R (2004) Wybrane aspekty biogenezy białek łańcucha oddechowego w mitochondriach ssaków. *Postępy Biochem* 50: 228-239
59. Binder S, Brennicke A (2003) Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 181-189
60. Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 221-242
61. Kołodziejczak M, Kolaczkowska A, Szczęsny B, Urantowka A, Knorpp C, Kieleczawa J, Jańska H (2002) A higher plant mitochondrial homologue of the yeast m-AAA protease. Molecular cloning, localization, and putative function. *J Biol Chem* 277: 43792-43798
62. Urantowka A, Knorpp C, Olczak T, Kołodziejczak M, Jańska H (2005) Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. *Plant Mol Biol* 59: 239-252

Evolution of the mitochondrial DNA and its expression system – comparison between animal and plant kingdom

Janusz Piechota, Hanna Jańska

Laboratory of Molecular Cell Biology, University of Wrocław, 66/73 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

* e-mail: Hanna.Janska@ibmb.uni.wroc.pl

Keywords: mitochondrial genome, mtDNA, evolution, plants, animals

ABSTRACT

The information about features of the Eukaryotic cells is maintained not only in the nucleus, but also in the extranuclear genomes localized in mitochondria and chloroplasts. Comparison between plant and animal mitochondrial genomes allows to perceive two extremely distinct evolution strategies. Animals clearly tend to reduce the size of the mitochondrial genome to the minimum. In accordance with this, the simplification in decoding of genetic information present in the genome is observed. On the contrary, plant mitochondrial genomes tend to increase their size. Accumulation of extraordinary solutions for maintaining and expression of genetic information present in the genome is the second distinctive feature of plant mitochondria.

Występowanie mutacji w mtDNA i ich potencjalny wpływ na strukturę białek w wybranych typach nowotworów

STRESZCZENIE

Badania ostatnich lat wskazują na występowanie w wielu typach nowotworów zwiększonej częstości mutacji w mitochondrialnym DNA, jednak ich znaczenie dla struktury i funkcji systemu fosforylacji oksydacyjnej nie zostało dotychczas podsumowane. W niniejszej pracy omówiono mutacje genów mitochondrialnych kodujących białka w raku prostaty, przełyku oraz w nabłonku rdzeniastym. Ze względu na fakt, że wszystkie kodowane przez genom mitochondriów polipeptydy są podjednostkami kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej, szczególną uwagę zwrócono na wpływ mutacji tego genomu na metabolizm tlenowy komórki.

WPROWADZENIE

BUDOWA I FUNKCJA MITOCHONDRIMUM

Mitochondria są organellami, w których zachodzi wiele istotnych procesów metabolicznych, takich jak cykl Krebsa, fosforylacja oksydacyjna i β -oksydacja kwasów tłuszczowych [1]. Mitochondria posiadają własny genom (mtDNA); w mitochondriach człowieka jest to kolistą cząsteczką o wielkości 16569 pz [2] i niosąca 37 genów: 13 kodujących polipeptydy, 2 geny rRNA (12S i 16S rRNA) oraz 22 geny tRNA [3]. Wszystkie polipeptydy kodowane przez DNA mitochondrialny są podjednostkami kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) (Tabela 1). Pozostałe białka mitochondrialne są kodowane w genie jądrowym [4].

Tabela 1. Skład podjednostkowy kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej, na podstawie [49,50].

Kompleks	Liczba podjednostek	Podjednostki kodowane w DNA jądrowym	Podjednostki kodowane w mtDNA
I	46	39	7
II	4	4	0
III	11	10	1
IV	13	10	3
V	16	14	2

Częstość powstawania mutacji w mtDNA jest wyższa niż w genie jądrowym. Jest to warunkowane czynnikami, takimi jak powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) w łańcuchu oddechowym, brak białek histonowych oraz mała wydajność systemów naprawy DNA w mitochondrium [4]. Wysoka częstość zmian w mtDNA jest przyczyną powstawania licznych polimorfizmów i mutacji [5].

Komórka nowotworowa w porównaniu ze zdrową wykazuje różnice w skwencji nukleotydowej genomu oraz różnice epigenetyczne, za czym dalej idą różnice na poziomie transkryptomu i proteomu, a w końcu na poziomie metabolomu. Komórki nowotworowe mają podwyższony poziom glikolizy oraz upośledzoną produkcję ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej [6]. Zaburzenia metabolizmu tlenowego komórek nowotworowych zostały po raz pierwszy zaobserwowane przez Otto Warburga ponad 70 lat temu, stąd obecnie teoria o obniżonym poziomie fosforylacji oksydacyjnej i podwyższonym poziomie oddychania beztlenowego w komórkach nowotworowych nazywana jest hipotezą Warburga [7].

W reakcjach dehydrogenacji, będących częścią procesów, takich jak: cykl Krebsa, β -oksydacja kwasów tłuszczowych i innych, uwolnione z substratów protony i elektrony zostają przeniesione na cząsteczki przenośników NAD⁺ (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) oraz FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy). Cząsteczki zredukowanych przenośników następnie oddają elektrony

Katarzyna Plak¹

Wojciech Kukwa²

Ewa Bartnik^{1,3}

Paweł Golik^{1,3}

Anna Ścińska²

Tomasz Krawczyk⁴

Anna M. Czarnecka^{1,5,6,8}

¹Institut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

²Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii AM, Szpital Czerniakowski, Warszawa

³Institut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

⁴Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Łódź

⁵Studium Medycyny Molekularnej, Akademia Medyczna w Warszawie, Warszawa

⁶John Petros Lab, Emory School of Medicine, Atlanta, USA (obecny adres)

⁸John Petros Lab, Emory School of Medicine, Clinic Building B, Room B4220, 1365 Clifton Rd NE, 30322 Atlanta, GA, USA; tel.: (001) 404 778 4696 lub (001) 404 822 6849, e-mail: anna.czarnecka@gmail.com lub aczarne@emory.edu

Artykuł otrzymano 3 grudnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 15 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: Nowotwory, mitochondria, mtDNA, fosforylacja oksydacyjnej, struktura białek

Wykaz skrótów: ATPaza (6,8) – podjednostki kompleksu ATPazy V; Cyt b – cytochrom b, mtDNA – DNA mitochondrialny; ND (1-6) – podjednostki kompleksu dehydrogenazy NADH; OXPHOS – łańcuch fosforylacji oksydacyjnej; PIN – stan przednowotworowy raka prostaty

Podziękowania: Praca została wykonana w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej i w trakcie realizacji projektów badawczych MNiSW N401232733 i N301238633. Autorzy dziękują Panu Przemysławowi Tomalskiemu (Centre for Brain and Cognitive Development, School of Psychology, Birkbeck College, UK) oraz Panu Radosławowi Ejsmontowi (Max Planck Institute of Cell Biology and Genetics, Technische Universität Dresden, Niemcy) za cenne uwagi i wskazówki podczas opracowywania tekstu. AMC jest stypendystką Studium Medycyny Molekularnej, Akademii Medycznej w Warszawie oraz FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe, Fulbright Junior Research Grant i The Kosciuszko Foundation Scholarship

kompleksom łańcucha oddechowego (NADH na kompleks I, natomiast FADH₂ na kompleks II). Energia uwolniona w procesie przenoszenia elektronów wzdłuż przekaźników o wzrastających potencjałach redoks jest wykorzystywana do przenoszenia protonów H⁺ w poprzek wewnętrznej błony mitochondrium, co powoduje ustalenie się różnicy potencjałów ($\Delta\psi$) i stężeń ($\Delta p\text{H}$) w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, z utworzeniem tzw. potencjału elektrochemicznego (Δp) – siły protonomotorycznej. Zgodnie z założeniami teorii chemiosmotycznej Mitchella, utworzona siła jest wykorzystywana do syntezy ATP przez tzw. pompę protonową. Rolę pompy protonowej odgrywa kompleks V systemu fosforylacji oksydacyjnej czyli syntaza ATP (F₁F₀ ATPaza, ATPaza V) [8,9] Ponadto, łańcuch oddechowy budują dwa ruchome przekaźniki elektronów (ubichinon, cytochrom c) oraz kompleksy: dehydrogenazy NADH, oksydoreduktazy bursztynianowej, cytochromów bc₁ i oksydazy cytochromu c [1,8].

Dehydrogenaza NADH (czyli kompleks I) zbudowana jest z 46 podjednostek i jest największym z kompleksów łańcucha oddechowego (masa około 1 MDa). Przenosi on elektrony z NADH na centrum zawierające FMN (mononukleotyd flawinowy), a potem przez serię centrów żelazo-siarkowych na ubichinon. Uwolniona energia zostaje wykorzystana do przeniesienia protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Struktura kompleksu I nie jest jeszcze dostatecznie zbadana, jednak z badań nad kompleksem z serca wołu wiadomo, że ma on kształt litery L, której jedno ramię zanurzone jest w macierzy mitochondrialnej, a drugie – w błonie wewnętrznej, a wszystkie siedem podjednostek kodowanych mitochondrialnie znajduje się w ramieniu błonowym [1,9,10].

Kompleks II, którego częścią jest dehydrogenaza bursztynianowa, zbudowany jest z czterech podjednostek kodowanych w genomie jądrowym. Jest on zaangażowany nie tylko w proces fosforylacji oksydacyjnej, ale też w cykl Krebsa (utlenianie bursztynianu do fumaranu). Uwolnione z bursztynianu elektrony są przenoszone na FAD znajdujący się w centrum aktywnym enzymu. Elektrony te przenoszone są na ubichinon z pominięciem kompleksu I.

Kompleks III (czyli kompleks cytochromów bc₁) występuje w postaci dimeru. Każda monomer składa się z 11 podjednostek, w tym jednej kodowanej przez DNA mitochondrialne (cytochrom b). Cytochrom b posiada dwie grupy hemowe zwane grupami b_L i b_H (grupy hemowe odpowiednio o niskim i wysokim potencjale oksydoredukcyjnym). Oprócz cytochromu b jeszcze dwie podjednostki kompleksu III posiadają centra aktywne: białko żelazo-siarkowe z centrum Rieske'go oraz cytochrom c₁ [11].

Oksydaza cytochromowa (kompleks IV), składa się z 13 podjednostek, których struktura została dość dobrze zbadana. Rdzeń kompleksu, a zarazem jego część katalityczną, tworzą trzy podjednostki kodowane w genomie mitochondrialnym (COX1, COX2 i COX3) [1]. Cytochrom c oddaje elektron na centrum zawierające miedź w podjednostce COX2 (centrum CuA), skąd przekazywany jest na leżący w pobliżu cytochrom a podjednostki COX1, a potem na cytochrom a₃ połączony z centrum miedziowym Cu_B, gdzie

następuje redukcja tlenu. Redukcji jednej cząsteczki tlenu towarzyszy pobranie czterech jonów wodorowych z macierzy mitochondrialnej (zostają zużyte do utworzenia dwóch cząsteczek wody) oraz jednoczesne przeniesienie czterech protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej [1]. Protony przenoszone są poprzez trzy kanały (D, K i H), które łączą centrum aktywne z macierzą mitochondrialną [12].

Kompleks V (syntazy ATP), w którego skład wchodzi dwa białka kodowane przez genom mitochondrialny (ATP6 i ATP8), składa się z dwóch części: F₁ i F₀. Część F₀ jest transbłonowa i stanowi kanał dla przepływu protonów. Podjednostka F₁ znajduje się po stronie matriks mitochondrialnej i była porównywana do pęcherzyka na wewnętrznej błonie mitochondrium. Podjednostkę F₁ tworzą dwie części: rotor i stator. Przepływ protonów przez podjednostkę transbłonową wymusza ruch rotora względem statora. Zmiany w konformacji, które zachodzą w trakcie ruchu warunkują powstawanie ATP [1].

MUTACJE W mtDNA A FOSFORYLACJA OKSYDACYJNA

Dziedziczne mutacje w genach polipeptydów kodowanych w mitochondrialnym DNA mogą powodować zaburzenia funkcji systemu fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), których efektem jest szereg poważnych zespołów chorobowych, takich jak LHON (ang. *Leber hereditary optic neuropathy*), NARP (ang. *neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa*), czy MELAS (ang. *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) [13]. Badania przeprowadzone przez Plasterera i wsp. wskazują, że mutacje związane z rozwojem chorób mitochondrialnych mogą wpływać na funkcjonowanie kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej m. in. wskutek zaburzenia struktury białek – wpływając na stabilność białek OXPHOS lub na oddziaływanie między podjednostkami kompleksów [14]. Zaburzenia funkcji łańcucha fosforylacji oksydacyjnej mogą prowadzić do obniżenia efektywności syntezy ATP, jak też do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu. Reaktywne formy tlenu powstają, gdy centra flawinowe lub żelazo-siarkowe łańcucha oddechowego oddają elektrony bezpośrednio na tlen z pominięciem pozostałych elementów łańcucha [15]. Produkowane w nadmiarze reaktywne formy tlenu wywołują stres oksydacyjny, w wyniku którego powstawać mogą liczne uszkodzenia, w tym mutacje DNA.

ZABURZENIA W SYSTEMIE FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ W PROCESIE NOWOTWORZENIA

W ostatnich latach stwierdzono, że w komórkach nowotworowych z dużą częstością pojawiają się somatyczne mutacje w mtDNA. Bezpośrednie konsekwencje mutacji mtDNA dla metabolizmu i podziałów komórki nowotworowej pozostają jednak wciąż niewyjaśnione. Niemniej jednak dwie grupy badawcze przeprowadziły eksperymenty na modelach zwierzęcych, mające udowodnić, iż mutacje w mtDNA promują rozwój nowotworu [16,17]. W badaniach tych posłużono się tzw. cybrydami, czyli liniami komórkowymi powstałymi przez przeniesienie mitochondriów komórek z różnymi wariantami mtDNA do komórek pozbawionych uprzednio własnego mtDNA (*rho0*)

komórek takich linii jak HeLa (rak szyjki macicy) lub PC3 (rak prostaty).

Shidara i wsp. [16] wykazali, że opisane wcześniej u pacjentów z zespołem Leigha mutacje w podjednostce ATP6 – T8993G i T9176C [19,20] wpływają na szybkość formowania się nowotworu u myszy bezgranicznych (ang. *nude mice*). Mysiom wstrzykiwano cybrydy linii komórkowych HeLa: 1) z mitochondriami komórek chorych z zespołem Leigh'a lub 2) z mitochondriami o niezmutowanym mtDNA. U myszy, którym podano komórki HeLa niosące zmutowane mtDNA rozwój nowotworu we wczesnym jego stadium był szybszy niż u myszy, którym wstrzyknięto komórki z dzikim typem mtDNA, co wskazuje, iż genotyp mtDNA ma odbicie w fenotypie komórki nowotworowej. Szybszy wzrost nowotworu w tym eksperymencie spowodowany był częstszymi podziałami komórek nowotworowych [16].

Podobne wyniki otrzymała grupa Petrosa i wsp. [17], która badała wpływ mutacji T8993G na rozwój nowotworu u myszy. Przygotowano komórki cybrydowe linii PC3 (linia wyprowadzona z nowotworu prostaty), z mitochondriami posiadającymi w mtDNA mutację T8993G, oraz komórki kontrolne – linia PC3 z mitochondriami o niezmutowanym mtDNA. Po 110 dniach od wstrzyknięcia myszom cybryd, nowotwór, który rozwinął się z komórek niosących zmutowane mtDNA miał siedmiokrotnie większą objętość w porównaniu do nowotworu powstającego z komórek linii cybrydowej z dzikim typem mtDNA [17].

Obydwie badane mutacje (T8993G i T9176C) powodują zmianę zachowywanej ewolucyjnie reszty aminokwasu w

podjednostce ATP6. Mutacja T8993G powoduje zamianę reszty leucyny (Leu) w pozycji 156 łańcucha polipeptydowego na resztę argininy (Arg). Zamiana leucyny, która jest małym, hydrofobowym aminokwasem, na dużą, dodatnio naładowaną, hydrofilową argininę [20] w obrębie sekwencji silnie zachowywanej ewolucyjnie może być przyczyną patologicznego efektu, co zostało zasugerowane w pracy Plasterera i wsp. [14]. Mutacja T9176C, opisana u pacjentów z lżejszym przebiegiem klinicznym zespołu Leigha, powoduje zamianę reszty leucyny (Leu) w pozycji 217 w resztę proliny (Pro). Mutacja ta także występuje w obrębie sekwencji zachowywanej ewolucyjnie, a ponadto reszta aminokwasu 217 znajduje się w obrębie α -helisy sąsiadującej z resztą Leu 156 i ze względu na to położenie wydaje się mieć podobną funkcję. Mutacja może też zaburzać strukturę samej α -helisy ze względu na właściwości proliny, która nie tworzy odpowiednich wiązań wodorowych [20].

PATOFIZJOLOGIA MUTACJI mtDNA W WYBRANYCH TYPACH NOWOTWORÓW

NOWOTWORY PROSTATY

Nowotwory prostaty stanowią 33% (234460 nowych przypadków rocznie według danych z 2006 roku) zachorowań na wszystkie typy nowotworów w populacji mężczyzn w Stanach Zjednoczonych. Stanowią też trzecią przyczynę śmierci na raka wśród mężczyzn w USA [21]. W Polsce w roku 1999 nowotwór prostaty wykryto u 6016 pacjentów, a 3114 mężczyzn zmarło z jego powodu. Był to trzeci pod względem częstości występowania nowotwór u mężczyzn, a czwarty pod względem śmiertelności [22]. Nowotwory prostaty spotykane są głównie u starszych mężczyzn. Dokładne badania przeprowadzone na mężczyznach zmarłych w wieku 60–70 lat z powodów innych niż rak prostaty wykazały, że tylko co 3 z badanych nie miał żadnych zmian nowotworowych w obrębie gruczołu krokowego [23].

Tabela 2 prezentuje zmiany sekwencji nukleotydowej w podjednostce COX1 w nowotworach przebadanych przez grupę Petrosa i wsp. [17]. Tylko dwie z dwudziestu znalezionych mutacji (G5949A i G6924T) mogą być uznane za mutacje somatyczne; różnice w sekwencji występują tylko w tkance nowotworu, brak ich natomiast w mtDNA limfocytów. Pozostałe zmiany są wariantami mitochondrialnego DNA obecnymi zarówno w DNA tkanki zdrowej jak i tkance zmienionej nowotworowo [17]. Petros i wsp. wykonali analizę zależności między występowaniem wariantów w podjednostce COX1 a występowaniem nowotworów prostaty. W grupie 54 pacjentów bez nowotworu prostaty (wiek powyżej 50 lat, brak komórek rakowych w biopsji prostaty) znaleziono warianty mtDNA w podjednostce COX1 u 1,9% pacjentów, podczas gdy w grupie 260 pacjentów z nowotworem prostaty warianty występowały u 12% badanych. W grupie 1019 osób z populacji ogólnej warianty w podjednostce COX1 występowały u 7,8% badanych. Badania te na poziomie ufności 0,985

Tabela 2. Warianty mitochondrialnego DNA oraz mutacje somatyczne znalezione w nowotworach prostaty (pozycje 1-20 na podstawie [17], pozycje 21-24 na podstawie [30]). Mutacje w niekodujących fragmentach mtDNA i tRNA nie zostały uwzględnione.

	Zmiana nukleotydu	Gen	Zmiana aminokwasu
1	C5911T	COX1	Ala – Val
2	G5913A	COX1	Asp – Asn
3	A5935G	COX1	Asn – Ser
4	G5949A	COX1	Gly – STOP
5	G5973A	COX1	Ala – Thr
6	G6081A	COX1	Ala – Thr
7	G6150A	COX1	Val – Ile
8	T6253C	COX1	Met – Thr
9	G6261A	COX1	Ala – Thr
10	G6267A	COX1	Ala – Thr
11	G6285A	COX1	Val – Ile
12	C6340T	COX1	Thr – Ile
13	G6480A	COX1	Val – Ile
14	A6663G	COX1	Ile – Val
15	G6924T	COX1	Ala – Ser
16	G7041A	COX1	Val – Ile
17	T7080C	COX1	Phe – Leu
18	A7083G	COX1	Ile – Val
19	A7158G	COX1	Ile – Val
20	A7305C	COX1	Met – Leu
21	A3434G	ND1	Cys – Tyr
22	A3505G	ND1	Thr – Ala
23	11032	ND4	del
24	G14053A	ND5	Ala – Thr

```

P00395 -----MFADRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGVLGT
P00396 -----MFINRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGMVGT
P00399 -----MSRQWLFSTNHKDIGTLYFIFGAWAGMVGT
P60620 -----MKNLVRWLFSTNHKDIGTLYFIFGAIAGVMGT
Q9MIY8 -----MTITRWFSTNHKDIGTLYLVFGAWAGMVGT
P00402 KENIKQIESSSFLTFKQPTIEWQERWYLSNAKDIGTLYLMLFALFSGLLGT
P33517 AIHGHEHDR-----RGFETRWFMSSTNHKDIGVLYLFTGGVLGLISV
          : * : * : * * * * . * : . . * : . .

```

Rycina 1. Uliniowanie sekwencji białkowych podjednostki COX1. Wszystkie sekwencje pochodzą z bazy UniProtKB, z organizmów: *Homo sapiens* (P00395), *Bos taurus* (P00396), *Brachydanio rerio* (Q9MIY8), *Drosophila melanogaster* (P00399), *Aspergillus nidulans* (P00402), *Arabidopsis thaliana* (P60620), *Rhodobacter sphaeroides* (P33517). Pozycja, w której zaszła mutacja zaznaczona niebieską ramką. Uliniowanie wykonano za pomocą programu Tcoffee [53].

wskazują na istnienie zależności między badanymi cechami [17].

Zmiana C5911T powoduje substytucję reszty waliny w miejsce reszty alaniny w 3 pozycji polipeptydu COX1. Sekwencja, w obrębie której występuje mutacja nie jest zachowywana ewolucyjnie (Ryc. 1); reszty Ala i Val są niewielkie i charakteryzują podobnym punktem izoelektrycznym (pI) (Ala pI 6,107, Val pI 6,002) [20]. Ze względu na niski stopień zachowania sekwencji w ewolucji można przypuszczać, że zamiana pojedynczej reszty aminokwasowej nie ma wpływu na strukturę i funkcję polipeptydu. Również mutacja G5913A, powodująca zmianę reszty asparaginanu na resztę asparaginy w pozycji czwartej podjednostki COX1, nie wydaje się mieć wpływu na właściwości polipeptydu. Sekwencja, w obrębie której znajduje się zmieniona reszta aminokwasu jest silnie zmienna ewolucyjnie (Ryc. 1). Z kolei zmiana A5935G powoduje zmianę reszty asparaginy na resztę seryny w pozycji 11 łańcucha polipeptydowego podjednostki COX1. Sekwencja, w obrębie której znajduje się mutacja jest silnie zachowywana ewolucyjnie (Ryc. 2). W większości z przeanalizowanych sekwencji występuje reszta asparaginy (52 z 61) lub asparaginanu (7 na 61 przeanalizowanych sekwencji). Reszta seryny w tej pozycji występuje tylko w 2 z przeanalizowanych sekwencji (u *Crithidia oncopelithi*, oraz *Chlamydomonas reinhardtii*). Wysoki stopień zachowania tej sekwencji może świadczyć o istotnej roli reszty asparaginy w funkcji polipeptydu. Łańcuch boczny asparaginy może tworzyć liczne wiązania wodorowe (Ryc. 3), a

```

P00395 -----MFADRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGVLGTALSLLIRAE
P00399 -----MSRQWLFSTNHKDIGTLYFIFGAWAGMVGTLSLILIRAE
P00396 -----MFINRWLFSTNHKDIGTLYLLFGAWAGMVGTALSLLIRAE
Q9MIY8 -----MTITRWFSTNHKDIGTLYLVFGAWAGMVGTALSLLIRAE
P07657 NS---W--WTVYVNRWIFSTNAKDIALLYLFLGLVSGIIGSVFSFIIRME
P24893 NLYKKY--QGGGLAVWLESNNHKDIGTLYFIFGLWSGMVGTFSLLIRLE
P48887 -----MRWFYSTNHKDIGTLYLMLFGIWCVMVGTGLSLLIRLE
P08305 DSIEEK--RGFFTRWFMSSTNHKDIGVLYLFTAGLAGLISVTLTVYMRME
P08742 -----MTNLVRWLFSTNHKDIGTLYFIFGAIAGVMGTCSFVLIRME
P60620 -----MKNLVRWLFSTNHKDIGTLYFIFGAIAGVMGTCSFVLIRME
P18943 -----MTFINRWLFSTNHKDIGTLYLIFGTWAGMAGTALSLLIRAE
P24010 ALTEKRTRGMSLWDYLTVDHKKIAIILYLVAGGFFFLVGGIEAMFIRIQ
          : : : : * . * * . . : . : . * :

```

Rycina 2. Uliniowanie sekwencji białkowych podjednostki COX1. Wszystkie sekwencje pochodzą z bazy UniProtKB, z organizmów: *Homo sapiens* (P00395), *Bos taurus* (P00396), *Gallus gallus* (P18943), *Brachydanio rerio* (Q9MIY8), *Drosophila melanogaster* (P00399), *Albinaria coerulea* (P48887), *Schizosaccharomyces pombe* (P07657), *Pseudomonas denitrificans* (P08305), *Bacillus subtilis* (P24010), *Zea mays* (P08742), *Arabidopsis thaliana* (P60620), *Caenorhabditis elegans* (P24893). Pozycja, w obrębie której zaszła mutacja zaznaczona jest niebieską ramką. Uliniowanie wykonane zostało przy pomocy programu Tcoffee [53].

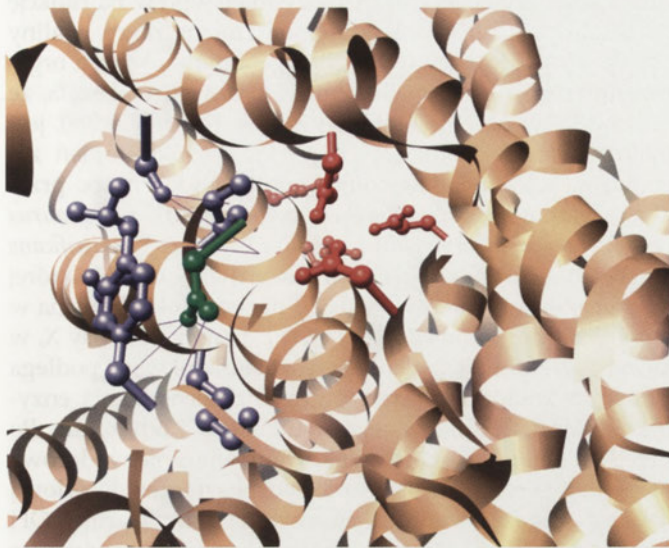
w przypadku zmiany reszty asparaginy na resztę seryny nie ma możliwości ich utworzenia. Brak ww. wiązań może destabilizować strukturę III rzędową polipeptydu. Reszta asparaginy 11 może też odgrywać rolę w tworzeniu kanału jonowego D (patrz powyżej, Kompleks IV), z powodu jej lokalizacji w pobliżu wejścia do kanału od strony macierzy mitochondrialnej.

Mutacja G5949A powoduje powstanie przedwczesnego kodonu STOP w genie COX1, a w – rezultacie brak syntezy funkcjonalnego polipeptydu (kodon STOP po wstawieniu 15 aa z 513 występujących w polipeptydzie pełnej długości).

Według Petrosa i wsp. [17] mutacja ta występowała w stanie homoplazmii w tkance nowotworu prostaty. Dodatkowo, badania immunohistochemiczne przeprowadzone na wycinku tkanki badanego nowotworu wskazywały na bardzo niski poziom podjednostki COX1 w porównaniu do tkanki zdrowej [17]. Badania nad liniami komórkowymi, do których wprowadzono mtDNA posiadające przedwczesny kodon STOP w genie COX1 (skrócenie produktu genu COX1 do 324 reszt aminokwasowych w wyniku mutacji G6930A), wykazały że skrócenie polipeptydu powoduje jego wysoką niestabilność, a co za tym idzie – szybką degradację [24]. W komórkach z mutacją powodującą powstanie przedwczesnego kodonu STOP w genie COX1, spada poziom białek COX1, jak i COX2, poziom mRNA COX2 nie jest jednak zmieniony. Obniżona jest także ilość prawidłowo złożonego kompleksu IV, co wskazuje na zaburzenia składania kompleksu oksydazy cytochromu c [24]. Podobne wyniki otrzymano też w badaniach przeprowadzonych na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. W związku z tym badacze przypuszczają, że przy braku podjednostki COX1 niemożliwe jest składanie kompleksu IV, a wolne podjednostki COX są niestabilne i ulegają proteolitycznej degradacji [25]. Wyniki badań komórek z mutacją G6930A, przeprowadzone przez D'Aurelio i wsp. [24] wykazały upośledzenie wzrostu tych komórek na pożywce z galaktozą, co również wskazuje na uszkodzenie fosforylacji oksydacyjnej. Można zatem przypuszczać, że mutacja G5949A znaleziona w nowotworze prostaty może

prowadzić do poważnego zaburzenia funkcjonowania systemu fosforylacji oksydacyjnej ze względu na silne skrócenie ramki odczytu COX1.

Mutacja G6081A powoduje zmianę reszty alaniny 60 w resztę treoniny w podjednostce COX1. Pozycja, w której miała miejsce mutacja, jest silnie zachowywana ewolucyjnie w obrębie *Eukaryota* (Ryc. 4), w większości sekwencji występują reszty aminokwasów o małych rozmiarach (alanina lub glicyna). Wysoki stopień zachowania struktury pierwszorzędowej w ewolucji jest zapewne związany z koniecznością ścisłego zachowania struktury podjednostki w obrębie tej sekwencji.



Rycina 3. Fragment podjednostki COX1 z kompleksu oksydazy cytochromu *c* z *Bos taurus*. Struktura pochodzi z bazy danych PDB [51], PDB ID 1v54 [26]. Na zielono zaznaczona Asn 11, na fioletowo – aminokwasy, z którymi tworzy wiązania wodorowe, a na czerwono – aminokwasy kluczowe dla tworzenia kanału D. Wizualizacja struktury otrzymana za pomocą programu CHIMERA [52].

Jest to związane z obecnością reszty histydyny 61, stabilizującej żelazo grupy hemowej (hemu *a*) [26]. Podstawienie reszty treoniny w miejsce alaniny może powodować lokalną destabilizację struktury helisy ze względu na fakt, że treonina posiadająca rozgałęziony łańcuch boczny, niechętnie lokalizuje się w obrębie helisy [20]. Może to mieć wpływ na destabilizację hemu *a*, a co za tym idzie również na transport elektronów poprzez hem *a*.

Z kolei zmiana G6150A powoduje zamianę reszty waliny na resztę izoleucyny w podjednostce COX1. Reszta Val 83 znajduje się przy C-końcu jednej z helis przezbłonowych, po stronie macierzy mitochondrialnej. Pozycja ta nie jest silnie zachowywana ewolucyjnie, a w jej obrębie występują różne reszty aminokwasów z grupy alifatycznych, hydrofobowych (waliny, leucyny i izoleucyny). Wszystkie te aminokwasy mają podobny punkt izoelektryczny (walina pI 5,97, izoleucyna pI 6,02, leucyna pI 6,036) [20]. Nie wydaje się, aby zamiana reszty aminokwasu w obrębie grupy tych aminokwasów miała

```

P00395 -----LLGNDHIYINVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVP LMI
P00399 -----LIGDDQIYNVIVTAHAFIMIFFMVMPIMIGGFGNWLVP LML
P00396 -----LLGDDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVP LMI
Q9MIY8 -----LLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVP LMI
P07657 -----LSGNGQLYNVAISAHGI LMIFFFIIPALFGAFGNYLVPLMI
P24893 -----FLSNGQLYNSVITAHAILMIFFMVPTMIGGFGNWL LPLML
P48887 -----LT-DDHFYINVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWMV P LLI
P08305 RLVADAAAECTPNAHLWNVVVTYHGI LMMFFVVI PALEGGFGNYFMP LHI
P08742 -----LGGNHQLYNVLI TAHAFLMIFFMVMPAMIGGFGNWFV P I LI
P60620 -----LGGNHQLYNVLI TAHAFLMIFFMVMPAMIGGFGNWFV P I LI
P18943 -----LLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVP LMI
P24010 -----FLSAQAYNEVMTMHGTTMIFLAAMPLLF-ALMNAVVP LQI
      . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Rycina 4. Uliniowanie sekwencji białkowych podjednostki COX1. Wszystkie sekwencje pochodzą z bazy UniProtKB, z organizmów: *Homo sapiens* (P00395), *Bos taurus* (P00396), *Gallus gallus* (P18943), *Brachydanio rerio* (Q9MIY8), *Drosophila melanogaster* (P00399), *Albinaria coerulea* (P48887) *Schizosaccharomyces pombe* (P07657), *Pseudomonas denitrificans* (P08305), *Bacillus subtilis* (P24010), *Zea mays* (P08742), *Arabidopsis thaliana* (P60620), *Caenorhabditis elegans* (P24893). Pozycja, w obrębie której zaszła mutacja zaznaczona jest niebieską ramką. Uliniowanie wykonano przy pomocy programu Tcoffee [53].

wywierać większy wpływ na strukturę lub funkcję polipeptydu.

Zmiana T6253C, powodująca substytucję Met 117 Thr, została opisana w podjednostce COX1 u trzech pacjentów z rozpoznaniem nowotworu prostaty. Według badania Petrosa i wsp. [17] wszyscy pacjenci należeli do haplogrupy H. Polimorfizm T6253C występuje natomiast u przedstawicieli jednej z podgrup haplogrupy H – H15. Prawdopodobnie wszyscy trzej mężczyźni mieli ten wariant mitochondrialnego DNA i w tym przypadku mamy do czynienia z polimorfizmem, a nie z mutacją. Jak do tej pory nie ma danych epidemiologicznych dotyczących częstości zapadania na nowotwory prostaty wśród mężczyzn w tej haplogrupie.

Warianty G6261A (ta zmiana została znaleziona u 6 przebadanych pacjentów, należących do 4 różnych haplogrup) i G6267A (znaleziony u jednego pacjenta) są przyczyną zmian A120T i A122T. Obydwie pozycje znajdują się w pętli pomiędzy dwiema helisami podjednostki COX1, po stronie przestrzeni międzybłonowej (Ryc. 5). Mutacja G6267A została opisana także w innych typach nowotworów (piersi i okrężnicy) oraz linii komórkowych wywodzących się z ludzkich komórek nowotworowych (trzustki, linii kostniakomięsaka, a także linii raka śluzowo-naskórkowego) [27]. Wykazano też, że linie niosące tę mutację mają obniżoną możliwość wzrostu na pożywce zawierającej galaktozę jako jedyne źródło węgla [27]. Brak możliwości wzrostu na podłożu nie zawierającym glukozy świadczy o uszkodzeniu łańcucha oddechowego. Mutacja G6267A może zatem powodować poważne zaburzenie metabolizmu komórki.

Ponieważ mutacja G6261A również powoduje zmianę reszty alaniny na resztę treoniny w obrębie tej samej pętli, w której znajduje się reszta Ala120 (Ryc. 5), wydaje się prawdopodobne, że mutacja może wywierać podobny efekt na metabolizm komórki. Jednak w wypadku mutacji G6261A brak jest dokładnych danych mogących potwierdzić tę hipotezę lub jej zaprzeczyć. Zmiana G6582A powoduje podstawienie reszty izoleucyny w miejsce reszty waliny w pozycji 128 polipeptydu. Aminokwas znajduje się w tej samej pętli, co A120 i A122 (Ryc. 6). Można jednak przypuszczać, że to podstawienie nie ma poważnych konsekwencji strukturalnych ze względu na duże podobieństwo właściwości obu aminokwasów, które należą do tej samej grupy i mają podobny punkt izoelektryczny (Val pI 5,97, Ile pI 6,02) [20].

Zmiana C6340T powoduje zastąpienie reszty treoniny resztą izoleucyny w pozycji 148 polipeptydu. Analiza sekwencji, w której występuje reszta treoniny 148 wykazała, że pozycja ta nie jest zachowywana w ewolucji. Reszta treoniny w tej pozycji występuje jedynie w części kręgowców, natomiast w większości pozostałych sekwencji występuje w tej pozycji reszta alaniny. Wydaje się więc, że obecność reszty treoniny w omawianej pozycji nie jest konieczna dla utrzymania prawidłowej struktury i funkcji białka.



Rycina 5. Fragment podjednostki COX1 z kompleksu oksydazy cytochromu *c* z *Bos taurus*. Struktura pochodzi z bazy danych PDB [51], PDB ID 1v54 [26]. Reszty Ala120 (zaznaczona na czerwono) i Ala122 (zaznaczona na fioletowo) przedstawione jako model kulkowy. Wizualizacja struktury otrzymana została przy użyciu programu CHIMERA [52].

Mutacja G6480A powoduje zamianę reszty waliny 193 na resztę izoleucyny. Pozycja ta nie jest ewolucyjnie konserwowana, a obydwa aminokwasy mają podobną budowę



Rycina 6. Fragment podjednostki COX1 z kompleksu oksydazy cytochromu *c* z *Bos taurus*. Struktura pochodzi z bazy danych PDB [51], PDB ID 1v54 [26]. Val 128 przedstawiona w kolorze niebieskim jako model kulkowy. Wizualizacja struktury otrzymana została przy użyciu programu CHIMERA [52].

i właściwości, należą do tej samej grupy aminokwasów alifatycznych hydrofobowych [20], więc nie wydaje się, aby ta mutacja miała wpływ na strukturę i/lub funkcję polipepty-

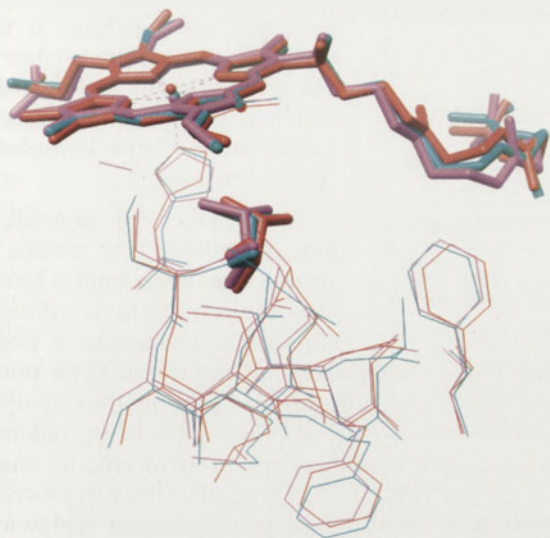
P00395	AGVSSILGAINFITTTIINMKPPAMTQYQTPFLVWSVLIITAVLLLLSLPVL
P00399	AGISSILGAVNFITTVINMRSTGISLDRMPLFVWSVVITALLLLSLPVL
P00396	AGVSSILGAINFITTTIINMKPPAMSQYQTPFLVWSVMIITAVLLLLSLPVL
Q9MIY8	AGVSSILGAINFITTTIINMKPPTISQYQTPFLVWAVLVTAVLLLLSLPVL
P07657	TGISSTLGSVNLIATMINMRAPGLSLYQMPFLFAWAIMITSILLLLTLPVL
P24893	AGLSSILGGINFMCTTKNLRSSSISLEHMTLFLVWTVFVTVFLVLVLSLPVL
P48887	AGMSSILGAINFITTTIINMRSPGTMERVSFLVWSILVTVFLLLSLPVL
P08305	SGATSLGAINIITTFNMRAPGTMFLFKVPLFAWAVFITAWMILLSLPVL
P08742	SGVSSILGSINFITTTIINMRGPGMTMHRLLPLFVWSVLVTAFLLLLSLPVL
P60620	SGVSSILGSINFITTTIINMRGPGMTMHRLLPLFVWSVLVTAFLLLLSLPVL
P18943	AGVSSILGAINFITTTIINMKPPALSQYQTPFLVWSVLITAILLLLSLPVL
P24010	SGLGTLIAGINFLATIINMRAPGMYMRLPLFTWTFVASALILFAFPPL
	: * : : . . . * : : * * : : . : : : . * * : : : : : : * *

Rycina 7. Uliniowanie sekwencji białkowych podjednostki COX1. Wszystkie sekwencje pochodzą z bazy UniProtKB, z organizmów: *Homo sapiens* (P00395), *Bos taurus* (P00396), *Callus gallus* (P18943), *Brachydanio rerio* (Q9MIY8), *Drosophila melanogaster* (P00399), *Albinaria coerulea* (P48887) *Schizosaccharomyces pombe* (P07657), *Pseudomonas denitrificans* (P08305), *Bacillus subtilis* (P24010), *Zea mays* (P08742), *Arabidopsis thaliana* (P60620), *Caenorhabditis elegans* (P24893). Pozycja, w obrębie której zaszła mutacja zaznaczona jest niebieską ramką. Uliniowanie wykonane zostało przy pomocy programu Tcoffee [53].

du. Z kolei mutacja G7041A może mieć wpływ na funkcję podjednostki COX1, powoduje ona zmianę reszty waliny 380 na resztę izoleucyny. Analiza genomów różnych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych wykazała, że sekwencja, w obrębie której występuje reszta Val 380, jest mało zmienna ewolucyjnie (Ryc. 7). Wysoki stopień zachowania sekwencji w ewolucji jest też widoczny po przeanalizowaniu struktur oksydazy cytochromu *c* z *Bos taurus* (1v54), *Thermus thermophilus* (1m56) i *Paracoccus denitrificans* (1ar1) (Ryc. 8). Sekwencja aminokwasów, w obrębie której ma miejsce zamiana reszt Val 380 Ile, jest zlokalizowana w obrębie helisy X podjednostki COX1. Fragment helisy X, w którym znajduje się zmieniona reszta aminokwasu podlega zmianom konformacyjnym w czasie przechodzenia enzymu ze stanu zredukowanego w utleniony i odwrotnie. Po przejściu hemu *a* w stan zredukowany wiązanie wodorowe pomiędzy seryną 282 a grupą hydroksyfarmezyloetylową hemu *a* ulega zerwaniu z jednoczesną rotacją grupy OH seryny o 110° [28]. Zmiany konformacyjne spowodowane tym przejściem obejmują reszty aminokwasów: Ser 382, Leu 381 i Val 380 (Ryc. 9). Nie wiadomo dokładnie jaką rolę może mieć ta zmiana konformacyjna, jednak postuluje się jej udział w procesie przenoszenia protonów przez błonę mitochondrialną [28]. Mimo że walina i izoleucyna należą do tej samej grupy aminokwasów i mają podobny punkt izoelektryczny, wydaje się, że mutacja może upośledzać funkcjonowanie białka. Świadczy o tym zarówno bardzo wysoki stopień zachowania sekwencji w obrębie gatunków odległych ewolucyjnie, jak i bliskość centrów aktywnych enzymu. Ponadto, patologiczny efekt mutacji może być również związany z różnicą wielkości łańcuchów bocznych aminokwasów waliny i izoleucyny [20].

Ostatnia opisana przez Petrosa i wsp. [17] mutacja – T7080C powoduje zastąpienie reszty fenyloalaniny 393 resztą leucyny. Reszta ta występuje w obrębie sekwencji, która jest zachowywana jedynie wśród wyższych *Eukariota*. U grzybów i *Prokariota* sekwencja, w obrębie której wystąpiła mutacja, nie jest zachowywana i występują tam reszty aminokwasów o różnych właściwościach fizykochemicznych. Reszta fenyloalaniny 393 wchodzi w skład tej samej helisy, co reszta waliny 380, nie znajduje się jednak w bezpośredniej bliskości centrum aktywnego. Może ona natomiast oddziaływać z jednym z fosfolipidów, który jest wbudowany w kompleks oksydazy cytochromu *c* (Ryc. 10). Według Yoshikawy fosfolipid ten może brać udział w wejściu cząsteczki tlenu do centrum aktywnego podjednostki COX1 [29].

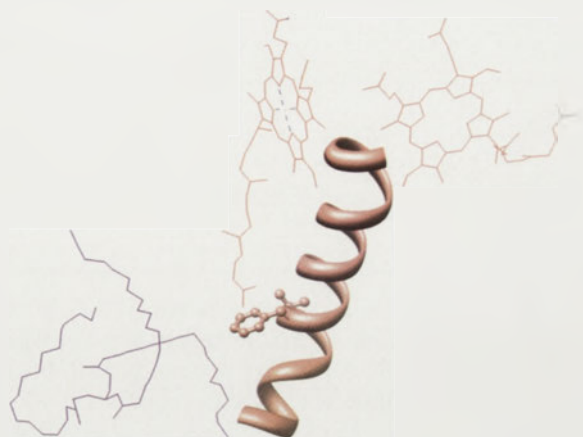
Jeronimo i wsp. [30], którzy jako drudzy opisali mutacje w mtDNA w nowotworach prostatici, badali mutacje w mitochondrialnej pętli D, mitochondrialnych genach rRNA i podjednostkach kompleksu I zarówno nowotworów, jak i odpowiadających im PIN (ang. *prostatic intraepithelial neoplasia*, stan przednowotworowy) pobranych od 16 pacjentów. Opisano 20 mutacji somatycznych u 3 pacjentów. U dwóch pacjentów opisano po jednej mutacji, natomiast u trzeciego aż 18 mutacji (mutacje nr 21, 22 i 24 w tabeli 3). Wydaje się jednak, iż bardzo duża liczba mutacji znaleziona u jednego pacjenta



Rycina 8. Wizualizacja i porównanie struktur fragmentów podjednostek COX1 z *Bos taurus* (1v54) (kolor błękitny) *Thermus thermophilus* (1m56) (kolor różowy) i *Paracoccus denitrificans* (1ar1) (kolor fioletowy) [51]. Walina 380 oraz hem *a*, pogrubione. Wizualizacja struktury otrzymana została przy użyciu programu CHIMERA [52].

(które to mutacje są *de facto* polimorfizmami typowymi dla haplogrup W i K) może wskazywać na wymieszanie próbek [31]. Nie można jednoznacznie stwierdzić czy próbki pochodzą od jednego pacjenta, a w publikacji brak też danych na temat haplogrupy, do której należały badane próbki, z tego też powodu dane te nie wydają się wiarygodne.

Tkanka nowotworu, w której znaleziono delecję adeniny w pozycji 11032 jest pod jej względem heteroplazmatyczna (poziom heteroplazmii trudno dokładnie określić, ale stosunek mtDNA zmutowanego do dzikiego wynosi $>0,6$), podczas gdy w mtDNA limfocytów oraz w tkance PIN pobranych od tego samego pacjenta występuje wyłącznie sekwencja typu dzikiego [30]. Adenina 11032 jest pierwszą w szlaku 7 adenin następujących po sobie, a takie obszary są szczególnie wrażliwe na błędy polimerazy w czasie replikacji mtDNA. W rezultacie mutacji tworzy się kodon STOP, co



Rycina 10. Fragment podjednostki COX1 z kompleksu oksydazy cytochromu c *Bos taurus*. Struktura pochodzi z bazy danych PDB [51], PDB ID 1v54 [26]. Na różowo przedstawiony fragment helisy X podjednostki COX1, na fioletowo – cząsteczka fosfolipidu. Reszta fenyloalanina 393 zaznaczona jako model kulkowy. Wizualizacja struktury otrzymana została przy użyciu programu CHIMERA [52].

powoduje skrócenie polipeptydu. Wykazano, że homoplazmatyczna mutacja przesunięcia ramki odczytu w pozycji 10952, również powodująca powstanie skróconego i niestabilnego polipeptydu ND4, prowadzi do upośledzenia procesu składania podjednostek kodowanych mitochondrialnie w kompleks I [32]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że mutacja opisana w tkance nowotworu może mieć analogiczny efekt. Z tego powodu u pacjenta z nowotworem prostaty można się spodziewać poważnego upośledzenia systemu fosforylacji oksydacyjnej w tkance nowotworowej, gdyż procent zmutowanego DNA w komórkach nowotworu jest wysoki.

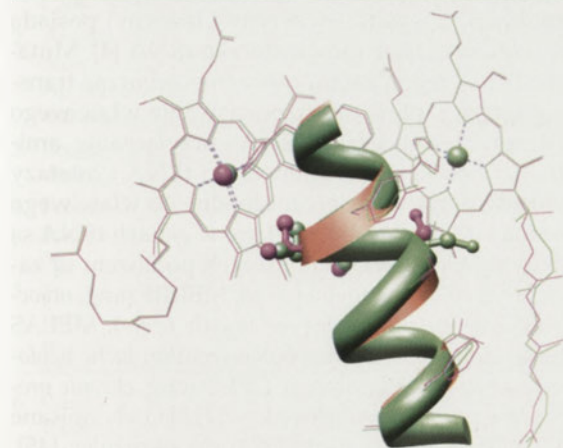
NABŁONIAK RDZENIASTY

Nabłoniak rdzeniasty jest nowotworem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [24]. Cechą charakterystyczną rdzeniaków jest fakt, że występują głównie u dzieci, z częstością 0,5 na 100 000 urodzeń. U dorosłych opisywane są niezwykle rzadko [34]. Wong i wsp. [34] przeanalizowali 15 przypadków rdzeniaków u dzieci. Łącznie zostało znalezionych 18 mutacji mtDNA w 6 z 15 nowotworów. Większość (11/18) mutacji znaleziono w pętli D, 3 mutacje w tRNA oraz 4 we fragmentach mtDNA kodujących polipeptydy (Tabela 3) [34].

Mutacje T7389C oraz T7028C są w rzeczywistości polimorfizmami charakterystycznymi odpowiednio dla haplogrup L1c2 oraz H. Tylko mutacja T11046C, powodująca zastąpienie reszty leucyny resztą proliny, nie występuje jako częsty polimorfizm mitochondrialnego

Tabela 3. Mutacje somatyczne w mtDNA znalezione w tkance nabłoniaków rdzeniastych (na podstawie [34]). Mutacje w rRNA, tRNA oraz fragmentach niekodujących zostały pominięte.

	Zmiana nukleotydu	Gen	Zmiana aminokwasu
1	T7389C	COX1	Tyr – His
2	T11046C	ND4	Leu – Pro
3	T7028C	COX1	Ala – Ala



Rycina 9. Wizualizacja i porównanie struktur fragmentów helisy X podjednostki COX1. Kolor różowy – konformacja fragmentu helisy X i hemu w czasie, gdy enzym jest w stanie zredukowanym, kolor seledynowy – enzym w stanie utlenionym. Struktury pochodzą z bazy danych PDB [51], PDB ID 1v54, 1v55 [26].

wstawiania zespołów chorobowych, takich jak LHON (ang. *Leber Hereditary Optic Neuropathy*) [13], a opisano je w bardzo wielu różnych typach nowotworów [34,36,38,42]. Mutacje w genach kodujących polipeptydy mitochondrialne mogą wpływać na szlak fosforylacji oksydacyjnej na szereg różnych sposobów, m.in. poprzez zmianę struktury powstającego produktu białkowego. Pomimo licznych przeprowadzonych do tej pory prac dotyczących zmian w mtDNA w nowotworach, pytanie czy mutacje te są istotne w procesie nowotworzenia, czy też nie wciąż pozostaje otwarte. Część autorów sugeruje, że nagromadzenie mutacji w mitochondrialnym DNA jest jedynie wynikiem przypadku a mutacje te nie dają komórkom przewagi selekcyjnej [47]. Inni autorzy uważają, że obecność mutacji w mitochondrialnym DNA promuje rozwój nowotworu. Hipoteza ta zgodna jest z wynikami badań na modelach mysich, gdzie komórki nowotworowe niosące zmutowane mtDNA dzieliły się szybciej i w efekcie powodowały powstawanie guzów o większej objętości [16,17]. Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające ten efekt: 1) mutacje w mitochondrialnym DNA powodują zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu, które mogą być przyczyną powstawania kolejnych mutacji w DNA mitochondrialnym i jądrowym, 2) komórki mające uszkodzony łańcuch fosforylacji oksydacyjnej i uzyskujące energię na drodze glikolizy mają przewagę selekcyjną w warunkach, jakie występują we wnętrzu guza (obniżona podaż tlenu). Opisane dotychczas w nowotworach mutacje zdają się upośledzać łańcuch fosforylacji oksydacyjnej. Są to przede wszystkim delecje i insercje, których rezultatem jest przesunięcie ramki odczytu, oraz mutacje punktowe uderzające w silnie zachowywany ewolucyjnie aminokwas polipeptydu. Mutacje te mogą powodować zaburzenia w funkcjonowaniu szlaku fosforylacji oksydacyjnej. Powyższe zestawienie pozwala też przydzielić opisane dotychczas mutacje do dwóch grup: potencjalnie patogennych i niepatogennych. Należy jednak pamiętać, że analiza taka daje jedynie przybliżony obraz stanu *in vivo* i dokładne określenie wpływu tych mutacji na szlak fosforylacji oksydacyjnej i ogólny metabolizm komórki nie jest możliwe *in silico* lub *in vitro*.

PIŚMIENNICTWO

- Metzler D (2001) *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*, Academic Press, San Diego
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 9: 457-465
- Leonard J, Schapira A (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 22: 299-304
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88: 41-56
- Finnila S, Hassinen IE, Ala-Kokko L, Majamaa K (2000) Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 66: 1017-1026
- Garber K (2004) Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 1805-1806
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314
- Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V (1999) *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL Sp. z o.o., Warszawa
- Saraste M (1999) Oxidative Phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493
- Carroll J, Fearnley I, Shannon R, Hirst J, Walker J (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2: 117-126
- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997) Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277: 60-66
- Papa S, Capitanio N, Capitanio G, Palese LL (2004) Protonmotive cooperativity in cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1658: 95-105
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC (2005) MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res* 33: D611-D613
- Plasterer TN, Smith TF, Mohr SC (2001) Survey of human mitochondrial diseases using new genomic/proteomic tools. *Genome Biol* 2: RESEARCH0021
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344
- Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H, Ohta S (2005) Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 65: 1655-1663
- Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC (2005) mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 719-724
- Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, DeVivo DC, DiMauro S (1993) The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 34: 827-834
- Makino M, Horai S, Goto Y, Nonaka I (1998) Confirmation that a T-to-C mutation at 9176 in mitochondrial DNA is an additional candidate mutation for Leigh's syndrome. *Neuromuscul Disord* 8: 149-151
- Betts MJ, Russell RB (2003) *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*, W: Michael R. Barnes ICG (red) *Bioinformatics for Geneticists* str. 289-316
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun M (2006) *Cancer Statistics 2006*. *Can J Clin* 1: 106-130
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D (2004) *GLOBCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. Lyon IARC Press, Lyon
- Kordek R, Jesionek-Kupicka D (2003) *Podstawy patologii onkologicznej*, W: Kordek R, Jassem J, Krzakowski M, Jeziorski A (red) *Onkologia. Podrecznik dla studentów i lekarzy* Medical Press, Gdańsk, str. 4-16
- D'Aurelio M, Pallotti F, Barrientos A, Gajewski CD, Kwong JQ, Bruno C, Beal MF, Manfredi G (2001) *In vivo* regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem* 276: 46925-49632
- Glerum DM, Tzagoloff A (1997) Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett* 412: 410-414
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272: 1136-1144
- Gallardo ME, Moreno-Loshuertos R, Lopez C, Casqueiro M, Silva J, Bonilla F, de Cordoba SR, Enriquez JA (2006) m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors. *Hum Mutat* 27: 575-582
- Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, Shimada H, Muramoto K, Aoyama H, Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yao M, Ishimura Y, Yoshikawa S (2003) The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15304-15309
- Yoshikawa S (2005) Reaction mechanism and phospholipid structures of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochem Soc Trans* 33: 934-937

30. Jeronimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D (2001) Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 20: 5195-5198
31. Salas A, Yao YG, Macaulay V, Vega A, Carracedo A, Bandelt HJ (2005) A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis. *PLoS Med* 2: e296
32. Hofhaus G, Attardi G (1995) Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol Cell Biol* 15: 964-974
33. Vagner-Capodano AM, Zattara-Cannoni H, Quilichini B, Giocanti G (2003) From cytogenetics to cytogenomics of brain tumors: Medulloblastoma. *Bull Cancer* 90: 315-318
34. Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, Vogel H (2003) Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Res* 63: 3866-3871
35. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 25: 147-150
36. Tan DJ, Bai RK, Wong LJ (2002) Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 62: 972-976
37. Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY (2001) High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 61: 5998-6001
38. Meierhofer D, Mayr JA, Fink K, Schmeller N, Kofler B, Sperl W (2006) Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. *Br J Cancer* 94: 268-274
39. Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D (2001) Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 61: 7623-7626
40. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 20: 291-293
41. Tan DJ, Chang J, Liu LL, Bai RK, Wang YF, Yeh KT, Wong LJ (2006) Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. *BMC Cancer* 6: 93-94
42. Parrella P, Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen D, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D (2001) Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res* 61: 7623-7626
43. Ballana E, Morales E, Rabionet R, Montserrat B, Ventayol M, Bravo O, Gasparini P, Estivill X (2006) Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 950-957
44. Mollers M, Maniura-Weber K, Kiseljakovic E, Bust M, Hayrapetyan A, Jaksch M, Helm M, Wiesner RJ, von Kleist-Retzow JC (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res* 33: 5647-5658
45. Yasukawa T, Suzuki T, Ohta S, Watanabe K (2002) Wobble modification defect suppresses translational activity of tRNAs with MERRF and MELAS mutations. *Mitochondrion* 2: 129-141
46. Lorenc A, Bryk J, Golik P, Kupryjanczyk J, Ostrowski J, Pronicki M, Semczuk A, Szolkowska M, Bartnik E (2003) Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion* 3: 119-124
47. Collier HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG (2001) High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 28: 147-150
48. Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, van der Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13: 2461-2472
49. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC (2001) Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 488: 119-133
50. Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, Van Den Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13: 2461-72
51. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov I, Bourne P (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242
52. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera – A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem* 25: 1605-1612
53. Poirot O, O'Toole E, Notredame C (2003) Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 31: 3503-3506

The impact of mtDNA mutations on proteins structure in selected types of cancer

Katarzyna Plak¹, Wojciech Kukwa², Ewa Bartnik^{1,3}, Paweł Golik^{1,3}, Anna Ścińska², Tomasz Krawczyk⁴, Anna M. Czarnecka^{1,5,6}

¹Institute of Genetics and Biotechnology, University of Warsaw, 5a Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

²Otolaryngology Department, Medical University of Warsaw, 19/25 Stępińska St., 00-739 Warsaw, Poland

³Institute of Biochemistry and Biophysics, PAS, 5a Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

⁴Clinical Pathology Laboratory, CZMP, Lodz, Poland

⁵Postgraduate School of Molecular Medicine, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

⁶present adress: John Petros Lab, Emory School of Medicine, Clinic Building B, Room B4220, 1365 Clifton Rd NE, 30322 Atlanta, GA, USA

e-mail: anna.czarnecka@gmail.com or aczarne@emory.edu

Key words: cancerogenesis, mitochondria, mtDNA, oxidative phosphorylation, protein structure

ABSTRACT

Recently published papers report a large number of mitochondrial DNA mutations in many different cancer types, but their significance for electron transport chain proteins remains unknown. This review covers structural mutations of mitochondrial genes, choosing prostate cancer, esophageal cancer and epithelioma as research models. As all mitochondrial genes encode subunits of the electron transport chain, the review focuses on the consequences of structural mutations on cell metabolism.

STRESZCZENIE

Choroby mitochondrialne u dzieci spowodowane są głównie mutacjami w genach nDNA. Defekty te upośledzają funkcję podjednostek strukturalnych i składania kompleksów łańcucha oddechowego oraz innych białek pośrednio związanych z fosforylacją oksydacyjną. Do najlepiej poznanych fenotypów klinicznych należą defekty związane z deficytem oksydazy cytochromowej i mutacjami w genach *SURF1* czy *SCO2*, deficyty podjednostek jądrowych kompleksu I oraz zaburzenia prowadzące do deplecji mtDNA. Mutacje mtDNA odpowiadają zaledwie za 10–20% mitochondriopatii w wieku wczesnodziecięcym. W połowie przypadków tło molekularne pozostaje nieustalone. Objawy chorób mitochondrialnych u dzieci są niespecyficzne. Wzrost stężenia kwasu mlekowego w osoczu jest jedynym znacznikiem biochemicznym, ale o małej czułości i specyficzności. Podstawą diagnostyki pozostaje biochemiczne badanie bioptatu mięśniowego z zastosowaniem udoskonalonych technik oceny funkcji mitochondriów. W pracy przedstawiono algorytm diagnostyczny chorób mitochondrialnych u dzieci. Zaproponowano pożądane kierunki badań naukowych. Na wyjaśnienie zasługuje m.in. fenomen identycznych zmian w mózgu o typie zespołu Leigha, niezależnie od rozmaitego tła molekularnego.

WPROWADZENIE

Po raz pierwszy choroby mitochondrialne zostały wyodrębnione w patologii człowieka w latach 60. i 70. XX wieku [1], na podstawie występowania w mięśniach typowych zmian ultrastrukturalnych mitochondriów (Ryc. 1) oraz widocznych w mikroskopie świetlnym tzw. poszarpanych czerwonych włókien mięśniowych (RRF, ang. *ragged red fibers*) (Ryc. 2, barwienie z zastosowaniem barwnika Trichrom). Rozpoznanie ustalone jest zwykle dopiero u młodzieży i dorosłych, chociaż pierwsze objawy są uchwytnie wcześniej. Symptomatologia, bardzo różnorodna, obejmuje zestaw postępujących zmian w mózgu, mięśniach, gruczołach wydzielania wewnętrznego, narządach zmysłów (głuchota, oftalmoplegia) i innych tkankach i narządach, w najrozmaitszych układach [2]. Charakterystyczne jest dziedziczenie w linii matczynej (mitochondrialne) niezgodne z zasadami Mendla. Jedyne powtarzające się w chorobach mitochondrialnych

Ewa Pronicka^{1,✉}

Dorota Piekutowska-Abramczuk²

Maciej Pronicki³

¹Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
²Zakład Genetyki Medycznej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
³Zakład Patologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

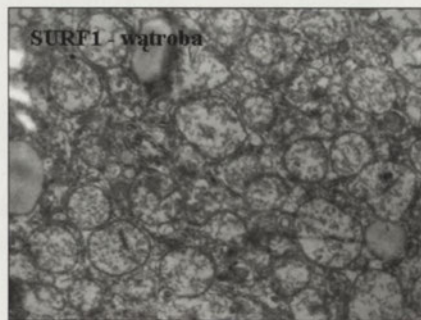
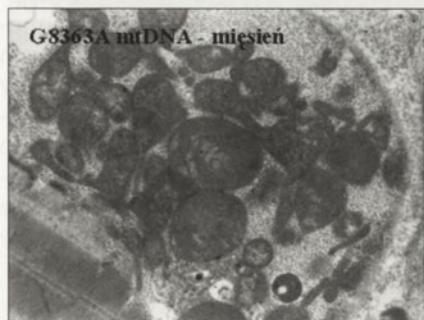
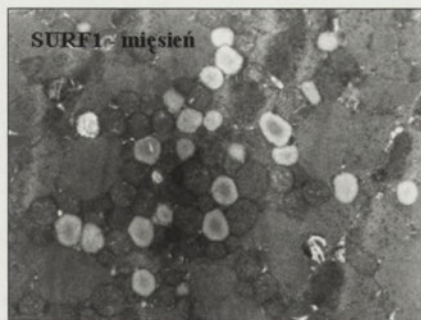
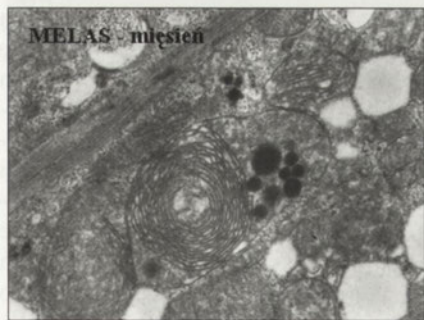
✉Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa, tel.: (0 22) 815 7490; e-mail: e.pronicka@czd.pl

Artykuł otrzymano 6 maja 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 8 maja 2008 r.

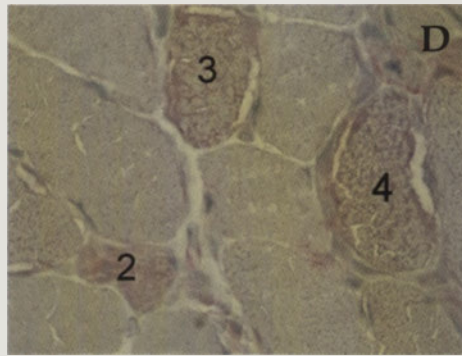
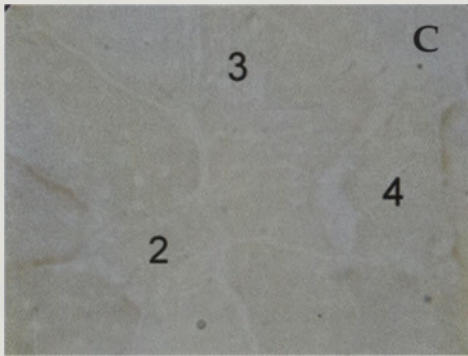
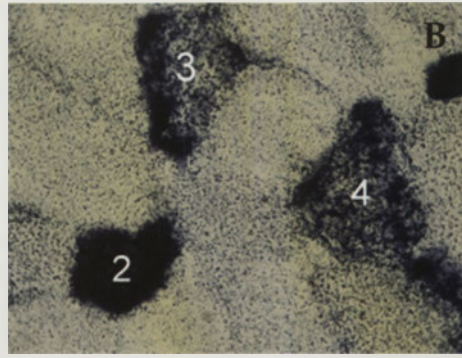
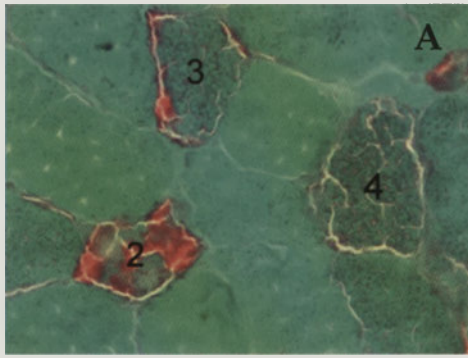
Słowa kluczowe: choroby mitochondrialne, dzieci, kryteria diagnostyczne, zespół Leigha

Skróty: FAO – mitochondrialna β -oksydacja kwasów tłuszczowych; FBP – fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanowa; GSD – glikogenozy; HHH – zespół 3H (hiperornitynemia, hiperamonemia, homocytulinuria); LCFA – długołańcuchowe kwasy tłuszczowe; MMA – acyduria (kwasica) metylomalonowa; OXPHOS – fosforylacja oksydacyjna; PA – acyduria (kwasica) propionianowa; PDH – dehydrogenaza pirogronianowa; PEPCK – karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa; RRF – poszarpane czerwone włókna mięśniowe (ang. *ragged red fibers*)

Podziękowania: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego MNiSW (PB 0890/P05/2005/29) oraz w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej MitoNet.pl



Rycina 1. Zmiany ultrastrukturalne w mięśni szkieletowym i w wątrobie u pacjentów, u których stwierdzono obecność mutacji leżących u podłoża chorób mitochondrialnych. Widoczne są zmiany liczby, kształtu i wewnętrznej struktury mitochondriów. Z archiwum Zakładu Patologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie [42].



Rycina 2. Przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy (powiększenie oryginalne 400 x). Włókna RRF (A) wykazują dodatnią reakcję w kierunku dehydrogenazy bursztynianowej (B) i brak aktywności oksydazy cytochromowej (C). Uszkodzone włókna wykazują niewielki wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy (D). Z archiwum Zakładu Patologii Instytutu „Pomnika – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.

odchylenia laboratoryjne to wzrost stężenia mleczanów i alaniny w płynach ustrojowych [3,4].

W 1988 roku wyjaśniono podłoże molekularne pierwszych zdiagnozowanych przypadków chorób mitochondrialnych poprzez identyfikację mutacji w mtDNA. Poszczególne mutacje próbowano wiązać z wyodrębnionymi wcześniej i używanymi do dziś zespołami klinicznymi o angielskich akronimach i aponimach [2]. I tak mutację w pozycji 3243 *tRNA^{Leu}* opisywano w MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke like episodes), mutację 8344 *tRNA^{Lys}* – w MERRF (ang. *myoclonic epilepsy, ragged red fibers*), mutację 8993T>C lub T>G w genie kodującym podjednostkę 6 ATPazy – NARP (ang. *neuronal atrophy, retinitis pigmentosa*) lub MILS (ang. *mitochondrially inherited Leigh syndrome*), dużą delecję mtDNA – w PEO (ang. *progressive external ophthalmoplegia*) lub w KSS (zespół Kearns-Sayre’a: cukrzyca, niedoczynność przytarczyc, blok przewodnictwa w sercu). Okazało się jednak, że fenotyp choroby mitochondrialnej zależy bardziej od przypadkowego przekazania ilości zmutowanego mtDNA komórkom potomnym na etapie rozwoju zarodka, płodu, narządu czy tkanki (czyli od stopnia heteroplazmii) niż od genotypu [5]. W zasadzie każdy pacjent choruje inaczej – pod względem ciężkości, wieku ujawnienia, stopnia rozwoju i zakresu zajętych narządów. Różnice występują niezależnie od spokrewnienia chorych osób. Zdrowa kobieta, nosicielka mutacji mtDNA, urodzić może dziecko niezdolne do życia, ciężko uszkodzone już od urodzenia. Ustalone wcześniej „dogmaty” diagnostyczne rzadko sprawdzają się w praktyce. Do chwili obecnej opisano ponad 100 mu-

tacji mtDNA w 11 genach strukturalnych podjednostek kompleksów I, III, IV, w 22 genach tRNA, dwóch rRNA oraz dwóch kodujących podjednostki syntazy ATP. Niektóre mutacje opisano tylko u pojedynczych pacjentów. U większości chorych, zwłaszcza w okresie dzieciństwa, obraz kliniczny nie spełnia kryteriów znanych zespołów.

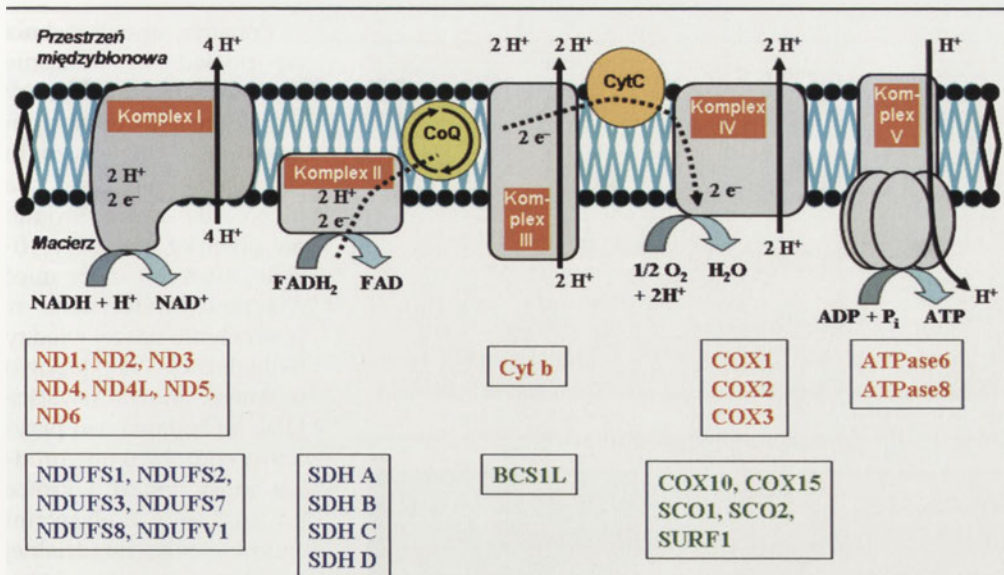
Wyjaśnienie na przełomie XX i XXI wieku tła molekularnego deficytów kilku białek składania oksydazy cytochromu c (*SURF1, SCO2, SCO1, COX10, COX15*), których geny zlokalizowane są w chromosomalnym DNA (nDNA), a mutacje przekazywane są w rodzinach zgodnie z zasadami Mendla [6,7], było otwarciem nowej ery, szczególnie w poznaniu patogenetyki chorób mitochondrialnych u dzieci. Od tej pory opisano kilkadziesiąt defektów dotyczących nDNA [8], a kolejne kilkadziesiąt, czy nawet kil-

kaset, pozostaje do odkrycia.

Chorobą mitochondrialną, we współczesnym ujęciu, nazywamy stan chorobowy wywołany uwarunkowaną genetycznie zmianą budowy białka, pierwotnie zaburzającą przebieg procesów energetycznych w komórce. Przyczynę defektu zidentyfikować można na poziomie molekularnym (mutacje mtDNA i nDNA) lub jedynie na poziomie biochemicznym (lokalizacja defektu w procesie OXPHOS). Satisfakcjonujący poziom diagnostyki klinicznej zmienia się i odpowiada bieżącemu stanowi wiedzy w zakresie „medycyny mitochondrialnej”. Właściwa diagnoza wymaga więc potwierdzenia obecności patogennej mutacji w znanych genach albo tylko – wykazania defektu biochemicznego w tkankach (najczęściej mięśniach, hodowanych fibroblastach, ostatnio też w wątrobie) [9,10]. Na Ryc. 3 przedstawiono lokalizację genów, w których identyfikowane są mutacje odpowiedzialne za zaburzenie funkcji poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego. W chwili obecnej w ponad połowie przypadków pierwotnych zaburzeń mitochondrialnych u człowieka tło molekularne pozostaje do wyjaśnienia. Tło biochemiczne to najczęściej izolowane deficyty kompleksów I i IV łańcucha oddechowego, ale także deficyty pozostałych kompleksów lub uogólnione defekty OXPHOS.

DEFICYTY KOMPLEKSU IV

Zarówno biosynteza oksydazy cytochromu c u człowieka, jak symptomatologia jej deficytu należą do naj-



Rycina 3. Podstawowe geny kodujące podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego, w których zidentyfikowano mutacje odpowiedzialne za wystąpienie choroby mitochondrialnej. Kolorem czerwonym i niebieskim zaznaczono podjednostki strukturalne, kodowane odpowiednio przez geny mitochondrialne i jądrowe. Kolorem zielonym zaznaczono podjednostki nDNA uczestniczące w składaniu kompleksów.

lepiej poznanych [11-15]. Występować mogą właściwie wszystkie możliwe fenotypy kliniczne. Dwa z nich, najlepiej poznane, powiązane zostały z mutacjami w genach *SURF1* i *SCO2*, uczestniczących w procesie składania kompleksu IV. Deficyt białka *SURF1* objawia się klinicznie klasycznym zespołem Leigha [16]. Dzieci rodzą się pozornie zdrowe. W drugiej połowie pierwszego roku życia pojawiają się wymioty, brak przybytku masy ciała, wiotkość, drżenia, zaburzenie dysocjacji gałek ocznych, zmiany rytmu oddychania, acydemia (kwasica) mleczanowa. Przebieg choroby podlega wahaniom. Postępująca encefalopatia prowadzi do zgonu przed 4 rokiem życia (brak skutecznego leczenia). Patomechanizm uszkodzenia mózgu wiąże się prawdopodobnie z występowaniem epizodów alkalozji oddechowej i hipokapnii [17]. Deficyt opiekuńczego białka *SCO2* prowadzi do postępującej noworodkowej kardiomiopatii przerostowej [12,13] lub zespołu „dziecka wiotkiego” (ang. *floppy child*) z obrazem przypominającym rdzeniowy zanik mięśni (SMA, ang. *spinal muscular atrophy*). Wcześniej występuje niewydolność oddechowa wymagająca sztucznej wentylacji. Dzieci umierają w niemowlęctwie. Defekt może prowadzić do samoistnych poronień płodu [18]. Szansa leczenia podskórnymi iniekcjami histynianu miedzi pozostaje do udowodnienia [19]. Należy podkreślić, że w ponad połowie przypadków chorych z deficytem COX nie ustalono jeszcze tła molekularnego [15]. Mutacje w genach strukturalnych podjednostek kompleksu (COI, COII, COIII) wykryto tylko u pojedynczych chorych, mimo intensywnych poszukiwań [20]. Być może niektóre zaburzenia są defektami letalnymi. Wykazanie lub wykluczenie deficytu oksydazy cytochromowej w mięśniu metodą histochemiczną [21] (Ryc. 4) i/lub spektrofotometryczną w homogenacie tkanki [22], stanowi pierwszy etap diagnostyki enzymatycznej chorób mitochondrialnych u dzieci. W Polsce mutacje w genach *SURF1* i *SCO2* należą do szczególnie częstych przyczyn deficytu COX, a liczba ziden-

tyfikowanych przypadków stanowi blisko połowę wszystkich opublikowanych na świecie [23].

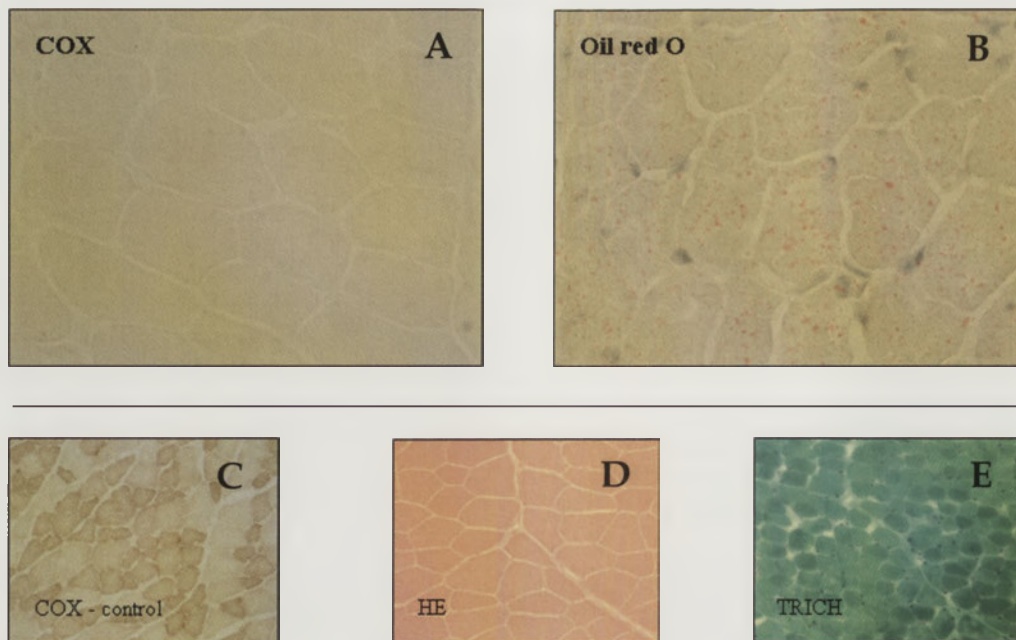
DEFICYTY KOMPLEKSU I

Do chwili obecnej opisano choroby mitochondrialne z mutacjami we wszystkich siedmiu mitochondrialnych i w ośmiu z 38 jądrowych podjednostek kompleksu I [6]. Najczęściej opisywanym (ale nie wyłącznym) obrazem klinicznym deficytu kompleksu I jest nietypowy zespół Leigha [24]. W większości przypadków obniżenia aktywności enzymatycznej w mięśniu i/lub w fibroblastach tło molekularne pozostaje nieznane. Trudność z identyfikacją tych zaburzeń wiąże się z brakiem odpowiedniego modelu eksperymentalnego u drożdży, a

także brakiem prostej reakcji histochemicznej pozwalającej na detekcję deficytu w mięśniu [25]. Upowszechnienie metody BN-PAGE i „*in gel activity*” (patrz artykuł poświęcony tej metodzie zamieszczony w niniejszym numerze „Postępów Biochemii”) w diagnostyce mitochondrialnej poprawiło co prawda stopień rozpoznawalności deficytów kompleksu I na poziomie biochemicznym [26,27], ale do ostatecznego wyjaśnienia ich patomechanizmu pozostaje daleka droga. Wykazano, że w skomplikowanej biogenezie kompleksu I współdziałają dwa komplementarne procesy: synteza podjednostek mtDNA tworzących pierwotny produkt składania i następową wymianę jego składu z udziałem podjednostek nowo importowanych z cytozolu [28]. Uszkodzenie każdego z uczestniczących w procesie składania białek, np. białka opiekuńczego B17.2L [29] i etapów stanowi potencjalną przyczynę choroby mitochondrialnej. Nieopublikowane badania aktywności kompleksu I w liniach fibroblastów pacjentów wskazują na istnienie co najmniej 7 różnych niepoznanych jeszcze defektów, które nie podlegają komplementarnej korekcji [25].

DEPLECJE mtDNA

Choroby mitochondrialne związane z mutacjami genów strukturalnych oraz genów kodujących białka składania aktywnych kompleksów łańcucha oddechowego, stanowią zaledwie część stale poszerzającego się spektrum zaburzeń mitochondrialnych u człowieka. Znaczącą podgrupę stanowią choroby mitochondrialne przebiegające z obniżeniem ilości mtDNA w stosunku do nDNA, tzw. zespoły deplekcji mtDNA (MDS, ang. *mitochondrial depletion syndromes*). Odkryte po raz pierwszy w początku lat 90. XX wieku u niemowląt z postępującą dysfunkcją wątroby o niepomyślnym przebiegu, okazują się obecnie względnie częstą przyczyną niewydolności i marskości wątroby u małych dzieci. Wśród nich na czoło wysuwają się zaburzenia syntezy nukleoty-



Rycina 4. Przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy. Całkowity (tzw. rozlany) deficyt oksydazy cytochromowej (A, reakcja kontrolna – C), wzrost ilości lipidów o średnim nasileniu (B). Barwienie hematoksylina i eozyną (D) oraz barwnikiem Trichrom według metody Gomoriego (E) nie ujawnia uchwytynych zmian. Z archiwum Zakładu Patologii Instytutu „Pomnika – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.

dów purynowych, ograniczających ilość substratu do produkcji mtDNA w komórce, zaburzeń replikacji mtDNA, czy nieprawidłowej komunikacji międzygenomowej. Aktualną wiedzę na temat MDS i udziału różnych genów w powstawaniu tego zjawiska (*DGUOK*, *POLG1*, *TP*, *ANT1*, *MPV17*, *TK2*, *SUCLA2*, *Twinkle*) znaleźć można w opublikowanych ostatnio wyczerpujących pracach przeglądowych [30,31]. Jednak wykryte do tej pory defekty wyjaśniają patogenezę niewielkiego tylko odsetka przypadków deplecji mtDNA. Z punktu widzenia klinicznego ważne jest, że objawy MDS ograniczać się mogą do jednego narządu czy tkanki (poza wątrobą, do mięśni szkieletowych, układu nerwowego, serca), wykraczając poza klasyczną formę wielonarządowego schorzenia mitochondrialnego.

INNE WYBRANE ZABURZENIA FUNKCJI MITOCHONDRIÓW

Proces poznawania patologii mitochondrialnej u człowieka wydaje się wkraczać w okres kolejnych znaczących odkryć, dzięki wprowadzaniu nowych wyrafinowanych i kosztownych metod badawczych i technologii do badań ciekawych, niewyjaśnionych przypadków. Podkreślana jest rola badania żywych niezmienionych mitochondriów z uwzględnieniem ich funkcji, np. poprzez pomiar syntezy ATP czy zużycia znakowanych substratów [10,32,33], a nie tylko w statycznym układzie zamrożonej tkanki. Okazuje się także, że metodyczne poszukiwanie mutacji mtDNA w pojednostkach strukturalnych kompleksu I (ND1–ND6) daje pozytywny efekt częściej niż poprzednio sądzono [8,34]. Wyniki otrzymane w badaniach nad defektem wykrytym u pojedynczego pacjenta, przekładają się niekiedy na lepsze zrozumienie patogenezy podobnych chorób, ale występujących powszechnie i mających charakter społeczny.

Ponadto, upowszechnia się pogląd, że poznanie patomechanizmu choroby u pacjenta z unikalnym defektem genetycznym jest ważne nie tylko dla niego, ale rzuca światło na przebieg procesów fizjologicznych i może mieć znaczenie uniwersalne w poszerzeniu naszej wiedzy biologicznej. Przykładowo wymienić można trwające kilka lat badania nad przyczyną choroby u noworodka, który zmarł wkrótce po urodzeniu z objawami choroby mitochondrialnej o ciężkim przebiegu, które doprowadziły do potwierdzenia szerszej roli dynamin w patologii człowieka [35]. Przynajmniej pięć genów jądrowych odpowiedzialnych za syntezę białek mitochondrialnych [31] odkryto poprzez identyfikację mutacji u pacjentów

z chorobami mitochondrialnymi, w tym gen *MRPS16* (ang. *mitochondrial ribosomal protein subunit 16*) u noworodka z kwasicą mleczanową, dysmorfia budowy i obrzękami kończyn i gen *PUS1* (ang. *pseudouridine synthase 1*) w rodzinach z fenotypem MLASA (ang. *myopatia, lactic acidosis, sideroblastic anemia*).

DIAGNOSTYKA KLINICZNA, BIOCHEMICZNA I MOLEKULARNA

Wiedza na temat częstości występowania chorób mitochondrialnych w populacji, w tym u małych dzieci, jest ograniczona. Dostępne są nieliczne, dobrze udokumentowane publikacje pozwalające oszacować tę liczbę na 1:3.5 tysiący mieszkańców [36,37]. Dane dotyczące występowania zespołu Leigha w Polsce zostały ostatnio opublikowane. Wskazują one, że populacja polska (prawdopodobnie w ogóle słowiańska) ma swój własny wzór epidemiologiczny choroby mitochondrialnej, wyrażony bardzo częstym występowaniem zespołu Leigha związanego z obecnością mutacji w genie *SURF1* [23]. Uważa się, że wstępne rozpoznanie choroby mitochondrialnej jest bardzo trudne z powodu niejednoznacznego obrazu chorobowego (przyjmującego najróżniejsze maski dobrze znanych lekarzom chorób nabytych), nierównomiernego przebiegu i braku niezawodnych znaczników biochemicznych. Jedynym względnie częstym parametrem biochemicznym jest wzrost stężenia mleczanów w płynach ustrojowych. Jest to jednak znacznik o niskim stopniu wiarygodności (występuje u około 70% chorych) i nieswoisty (towarzyszy np. każdemu niedotlenieniu), a w praktyce nie jest on oznaczany rutynowo. Tabela 1 przedstawia algorytm różnicowania acydemii (kwasicy) mleczanowej z uwzględnieniem zalet i pułapek interpretacyjnych.

Tabela 1. Diagnostyka różnicowa acydemii (kwasicy) mleczanowej*.

Identyfikacja przyczyny	Patomechanizm**	Wartość w różnicowaniu, jednostki chorobowe
Wynik fałszywy	trudności w pobraniu krwi, użycie stazy naczyniowej przy pobieraniu	-
Naczyniowe	wstrząs – utrata płynów/krwii, inne	-
Infekcja	posocznica, malaria, grzybica, inne	-
Oddechowe	niedotlenienie, stan astmatyczny	-
Neurologiczne	encefalopatia niedotlenieniowa, niedotlenienie okołoporodowe	-
Kardiologiczne	kardiomiopatia, niewydolność krążenia, inne	-
Metaboliczne	niewyrównana cukrzyca (ketoacydoza) (kwasica ketonowa) wrodzone wady metabolizmu	- zaburzenia OXPHOS (choroba mitochondrialna) deficyt karboksylazy pirogronianowej deficyt karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej deficyt kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej defekty przemian tiaminy GSD Ia/b GSD III (po posiłku) deficyt syntazy glikogenu (po posiłku) deficyt fruktozobisfosfatazy defekty LCFA, FAO Acydemie (kwasice) organiczne (MMA, PA i inne) deficyt biotynidazy i holokarboksylazy defekty cyklu Krebsa zespół HHH (???)
Przewód pokarmowy	zespół krótkiego jelita (d-mleczan)	-
Nerkowe	niewydolność nerek, kwasica kanalikowa	-
Wątrobowe	marskość	-
Nowotwory złośliwe	białaczki, ziarnica złośliwa	-
Wpływ leków	metformina, alkohol, fruktoza, probiotyki, statyny, leki w AIDS	-
Wpływ diety	niedobór tiaminy	-

Skróty: OXPHOS – fosforylacja oksydacyjna; LCFA - długołańcuchowe kwasy tłuszczowe; FAO – mitochondrialna beta-oksydacja kwasów tłuszczowych; GSD – glikogenozy. *(wg J Leonarda, EMG meeting 2003, dane niepublikowane). ** Przyczyny kumulacji kwasu mlekowego są wieloczynnikowe i złożone; poszczególne mechanizmy mogą nakładać się na siebie.

W literaturze medycznej dostępne są od pewnego czasu algorytmy diagnostyczne dla dorosłych i dla dzieci z podejrzeniem mitochondriopatii [10], a także próby ustalenia prognozy u dzieci z już zdefiniowaną chorobą mitochondrialną [37,38]. W opinii autorów szczególnie przydatna jest zarówno w pierwszym podejściu, jak i w interpretacji wyników biopsji mięśnia, punktacja zaproponowana przez mitochondrialny ośrodek w Nijmegen. Została ona ostatnio pozytywnie zweryfikowana w praktyce [39]. Na podstawie analizy objawów klinicznych, badań laboratoryjnych i obrazowych można zakwalifikować pacjenta do różnego poziomu pewności rozpoznania, od mało prawdopodobnej choroby mitochondrialnej (1 pkt), przez możliwą (2-3 pkt), prawdopodobną (4-7 pkt), do dobrze zdefiniowanej (8-12 pkt). Wśród ważnych parametrów diagnostycznych, poza wspomnianą wyżej acydemią (kwasicą) mleczanową,

jest obecność włókien RRF, obniżenie aktywności COX w mięśniu, czy charakterystyczny wynik obrazowania mózgu (zespół Leigha, zmiany udaro-podobne). Skala oceny przedstawiona w tabeli 2 pozwala na wypełnienie indywidualnego formularza chorego, zwiększając obiektywizm interpretacji i wnioskowania różnicowego. Wykrycie mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie choroby mitochondrialnej (w około połowie badanych przypadków) kończy proces diagnostyczny. Niestety nie znamy leczenia przyczynowego choroby mitochondrialnej. Meta-analiza Cochrane'a wymienia nie-liczne nadające się do oceny prace, które nie potwierdzają skuteczności stosowanych dość powszechnie leków (koenzym Q, witaminy, karnityna). Szczęśliwie nie ma też przesłanek, że takie postępowanie jest szkodliwe [41].

PODSUMOWANIE – POŻĄDANE KIERUNKI BADAŃ

Pacjent ze zdefiniowaną chorobą mitochondrialną, u którego

nie wykryto znanych mutacji mtDNA i nDNA, ani określonych deficytów enzymatycznych, może uczestniczyć w dalszych badaniach naukowych. Zwykle pacjenci z rzadkimi chorobami i ich rodziny świadomie w nich uczestniczą zarówno z powodów osobistych, jak i solidarnościowych. Metodyka poszukiwania nowych defektów funkcji mitochondriów powodujących choroby mitochondrialne u ludzi może być bardzo różna. Klasyczne podejście polega na badaniu sprzężeń fenotypu z genotypem w dużych grupach osób spokrewnionych. Wymaga ono jednak wcześniejszej identyfikacji takich rodzin, co w polskiej populacji zwykle nie jest możliwe. Analiza komplementarna linii komórkowych pochodzących od pacjentów z tym samym deficytem jest także przydatną metodą lokalizacji defektu metabolicznego. Metoda ta doprowadziła, m.in., do wykrycia w wielośrodkowych badaniach pierwszego

Tabela 2. Kryteria rozpoznania choroby mitochondrialnej u dzieci wg skali Nijmegen [39].

Grupa parametrów	Parametr/objawy	Punktacja/ parametr	Maximum punktów w podgrupie A,B,C	
I. Objawy kliniczne (maksimum A+B+C = 4 punkty)				
A. Objawy ze strony mięśni	oftalmoplegia	2	2	
	twarz miopacyjna	1		
	nietolerancja wysiłku	1		
	osłabienie mięśniowe	1		
	rabdomyoliza	1		
	nieprawidłowy zapis EMG	1		
	B. Objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego	opóźnienie rozwoju	1	2
		utrata nabytych umiejętności	1	
		epizody udaro-podobne	1	
		migrena	1	
drgawki		1		
mioklonie		1		
ślepotą korową		1		
objawy piramidowe		1		
objawy pozapiramidowe		1		
uszkodzenie pnia mózgu (oddech, polykanie)		1		
C. Choroba wielonarządowa	układ krwiotwórczy	1	3	
	przewód pokarmowy	1		
	hormony/wzrost	1		
	serce	1		
	nerki	1		
	wzrok	1		
	słuch	1		
	neuropatia	1		
	nawracające/rodzinne objawy	1		
	II. Badania metaboliczne i obrazowe (maksimum 4 punkty)			
- ↑ kwas mlekowy (wielokrotny pomiar)	2	4		
- ↑ stosunek kwasu mlekowego do pirogronowego	1			
- ↑ alanina	2			
- ↑ kwas mlekowy w CSF	2			
- ↑ białko w CSF	1			
- ↑ alanina w CSF	2			
- ↑ metabolity cyklu Krebsa w moczu	2			
- acyduria etylomalonowa (EMA)	1			
- zmiany udaropodobne w MRI głowy	1			
- zespół Leigha w MRI głowy	2			
- wzrost stężenia mleczanów w MRS głowy	1			
III. Morfologia mięśnia (maksimum 4 punkty)				
- włókna RRF lub BRF (ang. <i>blue ragged fibers</i>)	4		4	
- włókna COX-ujemne	4			
- ↓ reakcja barwna na COX	4			
- ↓ reakcja barwna na SDH	1			
Naczynia krwionośne SDH-dodatnie	2			
Nieprawidłowa ultrastruktura mitochondriów	2			

Skala: 1 pkt: choroba mitochondrialna mało prawdopodobna; pkt 2-4: choroba mitochondrialna możliwa; pkt 5-7: choroba mitochondrialna prawdopodobna; 8-12: choroba mitochondrialna zdefiniowana. MRI – rezonans magnetyczny; MRS – spektroskopia rezonansu magnetycznego; COX – oksydaza cytochromowa; SDH – dehydrogenaza bursztynianowa; CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy.

defektu składania kompleksu IV i mutacji w genie *SURF1*, jako przyczyny zespołu Leigha z deficytem oksydazy cytochromu c.

W badaniach nad patomechanizmem chorób mitochondrialnych ważną rolę odgrywają zwierzęta doświadczal-

ne z naturalnym lub sztucznie wywołanym defektem genetycznym. To podejście nie zawsze jednak się sprawdza. Wywołany doświadczalnie u myszy deficyt białka Surf1 przypomina fenotyp pacjentów tylko w patologii dotyczącej mięśni. Zaskakujące jest natomiast, że zwierzęta eksperymentalne nie wykazują obecnych zawsze u człowieka zmian neurologicznych o typie zespołu Leigha. Co więcej, wykazano, że w jednym z dwóch eksperymentów obecność mutacji w genie *SURF1* wiąże się z dłuższym przeżyciem (dotąd brak jest wytłumaczenia tego zjawiska) [40].

Patomechanizm, który prowadzi do wystąpienia zespołu Leigha u dzieci z różnymi defektami OXPHOS pozostaje niewyjaśniony. Jest to fenomen obecności prawie identycznych zmian patologicznych o symetrycznej zbliżonej lokalizacji, niezależnie od rodzaju choroby mitochondrialnej i jej tła molekularnego [24]. Czynnikiem uszkadzającym te same obszary mózgu (i w ten sam sposób) w zaburzeniach OXPHOS może być prawdopodobnie hiperwentylacja, alkalozia oddechowa i hipokapnia [17]. Wiadomo, że także w warunkach fizjologicznych alkalozia oddechowa powoduje wyrównawcze kumulowanie kwasu mlekowego w płynie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym. Zakwaszenie poprzez kumula-

cję mleczanu może przeciwdziałać, szkodliwej dla komórek mózgowych, alkalizacji. Potwierdzenie hipotezy o związku hipokapnii z występowaniem zmian o typie zespołu Leigha mogłoby mieć znaczenie terapeutyczne u pacjentów z tym zespołem.

Innym tematem badań powinna być ocena stopnia szkodliwości dwóch czynników współobecnych w chorobie mitochondrialnej, czyli komórkowego niedoboru energii (produkcji ATP), związanego z samym defektem OXPHOS, oraz nadprodukcji wolnych rodników, wtórnego zjawiska chorobotwórczego. Można przypuszczać, że w niektórych chorobach mitochondrialnych, takich jak uszkodzenie wątroby w zespołach deplekcji mtDNA lub w zespole Leigha, rola tego drugiego patomechanizmu może okazać się kluczowa.

Dalsze intensywne badania nad przyczyną i patomechanizmem chorób mitochondrialnych stwarzają szansę poznania w przyszłości metod ich leczenia, a przynajmniej spowolnienia procesu uszkodzenia narządowego w pierwotnych zaburzeniach funkcji mitochondriów. Postępowanie takie nie jest obecnie znane [41,42].

PIŚMIENNICTWO

- DiMauro S (2004) The many faces of mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 4: 799-807
- Walker UA, Collins S, Byrne E (1996) Respiratory chain encephalomyopathies; A diagnostic classification. *Eur Neurol* 36: 260-267
- Barshop BA (2004) Metabolomic approaches to mitochondrial disease: correlation of urine organic acids. *Mitochondrion* 4: 521-527
- Ueki I, Koga Y, Povalko N, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Fukiyama R, Matsuiishi T (2006) Mitochondrial tRNA gene mutations in patients having mitochondria disease with lactic acidosis. *Mitochondrion* 6: 29-36
- DiMauro S, Bonilla E, De Vivo DC (1999) Does the patient have a mitochondrial encephalopathy? *J Child Neurol* 14 (suppl 1): S23-S35
- Tiranti V, Hoertnagel K, Carozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez J-A, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M (1998) Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 63: 1609-1621
- Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J-Ch, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nature Genet* 20: 337-343
- DiMauro S, Hirano M (2005) Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscul Disorders* 15: 276-286
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR (2002) Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adult and children. *Neurology* 59: 1406-1411
- Wolf NI, Smeitink JAM (2002) Mitochondrial disorders. A proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 59: 1402-1405.
- Robinson BH (2000) Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res* 48: 581-585
- Shoubridge EA (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 106: 46-52
- Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J (2004) Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res* 53 (suppl 1): S213-S223
- Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L, Zeman J (2006) Biogenesis of eucariotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res* 55 (suppl 2): S27-S41
- Bohm M, Pronicka E, Karczmarewicz E, Pronicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Sykut-Cegielska J, Mierzewska H, Hansikova H, Vesela K, Tesarova M, Houstkova H, Houstek J, Zeman J (2006) Retrospective, multicentric survey in 180 children with cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res* 59: 21-26
- Piekutowska-Abramczuk D, Pronicka E, Krajewska-Walasek M (2008) Rola genu SURF1 w patogenezie zespołu Leigha sprzężonego z deficytem aktywności oksydazy cytochromu c. *Ped Pol* 83: 211-216
- Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Pronicki M, Karczmarewicz E, Sykut-Cegielska J, Taybert J. (2001) Compulsory hyperventilation and hypocapnia of patients with Leigh syndrome associated with SURF-1 gene mutations as a cause of low serum bicarbonates. *J Inherit Metab Dis* 24: 707-714
- Tay SK, Shanske S, Kaplan P, DiMauro S (2004) Association of mutations in SCO2, a cytochrome c oxidase assembly gene, with early fetal lethality. *Arch Neurol* 61: 950-951
- Freisinger P, Horwath R, MacMillan C, Peters J, Jaksch M (2004) Reversion of hypertrophic cardiomyopathy in a patient with deficiency of the mitochondrial copper binding protein Sco2: Is there a potential effect of copper? *J Inherit Metab Dis* 27: 67-79
- Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Pongratz DE, Muller-Hocker J, Jedele KB, Meitinger T, Gerbitz K-D (1998) A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA^{Ser(UCD)} mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *J Med Genet* 35: 895-900
- Karczmarewicz E, Bielecka L, Kulczycka H, Lorenc LS, Pronicka E (1997) Analytical reliability of spectrophotometric analysis of the activity of mitochondrial respiratory chain complexes in muscle homogenates. *Diagn Lab* 33: 495-503
- Pronicki M, Matyja E, Piekutowska-Abramczuk D, Szymanska-Debinska T, Karkucinska-Wieckowska A, Karczmarewicz E, Grajkowska W, Kmiec T, Popowska E, Sykut-Cegielska J (2008) Light and electron microscopy characteristics of the muscle of patients with SURF1 gene mutations associated with Leigh disease. *J Clin Pathol* 61: 460-466
- Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Pronicki M, Karczmarewicz E, Tylek-Lemanska D, Sykut-Cegielska J, Szymanska-Debinska T, Bielecka L, Krajewska-Walasek M, Pronicka E (2008) High prevalence of SURF1 c.845_846delCT mutation in Polish Leigh patients. *Eur J Pediatr Neurol*, w druku
- Piekutowska-Abramczuk D (2008) Molekularne podłoże zespołu Leigha. *Neurol Neurochir Pol*, w druku
- Thornburn DR (2004) Mitochondria disorders: Prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis* 27: 349-362
- Van Coster R, Smet J, George E, De Meirleir L, Seneca S, van Hove J, Sebire G, Verhelst H, de Bleecker J, van Vlem B, Verloof P, Leroy J (2001) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in diagnosis of oxidative phosphorylation defects. *Pediatr Res* 50: 658-665
- Karkucinska-Wieckowska A, Czajka K, Wasilewski M, Sykut-Cegielska J, Pronicki M, Cukrowska B, Pronicka E, Zablocki K, Duszyński J, Wieckowski M (2006) Blue native electrophoresis: an additional useful tool to study deficiencies of mitochondrial respiratory chain complexes. *Ann Diag Paediatr Pathol* 10: 89-92
- Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR, Ryan MT (2007) Analysis of the assembly profiles for mitochondria- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol* 27: 4228-4237
- Oglivie I, Kennaway NG, Shoubridge EA (2005) A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 115: 2784-2792
- Almerio S, Mineri R, Tirani V, Zeviani M (2007) Depletion of mtDNA: Syndromes and genes. *Mitochondrion* 7: 6-12
- Spinazzola A, Zeviani M (2007) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci Rep* 27: 39-51
- Miles L, Wong BL, Dinopoulos A, Morehart PJ, Hofmann IA, Bove KE (2006) Investigation of children for mitochondrialriopathy confirms need for strict patient selection, improved morphological criteria, and better laboratory methods. *Hum Pathol* 37: 173-184
- Pecina P, Capkova M, Chowdhury SKR, Drahota Z, Dubot A, Vojtikova A, Hansikova H, Houstkova H, Zeman J, Godinot C, Houstek J (2003) Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochem Biophys Acta* 1639: 53-63

34. Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F, Fischinger-Moura de Souza C, Farina L, Carrara F, Lamantea E, Antozzi C, Confalonieri P, Sanseverino MT, Guiliani R, Uziel G, Zeviani M (2007) Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondria encephalopathy. *Brain* 130: 1894-1904
35. Chan DC (2007) Mitochondrial dynamics in disease. *N Engl J Med* 366: 17
36. Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, Vainionpaa L, Herva R, Vuopala K, Nuutinen M, Majamaa K, Hassinen IE (2000) Childhood encephalomyopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics* 105: 598-603
37. Phoenix C, Schaeffer AM, Elson JL, Morava E, Bugiani M, Uziel G, Smeitink JA, Turnbull DM, McFarland R (2006) A scale to monitor progression and treatment of mitochondrial disease in children. *Neuromuscular Disord* 16: 814-820
38. Garcia-Cazorla A, De Lonlay P, Nassogne MC, Rustin P, Touati G, Saudubray JM (2006) Long-term follow-up of neonatal mitochondrial cytopathies; A study of 57 patients. *Pediatrics* 116: 1170-1177
39. Morava E, van den Heuvel L, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, Smeitink JAM (2006) Mitochondrial disease criteria. Diagnostic applications in children. *Neurology* 67: 1823-1826
40. Chinnery P, Majamaa K, Turnbull D, Thorburn D (2006) Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD004426
41. Dell'Agnello C, Leo S, Agostino A, Szabadkai G, Tivernon C, Zullan A, Prella A, Roubertoux P, Rizzuto R, Zeviani M (2007) Increased longevity and refractoriness to Ca²⁺-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum Mol Genet* 16: 431-444
42. Pronicki M, Sykut-Cegielska J, Matyja E, Tonska K, Piechota J, Bartnik E, Szymańska-Dębińska T, Karczmarewicz E (2007) Diagnostic skeletal muscle biopsy in a boy with A3243G mitochondrial DNA (MELAS) mutation – pathology of “classical” mitochondrial disorder. *Ann Diag Paediat Pathol* 11: 41-44

Metabolic diseases in children including Leigh syndrome – biochemical and molecular background

Ewa Pronicka^{1,✉}, Dorota Piekutowska-Abramczuk², Maciej Pronicki³

¹Department of Metabolic Diseases, Endocrinology and Diabetology, Children's Memorial Health Institute; ²Department of Medical Genetics, Children's Memorial Health Institute; ³Department of Pathology, Children's Memorial Health Institute, 20 Dzieci Polskich Av., 04-730 Warszawa, Poland

✉e-mail: e.pronicka@czd.pl

Key words: Mitochondrial diseases, children, diagnostic criteria, Leigh syndrome

ABSTRACT

Mitochondrial diseases in children are more frequently caused by mutations in nuclear DNA than in mtDNA. Special clinical phenotypes are associated with the mutations in *SURF1* gene, in *SCO2* gene and with mtDNA depletion syndromes. Leigh syndrome is the most common clinical presentation of various mitochondrial disorders during childhood. Elevation of lactate in blood, cerebrospinal fluid and urine is a simple biochemical marker of mitochondrial disorders but its specificity and sensitivity are low. Biochemical investigation of muscle biopsy and search for mitochondrial mutations remain a gold standard in the diagnosis. The standardized diagnostic criteria to establish level of diagnostic certainty (possible, probable, definite) are proposed to be used in practice; these include clinical features, neuroimaging and muscle biopsy investigations. Further research directions to improve our understanding of mitochondrial pathologies in children are suggested.

STRESZCZENIE

Mitochondria są organellami pełniącymi kluczowe funkcje w metabolizmie komórki. Obok udziału w syntezie ATP, mitochondria odgrywają rolę wewnątrzkomórkowego bufora jonów wapnia oraz są miejscem wytwarzania reaktywnych form tlenu. To sprawia, iż organelle te są aktywnie zaangażowane w przekazywanie sygnałów chroniących komórki przed uszkodzeniem. Podstawą wielu zjawisk neuroprotektorycznych są zmiany spójności błon mitochondrialnych. W pracy przedstawiono, między innymi, potencjalną neuroprotektoryczną funkcję mitochondrialnych kanałów jonowych.

WSTĘP

Mitochondria są organellami pełniącymi kluczowe funkcje w metabolizmie komórki. Obok produkcji ATP, zachodzącej na drodze fosforylacji oksydacyjnej z udziałem syntazy ATP, mitochondria odgrywają rolę wewnątrzkomórkowego bufora jonów wapnia oraz są miejscem wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS). Istotnym czynnikiem w regulacji wspomnianych procesów jest gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Powstaje on podczas transportu elektronów przez łańcuch oddechowy oraz wskutek przeniesienia protonów do przestrzeni międzybłonowej. Ścisłe sprzężenie przepływu elektronów oraz fosforylacji ADP z transportem protonów sprawia, że oba procesy nie mogą zachodzić w oderwaniu od siebie, a gradient protonowy jest niezbędny do produkcji ATP. Ponadto, błonowy potencjał elektryczny ($\Delta\Psi$), będący składową siłą protonomotorycznej, stanowi siłę napędzającą transport jonów i metabolitów w poprzek błony wewnętrznej, regulując m. in. akumulację Ca^{2+} w mitochondriach. Proces ten katalizowany jest przez uniporter wapniowy wewnętrznej błony mitochondrialnej w warunkach wysokiego stężenia Ca^{2+} w cytosolu [1]. Napływ jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej może zwiększać aktywność metaboliczną mitochondriów poprzez aktywację kluczowych enzymów regulatorowych, takich jak dehydrogenaza pirogronianowa, dehydrogenaza izocytrynianowa i dehydrogenaza 2-oksoglutaranowa [2]. Z drugiej strony jednak nadmierna akumulacja jonów wapnia w mitochondriach prowadzi do aktywacji megakanala mitochondrialnego (PTP, ang. *permeability transition pore*), co powoduje zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondriów, pęcznienie macierzy mitochondrialnej, a następnie przerwanie ciągłości błony zewnętrznej i wypływ białek apoptogennych (co stwierdzono z wykorzystaniem izolowanych mitochondriów) [3]. Dotychczasowe badania molekularnej budowy megakanala sugerują, że jest to kompleks białkowy, w skład którego wchodzi translokaza nukleotydów adeninowych (ANT, ang. *adenine nucleotide translocase*) obecna w błonie wewnętrznej, poryna tworząca w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kanał anionowy zależny od potencjału (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*) oraz białko macierzy mitochondrialnej – cyklofilina D (CyP-D, ang. *cyclophilin D*). Ponadto, postuluje się, iż w regulacji tworzenia poru może brać udział szereg innych białek nie będących bezpośrednimi składnikami megakanala, m.in. anty- i proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, mitochondrialna kinaza kreatynowa (MtCK, ang. *mitochondrial creatine kinase*), mitochondrialna heksokinaza (HK) i receptor benzodiazepinowy (PBR, ang. *peripheral benzodiazepine receptor*) [3]. Wzrost stężenia jonów wapnia w mitochondriach jest podstawowym czynnikiem indukującym otwarcie megakanala. Procesowi temu sprzyja również obniżenie błonowego potencjału elektrycznego i alkalizacja macierzy mitochondrialnej [3]. Wrażliwość megakanala na Ca^{2+} wydaje się być regulowana poziomem syntezy CyP-D, co decydować może o różnicach tkankowych w odpowiedzi mitochondriów na jony wapniowe [4]. Wskazuje się także na rolę, jaką w modulacji indukcji PTP odgrywać mogą liczne szlaki sygnałowe zachodzące z udziałem kinaz oraz fosfataz. Udowodniono, że aktywność megakanala może być pośrednio regulowana przez kinazę białkową p38 aktywowaną przez mitogeny (p38 MAPK, ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*), która poprzez fosforylację uniportera wapniowego, wpływa

Marta Piwońska[✉]

Adam Szewczyk

Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

[✉]Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, e-mail: m.glab@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 9 maja 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 12 maja 2008 r.

Słowa kluczowe: mitochondria, apoptoza, megakanal mitochondrialny, kanały jonowe, białka rozprzegające, neuroprotekcja

Wykaz skrótów: CsA – cyklosporyna; CyP-D – cyklofilina D; $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ – mitochondrialny kanał potasowy regulowany ATP; $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapnia; PTP (ang. *permeability transition pore*) – megakanal mitochondrialny; ROS – reaktywne formy tlenu; UCP (ang. *uncoupling protein*) – białko rozprzegające; 5-HD (ang. *5-hydroxydecanoic acid*) – kwas 5-hydroksydekanowy

na homeostazę Ca^{2+} [3]. Zaobserwowano także, iż fosforylacja poryny, zachodząca z udziałem białkowej kinazy c typu ϵ (PKC ϵ , ang. *protein kinase C ϵ*), której aktywność modulowana jest przez reaktywne formy tlenu, może prowadzić do zahamowania indukcji PTP [5].

Reaktywne formy tlenu (ROS), wytwarzane w mitochondriach, to kolejny ważny czynnik sygnałowy zaangażowany w regulację metabolizmu komórki. Za główne miejsca wytwarzania ROS uważa się kompleksy łańcucha oddechowego, takie jak oksydoreduktaza NADH – ubichinon (kompleks I) oraz kompleks cytochromów bc_1 (oksydoreduktaza ubichinol – cytochrom c) (kompleks III). Wzmocniona produkcja ROS lub zaburzenia w funkcjonowaniu systemu przeciwutleniaczy mogą prowadzić do uszkodzenia struktur komórkowych wskutek utleniania białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Dodatkowo jednak ROS mogą pełnić funkcję metabolicznych przekazników sygnałów. Liczne dane wskazują na udział ROS w indukcji syntezy białek poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak czynnik jądrowy NF- κ B (ang. *nuclear factor*) i AP-1 (ang. *activator protein-1*) [6] oraz czynnik indukowany hipoksją (HIF-1, ang. *hypoxia inducible factor*) [7]. Postuluje się także rolę ROS w regulacji szlaku sygnalizacyjnego kinazy c -jun (JNK, ang. *c-Jun NH₂-terminal kinase*) oraz kinazy białkowej MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) [6]. Wydaje się również, że stan redoks komórki może modulować aktywność kinazy białkowej c (PKC, ang. *protein kinase C*), jak również białkowych kinaz tyrozynowych oraz białkowych fosfataz tyrozynowych [6]. Na uwagę zasługuje także rola, jaką ROS odgrywają w inicjowaniu programowanej śmierci komórki. ROS mogą indukować proces apoptozy pośrednio poprzez uszkodzenia struktur komórkowych, bądź uruchamiając odpowiednią kaskadę przekazywania sygnału w komórce.

Apoptoza jest procesem fizjologicznym, umożliwiającym kontrolowane usuwanie komórek podczas wzrostu i różnicowania oraz eliminację komórek nieprawidłowych oraz już niepotrzebnych. Wzmocniony proces programowanej śmierci obserwowany w stanach patologicznych, takich jak choroby autoimmunizacyjne czy schorzenia neurodegeneracyjne wiąże się natomiast z przesunięciem równowagi w kierunku niekontrolowanego usuwania komórek. Badania ostatnich lat bezspornie pokazują, że mitochondria odgrywają istotną rolę w procesie apoptozy. Uwolnienie do cytosolu AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) oraz endonukleazy G, a także apoptogennych białek mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, takich jak cytochrom c , białko Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), proteaza Omi/HtrA2 (ang. *high temperature requirement protein A2*), jest bowiem czynnikiem warunkującym kluczowy etap programowanej śmierci komórki, a mianowicie aktywację kaspaz. Proces ten zapoczątkowuje aktywacja prokaspazy-9, zachodząca w apoptosomie utworzonej przy udziale cytochromu c , białka adpatorowego Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor 1*) oraz ATP/dATP. Wyzwolenie kaskadowej reakcji kaspaz efektorowych możliwe jest natomiast dzięki oddziaływaniu białek Smac/DIABLO oraz Omi/HtrA2 z cytosolowymi inhibitorami apoptozy (IAP, ang. *inhibitory apoptosis protein*). Dodatkowo, przeniesienie białka AIF oraz endonu-

kleazy G do jądra komórkowego prowadzi do degradacji DNA, zachodzącej niezależnie od kaspaz [8].

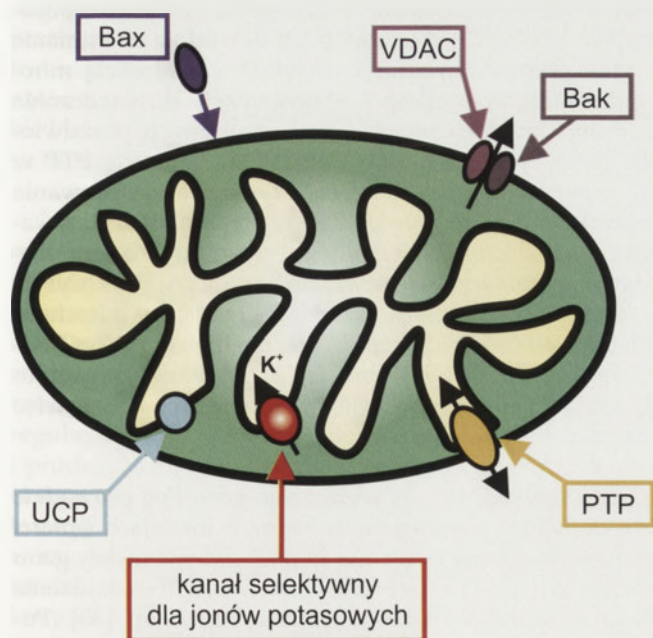
Molekularny mechanizm uprzepuszczalnienia błon mitochondrialnych, prowadzący do przemieszczenia białek apoptogennych do cytosolu, nadal pozostaje w sferze hipotez. Wydaje się, że przebieg procesu uwalniania cytochromu c z mitochondriów zależy może od typu komórek, rodzaju czynnika proapoptotycznego, jak również stanu bioenergetycznego komórki. Proponuje się kilka modeli opisujących mechanizm zachodzenia tego zjawiska. W procesie apoptozy przebiegającym na drodze zależnej od jonów wapnia kluczową rolę przypisuje się mitochondrialnemu megakanalowi (PTP) [3]. Wzrost stężenia Ca^{2+} indukuje otwarcie PTP, co prowadzi do uprzepuszczalnienia błony wewnętrznej, a w preparacie wyizolowanych z tkanki mitochondriów, także ich pęcznienia, rozerwania błony zewnętrznej i wypływu białek mitochondrialnych. Dane doświadczalne wskazują także na udział proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 w regulacji megakanalu. Zaobserwowano, między innymi, iż nadekspresja genu kodującego białko Bax w komórkach Jurkat indukuje śmierć hamowaną przez inhibitor megakanalu – cyklosporynę A (CsA). Istnieją również doniesienia wskazujące na bezpośrednie oddziaływanie białka Bax ze składnikami megakanalu – translokazą nukleotydów adeninowych oraz poryną [3]. Oddziaływania te modulują aktywność PTP w sposób zależny od CsA i białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-X_L. Odmienny mechanizm uwalniania cytochromu c z mitochondriów proponuje się dla szlaku transdukcji sygnału apoptotycznego niezależnego od Ca^{2+} . Model ten zakłada, iż kluczową rolę w uprzepuszczalnieniu zewnętrznej błony mitochondrialnej odgrywają białka z rodziny Bcl-2. Sugeruje się, że białka Bax i Bak w wyniku oligomeryzacji indukowanej przez białko t-Bid, mogą w zewnętrznej błonie mitochondrialnej formować pory, przez które dochodzi do wypływu białek apoptogennych z przestrzeni międzybłonowej [3]. Zaobserwowano także, że oligomeryczna forma białka Bax może oddziaływać z translokazą nukleotydów adeninowych lub poryną, generując powstawanie kanałów o dużym przewodnictwie [3]. Wyniki ostatnich badań pokazują również, że procesowi uwalniania cytochromu c z mitochondriów towarzyszyć może reorganizacja grzebieni mitochondrialnych. Czynnikiem inicjującym zmiany organizacji błony wewnętrznej wydaje się być białko tBid, które poprzez oddziaływanie z kardioliną, prowadzić może do zmian przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej, wzrostu produkcji ROS, i w konsekwencji, utleniania lipidów [9]. Zmiana struktury grzebieni mitochondrialnych podlegająca dodatkowo kontroli białek zaangażowanych w fuzję i fragmentację mitochondriów, m.in. Opa1 (ang. *Optic atrophy 1*) i Drp1, umożliwia mobilizację puli cytochromu c związanego z miejscami kontaktowymi oraz zamkniętego w obrębie grzebieni mitochondrialnych [10,11].

Obok utraty spójności błon mitochondrialnych, w procesie apoptozy obserwuje się także liczne zmiany metabolizmu mitochondriów, poprzedzające śmierć komórki. Jednym z pierwszych sygnałów pojawiających się na drodze przekazywania sygnału apoptotycznego jest obniżenie elektrycznego potencjału błonowego. Przypuszcza się, że spadek $\Delta\Psi$ może być wynikiem otwarcia megakanalu,

choć nie wyklucza się także scenariusza odwrotnego, w którym to depolaryzacja błony, indukowana m. in. zaburzeniami transportu elektronów w łańcuchu oddechowym lub zwiększoną przepuszczalnością błony wewnętrznej dla protonów, prowadzić może do aktywacji PTP. Zjawiskiem towarzyszącym procesowi apoptozy jest również wzmożona synteza ROS, za którą może odpowiadać zahamowanie szybkości oddychania lub wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej.

Neurony to komórki szczególnie narażone na działanie licznych czynników uszkodzających. Zablockowanie przepływu krwi, a zatem deficyt tlenu i glukozy prowadzi nieuchronnie do powstania zmian nekrotycznych w obrębie obszaru niedokrwienia mózgu. Dodatkowo, niedobór tlenu w sąsiadującym z rdzennym obszarem udaru półcieniu, powoduje zwiększone wydzielanie kwasu glutaminowego, aktywację receptorów glutaminergicznych, a co za tym idzie – napływ jonów wapniowych do wnętrza neuronów. Nadmierna akumulacja Ca^{2+} w cytoplazmie stanowi natomiast czynnik wyzwalający proces apoptozy komórek nerwowych. Toksyczność pobudzeniowa, indukowana nadmiarem neuroprzekaźnika, towarzyszy także wielu chorobom neurologicznym, takim jak choroba Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne.

Bezsprzeczny udział mitochondriów w przekazywaniu sygnału apoptotycznego sprawia, że badania ostatnich lat koncentrują się wokół poszukiwania strategii neuroprotektynnych, których bezpośrednim obiektem działania byłyby mitochondria. Oprócz prób wykorzystania substancji chemicznych w celu zablokowania megakanala mitochondrialnego, sugeruje się zasadność terapii z wykorzystaniem związków przeciwutleniających lub regulację poziomu ROS na drodze aktywacji mitochondrialnych białek rozprzegających. Postuluje się również potencjalną cytoprotekcyjną rolę mitochondrialnych kanałów potasowych. Dodatkowo,



Rycina 1. Mitochondrialne białka regulujące przepuszczalność błon mitochondrialnych: UCP – białko rozprzegające, PTP – megakanal mitochondrialny, VDAC – poryna mitochondrialna.

interesujący obiekt badań stanowią białka zaangażowane w regulację fuzji i fragmentacji mitochondriów, procesów, które obok kontroli kształtu i aktywności metabolicznej mitochondriów, wydają się grać istotną rolę w procesie apoptozy (Ryc. 1).

BIAŁKA REGULUJĄCE PROCES FUZJI/FRAGMENTACJI MITOCHONDRIOW

Fuzja i fragmentacja mitochondriów to procesy prowadzące do formowania i rozpadu sieci mitochondrialnych w komórce. Stabilizacja struktury mitochondriów, warunkowana utrzymaniem równowagi pomiędzy zachodzeniem obu zjawisk, podlega ścisłej kontroli i regulacji przez szereg białek zlokalizowanych zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach. Jak dotąd w komórkach ssaków zidentyfikowano trzy białka zaangażowane w proces fuzji mitochondriów. Należą do nich błonowe GTPazy, takie jak Mfn1 (ang. *mitofusin 1*) i Mfn2 (ang. *mitofusin 2*), obecne w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, oraz Opa1 zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej [12]. Spośród białek regulujących proces fragmentacji mitochondriów należy wymienić białko zewnętrznej błony mitochondrialnej, Fis1, oraz białko cytosolowe, GTPazę Drp1 (ang. *dynamamin-related GTPase*) oraz endofilinę B1 [12]. Badania ostatnich lat pokazują, że białka odpowiedzialne za procesy fuzji/fragmentacji mitochondriów mogą również brać udział w regulacji sygnału apoptotycznego, co sugerowałoby potencjalną zależność między zmianami morfologicznymi mitochondriów a śmiercią komórki [13]. Zaobserwowano m.in., że wbudowaniu aktywnego białka Bax do zewnętrznej błony mitochondrialnej towarzyszy fragmentacja mitochondriów [14] i zahamowanie procesu fuzji [15]. Postuluje się, że zmiany morfologii mitochondriów indukowane procesem fuzji stanowią czynnik utrudniający wbudowanie oligomerów Bax/Bak do zewnętrznej błony mitochondrialnej [14]. Wykazano ponadto, iż w miejscach w których dochodzi do fragmentacji mitochondriów, białko Drp1 współwystępuje w błonie zewnętrznej z białkami Bax i Mfn2 [16].

Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach HeLa pokazały, że wyciszenie genu kodującego białko Fis1 lub Drp1 hamuje apoptozę indukowaną staurosporyną (STS), aktynomycyną D czy czynnikiem Fas [13]. Rola wspomnianych białek w przekazywaniu sygnału apoptotycznego wydaje się być jednak różna. Postuluje się, że etapem kluczowym dla aktywności białka Fis1 w apoptozie jest faza poprzedzająca transport białka Bax do mitochondriów, podczas gdy aktywność Drp1 próbuje się wiązać z fazą wpływu cytochromu c do przestrzeni międzybłonowej [13]. Ponadto, zaobserwowano, że wzmożona fuzja mitochondriów może być czynnikiem sprzyjającym przeżyciu komórek. Wzrost aktywności białka Mfn2 prowadzi do zahamowania aktywacji białka Bax i uwalniania cytochromu c z mitochondriów [17].

Neurony są komórkami szczególnie wrażliwymi na zmiany struktury mitochondriów. Znane są przynajmniej dwie choroby neurodegeneracyjne wywołane mutacjami w genach kodujących białka regulujące proces fuzji i fragmentacji mitochondriów. Mutacje w genie *OPA1* odpowiadają za rozwój choroby zwanej atrofią wzrokową typu I

[18]. Punktowe mutacje w genie *Mfn2* są natomiast główną przyczyną choroby neurozwyrodnieniowej Charcot-Marie-Tooth typu 2, prowadzącej do zaniku aksonów nerwów obwodowych [19]. Zaobserwowano także, że białko *Mfn2* jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju mózdzku, w tym głównie dla komórek Purkiniego [20]. Komórki Purkiniego pozbawione genu *Mfn2* charakteryzują się uboższą siecią połączeń kolateralnych, mniejszą gęstością kolców dendrytycznych i dramatycznie obniżoną przeżywalnością. Zmianom morfologii neuronów towarzyszą również zaburzenia ultrastruktury i dystrybucji mitochondriów oraz spadek aktywności kompleksów łańcucha oddechowego [20]. Ponadto zaobserwowano, że proces fragmentacji mitochondriów stanowi jeden z pierwszych etapów apoptozy zachodzącej w neuronach zarówno *in vitro* [21-23], jak i *in vivo* [21]. Doświadczenia przeprowadzone z użyciem neuronalnych hodowli pierwotnych wykazały, że wzmożona synteza białek biorących udział w procesie fuzji mitochondriów skutecznie hamuje apoptozę komórek nerwowych. Pokazano m.in., że wzrost aktywności białka *Mfn2* prowadzi do ochrony komórek ziarnistych mózdzku w warunkach stresu oksydacyjnego, bądź uszkodzenia DNA indukowanego inhibitorem topoisomerazy, kamptotecyną [22]. Neuroprotektoryny efekt wzmożonej syntezy *Mfn2* obserwowano również w hodowli pierwotnej neuronów kory mózgowej poddanej działaniu tlenu azotu, rotenonu i β amyloidu [21]. W obu modelach obserwowano wyraźne zahamowanie fragmentacji mitochondriów, co wskazuje na istotną rolę tego procesu w przekazywaniu sygnału apoptotycznego w neuronach. Co więcej, podobny efekt uzyskany w doświadczeniach z zastosowaniem komórek nerwowych pozbawionych genu kodującego *Drp1* sugeruje, że właśnie to białko może być bezpośrednio zaangażowane w proces fragmentacji mitochondriów indukowany czynnikiem apoptotycznym [23]. Mechanizm ochrony, wywołany nadekspresją genu kodującego *Mfn2*, próbuje się dodatkowo wiązać z funkcją sygnałową tego białka. Wyniki badań Johani-Asl i wsp. dowiodły bowiem, że zmutowane białko *Mfn2* zdolne do wiązania nukleotydów, ale pozbawione aktywności hydrolitycznej, indukując podobny poziom fuzji mitochondriów, co białko typu dzikiego, wykazuje jednocześnie dużo większe działanie neuroprotektoryjne. Sugeruje się więc, że stan nukleotydowy *Mfn2*, determinując oddziaływanie z innymi białkami zewnętrznej błony mitochondrialnej, może stanowić czynnik krytyczny dla przeżywalności neuronów. Hipotezę tę wydają się potwierdzać dane pokazujące, iż forma białka *Mfn2* związana z GTP nie oddziałuje z oligomerami Bax/Bak wbudowywanymi w błonę zewnętrzną we wczesnym etapie apoptozy [17].

MEGAKANAŁ MITOCHONDRIALNY

Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie neuronów towarzyszy wielu procesom patologicznym, takim jak udar mózgu i neurozwyrodnienie. W tych warunkach rola mitochondriów jako wewnątrzkomórkowych buforów Ca^{2+} wydaje się być szczególnie istotna. Z drugiej strony jednak nadmierna akumulacja Ca^{2+} w mitochondriach prowadzi do indukcji PTP i śmierci komórki. Jako jedną ze strategii neuroprotektoryjnych proponuje się więc zastosowanie substancji chemicznych hamujących aktywność megakanala. Megakanal mitochondrialny to kompleks białkowy odgry-

wający kluczową rolę w mechanizmie uprzepuszczalności zewnętrznej błony mitochondriów podczas apoptozy zachodzącej na drodze zależnej od Ca^{2+} . Wrażliwość PTP na wzrost stężenia jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej jest zróżnicowana tkankowo i zależy od poziomu syntezy jednego ze składników megakanala – cyklofiliny D (CyP-D) [4,24]. CyP-D jest izomerazą peptydylo-prolinową *cis-trans* zlokalizowaną w macierzy mitochondrialnej. Białko to uwrażliwia megakanal na aktywację Ca^{2+} [24] i stanowi specyficzne miejsce wiązania cyklosporyny A (CsA), immunosupresyjnego cyklicznego oligopeptydu hamującego aktywność PTP [25].

Wyniki badań prowadzonych na hodowlach pierwotnych dowiodły, że zastosowanie CsA prowadzi do ochrony neuronów w warunkach toksyczności pobudzeniowej indukowanej glutaminianem [26] i NMDA [27]. Wykazano, że CsA poprzez hamowanie depolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, zapobiega spadkowi poziomu ATP, blokuje wzrost produkcji ROS i śmierć komórki [26,27]. Podobne wyniki uzyskano także w doświadczeniach *in vivo* [28,29] choć tu stopień neuroprotekcji uzależniony był od dawki i drogi podania leku immunosupresyjnego. Ponadto, słaba przenikalność przez barierę krew-mózg oraz neurotoksyczność wysokich stężeń CsA sprawiają, że obecnie duże zainteresowanie wzbudzają jej analogi, takie jak N-Me-Val 4-cyclosporin A [30], NIM811 i UNIL025 [31], nie mające właściwości immunosupresyjnych.

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach pokazały, że w porównaniu z mitochondriami serca czy wątroby, mitochondria mózgowe cechuje wysoka odporność na indukcję megakanala jonami wapniowymi, a poziom CyP-D jest dużo niższy niż w innych tkankach [4]. Podobne zależności obserwowano także w obrębie mózgu. Wykazano, między innymi, że mitochondria synaptyczne kory mózgowej charakteryzujące się wysokim poziomem syntezy CyP-D są dużo bardziej wrażliwe na wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej niż mitochondria z obszarów pozasynaptycznych [32]. Bezpośrednich dowodów na istnienie związku pomiędzy poziomem CyP-D a zdolnością mitochondriów do akumulacji Ca^{2+} dostarczyły doświadczenia przeprowadzone na myszach transgenicznych pozbawionych genu *Ppif* kodującego CyP-D [24]. Indukcja PTP w mitochondriach myszy *knock-out* wymagała zastosowania dwukrotnie wyższych stężeń Ca^{2+} w porównaniu z aktywacją megakanala mitochondriów myszy typu dzikiego. Dodatkowo proces ten był niewrażliwy na CsA. Brak CyP-D nie wpływał natomiast na stan bioenergetyczny mitochondriów o czym świadczyć może niezmienną szybkość oddychania w warunkach stymulacji ADP lub rozpręszczaczem [24]. Regulacja poziomu CyP-D w komórce wydaje się więc być atrakcyjną strategią neuroprotektoryjną.

Ostatnio wykazano, że wyłączenie genu *Ppif* prowadzi do ochrony neuronów w różnych modelach śmierci komórkowej. Zaobserwowano, iż pozbawienie myszy genu kodującego CyP-D znacznie obniża stopień uszkodzenia mózgu w warunkach niedotlenienia/reperfuzji [33]. Ponadto, doświadczenia z zastosowaniem eksperymentalnego modelu stwardnienia rozsianego dowodzą roli, jaką w rozwoju tego schorzenia odgrywa, indukowana Ca^{2+} , akty-

wacja megakanalu mitochondrialnego [34]. U myszy *Ppif*^{-/-}, mimo rozwoju klinicznych symptomów EAE, wywołanych procesami zapalnymi, dużo szybciej w porównaniu do myszy typu dzikiego obserwowano zanik objawów i znaczną poprawę stanu ogólnego. Wykazano również wyraźne zahamowanie procesów neurozwyrodnieniowych prowadzących do uszkodzenia i redukcji gęstości aksonów w rdzeniu kręgowym, jak i wzrost odporności mitochondriów na ROS i Ca²⁺ [34].

BIĄŁKA ROZPRZĘGAJĄCE

Białka rozprzegające (UCP, ang. *uncoupling proteins*) to rodzina białek wewnętrznej błony mitochondrialnej, pełniących funkcję transporterów anionów. Ich fizjologiczna rola w metabolizmie energetycznym mitochondriów wydaje się polegać na transporcie H⁺ do wnętrza macierzy mitochondrialnej, co stanowi mechanizm biernego „przecieku” protonów odpowiedzialnego za 10–27% spoczynkowego zużycia tlenu. Do tej pory zidentyfikowano pięć białek UCP. Po raz pierwszy opisane w brunatnej tkance tłuszczowej, UCP-1 odpowiada za termogenezę bezdrzeniową i produkcję ciepła u noworodków oraz prawdopodobnie bierze udział w odpowiedzi dorosłych na stres związany z niską temperaturą. Białko UCP-3 występuje w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym oraz brunatnej tkance gryzoni. UCP-2, obecne w większości tkanek, zidentyfikowane zostało w układzie nerwowym, gdzie obecne są także dwa inne specyficzne dla mózgu białka rozprzegające: UCP-4 oraz UCP-5, zwane także BMPC-1 (ang. *brain mitochondrial carrier protein-1*) [35].

W literaturze istnieją dwie hipotezy wyjaśniające mechanizm transportu protonów przez białka UCP. Jedna z nich opiera się na założeniu, że białko rozprzegające może tworzyć w błonie wewnętrznej mitochondriów kanał anionowy transportujący kwasy tłuszczowe wraz z protonami [36]. Dodatkowo nie wyklucza się także roli, jaką w tym procesie odgrywać mogą translokaza nukleotydów adeninowych, przenośnik asparginian/glutaminian [37], czy przenośnik kwasów dikarboksylowych [38]. Druga hipoteza zakłada natomiast przemieszczanie kwasów tłuszczowych w obrębie błony i udział UCP w transporcie anionowej formy kwasu tłuszczowego.

Niezależnie od mechanizmu transportu H⁺ do wnętrza mitochondriów, proces ten prowadzi do rozprzegania fosforylacji oksydacyjnej i spadku elektrycznego potencjału błonowego. Podczas gdy całkowite i długotrwałe rozprzeganie mitochondriów prowadzi do zaburzenia metabolizmu energetycznego komórki, przejściowy napływ protonów do wnętrza macierzy mitochondrialnej stanowić może czynnik regulujący zarówno akumulację Ca²⁺ w mitochondriach, jak i produkcję ROS. Badania ostatnich lat pokazują, iż krótka ekspozycja komórek na egzogenne czynniki rozprzegające, takie jak FCCP czy DNP prowadzić może do neuroprotekcji w modelu toksyczności pobudzeniowej indukowanej glutaminianem [39] lub w warunkach pozbawienia tlenu i glukozy [40]. Dodatkowych danych dostarczają eksperymenty *in vivo*. Zaobserwowano, między innymi, iż systemowe podanie DNP w istotny sposób zmniejsza rozmiary uszkodzenia mózgu w modelu niedotlenienia/reperfuzji [41] oraz

aktywacji receptorów NMDA kwasem kwinolinowym [42]. Doświadczenia przeprowadzone z użyciem mitochondriów izolowanych z mózgu poddanego działaniu DNP dowodzą, że mechanizm cytoprotekcji indukowanej przez substancję rozprzegającą polega w głównej mierze na zahamowaniu akumulacji jonów wapniowych w mitochondriach i obniżeniu poziomu ROS [41].

Pojawienie się danych wskazujących na neuroprotekcijną rolę egzogennych protonoforów sprawiło, że również endogenne białka rozprzegające UCP wydały się ciekawym obiektem badawczym w kontekście zjawiska cytoprotekcji. Doświadczenia, w których stosowano hartowanie niedotlenieniem (IPC, ang. *ischemic preconditioning*) polegające na krótkotrwałym epizodzie niedotlenienia chroniącym mózg przed następnym długotrwałym pozbawieniem tlenu, wykazały, że zjawisku temu towarzyszy wzrost syntezy białka UCP-2 w mózgu [40]. Autorzy postulują potencjalną rolę UCP-2 w regulacji stanu redoks komórki, który poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak NF-κB lub AP-1, wpływać może na poziom syntezy białek zaangażowanych w proces neuroprotekcji, m. in. dysmutazy ponadtlenkowej i Bcl-2 [40]. Pokazano także, że czynnikiem modulującym poziom UCP-2 może być dieta. U szczurzych noworodków karmionych wysokotłuszczowym mlekiem matki obserwowano wysoki poziom UCP-2 w mózgu, który pozytywnie harmonizował z odpornością zwierząt na uszkodzenie neuronów układu limbicznego, indukowane kwasem kainowym [43]. Zaobserwowano także, że wzmocniona synteza UCP-2 w hodowlach pierwotnych kory mózgowej inkubowanych w warunkach pozbawionych tlenu i glukozy hamuje aktywację kaspazy 3, prowadząc tym samym do ochrony neuronów [40]. Podobne obserwacje pochodzą z doświadczeń prowadzonych na myszach zdolnych do wzmoczonej syntezy UCP-2, u których operacyjnie dokonywano uszkodzenia kory śródwęchowej. W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, u myszy transgenicznych obserwowano wyraźnie niższy poziom aktywacji kaspazy 3 [44]. Ponadto, neuroprotekcijnego efektu wzmoczonej syntezy UCP-2 dowiedziono *in vivo* w eksperymentalnym modelu udaru mózgu, wywołanym zamknięciem środkowej aorty mózgowej (MCAO, ang. *middle cerebral artery occlusion*) [40], jak również w modelu choroby Parkinsona indukowanej MPTP [45]. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wzrostowi przeżywalności neuronów towarzyszył obniżony poziom peroksydacji lipidów i karbonylacji białek, jak również zahamowanie produkcji ROS. Wydaje się więc, że neuroprotekcja, wynikająca z przejściowego rozprzegania mitochondriów zachodzącego na drodze aktywacji UCP-2, wiąże się bezpośrednio z regulacją poziomu ROS w komórce.

MITOCHONDRIALNE KANAŁY POTASOWE

Badania ostatnich lat wskazują na rolę jaką w zjawisku cytoprotekcji odgrywać mogą kanały potasowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondriów. Mimo że fizjologiczna rola mitochondrialnych kanałów potasowych nadal pozostaje nie do końca poznana, wiadomo, iż mogą one brać udział w regulacji objętości mitochondriów, potencjału elektrycznego, a co za tym idzie – szybkości oddychania, produkcji ROS i akumulacji Ca²⁺ w macierzy mitochondrialnej. Wykazano także, że napływ jonów potasu do

wnętrza mitochondriów prowadzi do ochrony komórek w różnych modelach śmierci. Sugeruje się, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych poprzez wzrost objętości macierzy mitochondrialnej może korzystnie wpływać na gospodarkę energetyczną komórki. Ponadto, przypuszcza się, iż wzmożony transport K^+ do mitochondriów powodować może zahamowanie akumulacji jonów wapniowych w macierzy mitochondrialnej, chroniąc tym samym komórki przed aktywacją megakanalu. Dodatkowo, nie wyklucza się także roli jaką w mechanizmie cytoprotekcji odgrywać mogą ROS (Ryc. 2).

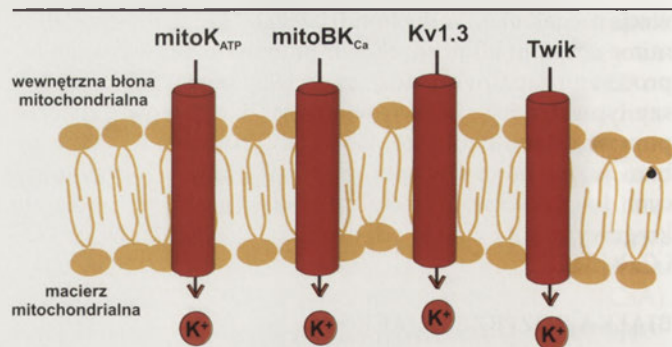
MITOCHONDRIALNY KANAŁ POTASOWY REGULOWANY ATP

Mitochondrialny kanał potasowy regulowany ATP (mitoK_{ATP}), zidentyfikowany został w wewnętrznej błonie mitochondriów wątroby [46], serca [47], mięśni szkieletowych [48] i mózgu [49]. Budowa molekularna kanału mitoK_{ATP}, choć nie do końca poznana, wydaje się być zbliżona do struktury kanału K_{ATP} z błony plazmatycznej, utworzonego przez podjednostki Kir 6.x -tworzące por kanału oraz podjednostki regulatorowe SUR, będące receptorami sulfonocymidów. Próby identyfikacji izoform podjednostki Kir i SUR kanału mitoK_{ATP} z mózgu pokazały, iż w mitochondriach obecne jest zarówno białko Kir 6.1, jak i Kir6.2, SUR1 oraz SUR2. Wydaje się jednak, że izoformami dominującymi w mitochondriach mózgu są prawdopodobnie Kir6.1 i SUR2 [50].

W warunkach fizjologicznych kanał mitoK_{ATP} podobnie jak kanał K_{ATP} obecny w błonie plazmatycznej, aktywowany jest przez GTP i GDP, a hamowany przez ATP. ADP i długołańcuchowe estry CoA aktywujące kanał K_{ATP} z błony plazmatycznej powodują natomiast zahamowanie aktywności kanału mitoK_{ATP}. Aktywność kanału mitoK_{ATP} może być również modulowana na szlaku przekazywania sygnału z udziałem kinaz białkowych, m.in. PKC. Obserwuje się także aktywację kanału mitoK_{ATP} pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenoazotynu [50].

Oba typy kanałów regulowane są przez grupę związków farmakologicznych, wśród których wyróżnić można aktywatory kanałów potasowych (ang. *potassium channels openers*), m.in. kromakalimę i diazoksyd oraz inhibitory, w tym pochodne sulfonocymidów, takie jak glibenklamid [50]. Mimo podobnej farmakologii, kanały te cechuje różna wrażliwość na te same stężenia modulatorów. Pokazano m.in., że powinowactwo diazoksydu do kanału mitoK_{ATP} jest znacznie wyższe niż do kanału K_{ATP} z błony plazmatycznej. Wiadomo także, że wrażliwość podjednostek SUR kanału mitoK_{ATP} na pochodne sulfonocymidów jest niższa w porównaniu z receptorami SUR z błony plazmatycznej. Znany jest również selektywny aktywator mitoK_{ATP} – BMS191095, jak również specyficzny inhibitor tego kanału – kwas 5-hydroksydekanowy [50].

Kluczowe znaczenie w badaniach nad potencjalną rolą kanałów mitoK_{ATP} w zjawisku cytoprotekcji miało odkrycie pokazujące, że substancje zwiększające napływ jonów potasu do mitochondriów prowadzą do ochrony mięśnia



Rycina 2. Mitochondrialne kanały potasowe: mitoK_{ATP} – kanał potasowy regulowany ATP, mitoBK_{Ca} – kanał potasowy o dużym przewodnictwie, aktywowany jonami wapnia, Kv1.3 – kanał potasowy regulowany potencjałem błonowym, TWIK – kanał potasowy „dwupasmowy”

sercowego w wielu modelach niedotlenienia. Ponadto, wykazano, że 5-HD, inhibitor kanału mitoK_{ATP}, hamuje efekt ochronny, indukowany procesem hartowania niedotlenieniem [51]. Dane te sugerują więc udział kanałów mitoK_{ATP} w mechanizmie IPC, wskazując dodatkowo na rolę jaką w naśladowaniu tego procesu odgrywać mogą substancje farmakologiczne modulujące aktywność mitoK_{ATP}.

Wstępne dane wskazujące na neuroprotektoryjne działanie aktywatorów kanału mitoK_{ATP} pochodzą z doświadczeń prowadzonych *in vivo* na noworodkach świni poddawanych globalnemu niedotlenieniu. Zastosowanie diazoksydu hamowało uszkodzenie neuronów, a efekt ten blokowany był przez 5-HD, inhibitor kanału mitoK_{ATP}. Udowodniono także, że diazoksyd skutecznie zmniejsza obszar martwicy mózgu u myszy i szczurów poddanych zamknięciu tętnicy środkowej mózgu, jak również u noworodków szczurzych w modelu hipoksji – niedokrwienia. W obu układach doświadczalnych obserwowano wyraźne odwracanie efektu diazoksydu przez 5-HD [50].

Podobne wyniki uzyskano także w doświadczeniach *in vitro* prowadzonych z użyciem hodowli pierwotnych komórek z mózgu. Wykazano, iż aktywacja kanału mitoK_{ATP} prowadzi do ochrony neuronów hipokampa szczura w warunkach chemicznej hipoksji, jak również apoptozy indukowanej staurosporyną. Zjawisku cytoprotekcji towarzyszyło zahamowanie transportu białek Bax do mitochondriów oraz wzrost syntezy białka Bcl-2 we frakcji mitochondrialnej [52]. Neuroprotektoryjny efekt diazoksydu obserwowano także w modelu apoptozy indukowanej stresem oksydacyjnym [53]. Preinkubacja neuronów ziarnistych mózdzku ze 100 μ M diazoksydem prowadziła do spadku aktywności kaspazy 3, stabilizacji elektrycznego potencjału błonowego mitochondriów i w rezultacie – do wzrostu przeżywalności komórek. Ostatnio proponuje się również udział kanału mitoK_{ATP} w ochronie neuronów w modelu doświadczalnym choroby Parkinsona [54]. Pokazano, że diazoksyd, w sposób zależny od stężenia (1–300 μ M), chronił komórki PC12 poddane działaniu rotenonu, inhibitora kompleksu I łańcucha oddechowego. Efekt ten odwracany był przez 5-HD, podczas gdy HMR-1098, selektywny inhibitor kanału K_{ATP} z błony plazmatycznej, pozostawał bez wpływu na przeżywalność komórek.

Dodatkowo, badania ostatnich lat pokazują, że opóźnione hartowanie diazoksydem (ang. *delayed pharmacological preconditioning*) skutecznie zmniejsza wrażliwość komórek na czynniki uszkadzające, indukując długotrwały efekt neuroprotektyny. Wykazano, między innymi, że godzinna inkubacja neuronów korowych z 500 lub 750 μM diazoksydem powtarzana przez trzy kolejne dni przed pozbawieniem komórek tlenu i glukozy w istotny sposób zwiększa przeżywalność neuronów [55]. Ochronne działanie diazoksydu znoszone było przez 5-HD, nie obserwowano natomiast hamowania neuroprotekcji przez glibenklamid, pochodną sulfonamocznika, oddziałującą zarówno z kanałem $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, jak i jego odpowiednikiem z błony plazmatycznej. Co ciekawe, zastosowanie 500 μM diazoksydu w modelu toksyczności pobudzeniowej indukowanej glutaminianem prowadziło do ochrony neuronów kory mózgowej szczura, a efekt ten był niewrażliwy na 5-HD [56]. W świetle danych literaturowych, wskazujących na niespecyficzne działanie diazoksydu, takie jak hamowanie dehydrogenazy bursztynianowej, syntazy ATP, jak również działania rozprężające, zastosowanie wysokich stężeń aktywatora, zdaje się sugerować, że obserwowany mechanizm neuroprotekcji może być częściowo niezależny od aktywacji kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Postuluje się więc wpływ diazoksydu na aktywność kompleksu II łańcucha oddechowego. Hipotezę tę dodatkowo potwierdza fakt, iż podobny efekt ochronny uzyskano przy użyciu 3-nitropropionianu, inhibitora dehydrogenazy bursztynianowej [55], a inkubacji komórek z diazoksydem towarzyszył wzrost produkcji ROS [55,56].

Zastosowanie BMS191095, specyficznego aktywatora kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, pokazało, że napływ jonów potasu do wnętrza macierzy mitochondrialnej prowadzi do ochrony neuronów zarówno w warunkach *in vitro* [57,58], jak i *in vivo* [59]. Wyraźną redukcję obszaru martwicy mózgu obserwowano u szczurów poddanych działaniu BMS191095 w modelu niedokrwienia wywołanego zamknięciem tętnicy środkowej mózgu [57]. Ponadto, wykazano wzrost przeżywalności neuronów kory mózgowej szczura w warunkach pozbawienia komórek tlenu i glukozy [57], jak również toksyczności pobudzeniowej indukowanej glutaminianem [57,58]. Uzyskane dane sugerują, że istotnym etapem w mechanizmie neuroprotekcji wywołanej BMS191095 jest obniżenie poziomu ROS podczas działania czynnika uszkadzającego [57-59]. Postuluje się także udział BMS191095 w indukcji fosforylacji PKC [57], aktywacji szlaku kinaz PI3K-Akt [58], jak również regulacji poziomu katalazy [58].

MITOCHONDRIALNY KANAŁ POTASOWY O DUŻYM PRZEWODNICTWIE AKTYWOWANY JONAMI WAPNIA

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia ($\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$) po raz pierwszy zidentyfikowany został w mitochondriach (mitoplastach) wyizolowanych z glejaka LN229 [60]. Stosując technikę *patch-clamp*, udowodniono, że w środowisku 150 mM KCl kanał ten wykazuje przewodnictwo 295 ± 18 pS, a jego otwarciu sprzyja zarówno depolaryzacja, jak i wzrost stężenia jonów wapnia w roztworze. Ponadto, obserwowano hamowanie aktywności kanału przez 100 nM charybdotoksynę (ChTx), znany inhibitor kanałów BK_{Ca} zlokalizowanych

w błonie plazmatycznej wielu typów komórek. Podobne wyniki uzyskano także w doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem mitoplastów pochodzących z kardiomiocytów świnki morskiej [61]. Dalsze badania wykazały także obecność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w wewnętrznej błonie mitochondriów mózgu [62].

Brak jest danych w sposób jednoznaczny określających molekularną budowę kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$. Wydaje się, że tak jak w przypadku kanału BK_{Ca} z błony plazmatycznej, w jego skład wchodzić mogą 4 podjednostki α tworzące por kanału oraz 4 podjednostki regulatorowe β . Stosując przeciwciała specyficznie wiążące C-koniec podjednostki α kanału BK_{Ca} z błony plazmatycznej, zidentyfikowano białko o masie cząsteczkowej 55 kDa obecne we frakcji mitochondrialnej kardiomiocytów świnki morskiej [61], jak również w homogenacie serca myszy [63]. Dane literaturowe wskazują ponadto na rolę, jaką w regulacji aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w sercu odgrywać może podjednostka $\beta 1$ [64]. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych przy użyciu techniki hybryd drożdżowych postuluje się także możliwość bezpośredniego oddziaływania podjednostki $\beta 1$ z oksydazą cytochromu *c* [64]. Dodatkowo, zastosowanie metody Western Blot, jak również technik mikroskopii elektronowej i konfokalnej pozwoliło na identyfikację podjednostek wchodzących w skład kanału BK_{Ca} wewnętrznej błony mitochondriów mózgu. We frakcji mitochondrialnej wykazano obecność białka o masie cząsteczkowej 125 kDa, specyficznie znakowanego przeciwciałem na podjednostkę α kanału BK_{Ca} [62], jak również białka 23- i 28 kDa rozpoznawanych przez przeciwciała skierowane na podjednostkę $\beta 4$ kanału BK_{Ca} [65].

Kanał $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ ulega aktywacji wskutek depolaryzacji wewnętrznej błony mitochondriów lub wzrostu stężenia jonów wapnia w macierzy mitochondrialnej. Znana jest także grupa substancji farmakologicznych modulujących aktywność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$. Spośród nich wymienić należy m.in. pochodne benzoimidazolu, będące aktywatorami kanału BK_{Ca} z błony plazmatycznej, takie jak NS1619 czy NS004. Do inhibitorów kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ należą natomiast indolowy alkaloid paksylina (Pax) oraz peptydy otrzymany z jadu skorpionów, takie jak iberiotoksyna (IbTx) i charybdotoksyna (ChTx). Wydaje się również, że aktywność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ może być regulowana przez białkową kinazę A (PKA) [66].

Doświadczenia przeprowadzone na kardiomiocytach świnki morskiej pokazały, że 30 μM NS1619 powoduje znaczącą depolaryzację wewnętrznej błony mitochondriów, prowadząc jednocześnie do zmniejszonej akumulacji Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej w warunkach podwyższonego stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie komórki [66]. Istnieje również szereg danych wskazujących na kardioprotekcyjne działanie NS1619 i udział aktywacji kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w mechanizmie ochrony komórek serca w warunkach niedotlenienia. Wykazano m.in., że zastosowanie NS1619 w modelu niedotlenienia/reperfuzji w istotny sposób redukuje obszar martwicy mięśnia sercowego u królika [61], myszy [63], jak również świnki morskiej [67], a efekt ten blokowany jest przez paksylinę, inhibitor kanału BK_{Ca} [61,63,67]. Dodatkowo postuluje się udział kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w zjawisku hartowania niedotle-

nieniem. Zaobserwowano, iż kardioprotekcja, wywołana krótkimi cyklami niedotlenienia/reperfuzji, odwracana jest przez zahamowanie kanału mitoBK_{Ca} paksyliną [68]. Mechanizm działania NS1619 i jego rola w ochronie komórek serca wciąż pozostają jednak nieznanne. Sugeruje się, że etapem kluczowym w zjawisku kardioprotekcji indukowanej przez NS1619 może być przejściowy wzrost produkcji anionu nadtlenkowego [67] lub zablokowanie aktywności megakanału mitochondrialnego [68].

Identyfikacja podjednostki α i β 4 w mitochondriach neuronów [62,65] oraz dane funkcjonalne wskazujące na obecność kanału mitoBK_{Ca} w mózgu, stały się punktem wyjścia do badań nad rolą mitoBK_{Ca} w zjawisku neuroprotekcji. Doświadczenia prowadzone z użyciem hodowli pierwotnych neuronów kory mózgu szczura pokazały ochronny efekt działania NS1619 w warunkach pozbawienia komórek tlenu i glukozy oraz uszkodzenia indukowanego nadtlakiem wodoru lub glutaminianem [69]. We wszystkich modelach eksperymentalnych sześciogodzinna inkubacja ze 100 μ M NS1619 powtarzana przez 3 kolejne dni powodowała wyraźny wzrost przeżywalności neuronów. Co ciekawe, efekt ten nie był odwracany przez paksylinę, charybdotoksynę czy iberiotoksynę, co wskazywać by mogło na działanie NS1619 niezależne od aktywacji kanału mitoBK_{Ca}. Istotną rolę w mechanizmie neuroprotekcji indukowanej przez NS1619 wydaje się natomiast odgrywać aktywacja prożyciowego szlaku sygnałowego PI3K. Wykazano bowiem, że 100 μ M NS1619 prowadzi do fosforylacji kinazy Akt i Gsk3 β , a wortmanina, znany inhibitor kinazy PI3K, hamuje efekt neuroprotekcji. Ochronie komórek towarzyszyły ponadto obniżenie aktywności kaspazy 3 i 7 oraz wzrost produkcji reaktywnych form tlenu, m.in. anionu nadtlenkowego [69], który tłumaczyć można zahamowaniem łańcucha oddechowego przez wysokie stężenia NS1619 [70]. W świetle powyższych danych, wydaje się, że w celu określenia roli kanału mitoBK_{Ca} w zjawisku neuroprotekcji konieczne są dalsze badania z zastosowaniem niższych stężeń NS1619.

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat bezsprzecznie pokazują, że mitochondria odgrywają kluczową rolę nie tylko w syntezie ATP i wytwarzaniu ROS, ale również w regulacji mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację i przebieg śmierci komórkowej. Dane wskazujące na udział mitochondriów w przekazywaniu sygnału apoptotycznego stały się więc punktem wyjścia dla poszukiwania strategii cytoprotekcyjnych celujących w mitochondria. Interesującym obiektem badawczym, obok megakanału mitochondrialnego bezpośrednio zaangażowanego w przebieg procesu apoptozy, okazały się być również białka regulujące procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów, białka rozprzegające, a także mitochondrialne kanały potasowe. Mimo intensywnych badań, dokładny mechanizm zjawiska neuroprotekcji zachodzącego z udziałem mitochondriów nadal pozostaje w sferze hipotez. Wydaje się, więc, że lepsze poznanie zależności istniejących pomiędzy metabolizmem mitochondriów a fizjologią neuronów, może pomóc w znalezieniu skutecznych strategii neuroprotekcji.


PIŚMIENNICTWO

- Gunter KK, Gunter TE (1994) Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26: 471-4852.
- McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70: 391-425
- Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12: 815-833
- Eliseev RA, Filippov G, Velos J, Van Winkle B, Goldman A, Rosier RN, Gunter TE (2007) Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging* 28: 1532-1542
- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P (2003) Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 92: 873-880
- Genestra M (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19: 1807-1819
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11715-11720
- Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 149: 19-23
- Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinovich H, Amoscato AA, Yin XM (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome c release. *Mol Biol Cell* 15: 3061-3072
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Benzoussenko CV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126: 177-189.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EGm, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515-525
- Cheung ECC, McBride HM, Slack RS (2007) Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. *Apoptosis* 12: 979-992
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15: 5001-5011
- Martinou JC, Youle RJ (2006) Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13: 1291-1295
- Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164: 493-499
- Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159: 931-938
- Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion interferes with Bax activation and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 280: 25060-25070
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207-210
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battalogliu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449-451

20. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548-562
21. Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, Kovacs I, Lee WD, Waggoner J, Cui J, White AD, Bossy B, Martinou JC, Youle RJ, Lipton SA, Ellisman MH, Perkins GA, Bossy-Wetzel E (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J* 25: 3900-3911
22. Jahani-Asl A, Cheung EC, Neuspiel M, MacLaurin JG, Fortin A, Park DS, McBride HM, Slack RS (2007) Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J Biol Chem* 282: 23788-23798
23. Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA, Bossy-Wetzel E (2007) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* 14: 462-471
24. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280: 18558-18561
25. Halestrap AP, Davidson AM (1990) Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160
26. White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16: 5688-5697
27. Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, Selman WR (1996) Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. *Neuroscience* 75: 993-997
28. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998) Cyclosporin A, but not FK506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 18: 5151-5159
29. Okonkwo DO, Melon DE, Pellicane AJ, Mutlu LK, Rubin DG, Stone JR, Helm GA (2003) Dose-response of cyclosporin A in attenuating traumatic axonal injury in rat. *Neuroreport* 14: 463-466
30. Khaspekov L, Friberg H, Halestrap A, Viktorov I, Wieloch T (1999) Cyclosporin A and its nonimmunosuppressive analogue N-Me-Val-4-cyclosporin A mitigate glucose/oxygen deprivation-induced damage to rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11: 3194-3198
31. Hansson MJ, Mattiasson G, Mansson R, Karlsson J, Keep MF, Waldmeier P, Ruegg UT, Dumont JM, Besseghir K, Elmer E (2004) The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 36: 407-413
32. Naga KK, Sullivan PG, Geddes JW (2007) High cyclophilin D content of synaptic mitochondria results in increased vulnerability to permeability transition. *J Neurosci* 27: 7469-7475
33. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Dhanil NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12005-12010
34. Forte M, Gold BG, Marracci G, Chaudhary P, Basso E, Johnsen D, Yu X, Fowlkes J, Rahder M, Stem K, Bernardi P, Bourdette D (2007) Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7558-7563
35. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM (2006) Mitochondrial UCPs: new insight into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 1757: 480-485
36. Skulachev VP (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 294: 158-162
37. Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP (1997) Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1319: 251-257
38. Więckowski MR, Wojtczak L (1997) Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 414-417
39. Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1: 366-373
40. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9: 1062-1068
41. Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF (2005) The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 94: 1676-1684
42. Maragos WF, Rockich KT, Dean JJ, Young KL (2003) Pre- or post-treatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinic lesions. *Brain Res* 966: 312-316
43. Sullivan PG, Dube C, Dorenbos K, Steward O, Baram TZ (2003) Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol* 53: 711-717
44. Bechmann I, Diano S, Warden CH, Bartfai T, Nitsch R, Horvath TL (2002) Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol* 64: 363-367
45. Conti B, Sugama S, Lucero J, Winsky-Sommerer R, Wirz SA, Maher P, Andrews Z, Barr AM, Morale MC, Paneda C, Pemberton J, Gaidarova S, Behrens MM, Beal F, Sanna PP, Horvath T, Bartfai T (2005) Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity. *J Neurochem* 93: 493-501
46. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247
47. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267: 26062-26069
48. Dębska G, Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS (2002) Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1556: 97-105
49. Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucel P (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 276: 33369-33374
50. Busija DW, Lacza Z, Rajapakse N, Shimizu K, Kis B, Bari F, Domoki F, Horiguchi T (2004) Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels – a novel approach to neuroprotection. *Brain Res Rev* 46: 282-294
51. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovsky V, Murray HNM, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81: 1072-1082
52. Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson M (2002) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 431-443
53. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, Johnston MV, Marban E (2002) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke* 33: 1796-1802
54. Tai KK, McCrossan ZA, Abbott GW (2003) Activation of mitochondria ATP-sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone-induced cell death. *J Neurosci* 23: 1193-1200
55. Kis B, Rajapakse NC, Snipes JA, Nagy K, Horiguchi T, Busija DW (2003) Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci* 23: 969-980
56. Nagy K, Kis B, Rajapakse NC, Bari F, Busija DW (2004) Diazoxide pre-conditioning protects against neuronal cell death by attenuation of

- oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res* 76: 697-704
57. Kis B, Nagy K, Snipes JA, Rajpake NC, Horiguchi T, Grover GJ, Busija DW (2004) The mitochondrial KATP channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. *Neuroreport* 15: 345-349
 58. Gáspár T, Snipes JA, Busija AR, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW (2008) ROS-independent preconditioning in neurons via activation of mitoK(ATP) channels by BMS-191095. *J Cereb Blood Flow Metab* doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600611
 59. Mayangi K, Gaspar T, Katakam PVG, Kis B, Busija D (2006) The mitochondria K_{ATP} channel opener BMS-1911095 reduces neuronal damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 348-55
 60. Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F (1999) Ca^{2+} -activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 549-54
 61. Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, O'Rourke B (2002) Cytoprotective role of Ca^{2+} -activated K^+ channels in the cardiac inner mitochondria membrane. *Science* 298: 1029-1033
 62. Douglas RM, Lai JCK, Bian S, Cummins L, Moczyłowski E, Haddad GG (2006) The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience* 139: 1249-1261
 63. Wang X, Yin C, Xi L, Kukreja RC (2004) Opening of Ca^{2+} -activated K^+ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2070-H2077
 64. Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K, Imaizumi Y (2005) Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1635-H1642
 65. Piwońska M, Wilczek E, Szewczyk AM, Wilczyński GM (2008) Differential distribution of Ca^{2+} -activated potassium channel beta4 subunit in rat brain: immunolocalization in neuronal mitochondria. *Neuroscience* 153: 446-460
 66. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaza H (2005) Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac myocytes. A mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111: 198-203
 67. Stowe DF, Aldakkak M, Camara AKS, Riess ML, Heinen A, Varadarajan SG, Jiang M-T (2006) Cardiac mitochondrial preconditioning by big Ca^{2+} -sensitive K^+ channel opening requires superoxide radical generation. *Am J Physiol Heart Physiol* 290: H434-H440
 68. Cao C-M, Xia Q, Gao Q, Chen M, Wong T-M (2004) Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 644-50
 69. Gaspar T, Katakam P, Snipes JA, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW (2008) Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J Neurochem* 105: 1115-1128
 70. Dębska G, Kicińska A, Dobrucki J, Dworakowska B, Nurowska E, Skalska J, Dołowy K, Szewczyk A (2003) Large-conductance K^+ channel opens NS1619 and NS004 as inhibitor of mitochondrial function in glioma cells. *Biochem Pharmacol* 65: 1827-1834

Mitochondrial neuroprotection

Marta Piwońska , Adam Szewczyk

Laboratory of Intracellular Ion Channels, Biochemistry Department, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: m.glab@nencki.gov.pl

Key words: mitochondria, apoptosis, ion channels, neuroprotection

SUMMARY

Mitochondria play a key function in cellular metabolism. Additionally to ATP synthesis, mitochondria may buffer cytosolic calcium ions and generate reactive oxygen species. Due to these processes, mitochondria are involved in complex cytoprotective phenomena. Neuroprotection is very often based on changes in the integrity of mitochondrial membranes. In this report potential neuroprotective role of mitochondrial ion channels is discussed.

STRESZCZENIE

Białka rozprzegające (ang. UCPs, *uncoupling proteins*) to nieodłączny składnik wewnętrznej błony mitochondrialnej, umożliwiające tzw. kontrolowany „przeciek” protonów z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondriów. Aktywność rozprzegająca UCPs obniża protonowy gradient elektrochemiczny, $\Delta\mu\text{H}^+$, wytworzony przez łańcuch oddechowy, nie prowadząc do syntezy ATP. Rozpraszając użyteczną energię swobodną, pochodzącą z utleniania substratów oddechowych, UCPs stanowią istotny punkt kontrolny w gospodarce energetycznej komórki. Aktywacja UCP1 (termogeniny) w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków prowadzi do uwalniania dużej ilości ciepła (termogenezy) w wyniku rozpraszania energii $\Delta\mu\text{H}^+$. Białka rozprzegające są stymulowane przez wolne kwasy tłuszczowe, a ich allosterycznymi inhibitorami są nukleotydy purynowe. Działanie UCPs jest napędzane przez potencjał błonowy ($\Delta\Psi$, ujemny wewnątrz mitochondrium) oraz różnicę pH (kwaśne na zewnątrz). Odkrycie UCPs we wszystkich ważniejszych grupach eukariontów: u roślin wyższych, niektórych bezkręgowców, pierwotniaków, grzybów i w wielu nietermogennych tkankach ssaków (UCP2 – w różnych tkankach, UCP3 – głównie w mięśniach szkieletowych, UCP4 i UCP5 – w mózgu), pozwala przypuszczać, że te „nowe” UCPs, przeciwnie do UCP1 brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków, spełniają inne funkcje niż produkowanie ciepła poprzez zwiększanie oddychania mitochondrialnego. Jedną z nich może być obniżanie produkcji reaktywnych form tlenu w mitochondriach, a więc ochrona komórki przed stresem oksydacyjnym. Jednocześnie aktywność UCPs zwierząt (poza UCP1) i roślin może być stymulowana przez produkty peroksydacji lipidów (np. 4-hydroksy-2-nonenal, HNE), powstające wskutek podwyższonego poziomu anionorodnika ponadtlenkowego.

WPROWADZENIE

W bioenergetyce termin „rozprzeganie” (ang. *uncoupling*) odnosi się do procesów, których efektem jest rozpraszanie energii uwalnianej podczas utleniania substratów oddechowych w mitochondriach, przeciwnie do procesów prowadzących do „zachowania” energii (ang. *energy conservation*), czyli syntezy ATP. Początkowo sądzono, że białko rozprzegające (UCP, ang. *uncoupling protein*) stanowi składnik jedynie brunatnej tkanki tłuszczowej (BAT, ang. *brown adipose tissue*) ssaków, będąc stosunkowo późnym z ewolucyjnego punktu widzenia, wąskim przystosowaniem metabolicznym, umożliwiającym przejściową termogenezę. Jednak obecnie, w oparciu o liczne odkrycia genów i badania funkcjonalne, uważa się, że białka rozprzegające (UCPs) mogą być standardowym elementem wyposażenia wewnętrznej błony mitochondrialnej u wszystkich *Eucaryota*, a w tym zwierząt kręgowych i bezkręgowych, roślin, grzybów (niefermentujących), a nawet pierwotniaków [1,2]. Ta powszechna obecność UCPs u *Eucaryota*, wskazuje na wyewoluowanie pierwotnego genu *ucp* przed wyodrębnieniem się organizmów będących przodkami dzisiejszych reprezentantów wspomnianych wyżej czterech królestw w obrębie *Eucaryota*. Funkcjonowanie UCPs w mitochondriach prostych organizmów ameboidalnych (*Protista*) wskazuje na wyspecjalizowanie we wczesnych etapach ewolucji systemów rozpraszających energię, modulujących precyzję sprzężenia pomiędzy oddychaniem komórkowym a syntezą ATP, czyli regulujących wydajność procesu fosforylacji oksydacyjnej. W ten oto sposób komórka może dokonywać starannej autokorekty tempa przemian metabolicznych i tym samym sprawniej utrzymywać równowagę pomiędzy zapotrzebowaniem na energię a jej pozyskiwaniem z dostępnych źródeł.

REGULACJA WYDAJNOŚCI FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ

W skład wewnętrznej błony mitochondrialnej wszystkich organizmów wchodzi kompleksy białkowe (pompy protonowe, kompleksy I, III, IV), przenoszące elektrony z substratów oddechowych na tlen (Ryc. 1). Transportując elektrony, kompleksy te wypompowują protony z macierzy mitochondrialnej, wytwarzając protonowy gradient elektrochemiczny ($\Delta\mu\text{H}^+$) (złożony z gradientu protonowego, ΔpH i potencjału błonowego, $\Delta\Psi$), który napędza syntezę ATP w reakcji przeprowadzanej przez syntazę ATP. Ponieważ $\Delta\mu\text{H}^+$ sprzęga transport elektronów w łańcuchu oddechowym z syntezą ATP, brak możliwości wytworzenia ATP

Wiesława Jarmuszkiewicz✉

Andrzej Woyda-Płoszczyca

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

✉ Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. (061) 828-58 81, e-mail: wieslaj@amu.edu.pl

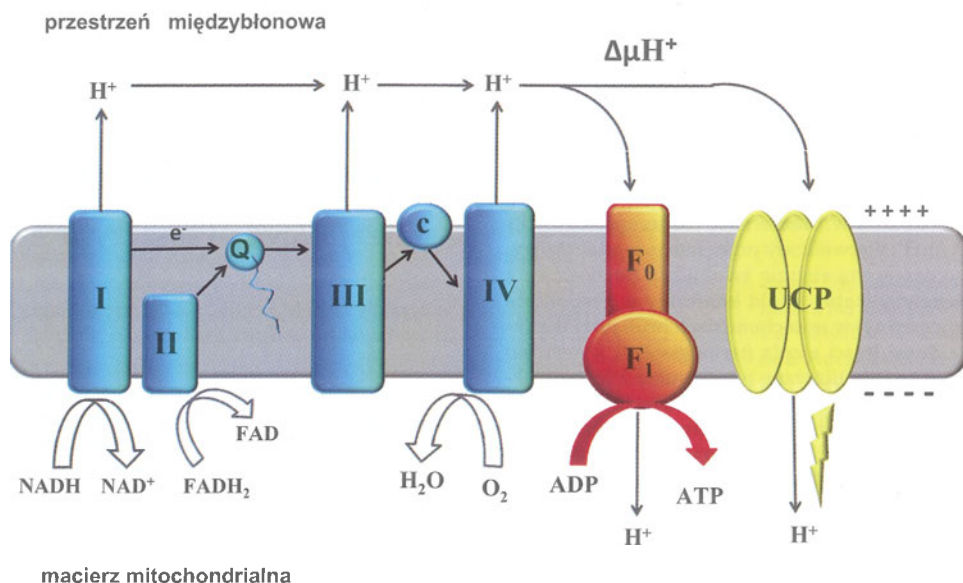
Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 21 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: białka rozprzegające, reaktywne formy tlenu, peroksydacja lipidów, mitochondria, rozpraszanie energii

Wykaz skrótów: BAT – brunatna tkanka tłuszczowa (ang. *brown adipose tissue*); FFA – wolne kwasy tłuszczowe (ang. *free fatty acid*); LOOH – produkty peroksydacji kwasów tłuszczowych lipidów (ang. *lipid peroxide*); ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; UCP(s) (ang. *uncoupling protein(s)*) – białko(a) rozprzegające; $\Delta\mu\text{H}^+$ – elektrochemiczny gradient protonowy; $\Delta\Psi$ – elektryczny potencjał błonowy mitochondriów

Podziękowanie: Przygotowanie artykułu zostało dofinansowane ze środków budżetowych na naukę jako projekt badawczy nr: 3382/B/P01/2007/33



Rycina 1. Schemat klasycznego łańcucha oddechowego wewnętrznej błony mitochondrialnej zwierząt. Nie zaznaczono dodatkowych nośników elektronów (dehydrogenazy NAD(P)H, oksydaza alternatywna) obecnych w mitochondriach roślin i niektórych mikroorganizmów eukariotycznych. Transport elektronów w dół łańcucha oddechowego prowadzi do pompowania protonów do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (aktywność kompleksów I, III i IV; kompleks II nie pompuje H^+). W rezultacie powstaje protonowy gradient elektrochemiczny, $\Delta\mu H^+$, na który składa się potencjał błonowy ($\Delta\psi$) oraz różnica pH po obu stronach błony (ΔpH). Gradient ten napędza molekularny motor F_0 - F_1 syntazy ATP, która fosforyluje ADP. W określonych warunkach $\Delta\mu H^+$ może ulegać częściowemu rozproszeniu (dyssypacji) z udziałem białka rozprzęgającego (UCP). Q, koenzym Q, c – cytochrom c.

może prowadzić do rozproszenia energii $\Delta\mu H^+$, a więc do przekształcenia tej energii w ciepło. Wydajność fosforylacji oksydacyjnej oparta jest na nieprzepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów i na stałej stechiometrii działania każdej z trzech pomp protonowych. Wydajność fosforylacji oksydacyjnej zależy także od obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wyspecjalizowanych białek rozpraszających energię, takich jak niewrażliwa na cyjanek alternatywna oksydaza czy dodatkowe dehydrogenazy NAD(P)H (mitochondria roślin wyższych i niektórych mikroorganizmów eukariotycznych) oraz UCP (mitochondria wszystkich *Eukaryota*). Mechanizm rozpraszania energii przez te białka jest różny: UCP rozprasza $\Delta\mu H^+$ tworzony przez łańcuch oddechowy mitochondriów a alternatywna oksydaza i dodatkowe dehydrogenazy NAD(P)H obniżają potencjał oksydoredukcyjny tego łańcucha. Mimo różnego mechanizmu rozpraszania energii, aktywność tych białek wywiera podobny wpływ na stan energetyczny komórki, tj. obniża poziom syntezy ATP w mitochondriach.

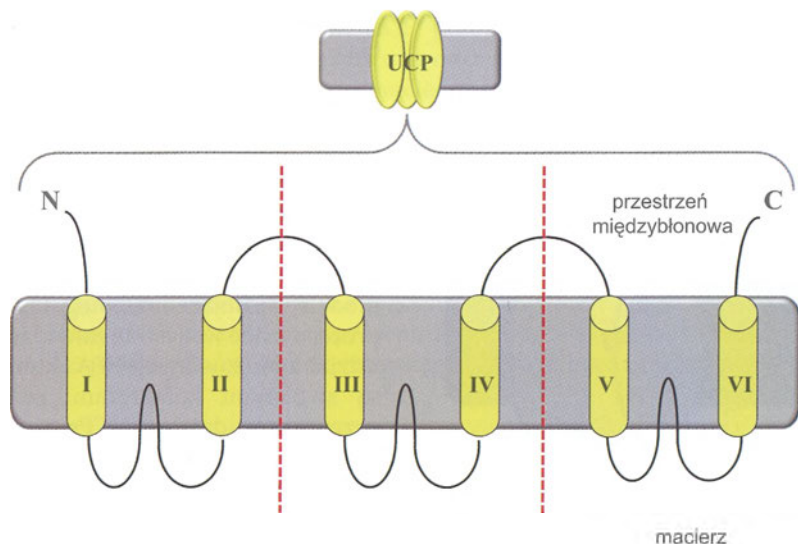
Ponadto, część wytworzonego przez łańcuch oddechowy $\Delta\mu H^+$ ulega niespecyficznemu rozproszeniu z udziałem niektórych białek wewnętrznej błony mitochondrialnej (np. translokazy nukleotydów adeninowych czy nośnika fosforanu), głównie w warunkach wysokiego $\Delta\psi$ (w niefosforylującym stanie oddechowym, stanie 4) [1,2]. W trakcie wzmożonej fosforylacji oksydacyjnej (w fosforylującym stanie oddechowym, stanie 3) nośniki te są głównie zaangażowane w transport swoich specyficznych substratów. Częściowe rozproszenie $\Delta\mu H^+$ może być także wynikiem przechodzenia protonów do macierzy mitochondrialnej poprzez

niebiałkowe pory błonowe lub molekularne szczeliny tworzące się przy powierzchniach przylegania białek i lipidów. Jest to tzw. przeciek protonowy (ang. *proton leak*) [3]. A zatem rozprężanie stanowi nieodłączną cechę funkcjonowania mitochondriów i oznacza brak ścisłej zależności pomiędzy ilością utlenianych w trakcie oddychania komórkowego substratów a ilością energii swobodnej zawartej w wytworzonych cząsteczkach ATP.

Ze względu na podstawowy charakter działania wszystkich UCPs w mitochondriach eukariotów, tj. rozpraszanie użytecznej energii swobodnej, białka te stanowią istotny punkt kontrolny w gospodarce energetycznej komórki. Ukierunkowany i kontrolowany przeciek protonów, a więc zachodzący z udziałem wyspecjalizowanych systemów rozpraszających energię (głównie UCPs), ma duże znaczenie fizjologiczne dla organizmu, chociażby ze względu na potencjalną rolę efektywnego i naturalnie bezpiecznego mechanizmu kontroli masy ciała. Wiąże się to z utrzymywaniem w komórce odpowiednio wysokiej proporcji NAD/NADH, napędzającej utlenianie substratów oddychania komórkowego. Zmniejszanie stopnia redukcji mitochondrialnych komponentów łańcucha oddechowego przez UCPs sprzyja również osłabianiu powstawania ROS, a tym samym chroni przed fizjologicznym wyniszczaniem organizmu [4]. Jednakże nadal brakuje wystarczająco przekonujących danych doświadczalnych, wskazujących na celowość poświęcania nakładów energetycznych (części wytworzonego $\Delta\mu H^+$) dla utrzymywania mitochondrialnego przecieku protonów [5].

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA UCPs

Wewnętrzna błona mitochondrialna wyposażona jest w swoisty zestaw nośników odpowiedzialnych za specyficzną wymianę molekuł pomiędzy cytosolem a macierzą mitochondrialną. Ze względu na wyraźne podobieństwo struktury pierwszorzędowej UCP do translokazy nukleotydów adeninowych czy nośnika fosforanowego, postuluje się istnienie rodziny homologicznych nośników mitochondrialnych (MCF, ang. *mitochondrial carrier family*) [6]. Pogląd ten dodatkowo potwierdzają analizy struktury innych nośników wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz zidentyfikowanych izoform UCPs zwierząt i roślin. Jednakże to UCP, translokaza nukleotydów adeninowych oraz nośnik fosforanowy razem wyznaczają funkcjonalną podgrupę nośników silnie związaną z przekształcaniem energii w mitochondriach. A zatem, proces ten regulowany jest przez strukturalnie bardzo podobne białka, które, co zaskakujące,



Rycina 2. Model przestrzenny cząsteczki UCP. UCP zbudowane jest z sześciu transbłonowych α -helis (I-VI), połączonych hydrofilowymi pętlami. Przerywane linie wyznaczają domeny w obrębie trójkrotnej struktury UCP. Podobny typ organizacji budowy molekularnej charakteryzuje także innych członków rodziny mitochondrialnych nośników anionów wewnętrznej błony mitochondriów.

zajmują się transportem cząsteczek różniących się znacznie rozmiarem. Protony przenoszone przez UCPs są najmniejszymi transportowanymi cząstkami, natomiast translokaza ADP/ATP transportuje jedne z największych molekuł dla nośników mitochondrialnych [7].

Do tej pory najwięcej informacji zgromadzono na temat UCP1 (wcześniej zwanego termogeniną), czyli UCP BAT ssaków. Często białko te określa się jako pierwotne UCP, choć określenie to może być mylące, zwłaszcza w kontekście odkryć licznych ortologów UCP1 u organizmów znajdujących się na niższym poziomie rozwoju ewolucyjnego. Ogólnie akceptowaną rolą fizjologiczną UCP1 jest adaptacyjna termogeneza u hibernujących i nowo narodzonych ssaków prowadząca do wzrostu temperatury ciała (stąd nazwa termogenina) w rezultacie intensywnego rozpręgnięcia oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach BAT. Natomiast funkcją homologów UCP1 występujących w mitochondriach nietermogennych tkanek zwierzęcych (UCP2-5) i roślinnych oraz mikroorganizmów eukariotycznych nadal nie jest w pełni poznana.

STRUKTURA UCPs

Mimo pewnych indywidualnych cech izoform UCPs, zwykle ich strukturę opisuje się na przykładzie UCP1, które najpełniej scharakteryzowano. Białka rozprzegające to białka wewnętrznej błony mitochondrialnej, zbudowane z około 300 reszt aminokwasowych. Ich masa molekularna mieści się w granicach 32–33 kDa (dla monomeru). Określono również masę 66 kDa dla potencjalnie funkcjonalnych struktur homodimerycznych, co potwierdza koncepcję preferencyjnej oligomeryzacji większości białek błonowych. Sumaryczny ładunek elektryczny łańcuchów bocznych aminokwasów jest dodatni, ze względu na przewagę aminokwasów zasadowych nad kwasowymi. Określona lokalizacja dodatnich ładunków jest prawdopodobnie konieczna dla prawidłowego zakotwiczenia białka w dwuwarstwie lipidowej, zwłaszcza

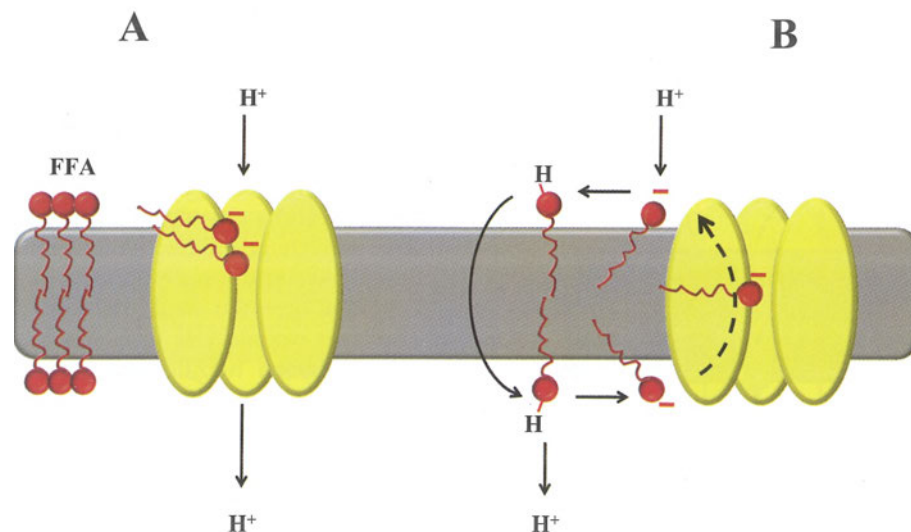
gdy jest to środowisko bogate w kardiolipinę [7]. Analiza struktury pierwszorzędowej, profilu hydrofobowości oraz spektroskopii w podczerwieni wskazuje na 40–50% zawartość struktur α helikalnych w UCP1. Jest to zgodne z opracowanym modelem topologii UCPs w błonie, zakładającym obecność aż sześciu transbłonowych α helis (Ryc. 2). Wspólną cechą charakterystyczną UCPs oraz innych nośników błonowych jest organizacja strukturalna oparta na trójkrotności motywu strukturalnego [7-9]. Prawdopodobnie jest to konsekwencją zajęcia dwóch niezależnych duplikacji sekwencji DNA, odległego ewolucyjnie pierwowzoru dla całej obecnej rodziny nośników mitochondrialnych (MCF). Dlatego też łańcuch polipeptydowy UCP dzieli się na trzy podobne domeny, zawierające po około 100 aminokwasów. Pojedyncza domena obejmuje dwie transbłonowe α helisy, oddzielone po stronie macierzy długim odcinkiem (pętlą złożoną z około 40 reszt) silnie hydrofilowych aminokwasów. Niewielka część tego odcinka wnika w hydrofobowe środowisko błony i prawdopodobnie tworzy wyściółkę dla obszaru białka zaangażowanego w przenoszenie protonów. Pętle łączące transbłonowe helisy od strony macierzy zawierają zachowane w ewolucji sekwencje (ang. *energy transfer protein signatures*), występujące u wszystkich członków rodziny nośników mitochondrialnych (MCF) [7,9]. Końce N i C białka UCP zwrócone są do przestrzeni międzybłonowej. Białka rozprzegające wyróżniają charakterystyczne, zachowane w ewolucji rejony zwane podpisami UCP (ang. *UCP signatures*), obecne w trzech helisach (1, 2 i 4).

Informacja kodująca w pełni dojrzałe białka UCPs jest zawarta w jądrowym DNA. W przeciwieństwie do wielu mitochondrialnych białek kodowanych przez genom jądrowy, polipeptyd UCP nie jest obdarzony sekwencją sygnałową odcinaną po imporcie do mitochondriów [8]. Regulacja aktywności UCPs obejmuje zmiany zarówno na poziomie syntezy białka, jak i specyficzną aktywację i hamowanie funkcjonalnego białka w mitochondrium.

MECHANIZM DZIAŁANIA UCPs

Białka rozprzegające są najprostszymi nośnikami protonów jakie dotychczas poznano [7]. Nie wymagają energii z hydrolizy ATP, nie prowadzą współtransportu oraz nie działają na zasadzie wymiennika jonowego. Kluczem do uruchomienia transportowych właściwości UCPs jest $\Delta\mu\text{H}^+$ wewnętrznej błony mitochondrialnej, napędzający jednokierunkowy przepływ protonów. Aktywacja UCP, białkowego rozprzegacza łańcucha oddechowego, jest zatem ściśle powiązana z pracą trzech pomp protonowych tego łańcucha.

Działanie UCPs prowadzi do skrócenia (ang. *short-circuit*) obiegu protonów w procesie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [10]. Aktywność syntazy ATP zależy od $\Delta\mu\text{H}^+$ wytworzonego w poprzek wewnętrznej błony mito-



Rycina 3. Proponowane modele działania UCP. A – Model Klingenberga – model nośnika protonów, zakłada transport protonów poprzez wewnętrzną strukturę UCP, dzięki specyficznemu oddziaływaniu z anionowymi formami wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). B – Model Skulacheva i Garlida zakłada transport FFA z udziałem UCP z macierzy do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Przejście protonów do macierzy zależy wyłącznie od zjawiska flip-flop (przejścia w płaszczyźnie poprzecznej błony) uprotonowanej formy.

chondrialnej. Przy braku wolnego ADP (niefosforylujący, spoczynkowy stan oddechowy), syntaza ATP nie zapewnia powrotnego transportu protonów do macierzy. Stan taki prowadzi do niebezpiecznej akumulacji H^+ w przestrzeni międzybłonowej. Zbyt wysoki $\Delta\mu H^+$ może promować nasilenie reakcji ubocznych pomiędzy łatwo reagującymi ze sobą cząsteczkami, jak np. semichinony i tlen cząsteczkowy, powodując nadmierne powstawanie ROS [11]. W takiej sytuacji nieocenione staje się posiadanie awaryjnej ścieżki konsumpcji $\Delta\mu H^+$, którą głównie stanowi aktywność UCPs.

Aktywność UCPs może ulegać zarówno pozytywnej, jak i negatywnej regulacji z udziałem kilku czynników. Do pozytywnych regulatorów stymulujących proces rozprężania zaliczamy dostępność długołańcuchowych wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acids*) w formie zjonizowanej. Przyjmuje się, że aktywacja transportu H^+ z udziałem UCP1 wiąże się z rekrutacją FFA przede wszystkim z otaczające fazy lipidowej. Z fizjologicznego punktu widzenia wymóg ten jest łatwy do spełnienia, gdyż często uruchamiane szlaki lipolityczne (zwłaszcza w BAT) dają wysokie stężenia kwasów tłuszczowych (nawet do 20 mM). Z kolei nukleotydy purynowe (adeninowe i guaninowe) wywołują antagonistyczny efekt w stosunku do FFA i przyhamowują aktywność UCP. Obecny w mitochondriach ATP może więc działać jako endogenny inhibitor UCP. A zatem przynajmniej cztery czynniki wpływają na transport H^+ z udziałem UCP1: (i) stężenie ATP i innych nukleotydów purynowych, (ii) dostępność FFA, (iii) $\Delta\Psi$ oraz (iv) gradient protonowy (ΔpH) mitochondriów [7]. Wartość pH środowiska jest ważna ze względu na procesy protonacji i deprotonacji zmieniające zarówno właściwości aktywatorów, inhibitorów, jak i specyficznych rejonów regulatorowych białka. Natomiast wielkość $\Delta\Psi$ ma istotnie znaczenie przy sprzężeniu transportu elektronów w łańcuchu oddechowym z syntezą ATP,

a tym samym wyznacza rozmiar potencjalnego efektu rozprężania.

AKTYWACJA UCPs – ROLA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Rozprężająca aktywność UCP1 oraz innych UCPs z pewnością wiąże się z transportem protonów. Istnieją dość odmienne modele opisujące przebieg tego procesu, choć wszystkie zakładają udział zjonizowanych FFA, które są swoistymi kofaktorami rozprężania z udziałem UCPs.

Model nośnika H^+ (model Klingenberga) zakłada, że rola FFA sprowadza się do substratowej aktywacji UCPs [12] (Ryc. 3A). Swoiste zainstalowanie się zjonizowanych FFA (ale nie stałe związanie) w strukturę UCP skutkuje powstaniem pełnego szlaku transportowego dla H^+ . Szlak ten tworzony jest przez zjonizowane grupy karboksylowe pochodzące zarówno od wprowadzonych w białko FFA, jak i od bocznych łańcuchów aminokwasów samego UCP (Asp, Glu, His). Każda z tych grup jest akceptorem i donorem protonów. Protonacja i deprotonacja krytycznych grup uczestniczących w transporcie protonów zależy od $\Delta\Psi$ i umożliwia jedynie jednokierunkowy transport H^+ . W modelu tym jony FFA, poprzez dostarczenie dodatkowych grup karboksylowych, uzupełniają braki reszt donorowo-akceptorowych dla H^+ w krytycznych pozycjach białka. Zakłada się również, że FFA uczestniczące w transporcie protonów oddziałują od strony cytosolowej, co potwierdzają badania z użyciem pochodnych kwasów tłuszczowych niezdolnych do przechodzenia przez błonę [36].

Drugi proponowany model (model Skulacheva i Garlida) opiera się na cyklicznym obiegu FFA (ang. *fatty acid-cycling model*) [13,14] (Ryc. 3B). Zgodnie z tym modelem, FFA transportowane są przez UCP do przestrzeni międzybłonowej jako aniony i gdy tam ulegną uprotonowaniu, powracają przez dwuwarstwą lipidową do macierzy (flip-flop) w niezdysonowanej formie. Powrót do macierzy zneutralizowanych (lipofilnych) kwasów nie zależy już od UCP, które zapewnia jedynie jednokierunkowy transport anionów FFA (do przestrzeni międzybłonowej) w trakcie ich wahadłowego przemieszczania się. W rezultacie, ze względu na inną wartość pH w macierzy, kwasy tłuszczowe dysonują, tym samym uwalniając protony. W modelu tym UCP nie jest nośnikiem H^+ , lecz jedynie nośnikiem anionów FFA, które po uprotonowaniu stanowią faktyczny nośnik protonów. Dyfuzja poprzeczna uprotonowanych form FFA (na zasadzie flip-flop) w poprzek błony stanowi kluczowy element tego modelu [13].

Niezależnie od mechanizmu, oba przedstawione modele zakładają, że działanie UCP polega na burzeniu $\Delta\mu\text{H}^+$ wytworzonego przez łańcuch oddechowy poprzez zwrotne wprowadzenie H^+ do macierzy (ang. *short-circuit*). W obu modelach działanie UCP pozwala na regulację procesu rozprzęgnięcia w zależności od dostępności FFA, które nie są na stałe związane z UCP. Ich usunięcie pozwala na szybki powrót UCP do stanu inaktywacji. Co więcej, kwasy tłuszczowe oprócz odgrywania roli induktora procesu rozprzęgnięcia (bezpośrednia aktywacja UCP) oraz głównych substratów dla procesu termogenezy (jako substraty β -oksydacji), mogą również pośrednio aktywować ekspresję genów białek rozprzęgających u zwierząt [15].

INAKTYWACJA UCPs – ROLA NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH

Wspólny mianownik dla obecnie znanych UCPs stanowi swoiste oddziaływanie z nukleotydami purynowymi (adeninowymi i guaninowymi). Aminokwasy UCP1, które oddziałują z nukleotydem są w pełni zachowane we wszystkich znanych UCPs [5]. Oddziaływanie nukleotydów purynowych prowadzi do zahamowania nośnikowej aktywności UCP i może zająć wyłącznie od cytosolowej strony białka [7]. Efekt hamowania jest dodatkowo silnie zależny od pH środowiska.

Najwydajniejszymi inhibitorami są tri- i difosforany nukleotydów (NTP: GTP i ATP oraz NDP: GDP i ADP). Stan całkowitego zjonizowania grup fosforanowych w NTP^{4-} i NDP^{3-} nadaje przewagę w hamowaniu UCP nad formami NTPH^{3-} i NDPH^{2-} oraz tymi jeszcze bardziej zredukowanymi. Białka rozprzęgające często wykazują nieco większe powinowactwo do nukleotydów guaninowych niż adeninowych. Wartość pH wpływa również na odblokowanie samego miejsca wiążącego nukleotydy purynowe w białku, gdyż decyduje ona o wybiórczym uprotonowaniu pewnych krytycznych aminokwasów zaangażowanych w przyjmowanie nukleotydu przez UCP. Do specyficznej protonacji białka musi dojść przed związaniem nukleotydu [7]. Z powodu wysokiego powinowactwa UCP do nukleotydów purynowych oraz dużego stężenia nukleotydów w cytosolu wydawałoby się, iż UCPs są w stanie ciągłej inaktywacji. Jednakże wyłącznie stężenie wolnych (zjonizowanych) ATP/ADP czy GTP/GDP jest istotne dla procesu hamowania. W warunkach fizjologicznych może dojść do zniesienia wpływu ATP (i innych nukleotydów) na przykład z powodu ich chelatacji jonami Mg^{2+} [5,7], które jednocześnie pełnią funkcję kofaktorów wielu enzymów. W przypadku UCP1 proponowany jest mechanizm współzawodnictwa między nukleotydami purynowymi i FFA o miejsce regulatorowe na białku [16]. Oznacza to, że zwiększenie stężenia FFA może przewyciężyć hamowanie aktywności UCP1 przez nukleotydy. W przypadku roślinnych, zwierzęcych i występujących u mikroorganizmów eukariotycznych homologów UCP1 efektywność hamowania aktywności tych UCPs przez nukleotydy purynowe może być modulowana przez stopień redukcji koenzymu Q w błonie mitochondrialnej [17].

TERMOGENEZA BRUNATNEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Termogenina (UCP1) ulega intensywnej syntezie w BAT. Przepięcie protonów z udziałem UCP1 silnie rozprasza $\Delta\mu\text{H}^+$, co znacznie redukuje liczbę protonów przechodzących przez syntazę ATP. Procesowi temu towarzyszy szybkie tempo oddychania (zużycie tlenu), niezwiązane z syntezą ATP. W ten sposób UCP1 rozpręga utlenianie substratów w łańcuchu oddechowym i fosforylację ADP do ATP, a energia $\Delta\mu\text{H}^+$ jest rozpraszana i uwalniana jedynie jako ciepło (produkt uboczny). Prowadzi to do termogenezy (wzrostu temperatury) BAT, która tym samym reguluje tzw. adaptacyjną bezdrzeniową termogenezę (ang. *nonshivering thermogenesis*). Zjawisko to występuje u noworodków, drobnych ssaków (zwłaszcza gryzoni) oraz u ssaków hibernujących i przystosowanych do chłodnego klimatu [18]. A zatem UCP1 może stanowić swoiste narzędzie samoobrony sporej grupy ssaków przed stresem niskiej temperatury.

Wielu badaczy uważa, że jedynie UCP1 jest „prawdziwym” białkiem rozprzęgającym. Tylko aktywność UCP1 w BAT może bowiem prowadzić do zjawiska bezdrzeniowej termogenezy, czyli produkcji ciepła związanej ze wzrostem temperatury tkanki lub całego ciała, w której procesy oddechowe nie są sprzężone z procesami fosforylacji oksydacyjnej. Wzrost temperatury na poziomie całego ciała (ang. *whole body thermogenesis*) jest skutkiem sumarycznego rozprzęgnięcia oddychania mitochondrialnego BAT z udziałem UCP1, które może stanowić nawet do 8% puli białek mitochondrialnych tej tkanki [15,19]. Z kolei białka mitochondrialne reprezentują aż około 50% wszystkich białek BAT. Wewnętrzna błona mitochondriów adipocytów BAT, oprócz olbrzymiej koncentracji UCP1, charakteryzuje bardzo niski poziom syntazy ATP. W komórkach tych z łatwością może dochodzić do aktywacji rozprzęgnięcia oddychania mitochondrialnego (aktywacji UCP1) kwasami tłuszczowymi uwalnianymi z wewnątrzkomórkowych zapasów triacylogliceroli [20]. Brunatną tkankę tłuszczową bezpośrednio unerwia współczulny system nerwowy. W odpowiedzi na zimno dochodzi do aktywacji w cytoplazmie zależnej od cAMP lipolizy wskutek stymulacji receptora β -adrenergicznego przez noradrenalinę. Uwolnione kwasy tłuszczowe nie tylko aktywują UCP1, ale także są głównymi substratami napędzającymi proces termogenezy. W mitochondriach kwasy tłuszczowe zasilają proces β -oksydacji, który z kolei napędza transport elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów poprzez dostarczanie siły redukcyjnej (FADH_2 i NADH). Energia wytworzonego przez łańcuch $\Delta\mu\text{H}^+$ jest rozpraszana (zamieniana w ciepło) w wyniku aktywacji UCP1.

W oparciu o najnowsze badania nie możemy już powiedzieć, że UCP1 jest wyłącznie specyficzne dla BAT. UCP1 wykryto np. w podłużnych warstwach mięśni gładkich przewodu pokarmowego, czy macicy, gdzie prawdopodobnie pełni funkcję przy rozluźnianiu skurczu [5]. UCP1 znaleziono również w szczurzej i mysiej grasicy, która, podobnie jak BAT, zanika w trakcie ontogenezy [21]. Jednakże naturalnie wysoki poziom syntezy UCP1 *in vivo* dotyczy nadal wyłącznie BAT.

HOMOLOGI UCP1 W MITOCHONDRiach ZWIERZĄT

Pierwszych obserwacji wskazujących na istnienie UCP1 w mitochondriach BAT ssaków dokonano ponad 30 lat temu. Przez długi czas UCP1 było uważane za unikalny element radiacji adaptacyjnej ssaków, odpowiedzialny za bezdrżeniową termogenezę. Jednakże identyfikacja tzw. „nowych” UCPs rozpoczęła zupełnie nową erę badań bioenergetycznych [22]. Ssaki mogą syntetyzować aż pięć różnych izoform UCPs (UCP1 do UCP5), choć stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej „nowych” UCPs do „pierwotnego” UCP1 nie przekracza 60%. W przeciwieństwie do UCP1, jego homologi występują w mitochondriach wielu tkanek innych niż BAT, a poza tym ich synteza nigdy nie osiąga tak wysokiego poziomu jak UCP1 (tj. nawet do 8% puli białek mitochondrium) [23]. Dlatego też udział UCP1 oraz jego homologów w kontrolowanym przepływie protonów w mitochondriach ssaków może znacznie się różnić. Dodatkowo, stabilność poszczególnych izoform UCPs również jest odmienna [24]. Bardzo niestabilne jest UCP2, którego czas połowicznego rozpadu wynosi około 30 min. To znacznie mniej w porównaniu z UCP1 (30h). Różnica ta może uwydatniać odmienną fizjologiczną rolę homologów UCP1 w mitochondriach zwierząt.

Najpospoliej występującą izoformą jest UCP2, które zidentyfikowano m. in. w śledzionie, grasicy, komórkach β trzustki, sercu, płucach, białej i brunatnej tkance tłuszczowej, żołądku, jądrach i makrofagach oraz w mniejszych ilościach w mózgu, nerkach, wątrobie i mięśniach [15,25]. Zauważono, że w przypadku tej izoformy ilość syntetyzowanego mRNA w danej tkance nie jest proporcjonalna do ilości funkcjonalnego białka w błonie [5]. Obecnie aktywność UCP2 głównie wiąże się z regulacją poziomu produkcji ROS przez mitochondria.

Synteza UCP3 ogranicza się do mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego oraz BAT [15]. Ilość UCP3 jest 200-700 razy mniejsza w mitochondriach mięśni szkieletowych czy BAT w porównaniu z poziomem UCP1 w mitochondriach adipocytów BAT [26]. Przypuszcza się, że UCP3 jest głównie zaangażowane w metabolizm tłuszczów.

Odkrycie UCP4 i UCP5 wniosło jeszcze więcej niewiadomych na polu badań UCPs, zważywszy na ich niewielkie podobieństwo do UCP1, sięgające zaledwie 30% identyczności sekwencji aminokwasowej [5]. Największą ekspresję genów *ucp4* i *ucp5* zaobserwowano w mózgu, choć dotychczas nie ustalono dokładnej roli tych białek w różnych tkankach mózgu. Przez analogię możemy przypuszczać, iż UCP4 i UCP5 również wpływają na wydajność syntezy ATP w mitochondriach komórek nerwowych.

Dysproporcja pomiędzy poziomem syntezy UCP1 w BAT oraz jego homologów w pozostałych tkankach zwierzęcych może być odzwierciedleniem wielofunkcyjności UCPs ssaków, u której podstaw leży współwystępowanie w jednym organizmie aż pięciu różnych reprezentantów tej podrodziny mitochondrialnych białek nośnikowych. Działanie „nowych” UCPs (homologów UCP1) nie wiąże się z adaptacyjną termogenezą w odpowiedzi na bodziec temperaturowy. Poziom ekspresji ich genów jest bowiem stanowczo za mały

i wyklucza taką funkcję w normalnych warunkach fizjologicznych. Aczkolwiek postuluje się, że fizjologicznie niski poziom syntezy homologów UCP1 jest bardzo istotny dla regulacji wielu procesów związanych z kondycją zwierząt, w tym ludzi [5,26].

UCPs W MITOCHONDRiach ROŚLIN I MIKROORGANIZMÓW EUKARIOTYCZNYCH

UCPs stanowią, obok niewrażliwej na cyjanek oksydazy alternatywnej i dodatkowych nie uczestniczących w transporcie protonów dehydrogenaz NAD(P)H, systemy rozpraszające energię obecne w mitochondriach roślin i niektórych mikroorganizmów eukariotycznych. Równoczesne występowanie UCP i oksydazy alternatywnej wykazano w mitochondriach wszystkich badanych dotąd roślin wyższych, w mitochondriach takich mikroorganizmów, jak niefotosyntetyzująca ameba *Acanthamoeba*, niefermentujące patogenne drożdże *Candida*, grzyby *Aspergillus*, pasożytnicze pierwotniaki *Plasmodium* oraz u mycetozoa *Dictyostelium discoideum*, wykazującego prymitywną wielokomórkowość i różnicowanie komórkowe [2,7,9]. UCPs roślin i mikroorganizmów eukariotycznych przypominają działaniem homologu UCP1 mitochondriów zwierząt, pozwalając na zwrotny transport H^+ do macierzy mitochondrialnej, w którym uczestniczą FFA. Fizjologiczna rola tych białek jest nadal przedmiotem dyskusji. Stwierdzono, że obniżają one produkcję ROS w mitochondriach, co sugeruje ich udział w mechanizmach obronnych towarzyszących stresowi tlenowemu w komórce. Ponadto, ponieważ wszystkie UCPs mogą wpływać na wydajność fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach poprzez rozprężanie transportu elektronów i syntezy ATP, białka te muszą odgrywać istotną rolę w utrzymywaniu równowagi energetycznej i metabolicznej komórki.

UCPs JAKO SYSTEMY ANTYOKSYDACYJNE; AKTYWACJA UCPs PRZEZ ROS

Spośród poznanych UCPs ssaków, najwięcej danych świadczących o ich udziale w mechanizmach obronnych przed stresem oksydacyjnym dotyczy UCP2 i UCP3. Pierwszych wskazówek dostarczyły badania ukazujące zwiększoną produkcję H_2O_2 w izolowanych mitochondriach ssaków w warunkach hamowania aktywności UCP2 przez GDP [16,27]. Założono więc, że zwiększone rozprężenie mitochondriów w warunkach stresu oksydacyjnego stanowi odzwierciedlenie mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego [28] (Ryc. 4). UCPs są aktywowane produktami stresu oksydacyjnego (np. związkami powstałymi wskutek peroksydacji lipidów), co prowadzi do łagodnego rozprężania (ang. *mild uncoupling*) oddychania mitochondriów, które z kolei zmniejsza generację ROS. Działanie UCPs związane jest bowiem ze zmniejszoną redukcją nośników elektronów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, czemu towarzyszy obniżenie powstawania ROS. Dzięki temu mitochondria, które mają tendencję do hiperpolaryzowania swojej błony wewnętrznej, uwalniają mniej szkodliwych ROS [29]. Istnieje bowiem ścisła zależność pomiędzy wartością mitochondrialnego $\Delta\Psi$ a ilością powstających ROS. Nawet niewielki spadek $\Delta\Psi$ (o 10 mV) może hamować wytwarzanie H_2O_2 do 70% [5,30]. Dlatego też, pierwotnej funkcji UCPs być może należy doszukiwać się w

indukowanym łagodnym rozprzęgnięciu mitochondriów, przeciwdziałającym oksydacyjnym zniszczeniom, kosztem niewielkiej utraty energii [31].

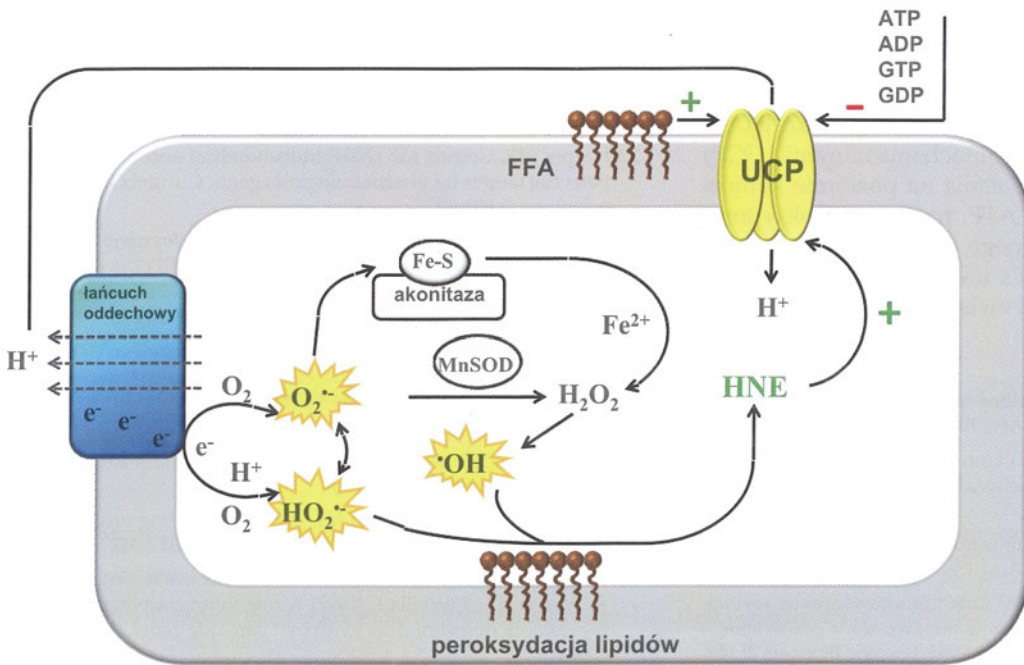
Pojęcie łagodnego rozprzęgnięcia (częściowego rozprzęgnięcia) z udziałem UCPs wiąże się zatem z subtelnym obniżaniem wartości $\Delta\Psi$, zmniejszającym prawdopodobieństwo wystąpienia stresu oksydacyjnego. Ten sposób obniżania $\Delta\Psi$ nie jest termogeniczny, nie prowadzi do zwiększenia temperatury organizmu, lecz stanowi swoisty, samoregulujący się przeciwutleniający system ochrony komórki [32]. Za ochronnym efektem łagodnego rozprzęgnięcia z udziałem UCPs przemawia również kardioprotekcyjny i neuroprotektoryjny efekt działania mitochondrialnych rozprzęgaczy [33].

Anionorodnik ponadtlenkowy może aktywować UCPs od wewnętrznej strony (macierzy) błony mitochondrialnej [34]. Obserwacja ta jest istotna przy rozważaniu fizjologicznej funkcji homologów UCP1. Założono, że fizjologicznie niski poziom homologów UCP1 w mitochondriach może uczestniczyć w oczyszczaniu wewnętrznego listka wewnętrznej błony mitochondrialnej z utlenionych form niesasyconych kwasów tłuszczowych, będących produktami peroksydacji (tworzenia grup nadtlenkowych) (LOOH, ang. *lipid peroxide*) [35]. Stężenie LOOH jest stosunkowo małe, dlatego też związki te mogą być docelowymi substratami pewnych izoform UCPs. Produkty peroksydacji kwasów tłuszczowych po przejściu przez błonę (w oparciu o jeden z

modeli działania UCPs, ryc. 3B) są pozbawione możliwości łatwego powrotu do macierzy na drodze flip-flop. Ograniczeniem staje się zmiana chemicznego charakteru cząsteczki na niekorzyść hydrofobowości. Potwierdzają to wyniki badań z pochodnymi kwasów tłuszczowych, które poza grupą karboksylową posiadają resztę hydroksylową [36]. Z biologicznego punktu widzenia większe stężenie LOOH w zewnętrznym listku wewnętrznej błony mitochondrialnej jest korzystniejsze [35]. Ma to związek z odmiennym składem macierzy mitochondrialnej i przestrzeni międzybłonowej. Macierz zawiera DNA, liczne mRNA oraz np. enzymy cyklu Krebsa, wśród nich akonitazę, która jest jednym z najbardziej wrażliwych na ROS białek w komórce. Znaczenie obrony macierzy przed wolnymi rodnikami wydaje się szczególnie ważne ze względu na odwrotną zależność pomiędzy długością życia ssaków a stopniem utlenienia mtDNA [35].

Powiązanie między ROS, produktami peroksydacji lipidów oraz aktywnością UCPs udowodniono, stosując związki wytwarzające wolne rodniki oraz przeciwutleniacze. Związkiem wydajnie przenikającym do macierzy o właściwościach „wymiatacza” wolnych rodników, jest mitoPBN [37]. MitoPBN to syntetyczny przeciwutleniacz fenyllobutylnitron (PBN), kowalencyjnie połączony z lipofilnym kationem trifenylofosfoniowym. Postuluje się, że związek ten bardzo skutecznie zapobiega aktywacji UCPs przez ROS, gdyż hamuje łańcuch przekształceń wolnorodnikowych, prowadzących do wytworzenia np. 4-hydroksy-2-nonenalu (HNE) – cząsteczki

sygnałowej aktywującej UCPs [31]. MitoPBN nie reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym oraz końcowymi produktami peroksydacji lipidów. Dlatego też produkty pośrednie procesu peroksydacji lipidów mogą stanowić jedynie warunek wstępny dla aktywacji UCPs. Dla mitochondriów zwierząt (oprócz mitochondriów BAT z UCP1) oraz mitochondriów roślin zaproponowano model wiążący aktywację UCPs przez ROS z funkcją UCPs, jako systemów przeciwutleniających [5,31,38] (Ryc. 4). W modelu tym wolne rodniki tlenowe pełnią funkcję sygnału aktywującego UCP, co prowadzi do obniżenia produkcji ROS. W mitochondriach, w warunkach wysokiego $\Delta\mu H^+$, dochodzi do wytwarzania anionorodnika



Rycina 4. Model aktywacji UCP przez reaktywne formy tlenu, które inicjują peroksydację (tworzenie grup nadtlenkowych) kwasów tłuszczowych lipidów. W mitochondriach anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz rodnik hydroperoksydowy (HO_2^{\cdot}) powstają najczęściej wskutek „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego. Obecna w macierzy manganowa dymutaza ponadtlenkowa (MnSOD) neutralizuje większość $O_2^{\cdot-}$, przekształcając ten rodnik w nadtlenek wodoru (H_2O_2). Część $O_2^{\cdot-}$ uszkadza enzymy zawierające centra Fe-S, np. bardzo wrażliwą na $O_2^{\cdot-}$ akonitazę, przyczyniając się do uwalniania jonów żelaza (Fe^{2+}). Jony Fe^{2+} katalizują produkcję rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) z H_2O_2 w reakcji Fentona. Rodniki $\cdot OH$ i HO_2^{\cdot} , reagując z acylowymi łańcuchami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (składników fosfolipidów błonowych), zapoczątkowują proces peroksydacji lipidów. Złożona mieszanina końcowych produktów peroksydacji lipidów, obejmuje głównie reaktywne alkeny w tym kluczowy 4-hydroksy-2-nonenal (HNE). HNE, aktywując UCP, zwiększa przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów. Indukowane przez ROS, łagodne rozprzęgnięcie z udziałem UCP stanowi podstawę nowo poznanej ścieżki regulującej uwalnianie wolnych rodników w mitochondriach.

ponadtlenkowego i innych ROS. Po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej anionorodnik ponadtlenkowy uwalnia jony Fe^{2+} z białek zawierających centra Fe-S (np. akonitazy). Jony Fe^{2+} reagują z H_2O_2 , tworząc rodnik hydroksylowy, rozpoczynający łańcuch przekształceń wolnych rodników, który inicjuje peroksydację lipidów błonowych. Tworzony jest HNE i inne alkenowe pochodne kwasów tłuszczowych. HNE aktywuje UCP, co prowadzi do obniżenia $\Delta\mu H^+$ i w konsekwencji do spadku uwalniania ROS przez mitochondria. Mechanizm ten zapobiega pogłębianiu się zniszczeń wywołanych przez stres oksydacyjny. Ceną którą mitochondria „płacą” za taki ochronny mechanizm redukujący poziom ROS, jest mniejsza wydajność fosforylacji oksydacyjnej. Jednakże do tej pory nie ma pełnej zgodności, co do faktycznego zaangażowania UCPs w odpowiedź na stres oksydacyjny i uruchamiania lokalnej ścieżki zwrotnej (ang. *feedback*), prowadzącej do tłumienia powstawania ROS. Jak dotąd brak także informacji na temat aktywacji UCPs przez ROS w mitochondriach organizmów jednokomórkowych.

PODSUMOWANIE

Przełom XX i XXI wieku to okres odkryć kolejnych homologów UCP1. Identyfikacja UCPs we wszystkich ważniejszych grupach eukariontów: u roślin wyższych, niektórych bezkręgowców, pierwotniaków, grzybów i w wielu nietermogennych tkankach ssaków sugeruje, że przeciwnie do UCP1 BAT ssaków, spełniają one inne funkcje niż produkowanie ciepła poprzez zwiększanie oddychania mitochondrialnego. Jedną z nich może być obniżanie produkcji ROS w mitochondriach, a więc ochrona komórki przed stresem oksydacyjnym. Zbadanie regulacji aktywności poszczególnych homologów UCP1 u różnych organizmów, w różnych tkankach czy organach roślin i zwierząt pomoże wyjaśnić nadal niejasną funkcję fizjologiczną spełnianą przez te białka. Rosnące zainteresowanie mitochondrialnymi UCPs związane jest z efektem ich działania na poziomie komórkowym, tj. regulacją poziomu ATP, równowagi oksydoredukcyjnej czy stresu oksydacyjnego. Z drugiej strony zaburzenia w funkcjonowaniu UCPs mogą przyczyniać się do wielu stanów patologicznych u zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

- Jarmuszkiewicz W (2001) Uncoupling proteins in mitochondria of plants and some microorganisms. *Acta Biochim Polon* 48: 145-155
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 510: 117-120
- Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363: 100-124
- Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postepy Biochem* 2: 145-156
- Echtay KS (2007) Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Rad Biol Med* 43: 1351-1371
- Ricquier D, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345: 161-179
- Klingenberg M, Huang SG (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1415: 271-296
- Ledesma A, Garcia de Lacoba M, Rial E (2002) The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 12: 3015.1-3015.9
- Vercesi AE, Borecky J, Maia I, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H (2006) Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* 57: 383-404
- Wacker M, Wanek P, Eder E (2001) Detection of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal after gavage of trans-4-hydroxy-2-nonenal or induction of lipid peroxidation with carbon tetrachloride in F344 rats. *Chem Biol Interact* 137: 269-283
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15-18
- Klingenberg M (1990) Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends Biochem Sci* 15: 108-112
- Skulachev VP (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 264: 246-248
- Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek P (1996) On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 271: 2615-2620
- Villarroya F, Iglesias R, Giral M (2007) PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res* 74364
- Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J (2006) Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species - or not? *Biochim Biophys Acta* 1757: 449-458
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM (2006) Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 1757: 480-485
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359
- Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D, Criscuolo F (2005) Thermogenesis: What role for UCPs in mammals and birds? *Biosci Rep* 3/4: 227-249
- Klingenberg M, Echtay KS (2001) Uncoupling protein: the issues from a biochemist point of view. *Biochim Biophys Acta* 1504: 128-143
- Carroll AM, Hainess LR, Pearson TW, Fallon PG, Walsh CM, Brennan CM, Breen EP, Porter RK (2005) Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J Biol Chem* 280: 15534-15543
- Harper ME, Gerrits MF (2004) Mitochondrial uncoupling proteins as potential targets for pharmacological agents. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 603-607
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B (2001) Uncoupling protein 2, *in vivo* distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276: 8705-8712
- Roussel S, Mozo J, Dujardin G, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM (2007) UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett* 581: 479-482
- Nedergaard J, Cannon B (2003) The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol* 88: 65-84
- Bezaire V, Seifert EL, Harper ME (2007) Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J* 2: 312-342
- Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11: 809-815
- Echtay KS, Roussel D, St Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415: 96-99
- Wiederkehr A, Wollheim CB (2006) Minireview: Implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 147: 2643-2649
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277

31. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37: 755-767
32. Skulachev VP (1997) Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci Rep* 17: 347-366
33. McLeod C, Aziz A, Hoyt RF Jr, McCoy JP Jr, Sack MN (2005) Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* 280: 33470-33476
34. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 277: 47129-47135
35. Goglia F, Skulachev VP (2003) A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J* 17: 1585-1591
36. Wojtczak L, Więckowski MR, Schönfeld P (1998) Protonophoric activity of fatty acid analog and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. *Arch Biochem Biophys* 357: 76-84
37. Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RA, Brand MD (2003) Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from α -phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem* 278: 48534-48545
38. Smith AM, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling proteins in plants. *J Biol Chem* 279: 51944-51952

Mitochondrial uncoupling proteins: regulation and physiological role

Wiesława Jarmuszkiewicz[✉], Andrzej Woyda-Płoszczyca

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

[✉]e-mail: wiesiaj@amu.edu.pl

Key words: mitochondria, uncoupling proteins, reactive oxygen species, lipid peroxidation

ABSTRACT

Uncoupling proteins (UCPs), members of mitochondrial carrier family, are present in mitochondrial inner membrane and mediate free fatty acid-activated, purine-nucleotide-inhibited H⁺ re-uptake. UCPs can modulate the tightness of coupling between mitochondrial respiration and ATP synthesis. A physiological function of the first described UCP, UCP1 or termogenin, present in mitochondria of mammalian brown adipose tissues is well established. UCP1 plays a role in nonshivering thermogenesis in mammals. The widespread presence of UCPs in eukaryotes, in non-thermogenic tissues of animals, plants and in unicellular organisms implies that these proteins may elicit other functions than thermogenesis. However, the physiological functions of UCP1 homologues are still under debate. They can regulate energy metabolism through modulation of the electrochemical proton gradient and production of ROS. Functional activation of UCPs is proposed to decrease ROS production. Moreover, products of lipid peroxidation can activate UCPs and promote feedback down-regulation of mitochondrial ROS production.

Andrzej Woyda-Płoszczyca

Wiesława Jarmuszkiewicz

Institut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Zakład Bioenergetyki, Institut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. (061) 828 5881, e-mail: wiesiaj@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 28 kwietnia 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 3 maja 2008 r.

Słowa kluczowe: białka rozprzegające, reaktywne formy tlenu, otyłość, cukrzyca typu 2, onkogeneza, uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne, neurodegeneracja

Wykaz skrótów: BAT (ang. *brown adipose tissue*) – brunatna tkanka tłuszczowa; koenzym A – CoA; FFA (ang. *free fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe; LDL – lipoproteina o małej gęstości; LMF (ang. *lipid mobilising factor*) – czynnik mobilizujący lipidy; NF- κ B (ang. *nuclear factor kappaB*) – jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B; PGC-1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α*) – koaktywator receptora PRAR; PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptor aktywowany przez proliferatory peroksydomów; pRB (ang. *retinoblastoma protein*) – białko retinoblastomy; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; TZD (ang. *thiazolidinedione*) – leki z grupy tiazolidinedionów; UCP(s) (ang. *uncoupling protein(s)*) – białko(a) rozprzegające; WAT (ang. *white adipose tissue*) – biała tkanka tłuszczowa; $\Delta\mu\text{H}^+$ – protonowy gradient elektrochemiczny; $\Delta\Psi$ – elektryczny potencjał błonowy mitochondriów

Podziękowanie: Przygotowanie artykułu zostało dofinansowane ze środków budżetowych na naukę (projekt badawczy nr 3382/B/P01/2007/33)

STRESZCZENIE

Działanie białek rozprzegających (UCPs), mitochondrialnych systemów rozpraszających energię, może mieć istotny wpływ na funkcjonowanie komórek, tkanek, narządów i całych organizmów ssaków. Regulacja aktywności UCPs może okazać się w przyszłości kluczowym celem działania terapeutycznego w wielu zaburzeniach funkcjonowania organizmu ludzkiego. Dotyczyć to może na przykład zaburzeń gospodarki tłuszczowej, otyłości, cukrzycy typu 2, procesu starzenia się, a nawet chorób neurodegeneracyjnych i zmian nowotworowych. Ponieważ fizjologiczna rola UCPs (poza UCP1, białkiem brunatnej tkanki tłuszczowej) nie jest w pełni poznana, zbadanie mechanizmów regulacji aktywności homologów UCP1 (UCP2-5) na poziomie molekularnym w różnych tkankach i narządach jest ważnym wyzwaniem. Ma to istotne znaczenie dla zrozumienia fizjologii mitochondriów zwierząt oraz patofizjologii związanych z zaburzeniami działania UCPs. Informacje te przyczynią się także do stworzenia bazy dla wykorzystania UCPs w klinice.

WPROWADZENIE

Mitochondria zajmują specjalną pozycję w świecie *Eucaryota*. Oprócz pełnienia funkcji „elektrowni” dostarczających komórce cząsteczek ATP, mitochondria są także ważnym miejscem przebiegu szlaków metabolicznych, co istotnie wpływa na utrzymywanie homeostazy komórkowej. Ponadto, mitochondria w komórce stanowią główne źródło reaktywnych form tlenu (ROS) i mogą być istotnym czynnikiem uruchamiającym mechanizm fizjologicznej śmierci komórki [1]. Dlatego też mitochondria mogą być przyczyną wielu stanów patologicznych, tak różnych jak nowotwory, cukrzyca, otyłość, uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne, zaburzenia neurodegeneracyjne (choroby Alzheimerera i Parkinsona), a także mogą wpływać na proces starzenia się [2].

Białka rozprzegające (UCPs, ang. *uncoupling proteins*), będące białkami wewnętrznej błony mitochondrialnej, rozprzegają oddychanie mitochondriów, burząc protonowy gradient elektrochemiczny ($\Delta\mu\text{H}^+$) wytworzony przez łańcuch oddechowy mitochondriów. UCPs są aktywowane przez niezestryfikowane (wolne) kwasy tłuszczowe (FFA, ang. *free fatty acids*), a ich allosterycznymi inhibitorami są nukleotydy purynowe [3]. Działanie UCPs jest napędzane przez potencjał błonowy ($\Delta\Psi$, ujemny wewnątrz mitochondrium) oraz różnicę pH (kwaśne na zewnątrz). UCPs występują w mitochondriach wielu tkanek ssaków: UCP1 (termogenina) w brunatnej tkance tłuszczowej (BAT, ang. *brown adipose tissue*), UCP2 w różnych tkankach zwierząt, UCP3 w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym oraz w BAT, UCP4 i UCP5 w mózgu. Ze względu na charakter działania wszystkich UCPs w mitochondriach organizmów eukariotycznych, tj. rozpraszanie użytecznej energii swobodnej pochodzącej z utleniania substratów oddechowych, białka te stanowią ważny punkt kontrolny w gospodarce energetycznej komórki [3]. Upośledzenie działania UCPs może mieć istotny wpływ na funkcjonowanie komórek, tkanek, narządów i całych organizmów. Dlatego też regulacja aktywności UCPs może okazać się kluczowym celem działania terapeutycznego w wielu zaburzeniach funkcjonowania organizmu ludzkiego [4-8].

UCP3 A GOSPODARKA TŁUSZCZOWA

Aktywność rozprzegająca UCPs związana jest z transportem protonów z przestrzeni międzybłonowej do macierzy mitochondriów, co obniża $\Delta\mu\text{H}^+$ [3]. FFA są swoistymi kofaktorami tego procesu. Jeden z modeli opisujących mechanizm działania UCPs (model cyklicznego obiegu FFA) zakłada ciągłe krążenie kwasów tłuszczowych przy ich udziale w zewnętrznym i wewnętrznym listku wewnętrznej błony mitochondrialnej w zależności od uprotonowania grup karboksylowych tych kwasów. W ten sposób podtrzymywanie stałego obiegu FFA wpływa pozytywnie na metabolizowanie kwasów tłuszczowych. Dodatkowo, usuwanie z mitochondriów utlenionych, bądź zjonizowanych (anionów) form

FFA może stanowić bardzo skuteczne narzędzie ochronne przed toksycznymi właściwościami tych cząsteczek [9].

W przeciwieństwie do kwasów tłuszczowych związanych wiązaniem tioestrowym z koenzymem A (acylo-CoA), długołańcuchowe FFA nie są metabolizowane. Brak równowagi pomiędzy ilością dostarczanego do macierzy mitochondriów acylo-CoA a tempem procesu β -oksydacji jest często przyczyną niekorzystnej akumulacji niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych w mitochondriach [7]. Mitochondrialna pula FFA jest wytwarzana przez mitochondrialną tioesterazę-1 (MTE-1), enzym, który poprzez hydrolizę wiązania tioestrowego acylo-CoA regeneruje w macierzy wolny koenzym A (HS-CoA). Związek ten jest czynnikiem ograniczającym szybkość procesu β -oksydacji kwasów tłuszczowych i cyklu Krebsa [10]. W ten sposób MTE-1 podtrzymuje ciągłość ważnych szlaków metabolicznych, odsuwając groźbę ich spowolnienia bądź zatrzymania. Występowanie UCP3 jest ograniczone do mitochondriów tkanek, które silnie zależą od procesu utleniania kwasów tłuszczowych (mięśnie szkieletowe, mięśnie serca i BAT). W tkankach tych współdziałanie obu białek, UCP3 i MTE-1, może skutecznie zwiększać szybkość cyklu Krebsa i β -oksydacji (MTE-1 poprzez uwalnianie HS-CoA a UCP3 poprzez zwiększanie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym) i równoległe podtrzymywać szybkie utlenianie kwasów tłuszczowych, dzięki ich transportowi do przestrzeni międzybłonowej (UCP3). Tam FFA są ponownie przekształcane do acylo-CoA przez syntazę acylo-CoA [10]. Co ciekawe, podwyższony poziom białek UCP3 i MTE-1 stwierdzono w mitochondriach serc szczurów cierpiących na cukrzycę [11]. Współdziałanie obu białek dodatkowo zapewnia ochronę przed podwyższeniem poziomu anionów FFA w macierzy [12]. Hipotezę, zakładającą działanie UCP3 jako rezerwowej ścieżki przepływu FFA w warunkach ich nadmiernego dostarczenia do mitochondriów [10], potwierdza spadek ilości triacylogliceroli w cytosolu włókien mięśniowych, obserwowany przy podwyższonej ekspresji *ucp3*. U ludzi i gryzoni, zwiększona ekspresja *ucp3* ma także miejsce w warunkach intensywnego metabolizmu tłuszczowego, tj. w trakcie postzczenia, nieregularnego ostrego treningu czy podczas diety wysokotłuszczowej [7,12]. Dlatego też odpowiedni poziom ekspresji genu *ucp3* może chronić przed typową otyłością wywołaną dietą. Wspomniana hipoteza wymaga dalszego potwierdzenia doświadczalnego ze względu na założenie, że UCPs są transporterami anionów FFA, co nie jest w pełni akceptowane [7,12]. Ponadto, istnieją pewne rozbieżności wynikające z badań z wykorzystaniem techniki „gene knock-out”. Jak stwierdzono myszy pozbawione UCP3 w mitochondriach mięśni (*ucp3* -/-) nie mają upośledzonego utleniania kwasów tłuszczowych.

Wywołany niewłaściwą dietą nadmiar kwasów tłuszczowych ma wpływ na funkcjonowanie mitochondriów [9,10]. Z powodu braku syntazy acylo-CoA w macierzy niemożliwe jest metabolizowanie FFA w mitochondriach. Powoduje to stan podwyższonego ryzyka peroksydacji mitochondrialnych lipidów błonowych oraz zjawiska lipotoksyczności. W tych warunkach, głównym zadaniem UCP3 mógłby być eksport (zjonizowanych) FFA z mitochondriów [9,10], zgodnie z modelem działania UCP zaproponowanym przez Skulacheva i Garlida [3]. Na przykład farmakologiczne

blokowanie procesu utleniania kwasów tłuszczowych za pomocą etomoksyru (inhibitor acylotransferazy karnitynowej I) indukuje wzrost poziomu UCP3, co wskazuje na zaangażowanie UCP3 w znoszenie nierównowagi metabolicznej, wynikającej z nadmiernego dostarczania kwasów tłuszczowych do mitochondriów a zdolnością do ich utleniania [9,10]. Pozytywnym efektem ubocznym tak ukierunkowanego działania rozprzęgającego UCP3 jest oczywiście także obniżanie $\Delta\mu H^+$ oraz zmniejszanie uwalniania ROS przez mitochondria. W warunkach podwyższonego poziomu FFA w cytosolu, zwiększony poziom UCP3 w błonie mitochondrialnej prowadzi do intensywnego usuwania z wewnętrznej listki błony wewnętrznej anionów FFA, które przedostały się tam niezależnie od systemu karnitynowego, co paradoksalnie sprzyja utlenianiu kwasów tłuszczowych (acylo-CoA) w procesie β -oksydacji [10]. Jednocześnie postuluje się, że UCP3 (a także powszechnie w tkankach zwierzęcych UCP2) mogłoby również usuwać aniony kwasów tłuszczowych fosfolipidów błonowych, które uległy peroksydacji, oczywiście po ich wcześniejszym uwolnieniu z fosfolipidów z udziałem fosfolipaz [13].

Sformułowano hipotezę, zakładającą działanie UCP3 jako molekularnego przełącznika, który decyduje o rodzaju wykorzystywanych substratów energetycznych w mięśniach (kwasy tłuszczowe *versus* glukoza) [14]. Potrzeba przestawienia się na metabolizm tłuszczowy czy węglowodanowy często jest podyktowana stanem fizjologicznym mięśni, zależnym od dostarczanego pożywienia. Zwiększone wykorzystywanie lipidów ma miejsce podczas głodzenia, gdy dostęp do glukozy jest ograniczony. Natomiast redukcja spalania tłuszczów wiąże się z ponownym zasilaniem pokarmowym organizmu, zwłaszcza gdy wznowiona dieta jest dietą niskotłuszczową. Jest to konieczne dla uzupełnienia lipidów zapasowych, magazynowanych na okres zwiększonej wydajności metabolicznej. Gdy głodzenie zastępowane jest obfitym odżywianiem się (i odwrotnie), zmiany w ilości syntetyzowanego UCP3 są większe i bardziej wyraźne w mitochondriach włókien mięśniowych typu II (głównie IIB), charakteryzujących się szybkimi skurczami, które pozyskują energię głównie z beztlenowej glikolizy. Przeciwnie, zmiany w poziomie UCP3 nie dotyczą włókien mięśniowych typu I, które kurczą się wolniej, a energetycznie ich funkcjonowanie oparte jest na fosforylacji oksydacyjnej oraz utlenianiu lipidów jako substratów paliwowych. A zatem, to szybkie, bazujące na glikolizie włókna mięśniowe typu II cechuje zdolność do przestawiania się na dostępny substrat oddechowy (z glukozy na lipidy i odwrotnie) w zależności od stanu fizjologicznego organizmu [14]. Zasilane fosforylacją oksydacyjną włókna mięśniowe typu I mają większą zawartość mitochondriów, mogą więc łatwiej poradzić sobie z drastycznie podwyższonym poziomem kwasów tłuszczowych, dzięki możliwości intensyfikacji procesu β -oksydacji. Takie fizjologiczne przystosowanie włókien typu I oznacza brak silnego zaangażowania UCP3 w metabolizm tej tkanki [12]. W świetle tych rozważań, funkcjonowanie UCP3 niekoniecznie musiałoby wiązać się z ułatwianiem utleniania kwasów tłuszczowych, lecz raczej stanowiłoby adaptację do zwiększonej dostawy tych kwasów.

Mimo że homologi UCP1 nie uczestniczą w procesach termogennych, to jednak w przypadku UCP3 zaobserwowano

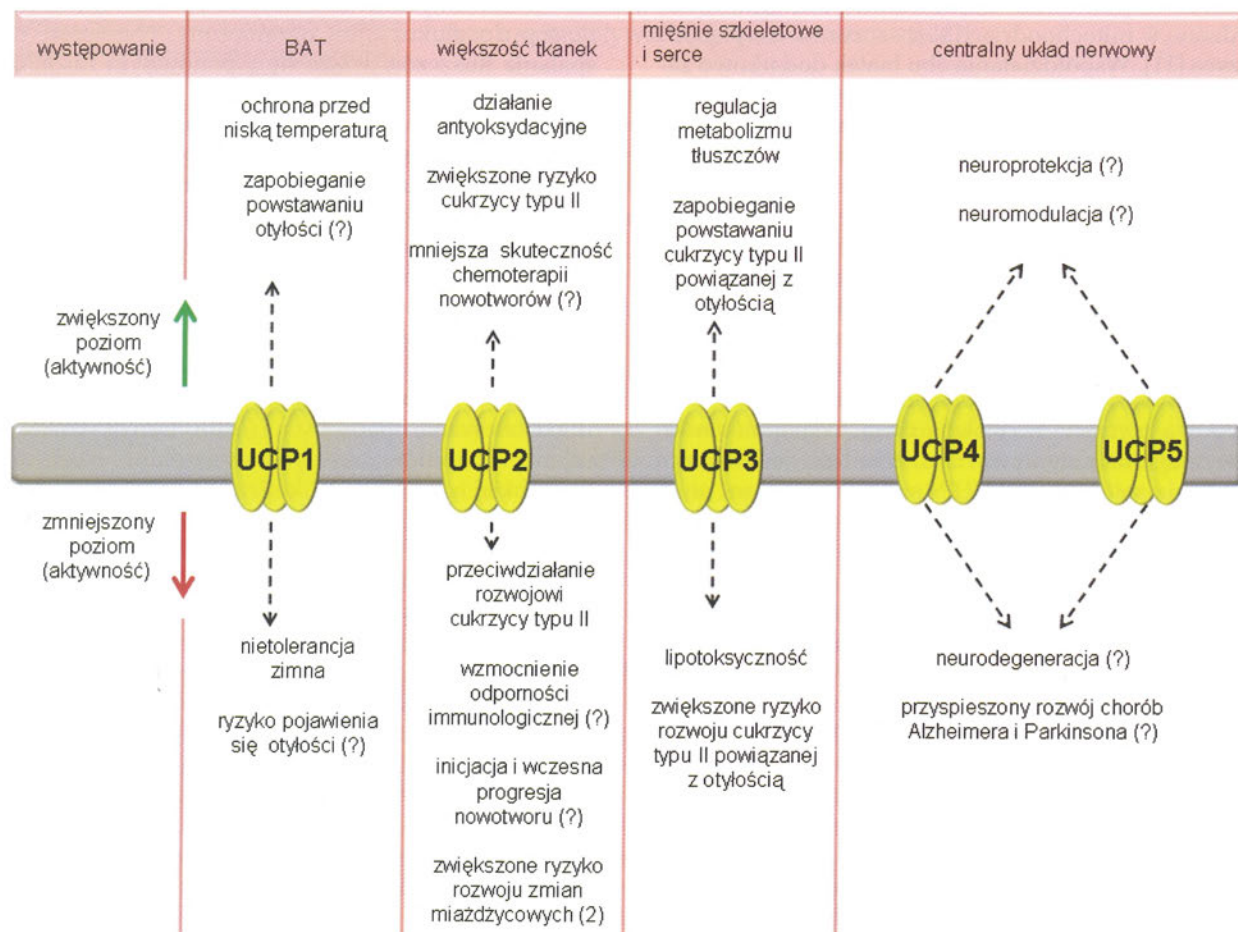
pewne ciekawe zjawisko. Termogenezę pośrednio powiązaną z UCP3 wykazano w warunkach silnej adrenergicznej aktywacji wywołanej aplikacją MDMA (3,4-metylenodioxymetamfetamina czyli *ecstasy*), w komórkach tkanki mięśniowej myszy [15]. Wzrostu temperatury nie obserwowano w mięśniach mutantów myszy pozbawionych *ucp3* (-/-), mimo identycznego traktowania zwierząt substancją narkotyczną. Obserwacja ta nadal pozostaje niewyjaśniona. Jednakże, obok faktu powszechnego występowania UCP3 w mięśniach szkieletowych, obserwacja ta sprawiła że UCP3 zaczęto traktować jako interesujący obiekt nowatorskiego podejścia do problemu otyłości z wykorzystaniem ukierunkowanych farmaceutyków (Ryc. 1). Wywołane rozprzegającą aktywnością UCP3 zwiększone oddychanie mitochondrialne oraz wydatkowanie energii (poprzez wzmożone utlenianie kwasów tłuszczowych, acylo-CoA) może być włączone w regulację bilansu energetycznego całego ciała [12].

UCP1 – SPOSÓB NA OTYŁOŚĆ?

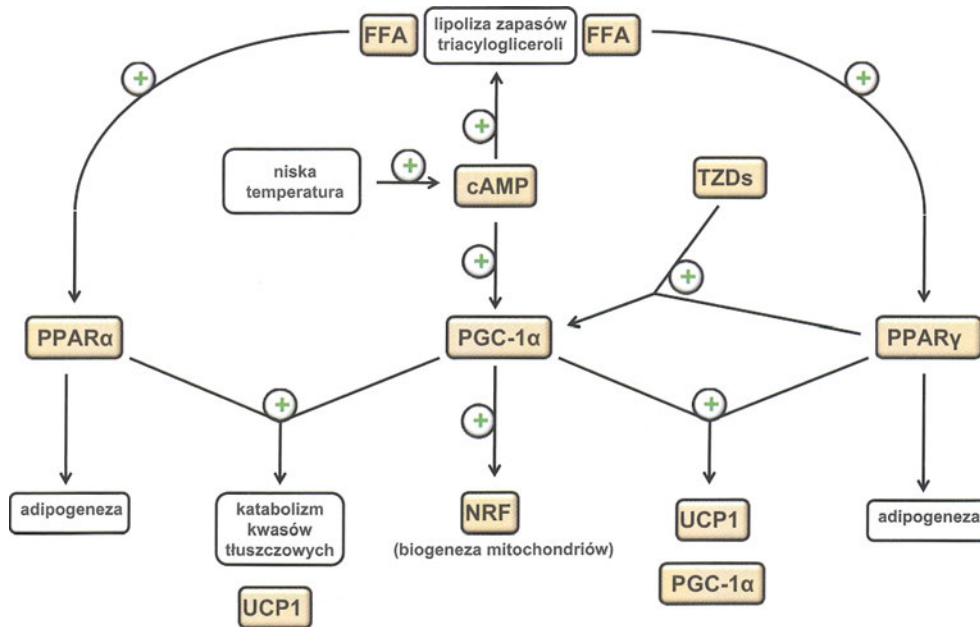
Efektom funkcjonowania UCP1 nie jest przechowywanie zasobów energetycznych w postaci tłuszczu w BAT, termogennej tkance ssaków [3]. Dlatego też, aktywność różnych UCPs (zwłaszcza UCP1) można także rozpatrywać jako działającą przeciwko stanom otyłości (Ryc. 1) [5]. Takie spojrzenie związane jest z oczekiwaniami szerokich kręgów społeczeństwa, szukających kolejnych środków odchudzających.

Bilans energetyczny ssaków zależy od wydatkowania energii oraz jej pobierania wraz z pokarmem. Brak równowagi objawia się albo jako magazynowanie energii w postaci triacylogliceroli (pobieranie przewyższa wydatkowanie), co często łączy się z otyłością, albo jako całkowite zużycie energii (wydatkowanie przewyższa pobieranie), co może prowadzić do kacheksji (wychudzenia i osłabienia organizmu) [8,16]. W związku z tym termogeneza związana z UCP1 rodzi pewne nadzieje związane z opracowaniem metody redukcji otyłości u ludzi, gdyż białko to indukuje mobilizację zasobów triacylogliceroli. Wyjściowym założeniem nowatorskiej strategii mającej przeciwdziałać otyłości jest kontrolowana aktywacja adipocytów BAT, bądź nadanie adipocytom WAT cech adipocytów BAT, czyli przekształcenie białej tkanki tłuszczowej (WAT, ang. *white adipose tissue*) w tkankę przypominającą BAT.

Tkanka tłuszczowa jest magazynem tłuszczu oraz narządem wydzielania wewnętrznego. Występujące u ssaków dwa typy adipocytów (komórek tłuszczowych) budujących BAT i WAT pełnią przeciwstawne fizjologiczne funkcje. Adipocyty WAT to największy magazyn energetyczny tłuszczu w organizmie, adipocyty BAT – termogenne komórki rozpraszające energię metaboliczną jako ciepło, które rozprawadane jest po całym ciele. Duże ilości białej tkanki tłuszczowej związane są z otyłością, wysoki poziom brunatnej tkanki tłuszczowej powiązany z intensywną ak-



Rycina 1. Możliwe patologiczne, bądź terapeutyczne efekty wynikające ze zmienionego poziomu syntezy (aktywności) pięciu izoform UCPs ssaków (UCP1-5).



Rycina 2. Rola receptorów PPAR w regulacji procesu termogenezy BAT ssaków. Kluczowy czynnik białkowy, tj. PGC-1 α , inicjuje uruchomienie termogenego programu BAT poprzez współaktywację receptorów PPAR γ i PPAR α , a także regulację syntezy czynnika transkrypcyjnego typu NRF. TZD (przeciwcukrzycowe leki z grupy tiazolidiniedionów), specyficznie aktywujące receptory PPAR γ , mogą również pobudzać adipogenezę oraz biogenezę mitochondriów. W ten sposób dochodzi do obejścia klasycznej ścieżki indukcji syntezy PGC-1 α poprzez adrenergiczną stymulację w odpowiedzi na odpowiedni bodziec temperaturowy wywołujący syntezę cAMP. Agoniści zarówno PPAR α , jak i PPAR γ mogą indukować ekspresję *ucp1*, prawdopodobnie na różnych etapach rozwoju BAT. Aktywacji procesu termogenezy BAT, fizjologicznie zależnej od cAMP, towarzyszy oprócz indukcji syntezy PGC-1 α również intensywna lipoliza zapasowych triglicerydów. Uwolnione FFA pełnią funkcję głównego substratu zasilającego proces termogenezy oraz indukują rozprzęgającą aktywność UCP1. FFA mogą również działać jako aktywatory receptorów PPAR. Stwierdzono również zwiększenie syntezy PGC-1 α poprzez autoregulacyjną pętlę, w której współaktywacja PPAR γ przez białko PGC-1 α uruchamia transkrypcję genu *pgc-1 α* .

tywnością metaboliczną zwykle związany jest z redukcją wagi ciała [17,18]. Trzeba jednak pamiętać, że BAT u ludzi (i u innych większych ssaków) zanika w trakcie ontogenezy (po okresie niemowlęctwa czy wczesnego dzieciństwa) i jedynie szczątkowe ilości tkanki utrzymują się u osobników dorosłych.

Kwasy tłuszczowe oprócz pełnienia funkcji związków indukujących proces rozprzegania (bezpośrednia aktywacja UCP) oraz głównych substratów w termogenezie (jako substraty β -oksydacji), mogą również pośrednio aktywować ekspresję *ucp1* u zwierząt, poprzez wpływ na receptory PPAR (Ryc. 2). Kilka podtypów jądrowych receptorów typu PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) zidentyfikowano jako czynniki kontrolujące transkrypcję genów *ucps* w tkankach tłuszczowych [17]. Forma PPAR γ ulega silnej syntezie zarówno w adipocytach WAT i BAT, i jest związana głównie z przebiegiem procesu adipogenezy. Forma PPAR α przeważa w komórkach BAT. Dzięki unerwieniu współczulnemu, BAT w przeciwieństwie do WAT jest efektem działania bodźca niskiej temperatury. Bodziec ten, poprzez ścieżkę sygnalizacyjną angażującą cAMP, indukuje wzmożoną syntezę PGC-1 α , koaktywatora receptora PPAR γ . Wydaje się, że PGC-1 α odgrywa zasadniczą rolę w regulacji transkrypcji genu *ucp1*. Postuluje się, że PGC-1 α , indukując syntezę UCP1, jest niezbędny dla powstawania adipocytów BAT bogatych w UCP1 [19]. A zatem silna synteza receptorów PPAR γ w połączeniu z syntezą koak-

tywatora PGC-1 α stanowi kluczowy zestaw czynników decydujących o różnicowaniu się adipocytów w kierunku BAT. Dodatkowo, PGC-1 α , współpracując z receptorem typu PPAR α , kontroluje ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za przeprowadzanie katabolizmu tłuszczu w BAT, niezbędnego do wywołania termogenezy [17]. W przeciwieństwie do adipocytów WAT, komórki BAT niezwykle wydajnie utleniają kwasy tłuszczowe. Wskazuje na to obfitość mitochondriów z silnie rozwiniętymi grzebieniami, a także wysoki poziom syntezy PPAR α w tych komórkach. PPAR α prawdopodobnie jest także induktorem genu *ucp1* w pełni wykształconych, dojrzałych komórkach BAT [20]. Obecność PGC-1 α , aktywującego zarówno PPAR α , jak i PPAR γ , jest podstawowa dla realizacji całego procesu termogenezy BAT (Ryc. 2).

Stwierdzono, że u myszy skłonność do otyłości jest ściśle związana z obniżoną aktywnością BAT [21]. Przeciwnie, „odporność” na otyłość może być związana z zwiększoną aktywnością BAT, bądź indukcją w WAT informacji genetycznej normalnie przypisanej BAT. Wykazano na przykład, że ektopowa ekspresja genu *pgc-1 α* w WAT człowieka może uruchamiać adipogenezę w kierunku komórek BAT, której towarzyszy ekspresja genu *ucp1* [22,23]. Zjawisko konwersji komórek WAT w BAT może okazać się pomocne w poszukiwaniu sposobu stymulacji termogenezy (a więc i wzmożonego utleniania kwasów tłuszczowych) u dorosłych, co potencjalnie może wywołać efekt zmniejszenia wagi ciała.

W komórkach tłuszczowych WAT dodatkową indukcję syntezy PGC-1 α (którego wysoki poziom występuje w komórkach BAT) można osiągnąć chemicznie, stosując przeciwcukrzycowy lek rosiglitazon (z grupy tiazolidiniedionów, TZD) [24]. Odpowiedzią adipocytów WAT na podanie TZD jest również wzmożona synteza mRNA UCP1. Jak stwierdzono, TZD mogą bezpośrednio wpływać na transkrypcję *ucp1* poprzez specyficzną aktywację receptorów PPAR γ komórek tłuszczowych (WAT i BAT). Receptory te z kolei indukują ekspresję genu *pgc-1 α* koniecznego dla syntezy UCP1 (Ryc. 2) [17,24]. A zatem, w stosunku do wcześniej poznanej adrenergicznej regulacji, TZD mogą wywoływać nową ścieżkę regulującą ekspresję genu *pgc-1 α* [24]. *In vitro* TZD jako ligandy PPAR γ także silnie po-

budząc adipogenezę białej i brązowej tkanki tłuszczowej. W adipocytach WAT TZD indukują zmiany w morfologii mitochondriów w kierunku wykształcenia licznych grzebieni [21]. Co ciekawe, chroniczne podawanie leków przeciwwirusowych może prowadzić do wzmożonej ekspresji genu *ucp1* u dorosłych, w znacznej mierze pozbawionych przecież BAT [25].

Białkiem wpływającym na powstawanie komórek tłuszczowych jest także białko pRB (ang. *retinoblastoma protein*). Będąc ważnym regulatorem cyklu komórkowego ssaków, a także supresorem zmian nowotworowych, białko pRB uważane jest za przełącznik molekularny decydujący o tym czy różnicowanie adipocytów zmierza w kierunku komórek WAT czy BAT [21,26]. Białko pRB jest potrzebne do różnicowania adipocytów WAT, natomiast hamuje powstawanie komórek BAT. Wskazuje na to obecność pRB w jądrze tylko preadipocytów WAT [26]. W związku z tym zaproponowano model doświadczalny, w którym selektywna inaktywacja pRB powinna wywołać zmiany prowadzące do powstawania adipocytów BAT, co wiązałoby się z intensywną syntezą UCP1, wydajnym spalaniem tłuszczu oraz redukcją masy ciała. Być może w przyszłości zamierzona ingerencja w równowagę pomiędzy różnicowaniem się adipocytów WAT i BAT, okaże się istotną w regulacji wagi ciała, a więc i w leczeniu otyłości oraz chorób związanych z otyłością [26].

UCPs JAKO PRZECIWIUTLENIACZE

Konsekwencją życia opartego na metabolizmie tlenowym jest nieustanne wytwarzanie ROS, a wśród nich kluczowego wolego rodnika, anionorodnika ponadtlenkowego. We wszystkich organizmach obniżanie się wydajności pracy narządów, tkanek czy komórek wiąże się z postępującym procesem starzenia się. Według wolnorodnikowej teorii starzenia się, jednym z głównych powodów starzenia się organizmu jest nagromadzenie się zniszczeń makrocząsteczek komórki w wyniku ich reakcji z wolnymi rodnikami (utlenienia) [27]. Przykładem może być skracanie się telomerów chromosomów w wyniku oddziaływań z ROS. Głównym miejscem uwalniania ROS w komórkach są mitochondria, a dokładnie centra oksydo-redukcyjne komponentów łańcucha oddechowego [1]. Ilość uwalnianych ROS w dużym stopniu zależy od metabolicznego stanu mitochondriów [7]. W tzw. spoczynkowym stanie oddechowym (stan „niefosforylujący”, stan 4), zwolnionemu oddychaniu mitochondriów, wysokiej wartości $\Delta\mu H^+$ oraz silnemu zredukowaniu kompleksów łańcucha oddechowego towarzyszy intensywne uwalnianie ROS. Stan spoczynkowy reprezentuje fizjologiczną sytuację chwilowo nikłego zapotrzebowania na ATP, bądź niewystarczającej ilości dostępnego ADP koniecznego do syntezy ATP. Rozpoczęcie syntezy ATP (uruchomienie syntazy ATP) prowadzi do przejścia w stan „fosforylujący” (stan 3), któremu towarzyszy zwiększenie szybkości oddychania mitochondriów, zmniejszenie $\Delta\mu H^+$ i w efekcie obniżenie wytwarzania ROS. *In vivo* mitochondria utleniające substraty oddechowe znajdują się więc w stanie mieszanym pomiędzy stanem spoczynkowym i „fosforylującym” [7]. Stosunek szybkości oddychania stanu 3 do stanu 4 określany jest kontrolą oddechową, parametrem, który opisuje stopień sprzężenia fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach.

Stres oksydacyjny w komórce, brak równowagi pomiędzy systemami pro- i antyoksydacyjnymi, powoduje zniszczenia wielu makromolekuł w komórce. Szczególnie niebezpiecznymi akceptorami ROS są kwasy tłuszczowe, zwłaszcza te wielonienasycone pochodzące np. z fosfolipidów błonowych. Pod wpływem działania ROS wytwarzanych w mitochondriach, kwasy tłuszczowe są przekształcane do silnie reaktywnych aldehydów, jak 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE) [28]. 4-HNE, jeden z głównych produktów peroksydacji lipidów, jest swoistym markerem stresu oksydacyjnego. Związek ten może również inaktywować geny poprzez oddziaływanie z resztą guanozyny w łańcuchu DNA [29]. Co więcej, peroksydacja lipidów jest bardzo niebezpieczna, ponieważ związki przejściowe i produkty końcowe tego procesu przyczyniają się do samoczynnej propagacji uwalniania związków wolnorodnikowych na zasadzie kaskad reakcyjnych [30]. Poza tym peroksydacja lipidów może zaburzać organizację błony, powodując zmiany jej płynności i przepuszczalności dla jonów oraz hamować procesy metaboliczne.

Działanie UCP prowadzące do łagodnego (częściowego) rozprzęgania mitochondriów (ang. *mild uncoupling*), któremu towarzyszy zwiększony poziom oddychania oraz subtelne obniżanie wartości $\Delta\mu H^+$, związane jest z obniżaniem produkcji ROS oraz zmniejszeniem prawdopodobieństwa wystąpienia stresu oksydacyjnego [1,3]. W ten sposób UCPs można traktować jako endogenne systemy antyoksydacyjne, stanowiące system ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym. Za cytoochronnym znaczeniem łagodnego rozprzęgania z udziałem UCPs przemawia również kardioprotekcyjny i neuroprotekcyny efekt związków farmakologicznych o działaniu mitochondrialnych rozprzęgaczy [31].

Ciekawy aspekt wynikający z braku aktywności UCP2 prezentują wyniki analizy fenotypu myszy pozbawionej tego białka [32]. Osobniki zmienione genetycznie (*ucp2* *-/-*) wykazywały całkowitą odporność na zakażenie wewnątrzkomórkowym pasożytem *Toxoplasma gondii* w przeciwieństwie do efektu letalnego obserwowanego u osobników *ucp2* *+/+*. Zaproponowano, iż jest to wynik podwyższonego poziomu ROS w pozbawionych UCP2 makrofagach, które skuteczniej mogą zwalczać niepożądane antygeny. Jednakże ceną za większą odporność na czynnik zakaźny może być skrócony czas życia makrofaga z powodu własnych zniszczeń oksydacyjnych makrocząsteczek [33]. Przypuszcza się, iż jedynie subtelna regulacja syntezy UCP2 *in vivo* może wiązać się z podnoszeniem wydajności układu immunologicznego. Ponieważ zakażenie patogenem należy do zdarzeń przejściowych, może to być osiągnięte dzięki krótkiemu czasowi połowicznego rozpadu funkcjonalnego UCP2 [34]. Podobne zjawisko dotyczy cyklu miesięcznego kobiet, podczas którego przed uwolnieniem dojrzałego oocytu szybko spada ekspresja *ucp2*. Jest to prawdopodobnie związane z koniecznością wytworzenia ROS w ilości niezbędnej dla uwolnienia oocytu. Aby uniknąć efektów ubocznych (uszkodzenia oocytu) cały proces musi być precyzyjnie kontrolowany [34]. Przeciwnie, na przykład termogeneza indukowana niską temperaturą nie należy do stanów przejściowych, co związane jest z 60 razy większą stabilnością UCP1 w BAT.

Miażdżyca, schorzenie związane ze zwężaniem się świątła tętnic, może być także powiązane z działaniem UCP2. Jedną z ważniejszych przyczyn miażdżycy może być stres oksydacyjny w komórkach krwi oraz naczyń krwionośnych. Na przykład transplantacja mysich komórek szpiku kostnego pozbawionych UCP2 (*ucp2* *-/-*) do myszy pozbawionej receptora dla LDL (lipoproteiny o małej gęstości) może znacznie przyspieszyć wczesne zmiany miażdżycowe w aorcie [35]. Zaawansowanie zmian miażdżycowych w kontroli, tzn. gdy przeszczepiono komórki szpiku z UCP2 (*ucp2* *+/+*), było wyraźnie mniejsze. Dlatego przypuszcza się, że czynniki zwiększające syntezę UCP2 w układzie naczyniowym mogłyby zapobiegać rozwojowi miażdżycy u pacjentów, zwłaszcza z podwyższonym poziomem ROS, tj. chorych na cukrzycę i nadciśnienie [36].

Postuluje się, aby współczesne strategie terapeutyczne zmierzające do obniżania poziomu uwalniania ROS w mitochondriach, bądź ich eliminowania zanim dokonają poważnych zniszczeń, powinny skupiać się na wywoływaniu ukierunkowanego rozprzęgania mitochondriów (m.in. poprzez kontrolowanie aktywności UCPs) oraz na stosowaniu przeciwutleniaczy [7]. Być może manipulacje takie wpłyną na długość i jakość życia. Ponadto, jeśli faktycznie aktywność UCPs łagodzi stres oksydacyjny i opóźnia starzenie się, również FFA (aktywatory UCPs) mogą odgrywać bardzo ważną rolę w regulacji długości życia [37]. Dlatego też zbilansowana, oparta na tłuszczach dieta, która zwykle uważana jest za niezdrową, być może stanowi jeden z kluczy do długowieczności.

UCPs A USZKODZENIA NIEDOKRWIENNO-REPERFUZJNE

Intensywna produkcja wolnych rodników w mitochondriach odbywa się przy niskim tempie fosforylacji ADP do ATP, mimo dużej dostępności tlenu i substratów oddechowych. Taki stan dotyczy m. in. zjawiska reperfuzji, czyli ponownego ukrwienia mięśnia na przykład tych obszarów serca, które wcześniej uległy niedokrwieniu (ischemii) [38]. Mechanizm hartowania przez niedokrwienie, które wywołane jest przejściową ischemią tkanek, stanowi jeden z mechanizmów „komórkowego programu przetrwania” (ang. *cell survival program*) i jest ewolucyjnie zachowany w wielu tkankach i narządach [31]. Hartowanie ischemiczne zwiększa zdolność przywracania prawidłowych funkcji mitochondriom (np. syntezy ATP) po udarze niedokrwinnym. Wznowienie skurczów mięśnia serca podczas reperfuzji następuje z opóźnieniem w stosunku do natychmiastowego rozruchu oddychania mitochondrialnego, co wywołuje na początku silną redukcję komponentów łańcucha oddechowego oraz wysoką wartością $\Delta\mu\text{H}^+$ [38]. Dlatego też okres reperfuzji wiąże się z nasilonym uwalnianiem ROS w mitochondriach. Wysoki potencjał błonowy ($\Delta\Psi$, jeden z komponentów $\Delta\mu\text{H}^+$) wzmaga również napływ jonów wapnia do mitochondriów [39]. Wobec tego reperfuzja niesie za sobą groźbę połączenia dwóch negatywnych czynników, tj. zwiększonego poziomu Ca^{2+} i ROS, które mogą wywołać otwarcie megakanału (PTP, ang. *permeability transition pore*) i w konsekwencji doprowadzić do śmierci komórki. Poprzez obniżanie wartości $\Delta\Psi$, działanie UCPs mogłoby

przeciwdziałać zaburzeniu prawidłowych parametrów pracy mięśnia sercowego w trakcie trwania reperfuzji.

Funkcję UCPs w kontekście uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego badano w izolowanych sercach myszy zmienionych genetycznie, tzn. charakteryzujących się wysokim poziomem UCP1 w mitochondriach serca (gdzie normalnie nie występuje) [38]. Mimo że wywołana ekspresja *ucp1* nie zmieniła wrażliwości narządu na ischemię, to znacząco poprawiła jego zdolność do regeneracji funkcjonowania po reperfuzji. Na przykład kurczliwość serca w 60 minut po reperfuzji była 2-krotnie większa w przypadku narządu pochodzącego od osobnika transgenicznego w porównaniu do osobnika stanowiącego kontrolę. Ponadto, w sercu z UCP1 poziom zużycia tlenu obserwowany po reperfuzji był taki jak sprzed ischemii, co wskazywało na zwiększone rozprzęganie oddychania (zużycie tlenu) wywołane aktywnością UCP1. W sercach kontrolnych zużycie tlenu znacząco się obniżyło. Niska aktywność UCPs w sercu (UCP2 i UCP3) prawdopodobnie wiąże się z utrzymywaniem normoksji (normalny, fizjologiczny poziom tlenu), natomiast znaczne zwiększenie aktywności rozprzęgającej może wynikać z ischemii oraz następującej po niej reperfuzji [38]. W sercu, w stanie normoksji, duże stężenie ATP i niski poziom kwasów tłuszczowych zapewnia prawie całkowite zahamowanie UCPs. Z kolei ischemia, prowadząc do zatrzymania syntezy ATP i utleniania kwasów tłuszczowych, stwarza warunki do aktywacji UCPs, gdyż rośnie stężenie aktywatorów (FFA) tych białek [38]. Przypuszcza się, że złagodzenie dysfunkcji pracy serca po reperfuzji, związane z obecnością heterologicznego UCP1, wiąże się z niedopuszczeniem do hiperpolaryzacji mitochondriów, która leży u podstaw negatywnego wpływu jonów wapnia oraz ROS w komórce. Podobne wnioski wyciągnięto z badań nad rolą UCP2 w kardiomiocytach oraz UCP2 i UCP3 w mioblastach serca [31,40]. Dlatego też, homologi UCP1 występujące w sercu, UCP2 i UCP3, są potencjalnym celem działania terapeutycznego w chorobach niedokrwiniowych. Jest to o tyle istotne, iż według Światowej Organizacji Zdrowia choroby układu krążenia (w tym choroby naczyń wieńcowych) plasują się w czołówce zmian patologicznych u ludzi z krajów rozwiniętych.

Podobnie jak reperfuzja, również hiperoksja (nadmiar, zwiększony poziom tlenu) prowadzi do stresu oksydacyjnego upośledzającego funkcjonowanie tkanek i narządów (np. płuc, serca czy mięśni). W przypadku mięśni szkieletowych szczura poddanych hiperoksji zaobserwowano zwiększony poziom syntezy UCP3 [41]. Stanowi to kolejny dowód wskazujący na udział UCPs w kontrolowaniu stresu oksydacyjnego.

UCP2 A ONKOGENEZA

Stres oksydacyjny wpływa na rozwój nowotworu [42,43]. ROS mogą przyczyniać się do niekontrolowanego namnażania się komórek, trwałego lub przejściowego zahamowania wzrostu, a także apoptotycznej, bądź nekrotycznej śmierci komórki. Wykazano, iż brak UCPs, które ograniczają stres oksydacyjny poprzez obniżanie uwalniania ROS w mitochondriach, może wiązać się z podwyższonym ryzykiem rozwoju pewnych typów nowotworów [44]. Mysz pozbawiona

wiona funkcjonalnego genu *ucp2* (*ucp2*^{-/-}) w porównaniu z myszą typu dzikiego, jest bardziej wrażliwa na chemiczną indukcję raka okrężnicy. Brak UCP2, i w konsekwencji zwiększenie stresu oksydacyjnego, wiąże się prawdopodobnie z aktywacją NF- κ B (ang. *nuclear factor kappaB*) oraz zakłóconą równowagą pomiędzy namnażaniem się nabłonkowych komórek jelita a ich apoptozą. Plejotropowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B reguluje wiele genów, w tym te, które promują wzrost komórki oraz hamują apoptozę [44]. Przy braku UCP2 niewystarczający poziom apoptozy, jako wynik odpowiednio silnej syntezy Bcl-2 (białko anty-apoptotyczne), przyczynia się przypuszczalnie do nasilonej onkogenezy. U myszy z aktywnym UCP2 (*ucp2*^{+/+}) niski poziom Bcl-2 współgrał z większym tempem apoptozy komórek jelita i tym samym nadawał większą odporność na chemiczną indukcję nowotworu.

Inne badania wskazują, że zwiększona synteza UCP2 może chronić przed stresem oksydacyjnym zarówno komórki rakowe oraz te, które nie uległy transformacji nowotworowej [45]. Stwierdzono na przykład 3–4-krotne zwiększenie syntezy UCP2 w większości przypadków raka okrężnicy u ludzi. Przy czym poziom zwiększenia syntezy tego białka wydaje się pozytywnie współistnieć ze stopniem pogłębiania się zmian nowotworowych. Wskazują na to również obserwacje linii komórkowych różnych typów raka odpornych na leki. Linie te odznaczają się zwiększoną ekspresją *ucp2*, niższym $\Delta\Psi$ oraz słabą wrażliwością na stres oksydacyjny [46]. Jak dotąd nie wyjaśniono przypuszczalnej roli UCP2 w inicjacji zmian nowotworowych i ich wczesnego rozwoju w przypadku ludzi [44].

Poziom ekspresji *ucp2* i pewne typy nowotworów łączy również czynnik mobilizujący lipidy (LMF, ang. *lipid mobilizing factor*), będący glikoproteiną [47]. Nowotwory powodujące kacheksję (zespół wyniszczenia nowotworowego połączony z utratą wagi) wydzielają LMF, który prowadzi do rozkładu tkanki tłuszczowej, aby pozyskać substancje odżywcze potrzebne do dalszego wzrostu. Oprócz bezpośredniego wpływu na lipolizę, LMF również wzmaga utlenianie kwasów tłuszczowych (uwolnionych z triglicerydów) poprzez indukcję ekspresji genów kodujących różne izoformy UCP. Wskazuje na to np. zwiększenie ilości UCP2 w komórkach MAC13 (komórki raka jelita grubego, nie produkujące własnego LMF), zależne od stężenia podawanego egzogennie LMF [47]. A zatem LMF, indukując ekspresję UCP2 w guzie nowotworowym, mógłby prowadzić do obniżenia poziomu ROS, których generacja jest nasiloną w stanie kacheksji, wskutek zwiększonej oksydacji związków energetycznych. Działanie wielu leków przeciwnowotworowych oparte jest na wytwarzaniu szkodliwych dla komórki ROS. Wobec tego indukcja ekspresji *ucp2* przez LMF może przyczyniać się do ochrony komórek guza przed toksycznymi skutkami intensywnego metabolizmu prowadzonego przez te komórki [47]. Niestety może to być jednym z powodów słabej odpowiedzi guza indukującego kacheksję na chemoterapię.

Zmieniający się poziom syntezy UCP2 może być związany zarówno z zapoczątkowywaniem zmian nowotworowych, jak i zwiększaniem przeżywalności zmienionych komórek. Oznaczałoby to, że działanie UCP2 jest częścią

reakcji adaptacyjnej, dzięki której komórki raka okrężnicy mogą kontrolować stres oksydacyjny i unikać apoptozy powodowanej przez ROS [45]. Ponadto, w komórkach nowotworowych negatywna kontrola uwalniania ROS poprzez zwiększoną syntezę UCP2 wydaje się ważniejsza niż utrzymywanie wydajnej fosforylacji oksydacyjnej. Od dawna zresztą wiadomo, że w szybko rosnących komórkach raka preferencyjnym szlakiem dostarczającym energii jest glikoliza. Jest to zgodne z niedawno przyjętą tezą traktującą UCP2 jako czujnik i negatywny regulator wytwarzania ROS w mitochondriach, a więc i stresu oksydacyjnego [45]. UCP2 mogłoby pełnić taką funkcję w wielu tkankach (prawidłowych i ze zmianami nowotworowymi), ze względu na powszechne występowanie tej izoformy w tkankach ssaków.

Dobroczynne dla komórek rakowych działanie UCP2 może dotyczyć jedynie zjawiska łagodnego (częściowego) rozprzęgania. Silne rozprzęganie oddychania mitochondrialnego poważnie uszczupla ilość syntetyzowanego ATP i może okazać się zgubne dla rozwoju guza z powodu braku energii potrzebnej do namnażania. Dlatego też wywołanie stanu całkowitego rozprzężenia komórek rakowych poprzez znaczną nadekspresję *ucp2* może stanowić kierunek potencjalnej strategii walki z nowotworem.

UCPs W UKŁADZIE NERWOWYM

Badania z ostatnich lat wykazały obecność UCPs w wielu strukturach mózgowych, włączając w to podwzgórze, hipokamp, mózdzek, rdzeń kręgowy, pień mózgu, korę mózgową i system limbiczny [5]. W układzie nerwowym odnaleziono UCP2, UCP4 oraz UCP5. W przypadku UCP2 zwykle poziom jego syntezy w CUN jest niski, z wyjątkiem np. obszaru jądra łukowatego podwzgórza, które kontroluje przyjmowanie pokarmu [5]. Przypuszcza się, że UCPs obecne w układzie nerwowym mogą modulować funkcje neuronów poprzez regulację biogenezy mitochondriów, gospodarki wapniowej, poziomu uwalniania ROS czy też lokalnej temperatury komórki. Rozprzęganie mitochondriów (poprzez działanie UCPs) może prowadzić do zmniejszenia poziomu produkcji wolnych rodników (zmniejszenia stresu oksydacyjnego), obniżenia napływu jonów wapnia (zależnego od $\Delta\Psi$) do mitochondriów oraz do lokalnego wzrostu temperatury [5]. Paradoksalnie, w efekcie końcowym, rozprzęganie może także sprzyjać wzmożonej syntezie ATP, gdyż indukuje biogenezę mitochondriów. Dlatego też wysunięto hipotezę, iż UCPs układu nerwowego dodatnio wpływają na funkcjonowanie neuronów (neuromodulacja), tj. przesyłanie impulsów elektrycznych oraz plastyczność synaptyczną, a także opóźniają stopniowe zanikanie aktywności neuronalnej (neuroprotekcja), która leży u podstaw procesów neurozwyrodnieniowych (Ryc. 1). W rozprzęganiu mitochondriów komórek nerwowych upatruje się swoisty system chroniący te komórki przed przedwczesnym starzeniem się i śmiercią, procesami których zaburzenia mają związek m.in. z chorobą Parkinsona czy Alzheimerem [48]. Odnotowano również pewien stopień synergizmu pomiędzy ekspresją genów *ucps* i etiologią Schizofrenii [49]. Co ciekawe w mózgu, uznawanym za najważniejszą strukturę w organizmie, poziom UCP2 rośnie wraz z wiekiem [13]. Wskazuje to na istnienie mechanizmu zapobiegającego rozwojowi stresu oksydacyjnego sprzężonego z wiekiem.

UCPs A CUKRZYCA

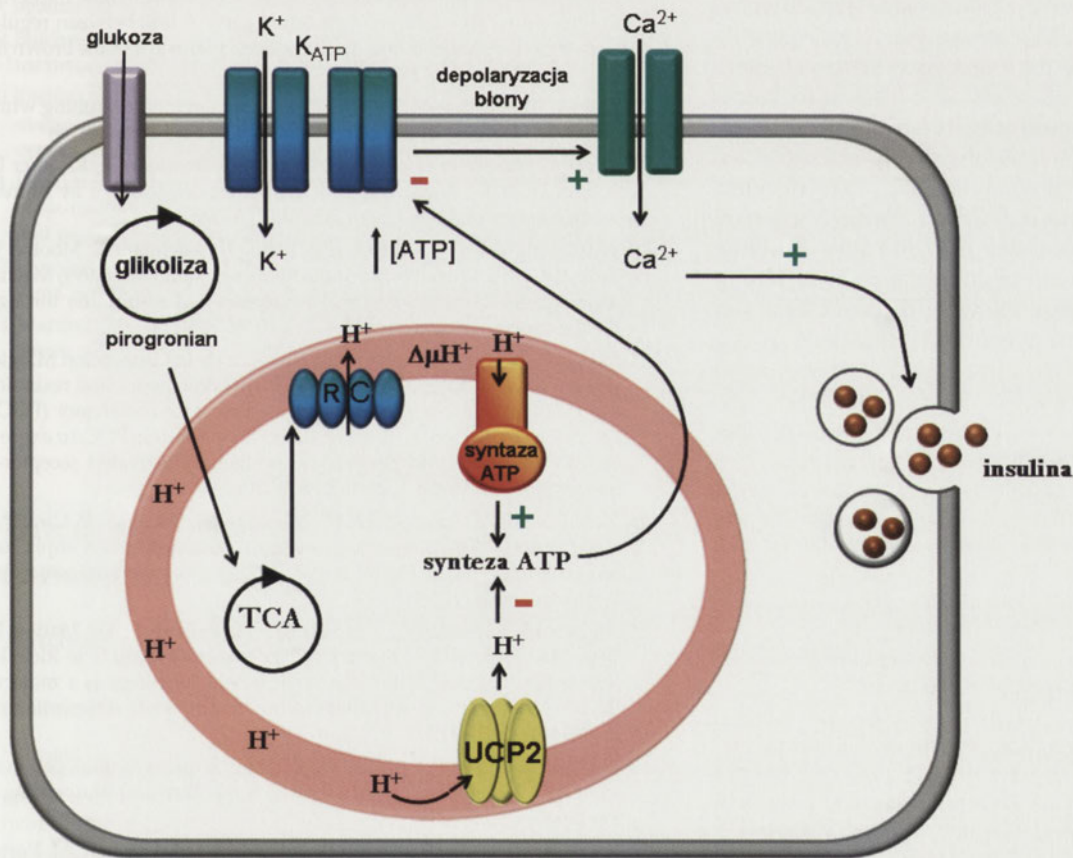
Cukrzyca stanowi jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych współczesnego świata. Nowe, obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu cukrzycy typu 2 wynika z faktu, że UCP2 negatywnie reguluje stymulowane przez glukozę wydzielanie insuliny (Ryc. 3) [50]. Metabolizm mitochondriów i wydzielanie insuliny połączone są poprzez ATP. Gdy w komórkach β wysepek trzustkowych stężenie glukozy jest wysokie, poziom cytosolowego ATP zwiększa się o około 40%. Dochodzi do zwiększenia utleniania glukozy, co prowadzi do wzrostu wartości $\Delta\mu\text{H}^+$ w mitochondriach, a tym samym do przesunięcia równowagi ATP/ADP w kierunku ATP. Większe stężenie ATP w cytosolu blokuje kanały potasowe wrażliwe na ATP (K_{ATP}) i w konsekwencji powoduje depolaryzację błony plazmatycznej. To z kolei związane jest z otwarciem kanałów wapniowych bramkowanych napięciem. Napływ jonów wapnia do komórek prowadzi do wydzielania insuliny z gruczołu trzustkowego [50].

Postuluje się, że łagodne rozprężanie oddychania mitochondrialnego z udziałem UCP2 może stanowić fizjologiczny element negatywnej regulacji wydzielania insuliny, poprzez wpływ na poziom ATP powstających z utleniania

glukozy w komórkach β trzustki [52]. Zwiększona aktywność UCP2 (wynikająca z nadekspresji *ucp2*) wpływa na obniżanie $\Delta\Psi$ wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz zmniejszanie ilości cytosolowego ATP, co w rezultacie osłabia wydzielanie insuliny stymulowane przez glukozę. W mysich komórkach β trzustki pozbawionych UCP2 (*ucp2*^{-/-}) stwierdzono wyższy poziom ATP i zwiększone wydzielanie insuliny w porównaniu do komórek myszy typu dzikiego [51]. Przypuszcza się, że zmiany w poziomie UCP2 mogą istotnie wiązać się z patologią prowadzącą do wystąpienia cukrzycy. Jak wspomniano wcześniej, podwyższony poziom kwasów tłuszczowych (hyperlipidemia), związany np. z otyłością, promuje ekspresję genów *ucps* w wyniku bezpośredniej aktywacji receptorów PPAR (Ryc. 2). Stan taki może przyczyniać się do dysfunkcji komórek β trzustki [17]. A zatem, inaktywacja UCP2 w trzustce, wyraźnie poprawiająca wydzielanie insuliny (na co wskazują badania z myszami *ucp2*^{-/-}) może w przyszłości odegrać kluczową rolę w opracowywaniu nowych technik leczenia cukrzycy typu 2 [17,51]

Zjawisko oporności na insulinę w mięśniach szkieletowych może z kolei wiązać się z niewłaściwym poziomem kwasów tłuszczowych, gdy poziom syntezy UCP3 odbiega od normy [53]. Pacjenci z cukrzycą typu 2 mają zmniejszone tempo utleniania kwasów tłuszczowych oraz zwiększony poziom FFA w błonie plazmatycznej [53]. Brak wystarczającej ochrony przed zjawiskiem lipotoksyczności (poprzez brak prawidłowego poziomu UCP3 w mitochondriach) może bezpośrednio wiązać się z cukrzycą typu 2 i, w konsekwencji, z otyłością. Farmakologiczna aktywacja ekspresji *ucp3* w mięśniach mogłaby wspomagać ich fizjologiczną funkcję w regulacji metabolizmu lipidów i zwiększać wrażliwość na insulinę [17].

Taki typ terapii stanowi potencjalne narzędzie przeciwdziałające negatywnemu wpływowi wysokiego poziomu kwasów tłuszczowych w mięśniach. Postuluje się, że zwiększone zasoby triacylogliceroli w mięśniach oraz zredukowana wrażliwość na insuli-



Rycina 3. Regulacja sekrecji insuliny z udziałem UCP2 w komórkach β trzustki. Glukoza jest transportowana do komórki na nośniku glukozowym. Utlenianie glukozy, na które składa się glikoliza, cykl kwasów trikarboksylowych (TCA) oraz transport elektronów w łańcuchu oddechowym (RC) mitochondrium, prowadzi do wytworzenia protonowego gradientu chemicznego ($\Delta\mu\text{H}^+$), który z kolei napędza syntezę ATP. Wzrastający poziom ATP w komórce β trzustki, jako konsekwencja podwyższonego poziomu cukru we krwi, przyczynia się do zamknięcia wrażliwych na ATP kanałów potasowych (K_{ATP}) błony plazmatycznej. Prowadzi to do depolaryzacji błony i otwarcia kanałów wapniowych bramkowanych napięciem. Napływ wapnia do komórki uruchamia proces wydzielania insuliny. Aktywność UCP2 rozprasza $\Delta\mu\text{H}^+$ i tym samym obniża wydajność syntezy ATP. UCP2 może więc pełnić funkcję negatywnego regulatora stymulowanego glukozą wydzielania glukozy w komórkach β wysepek trzustkowych.

nę mogą wynikać z zakłóceń wprowadzanych przez acylo-CoA (produkt rozpadu triacylogliceroli) do ścieżki oddziaływania insuliny angażującej aktywację kinazy białkowej C [12]. Potwierdza to obserwacja, że pacjenci z cukrzycą typu 2 wykazują 50% obniżenie poziomu UCP3 w mitochondriach mięśni szkieletowych [54]. Co więcej, w mięśniach tych pacjentów obserwuje się mniejsze i uszkodzone mitochondria, co może wynikać z zaburzeń w aktywności UCP3 [9].

PODSUMOWANIE

Regulacja funkcjonowania mitochondriów powinna stać się jednym z ważniejszych celów współczesnego podejścia terapeutycznego. Obecnie medycyna w niewielkim jeszcze stopniu wykorzystuje potencjał drzemiący w mitochondriach, choć u podstaw wielu jednostek chorobowych leży dysfunkcja mitochondriów. Podejmowane próby mogą w niedalekiej już przyszłości spowodować pojawienie się zupełnie nowych metod leczenia, które być może przyczynią się do zwalczania tak powszechnych schorzeń, jak: otyłość, cukrzyca typu 2, przedwczesne nowotworzenie czy przyspieszone starzenie się. Z coraz większą pewnością możemy stwierdzić, iż uwalnianie ROS, jako skutek uboczny normalnego metabolizmu komórki, stanowi punkt wyjściowy wielu procesów zwyrodnieniowych i patofizjologicznych. Dzięki działaniu UCPs (łagodnemu rozprężaniu) poziom stresu oksydacyjnego może być skutecznie regulowany. Dlatego też coraz częściej UCPs, jako swoiste przeciwutleniające, brane są pod uwagę przy opracowywaniu strategii leczenia wielu schorzeń. Wydaje się, że z punktu widzenia korzyści płynących dla komórki, negatywna kontrola uwalniania ROS z udziałem UCPs powinna mieć pierwszeństwo nad utrzymywaniem wydajnej fosforylacji oksydacyjnej (produkcji ATP). Zaprzęgnięcie UCPs w walkę z różnymi zespołami chorobowymi, poprzez opracowanie środków farmakologicznych selektywnie indukujących, bądź blokujących aktywność bądź syntezę różnych izoform UCPs, stanowi nowe, ważne wyzwanie początku XXI wieku.

PIŚMIENNICTWO

1. Jarmuszkiewicz W, Woyda-Ploszczyca A (2008) Mitochondrialne białka rozprężające. Postępy Biochem 54:
2. Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. Postępy Biochem 53: 145-156
3. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, third ed. Oxford University Press, New York
4. Nübel T, Ricquier D (2006) Respiration under Control of Uncoupling Proteins: Clinical Perspective. Horm Res 65: 300-310
5. Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP (2005) Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. Meeting on Uncoupling Proteins. EMBO Rep 6: 917-921
6. Harper ME, Gerritis MF (2004) Mitochondrial uncoupling proteins as potential targets for pharmacological agents. Cur Opin Pharmacol 4: 603-607
7. Echtay KS (2007) Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? Free Rad Biol Med 43: 1351-1371
8. Jezek P (2002) Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins – UCPn. Int J Biochem Cell Biol 34: 1190-1206
9. Schrauwen P, Hesselink MK (2004) The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? Proc Nutr Soc 63: 287-292
10. Himms-Hagen J, Harper ME (2001) Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. Exp Biol Med 226: 78-84
11. Gerber LK, Aronow BJ, Matlib MA (2006) Activation of a novel long-chain free fatty acid export system in mitochondria of diabetic rat hearts. Am J Physiol Cell Physiol 291: 1198-1207
12. Bezaire V, Seifert EL, Harper ME (2007) Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. FASEB J 21: 312-324
13. Goglia F, Skulachev VP (2003) A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. FASEB J 17: 1585-1591
14. Dulloo AG, Samec S (2000) Uncoupling proteins: Do they have a role in body weight regulation? News Physiol Sci 15: 313-318
15. Mills EM, Banks ML, Sprague JE, Finkel T (2003) Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. Nature 426: 403-404
16. Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D, Criscuolo F (2005) Thermogenesis: What role for UCPs in mammals and birds? Biosci Rep 3/4: 227-249
17. Villarroya F, Iglesias R, Giralt M (2007) PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. PPAR Res 2007: 74364
18. Ricquier D, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. Biochem J 345: 161-179
19. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell 92: 829-839
20. Barbera MJ, Schlüter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor activates transcription of brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. J Biol Chem 276: 1486-1493
21. Hansen JB, Kristiansen K (2006) Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. Biochem J 398: 153-168
22. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D (2003) Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. J Biol Chem 278: 33370-33376
23. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 98: 115-124
24. Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodriguez de la Concepcion M, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F (2006) Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 α gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1 α expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivation. Endocrinology 147: 2829-2838
25. Rodriguez de la Concepcion ML, Domingo JC, Domingo P, Giralt M, Villarroya F (2004) Uncoupling protein 1 gene expression implicates brown adipocytes in highly active antiretroviral therapy-associated lipomatosis. AIDS 18: 959-960
26. Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matties R, Boye HA, Petrovic N, Enerback S, Nedergaard J, Cinti S, te Riele H, Kristiansen K (2004) Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. PNAS 101: 4112-4117
27. Wolkow CA, Iser WB (2006) Uncoupling proteins homologues may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. Ageing Res Rev 5: 196-208
28. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. EMBO J 22: 4103-4110
29. Wacker M, Wanek P, Eder E (2001) Detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal after gavage of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal or induction of lipid peroxidation with carbon tetrachloride in F344 rats. Chem Biol Interact 137: 269-283

30. Nigam S, Schewe T (2000) Phospholipase A₂ and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1488: 167-181
31. McLeod C, Aziz A, Hoyt RF Jr, McCoy JP Jr, Sack MN (2005) Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* 280: 33470-33476
32. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26: 435-439
33. Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ (2002) The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1145-1152
34. Rousset S, Mozo J, Dujardin C, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM (2007) UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett* 581: 479-482
35. Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B, Mallat Z (2003) Protective role of Uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation* 107: 388-390
36. Kim HS, Park KG, Koo TB, Huh S, Lee IK (2007) The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Research and Clinical Practice* 77S: 46-48
37. Kua CH (2006) Hypothesis. Uncoupling the relationship between fatty acids and longevity. *IUBMB Life* 3: 153-155
38. Hoerter J, Gonzalez-Barroso MM, Couplan E, Mateo P, Gelly C, Cassard-Doulcier AM, Dirolez P, Bouillaud F (2004) Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 5: 528-533
39. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ (2001) Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 89: 29-46
40. Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93: 192-200
41. Flandin P, Donati Y, Barazzzone-Argiroffo C, Muzzin P (2005) Hyperoxia-mediated oxidative stress increases expression of UCP3 mRNA and protein in skeletal muscle. *FEBS Lett* 579: 3411-3415
42. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 276-285
43. Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15
44. Derdak Z, Fülöp P, Sabo E, Tavares R, Berthiaume EP, Resnick MB, Paragh G, Wands JR, Baffy G (2006) Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF- κ B activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 5: 956-961
45. Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G (2004) Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 6203-6207
46. Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuy E, Russo A, Trauger R, Vendemio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bepalov IA, Wallance SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamende R, Newell MK (2002) Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 16: 1550-1557
47. Sanders PM, Tisdale MJ (2004) Role of lipid-mobilizing factor (LMF) in protecting tumor cells from oxidative damage. *Brit J Cancer* 90: 1274-1278
48. Andrews ZB, Diano S, Horvath TL (2005) Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 6: 829-840
49. Yasuno K, Ando S, Misumi S, Makino S, Kulski JK, Muratake T, Kaneko N, Amagane H, Someya T, Inoko H, Suga H, Kanemoto K, Tamiya G (2007) Synergistic association of mitochondrial uncoupling protein (UCP) genes with schizophrenia. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet Part B* 144B: 250-253
50. Wiederkehr A, Wollheim CB (2006) Minireview: Implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 147: 2643-2649
51. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105: 745-755
52. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB (2001) Increased uncoupling protein-2 levels in β -cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50: 1302-1310
53. Hoeks J, Hesselink MKC, Schrauwen P (2006) Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity. *Exp Gerontology* 41: 658-662
54. Schrauwen P, Hesselink MK, Blaak EE, Borghouts LB, Schaart G, Saris WH, Keizer HA (2001) Uncoupling protein 3 is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 2870-2873

Uncoupling proteins in modulation of mitochondrial functions – therapeutic prospects

Andrzej Woyda-Ploszczyca, Wiesława Jarmuszkiewicz✉

Laboratory of Bioenergetics, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznan, Poland

✉e-mail: wiesiaj@amu.edu.pl

Key words: uncoupling proteins, reactive oxygen species, lipid peroxidation, obesity, type-2 diabetes, oncogenesis, ischemia-reperfusion injury, neurodegeneration

ABSTRACT

Enormous interest in mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) is caused by relevant impact of these energy-dissipating systems on cellular energy transduction. A key role of UCPs in regulation of mitochondrial metabolism is supported by existence of their different isoforms in various mammalian tissues. Recent studies have shown that UCPs have an important part in pathogenesis of various disorders, such as obesity, type-2 diabetes, cachexia, aging or tumor. The obscure roles of UCPs in normal physiology and their emerging role in pathophysiology, provide exciting potential for further investigation. However, neither the exact physiological nor biochemical roles of UCP homologues are well understood. Therefore, providing mechanistic explanation of their functions in cellular physiology may be the basis for potential pharmacological targeting of UCPs in future on clinical scale.

Antoni Wrzosek¹

Agnieszka Łojek^{1,2}

Iwona Stanisławska³

Antonina Chmura-Skirińska¹

Krzysztof Dołowy²

Stefan Chłopicki^{3,✉}

Adam Szewczyk^{1,✉}

¹Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa
²Katedra Fizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa
³Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

✉Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl lub

✉Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Grzegorzewska 16, 31-531 Kraków; e-mail: s.chlopicki@jmc.org.pl

Artykuł otrzymano 13 maja 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 19 maja 2008 r.

Słowa kluczowe: śródbłonek, mitochondria, kanały jonowe, apoptoza, zapalenie/dysfunkcja śródbłonka, farmakologia śródbłonka

Wykaz skrótów: AMPK – białkowa kinaza aktywowana AMP; AngII – angiotensyna II; Bax, Bak – białka proapoptyczne z rodziny Bcl-2; CAT-3 – katalaza 3; COX-1, COX-2 – cyklooksygenazy 1 i 2; EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzacyjny; EET – kwas epoksyeikozatrienowy; ET-1 – endotelina 1; GSH – glutation; IAP – inhibitor apoptozy; ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 – cząstki adhezyjne; IL-1, IL-6, IL-8 – interleukiny 1, 6 i 8; LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości; MCP-1 – czynnik chemotaktyczny monocytów; mtDNA- mitochondrialne DNA; mtNOS – mitochondrialna syntaza tlenu azotu; NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB; NOS – syntaza tlenu azotu; PGI₂ – prostacyklina I₂; ROS – reaktywne formy tlenu; RyR – receptor rianodynowy; TM – trombomodulina; TNF-α – czynnik martwicy nowotworu; t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu

Podziękowanie: Praca powstała w ramach Polskiej Sieci Mitochondrialnej (MitoNet.pl)

STRESZCZENIE

Śródbłonek naczyniowy składa się z jednej warstwy komórek wyścielejających każde naczynie krwionośne. Choć rozproszony, stanowi ważny narząd ustroju, który przez swoją prawidłową czynność (parakrynną, autokrynną i endokrynną) utrzymuje homeostazę układu krążenia. Natomiast dysfunkcja śródbłonka prowadzi do rozwoju wielu chorób, takich jak miażdżyca, cukrzyca i niewydolność serca. Dysfunkcja śródbłonka jest ściśle związana z nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników tlenowych, rozwojem stresu oksydacyjnego i odpowiedzią zapalną. W tych procesach ważną rolę odgrywają prawdopodobnie mitochondria. W przeciwieństwie do wielu innych komórek, komórki śródbłonka wytwarzają ATP głównie na drodze glikolizy, a zatem w tych komórkach mitochondria mają niewielkie znaczenie w syntezie ATP. Jednakże, jak wykazują ostatnie badania, wolnorodnikowe mechanizmy mitochondrialne w powiązaniu ze zmianami wewnątrzmitochondrialnej i wewnątrzkomórkowej homeostazy jonowej mogą brać udział w regulacji szlaków sygnałowych, prowadzących do rozwoju stanu zapalnego śródbłonka, stresu oksydacyjnego oraz apoptozy komórek śródbłonka. W tym kontekście mitochondria komórek śródbłonka zaczynają być uznawane za nowy cel farmakoterapii dysfunkcji śródbłonka i w chorobach układu krążenia.

WPROWADZENIE

Śródbłonek już dawno awansował ze statusu „płachty celofanu z powklejanymi jądrami komórkowymi” do statusu ważnego narządu ustroju, którego harmonijna czynność autokrynną, parakrynną i endokrynną wpływa na prawidłowe funkcjonowanie układu krążenia. Prawidłowa czynność śródbłonka utrzymuje zdrowie układu krążenia, a dysfunkcja (zapalenie) śródbłonka odgrywa kluczową rolę w rozwoju miażdżycy, cukrzycy, jak również wielu innych chorób układu krążenia. Wiedza o śródbłonkowych mechanizmach regulacji układu krążenia pochodząca z badań podstawowych i klinicznych zarysowuje nowy paradygmat choroby układu krążenia, którego wyznacznikiem jest dysfunkcja śródbłonka [1-5]. Dysfunkcja śródbłonka związana jest z upośledzeniem wytwarzania naczynioochronnych preaktywatorów śródbłonka, takich jak tlenek azotu (NO) i prostacyklina (PGI₂), nadmiernym wytwarzaniem anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻), zwiększoną syntezą prozapalnych cytokin (np. IL-6, IL-8), chemokin (np. MCP-1), cząsteczek adhezyjnych (np. selektyny P, selektyny E, ICAM-1, VCAM-1), aktywacją czynników prozakrzepowych w śródbłonku (np. PAI-1). Ostatnie badania wskazują na istotną rolę sygnalizacji zależnej od mitochondriów w mechanizmach dysfunkcji śródbłonka. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie zarysu wiedzy o mitochondriach komórek śródbłonka ze szczególnym uwzględnieniem sygnalizacyjnej roli mitochondriów, roli mitochondriów w utrzymaniu homeostazy jonowej śródbłonka i regulacji odpowiedzi zapalnej śródbłonka przez mechanizmy wolnorodnikowe zależne od mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

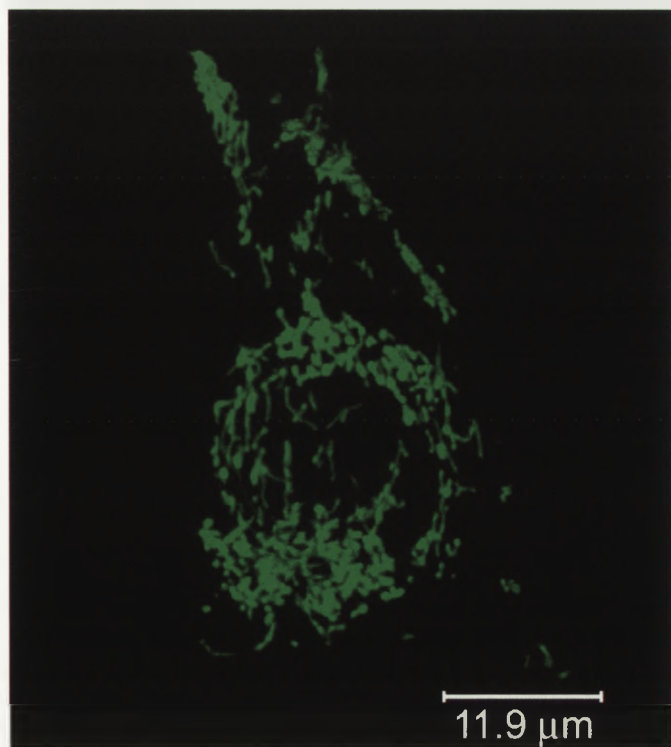
MITOCHONDRIA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Mitochondria to organelle, których wnętrze otoczone jest dwiema błonami lipidowo-białkowymi, wewnętrzną oraz zewnętrzną. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się enzymy łańcucha oddechowego odpowiedzialne za wyrzut jonów H⁺ z macierzy kosztem energii uwalnianej podczas utleniania substratów oddechowych. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla H⁺, co umożliwia wytworzenie gradientu protonowego i różnicy potencjału elektrycznego (Δψ) w poprzek tej struktury, który na wewnętrznej błonie mitochondrialnej może osiągać wartość około -180 mV. Różnica stężenia jonów H⁺ (ΔpH) między macierzą mitochondrialną a przestrzenią międzybłonową może osiągać niekiedy wartość 1,5 jednostki pH (zazwyczaj jest to 0,5-1 jednostki pH). Zewnętrzna błona mitochondrialna stanowi półprzepuszczalną barierę, w której znaczącą rolę odgrywa zależny od potencjału kanał anionowy VDAC prace przeglądowe [6,7]. Powstałe ΔpH oraz Δψ tworzą wspólnie siłę

protonomotoryczną [8]. W celu osiągnięcia stanu równowagi protony wracają do macierzy mitochondrialnej, transportowane przez syntazę ATP (EC 3.6.3.14), czemu towarzyszy synteza ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego.

W ostatnich latach pojawiły się jednak dane sugerujące, że mitochondria są bardziej organellami sygnałowymi niż „elektrownią” [9] i taką rolę odgrywają w komórkach śródbłonka. Pomimo tego że komórki śródbłonka zawierają liczne mitochondria, nie są one głównym miejscem syntezy ATP w tych komórkach (Ryc. 1). W komórkach śródbłonka zachodzi bowiem intensywna glikoliza. Może mieć to związek z dużą ilością wytwarzanego NO przez komórki śródbłonka, który z kolei wiąże się z oksydazą cytochromową, końcowym enzymem łańcucha oddechowego [10]. Oddziaływanie oksydazy cytochromowej z NO wywołuje spadek zużycia O_2 w cytosolu i kompensuje odpowiedź komórki na obniżoną zawartość tlenu. Zapewne jest to jednym z powodów, dla którego w komórkach śródbłonka czynnik indukowany niedotlenieniem (HIF, ang. *hypoxia-inducible factor*) 1 α ulega stabilizacji dopiero poniżej 0,5% stężenia O_2 .

Śródbłonek jest warstwą komórek bezpośrednio kontaktującą się z krwią, stosunkowo niewrażliwą na uszkażdżające działanie niskiego stężenia tlenu. Komórki śródbłonka jednak jako pierwsze „odczytują” zmiany stężenia O_2 we krwi. Na zasadzie analogii z komórkami mięśni oddechowych, które reagują na lokalne zmiany stężenia tlenu (prawdopodobny udział ROS) [11], liczni badacze postulują podobną rolę mitochondriów komórek śródbłonka [12].



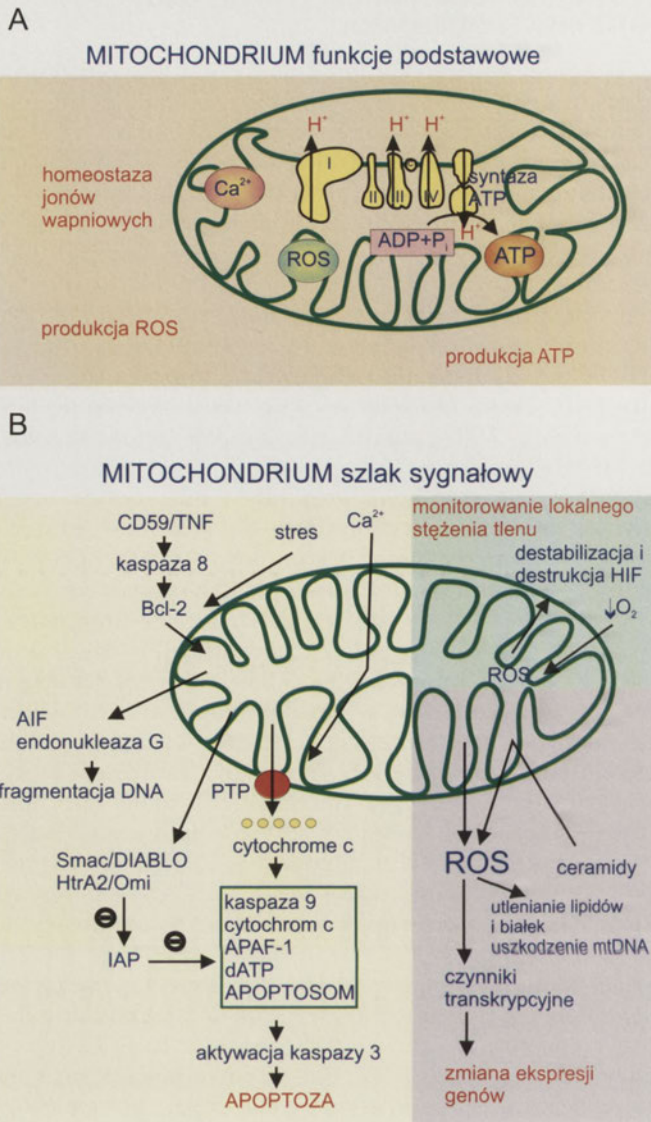
Rycina 1. Mitochondria komórek śródbłonka linii EA.hy 926. Mitochondria komórek linii EA.hy 926 wyznakowano fluorescencyjnie poprzez transfekcję komórek plazmidem zawierającym sekwencję kodującą białko GFP, sprzężoną z sekwencją kierującą do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

UDZIAŁ MITOCHONDRIÓW W APOPTOZIE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

W wielu typach komórek mitochondria odgrywają kluczową rolę w procesach apoptozy i analogiczne mechanizmy występują w komórkach śródbłonka. Ogromną uwagę poświęca się procesowi apoptozy w komórkach śródbłonka, bowiem ten proces jest ściśle związany z jego zapaleniem (dysfunkcją) i ma istotne znaczenie w rozwoju miażdżycy w naczyniach krwionośnych. Czynniki, które wywołują zapalenie śródbłonka są między innymi: stres oksydacyjny, angiotensyna II (Ang II), czy też cholesterol. Bódcze wywołujące apoptozę można podzielić na fizjologiczne (realizowaną poprzez receptory dla TNF, CD95) lub stresowe (np. promieniowanie UV, uszkodzenie DNA, nadmierny napływ jonów wapnia, zakażenia bakteryjne lub wirusowe) [13]. Bardzo często apoptoza jest wynikiem uszkodzeń mitochondriów, a zwłaszcza białek mitochondrialnych, enzymów, których uszkodzenia przyczyniają się do powstawania ROS [14]. W procesie apoptozy uczestniczą białka sygnałowe, takie jak kaspazy i białka z rodziny Bcl-2, a także sfingomieliiny. Szczególną funkcję pełnią białka z rodziny Bcl-2, takie jak białka proapoptotyczne Bax i Bak, które uczestniczą w formowaniu się porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i tym samym czynią ją przepuszczalną dla wielu składników komórkowych. Innym mechanizmem wpływającym na zmianę przepuszczalności błon mitochondriów w procesie apoptozy jest oddziaływanie białek Bcl-2 z siateczką śródplazmatyczną, co w konsekwencji powoduje uwalnianie dużej ilości Ca^{2+} , które aktywują kanał PTP (ang. *permeability transition pore*), znajdujący się w mitochondriach [15]. W zależności od rodzaju bodźca szlaki apoptozy mogą być różne, ale elementem łączącym je wydają się być mitochondria, np. w przypadku aktywacji receptorów CD95 i TNFR (receptor TNF) następuje enzymatyczne cięcie białka Bid, co powoduje zmianę konformacyjną oraz oligomeryzację białka Bax, które następnie wbudowuje się zewnętrzną błonę mitochondrialną. Wszystkie te procesy mają następstwo w postaci zmiany przepuszczalności błon mitochondrialnych, co skutkuje wpływem z mitochondriów takich czynników proapoptotycznych, jak cytochrom *c*, Smac/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), AIF, HtrA2, endonukleazy G [16]. Cytochrom *c* inicjuje utworzenie kompleksu wraz z Apaf-1, dATP, kaspazą 9, tzw. apoptosomu, który następnie aktywuje kaspazę 3. Smac/DIABLO, HtrA2 z kolei inaktywują IAP- inhibitor apoptozy, a dokładnie apoptosomu. Natomiast AIF i endonukleaza G działają na materiał genetyczny (Ryc. 2). Wszystkie te procesy prowadzą do zmian morfologicznych komórki i fragmentacji DNA, a w konsekwencji do apoptozy [13,17,18].

MITOCHONDRIA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA JAKO MIEJSCE POWSTAWANIA REAKTYWNYCH FORM TLENU I AZOTU

Nadmierne wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy lub w innych reakcjach (np. katalizowanych przez oksydazę NAD(P)H, oksydazę ksantynową lub monomer syntazy



Rycina 2. Rola mitochondriów w procesach energetycznych komórki i przekazywaniu sygnałów. **A.** Podstawowa rola mitochondrium, czyli wytwarzanie energii użytecznej w postaci ATP i powstawanie reaktywnych form tlenu (kompleksy I i III) oraz udział w utrzymywaniu homeostazy wapnia. **B.** Szlaki sygnałowe takich procesów, jak: apoptoza, monitorowanie lokalnego stężenia tlenu i zmiana ekspresji genów. ROS – reaktywne formy tlenu; P – fosforan nieorganiczny; ATP – adenylozotryfosforan; CD59 – receptor błonowy; TNF – czynnik martwicy nowotworu; Bcl-2 – rodzina białek biorących udział w apoptozie; AIF – czynnik indukcji apoptozy; SMAC – ang. *second mitochondria-derived activator of caspases*; DIABLO – ang. *direct inhibitor of apoptosis-binding protein with a low isoelectric point*; HtrA2/Omi – proteaza serynowa; IAP – inhibitor apoptozy; APAF-1 – ang. *apoptotic protease activating factor 1*; dATP – deoksyadenozynotryfosforan; HIF – ang. *hypoxia inducible factor*. Na rycinie schematycznie rozdzielono aktywność mitochondriów zaangażowaną w syntezę ATP (A) oraz szlaki sygnałowe związane m.in. z apoptozą.

NO) jest centralnym punktem odpowiedzi zapalnej śródbłonna. W mitochondriach wytwarzany jest jednak nie tylko O₂^{•-}, ale również inne ROS, takie jak H₂O₂ i rodnik hydroksylowy (HO[•]), których działanie, ze względu na wysoką reaktywność tych cząstek w stosunku do pozostałych składników komórek, najczęściej kojarzone jest z uszkodzaniem licznych struktur komórkowych poprzez reakcje z substancjami o dużym biologicznym znaczeniu, jak mtDNA, białka i lipidy błonowe [19]. W macierzy mitochondrialnej O₂^{•-} generowany poprzez łańcuch od-

dechowy jest eliminowany poprzez manganową dymutazę ponadtlenkową (MnSOD), która katalizuje przejście O₂^{•-} w H₂O₂. Reakcja może przebiegać również spontanicznie.



Ze względu na zdolność H₂O₂ do utleniania jonów metali w tzw. reakcji Fentona, pozornie nieszkodliwy H₂O₂ przekształca się w jeden z najbardziej reaktywnych rodników, rodnik hydroksylowy (HO[•]). Peroksydaza glutationowa katalizuje reakcję przejścia nadtlenu wodoru w H₂O. Glutation (GSH), który pełni funkcję kofaktora peroksydazy glutationowej oraz antyoksydanta i zmiatacza reaktywnych form tlenu jest odtwarzany w tym procesie poprzez reduktazę glutationową. H₂O₂ powstający w mitochondriach może być usuwany zarówno przez peroksydazę glutationową, peroksydazę cytochromu c, jak i zlokalizowaną w mitochondriach katalazę CAT-3. Należy wspomnieć również o mitochondrialnym systemie przeciwutleniającym tioredoksyny (Trx, ang. *thioredoxin*), która, jak wynika z ostatnich badań, pełni ważną funkcję ochronną w odpowiedzi zapalnej śródbłonna [20]. Ze względu na to, że H₂O₂ ma zdolność szybkiej dyfuzji przez błony lipidowe może być także rozkładany przez katalazę zlokalizowaną w cytoplazmie. Anionorodnik ponadtlenkowy może również reagować z NO, tworząc nadtlenoazotyn (ONOO⁻). NO jest cząsteczką o charakterze rodnikowym, która ze względu na historię swojego odkrycia, jako naczyniorozkurczający czynnik pochodzenia śródbłonkowego (EDRF, ang. *endothelium-derived relaxing factor*), kojarzy się ściśle z komórkami śródbłonna [5,21]. Gazowy charakter, niewielkie rozmiary cząsteczki oraz lipofilność powodują, że NO, pomimo krótkiego czasu życia, łatwo przenika przez błony biologiczne bez pośrednictwa układów transportujących na relatywnie duże odległości. Synteza NO w komórkach odbywa się z udziałem enzymu syntazy tlenu azotu (NOS, EC 1.14.13.39), który katalizuje reakcję jego syntezy z aminokwasu L-argininy. NOS jest jednym z najbardziej skomplikowanych enzymów, który do swojej aktywności wymaga obecności O₂, NADPH, FAD, FMN, hemu, tetrahydrobiopteryny (BH₄) i kalmoduliny. Dominującą izoformą syntazy NO w komórkach śródbłonna jest NOS-3. Oprócz trzech dobrze scharakteryzowanych izoform NOS (NOS-1,2,3), ostatnio zidentyfikowano formę mitochondrialną tego enzymu (mtNOS) w komórkach ssaków pochodzących z różnych tkanek [22] oraz wykazano funkcjonalny związek pomiędzy aktywnością mtNOS i mitochondrialnego kompleksu I w regulacji syntezy NO i czynności mitochondriów [23,24].

SYGNALIZACYJNA ROLA MITOCHONDRIALNYCH ROS W ŚRODBŁONKU

Do niedawna produkcja ROS przez mitochondria komórek śródbłonna była pomijana, gdyż uważano, że komórki te charakteryzują się małą aktywnością mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz niskim stężeniem produkowanych ROS w stosunku do innych komórek. Jednak badania ostatnich lat wyraźnie wskazują, że ROS

pełnią bardzo ważną funkcję sygnalizacyjną i regulacyjną. W komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych ROS są zaangażowane w regulację napięcia naczyń krwionośnych w odpowiedź na niedotlenienie, namnażanie, wzrost komórek oraz apoptozę. W szczególności ROS odgrywają istotną rolę w odpowiedzi zapalnej śródbłonna [25,26].

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym ROS powstają głównie w kompleksie III łańcucha, prawdopodobnie poprzez utlenienie semiubichinonu, oraz przy udziale kompleksu I głównie na drodze odwrotnego transportu elektronów [27]. Jednak źródło ROS zależy od bodźca stymulującego odpowiedź śródbłonna. Aktywność kompleksu III łańcucha oddechowego komórek śródbłonna żyły pępowinowej w produkcji ROS obserwuje się podczas niedotlenienia/natlenienia lub po stymulacji TNF- α [28]. Wytwarzanie ROS w tych komórkach uruchamia również ich stymulacja lizofosfatydylocholiną [29]. Kompleksy I i III odpowiedzialne są za produkcję ROS także podczas rozszerzenia naczyń wieńcowych, wywołanego przez siły ścinające [30].

Powstawanie ROS może być stymulowane przez różne czynniki, z czego na największą uwagę zasługują: depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej, podwyższone stężenie Ca^{2+} i/lub zmiany stężenia NO. Istnieją dane wskazujące na związek pomiędzy wysokim stężeniem Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej a wytwarzaniem ROS przez łańcuch oddechowy. Rozważając wpływ stężenia Ca^{2+} na produkcję ROS, bierze się pod uwagę między innymi zwiększanie przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy jako wynik aktywacji cyklu kwasów trikarboksylowych oraz zwiększenie produkcji tlenu azotu przez NOS [25]. NO wytwarzany przez mtNOS w mitochondriach komórek śródbłonna, może lokalnie wpływać na łańcuch oddechowy i powstawanie $O_2^{\cdot-}$. Najbardziej poznanym do tej pory mechanizmem regulacji wytwarzania ROS pod wpływem NO w mitochondriach komórek śródbłonna jest jego oddziaływanie z kompleksem IV łańcucha oddechowego. Niskie stężenie NO hamuje odwracalnie oksydazę cytochromową (kompleks IV łańcucha oddechowego) i w ten sposób zwiększa produkcję H_2O_2 . Z drugiej strony NO zmniejsza aktywność biologiczną $O_2^{\cdot-}$ poprzez bezpośrednią reakcję z $O_2^{\cdot-}$, prowadząc do utworzenia ONOO $^-$. Pośrednio ułatwia usuwanie $O_2^{\cdot-}$ przez cytochrom c poprzez stabilizowanie białka i blokowanie jego wypływu z mitochondrium [25]. Ponadto, NO może blokować aktywność kompleksu I łańcucha oddechowego poprzez tworzenie S-nitrozotiosi [31]. NO może więc regulować wytwarzanie ROS łańcucha oddechowego i jest to uwarunkowane miejscem jego oddziaływania z łańcuchem oddechowym, lokalnym środowiskiem redoks i towarzyszącej odpowiedzi wolnorodnikowej łańcucha oddechowego.

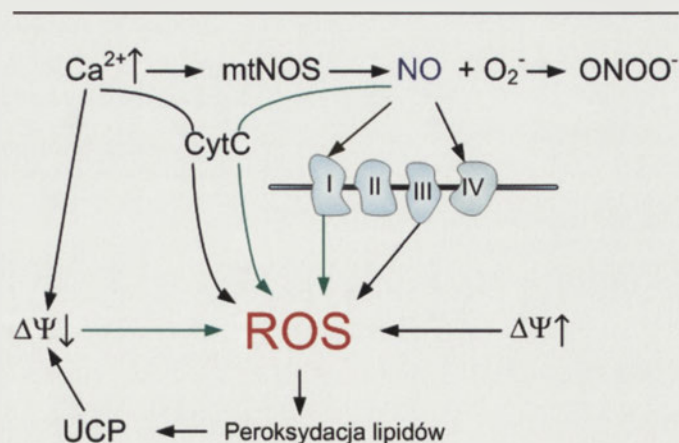
Interesujący jest fakt, że powstawanie ROS i zahamowanie aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego powoduje aktywację kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK) [9]. Tak więc czynność mitochondriów ma wpływ na metabolizm komórek śródbłonna przez wy-

tworzenie ROS i na tej drodze reguluje tworzenie ATP w śródbłonnku, a jego klasyczna rola bioenergetyczna ma, jak się wydaje, mniejsze znaczenie. Mitochondria, poprzez zwiększoną syntezę ROS, regulują czynność śródbłonna nie tylko przez aktywację AMPK, ale również poprzez reakcję z szeregiem innych białek sygnalizacyjnych. ROS mogą być też komórkowymi cząsteczkami sygnałowymi, regulując aktywność niektórych enzymów i genów [32]. Warto dodać, że ROS wytwarzane w wysokich stężeniach mogą wywoływać nieodwracalne zmiany czynności i struktury śródbłonna oraz prowadzić do uszkodzenia mtDNA [33,34].

Zwiększenie wytwarzania ROS przez mitochondria jest ściśle powiązane ze zmianami homeostazy jonowej komórek śródbłonna i ich mitochondriów. Wzrost aktywności ROS może być bowiem wywołany przez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$). Zmiana $[Ca^{2+}]_i$ wpływa na zmiany stężenia Ca^{2+} w mitochondriach, a to z kolei ma wpływ na aktywność wielu enzymów mitochondrialnych. Podwyższone stężenie Ca^{2+} przyczynia się do wzmożonej aktywności łańcucha oddechowego i syntezy ATP w komórkach, włączając w to komórki śródbłonna (Ryc. 3) [35]. Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ prowadzi nie tylko do aktywacji mitochondriów, ale też do aktywacji śródbłonnej NOS. Nie możliwe jest więc zrozumienie sygnalizacyjnej roli mitochondrialnych ROS w śródbłonnku bez szczegółowego przeanalizowania mechanizmów homeostazy jonowej śródbłonna.

HOMEOSTAZA JONOWA W KOMÓRKACH ŚRÓDBŁONKA

Jony wapnia są przekaźnikami sygnałów, które mogą regulować wiele różnych funkcji komórkowych. Każdy typ komórek syntetyzuje unikalny zestaw systemów regulujących $[Ca^{2+}]_i$, w celu wytworzenia sygnałowej „maszinerii” opartej o jony wapnia, o różnej przestrzennej i czasowej charakterystyce [36,37]. Komórki śródbłonna również dysponują odpowiednim zestawem „narzędzi” regulującym $[Ca^{2+}]_i$, a każde zaburzenie ich homeostazy



Rycina 3. Schemt oddziaływania NO z ROS i kompleksami łańcucha oddechowego. Reaktywne formy tlenu wytwarza kompleks I i III mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Oznaczenia na rycinie: mtNOS – mitochondrialna syntaza NO; Cyt C – oksydaza cytochromowa; UCP – mitochondrialne białka rozpręgające; $\Delta\Psi$ – różnica potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

może prowadzić do zmian, czasami nieodwracalnych dla komórki. Sygnał wapniowy może pochodzić z przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub też z wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych.

POTENCJAŁ BŁONOWY KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Komórki śródbłonka należą do grupy komórek nieobudliwych elektrycznie, różniących się funkcją, mechanizmem, jak i szlakami napływu jonów wapnia do ich wnętrza od komórek pobudliwych elektrycznie. Ich potencjał błonowy (V_m) oraz $[Ca^{2+}]_i$ odgrywają jednak istotną rolę w procesach kontroli skurczu komórek mięśni gładkich. Biorą one także udział w regulacji naprężenia naczyniowego, a w efekcie *in vivo* – ciśnienia krwi, poprzez kontrolę naczyniowo-aktywnych sygnałów i kontaktów międzykomórkowych zależnych od śródbłonka. Potencjał błonowy naczyniowych komórek śródbłonka jest ujemny w stosunku do krwi i przedziału tkankowego. Jego wartość, jak również pojemność i opór wejścia (ang. *input resistance*), różnią się znacząco w zależności od procesu izolacji komórek oraz sposobu ich hodowli. Upraszczając, potencjał błonowy zależy od typu komórek śródbłonka i jest bardziej ujemny w komórkach z makronaczyń niż z mikronaczyń.

Dla danych uzyskanych w izolowanych komórkach śródbłonka potencjał spoczynkowy waha się w granicach od 0 do -80 mV, pojemność błony od 30 do 80 pF, a opór wejścia pomiędzy 1 a 10 G Ω . Okazało się, że w hodowli komórki zlewające się (ang. *confluent*) posiadają wyższą wartość pojemności błony (aż do 160 pF) i niższy opór wejścia od 0.01 do 0.4 G Ω . Chociaż ostatnie warto-

ści są dość niepewne, mimo wszystko wplatają się one w spójny obraz związany z występowaniem międzykomórkowych połączeń szczelinowych [38-40]. W odniesieniu do spoczynkowego potencjału błonowego izolowane komórki śródbłonka można podzielić na dwie podgrupy – typ-K oraz typ-Cl [39,41]. Typ-K komórek śródbłonka, w których spoczynkowy V_m spada do wartości między -70 i -60 mV, jest potencjałem zbliżonym do potencjału Nernsta dla jonów K^+ (E_K) i w ten sposób określa dominującą rolę przewodnictwa błonowego dla K^+ , głównie w odniesieniu do dokomórkowego prądu prostowniczego K^+ (K_{ir}). Z drugiej strony, typ-Cl komórek śródbłonka, których potencjał spoczynkowy jest zwykle pomiędzy -40 i -10 mV i zbliżony jest do potencjału Nernsta dla Cl^- (E_{Cl}), co sugeruje dominujące przewodnictwo Cl^- w odniesieniu do warunków spoczynkowych [42].

Początkowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} po stymulacji agonistą jest zwykle spowodowany wpływem jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów, a utrzymujące się podwyższone $[Ca^{2+}]_i$, spowodowane jest napływem Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego [43,44]. Wydaje się zatem, że opróżnienie wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych i elektrochemiczna siła napędzająca regulują napływ jonów wapnia do komórki z otaczającego ją środowiska. Jednakże istnieją rozbieżności dotyczące udziału V_m w regulacji napływu jonów wapnia do śródbłonka. Dane opublikowane przez jednych autorów sugerują istotny wpływ V_m na homeostazę wapniową [44,45], jak i szczególnie nowsze dane czyniące z V_m mniej znaczący czynnik [46,47], faktycznie trudny do oszacowania w napływie Ca^{2+} do wnętrza komórek śródbłonka. Zrozumienie procesów

Tabela 1. Kanaly potasowe występujące w komórkach śródbłonka naczyniowego.

Nazwa	Przewodnictwo (pS)	Charakterystyka	Aktywatory	Inhibitory
K_{ir}	23-30	homo/heterotetramery α -podjednostek (Kir1.x, Kir2.1-4)	brak	Ba ²⁺ , Cs ⁺ , TEA, Mg ²⁺
BK _{Ca}	165-240	tetrametr α -podjednostek 7TMD' (np. hSlo) z 2TM czuły na Ca ²⁺ regulatorowa β -podjednostka zależność od potencjału	NS1619, NS004	charybdotoksyna, iberiotoksyna, TEA
IK _{Ca}	30-80	tetrametr α -podjednostek 6TMD niezależny od potencjału	EBIO	charybdotoksyna, TEA, klotrimazol
SK _{Ca}	4-14	tetramer α -podjednostek, 6TMD niezależny od potencjału		
SK1				TEA, d-TC
SK2				apamina, TEA, d-TC
SK3				apamina, TEA, 4-AP, d-TC
K_{ATP}	25	tetrametr α -podjednostek (Kir6.1 lub 6.2) plus receptor sulfonomocznika (SUR)	pinacidil, chromakalin, diazoksyd	glibenklamid, tolbutamid
K_V	12	6TMD	brak	4-AP, TEA
K_s		Kir2.1	inhibitory kinazy tyrozynowej	Ba ²⁺ , sprzężona aktywność kinazy tyrozynowej

4-AP – 4-aminopirydyna; EBIO – 1-etylo-2-benzimidazolina; TMD – domeny transbłonowe; d-TC-d – tubokurarina; K_{ir} – prostowniczy kanał potasowy; BK_{Ca} – kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany Ca²⁺; IK_{Ca} – kanał potasowy o pośrednim przewodnictwie regulowany przez Ca²⁺; SK_{Ca} – kanał potasowy o małym przewodnictwie regulowany Ca²⁺; K_{ATP} – kanał potasowy regulowany ATP; K_V – kanał potasowy zależny od potencjału; K_s – kanał potasowy zależny od sił ścinających

wykorzystywanych przez śródbłonek do kontroli $[Ca^{2+}]_i$, jest niezbędne, gdyż pomimo dużej liczby głównych szlaków komórkowych regulowanych Ca^{2+} , nadmiar tych kationów jest niezwykle toksyczny dla komórek, natomiast zmniejszenie jego stężenia jest łączone z patologią nadciśnienia [48]. Należy zauważyć, że w komórkach śródbłonna ulega syntezie ogromna liczba kanałów jonowych specyficznych dla K^+ , odpowiedzialnych za regulację potencjału błonowego, których rola i znaczenie, przy uwzględnieniu istnienia szeregu izoform, są trudne do oszacowania i zrozumienia (Tabela 1). Utrudnieniem jest również to, że kanały, które ulegają syntezie w hodowlach pierwotnych linii komórkowych różnią się od tych występujących *in vivo*. Komórki śródbłonna wykazują zróżnicowanie w zależności od rejonu z jakiego są uzyskiwane. Zaobserwowano różnice w $[Ca^{2+}]_i$, przekazywania sygnału, w immunologicznych i metabolicznych właściwościach oraz w charakterystyce wzorca uwalnianych mediatorów dla zależnego od śródbłonna rozkurczu naczyń krwionośnych [49,50]. Jednym z przykładów różnorodności wpływu otoczenia są oddziaływania śródbłonek-ściana naczynia. W hipoksji naczynia płucne kurczą się (tzw. ang. *hypoxic pulmonary vasoconstriction*), natomiast wszystkie inne łożyska naczyniowe, np. naczynia krążenia sercowego i mięśni, ulegają relaksacji, zwiększając przepływ krwi w odpowiedzi na niedotlenienie. Regulacja wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego jest prawdopodobnie najważniejszym zadaniem kanałów jonowych w komórkach śródbłonna [43].

NAPŁYW JONÓW WAPNIA Z PRZESTRZENI POZAKOMÓRKOWEJ

Szlaki napływu jonów wapnia z przestrzeni pozakomórkowej przez błonę plazmatyczną komórek śródbłonna są niezwykle istotne, gdyż napływający Ca^{2+} stanowi jeden z kluczowych elementów pośredniczących w długotrwałej odpowiedzi komórkowej. Opisano szereg systemów regulujących procesy napływu Ca^{2+} znacznie różniących się od siebie mechanizmem regulacji, selektywnością i ilością przepuszczanych jonów wapnia oraz czasem trwania ich napływu i subkomórkową lokalizacją [44]. Sprężenie dużej różnicy stężeń Ca^{2+} w poprzek błony plazmatycznej w komórkach spoczynkowych z hiperpolarizacyjnym V_m stanowi ogromną elektrochemiczną siłę faworyzującą napływ jonów wapnia do komórki. Jony wapnia mogą napływać do komórki przez błonę plazmatyczną w wyniku otwarcia specyficznych dla Ca^{2+} kanałów jonowych. Ogromna liczba kanałów jonowych o przepuszczalności specyficznej dla Ca^{2+} została odkryta w komórkowej błonie plazmatycznej [51]. Bramkowane potencjałem kanały Ca^{2+} występują w błonie plazmatycznej komórek pobudliwych elektrycznie, takich jak komórki mięśniowe, serca i nerwowe. Pomimo tego że komórki śródbłonna należą do grupy komórek niepobudliwych elektrycznie istnieją doniesienia świadczące o obecności kanałów zależnych od potencjału w szeregu ich typach [52,53].

Kanały receptorowe otwierane pod wpływem wiązania agonisty (ROC, ang. *receptor-operated channels*), kana-

ły wapniowe otwierane pod wpływem opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych (SOC, ang. *store-operated calcium channels*) oraz kanały otwierane pod wpływem przekaźnika drugiego rzędu (SMOC, ang. *small messenger-operated channel*) są szlakami napływu wapnia w komórkach śródbłonna o znacznie lepiej udokumentowanej obecności [44,51,54].

Szczególną grupę białek uczestniczących w tworzeniu kanałów jonowych stanowią białka TRP (ang. *transient receptor potential*) odkryte u *Drosophila melanogaster*, ale występujące również w komórkach ssaków. Białka TRP odkryte w organizmach ssaków podzielono na 6 grup głównych: TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML i TRPA [55]. Liczna grupa białek TRP została zlokalizowana również w komórkach śródbłonna, gdzie, jak wykazano, pełni one również ważną funkcję w regulacji napływu Ca^{2+} do komórki [56]. Dysfunkcja i brak odpowiedniej regulacji śródbłonkowych białek TRP skutkuje uszkodzeniem (wskutek nadmiernego wytwarzania ROS), zmniejszoną biologiczną aktywnością NO, uszkodzeniem bariery komórek śródbłonna oraz rozwojem chorób związanych z nieprawidłową angiogenezą [56]. Na uwagę zasługuje również sprzężenie niektórych białek TRP z kanałami potasowymi, w tym z kanałem potasowym o dużym przewodnictwie BK_{Ca} (ang. *big conductance potassium channel*) [57]. Istnieją doniesienia świadczące o zaangażowaniu białek TRP w proces napływu Ca^{2+} , wynikający z opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych (SOCE, ang. *store operated calcium entry*). W proces ten zaangażowane są białka STIM1 (ang. *stromal interacting molecule*) oraz ORAI (lub CRAM w organizmie ludzkim). Stwierdzono funkcjonalne oddziaływanie pomiędzy STIM1 a TRPC1 [58,59].

Odrębną grupę stanowią szlaki napływu jonów wapnia do komórek śródbłonna aktywowane pod wpływem stresu mechanicznego i stresu sił ścinających (ang. *shear stress*) powstałych pod wpływem zmian szybkości przepływu krwi przez naczynia [60,61].

Początkowy wzrost stężenia $[Ca^{2+}]_i$, powstały w wyniku stymulacji agonistą, wynika z opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów Ca^{2+} , siateczki śródplazmatycznej (ER), następujące po początkowym wzroście, utrzymujące się podwyższone stałe stężenie (plateau) jest podtrzymywane przez napływ jonów wapnia z przestrzeni pozakomórkowej [44,62]. Podczas stymulacji komórek śródbłonna agonistą generującym powstawanie inozytolotrisfosforanu (IP_3), który, oddziałując z receptorem znajdującym się w ER, powoduje wypływ Ca^{2+} [63]. Opróżnienie magazynów wewnątrzkomórkowych uruchamia szlak SOCE i napływ jonów wapnia z przestrzeni pozakomórkowej. Ponowne napełnienie magazynów ER powoduje wyłączenie szlaku SOCE napływu jonów wapnia. Okazuje się, że również kwas arachidonowy oraz NO są w stanie uaktywnić otwarcie innych kanałów jonowych niż SOC w komórkach śródbłonna. Aktywacja tych kanałów może odbywać się w dosyć ograniczonej przestrzeni komórki uwzględniającej zgrupowanie kanałów wapniowych [64].

MECHANIZMY USUWANIA JONÓW WAPNIA Z CYTOSOLU KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Wykazano, że usuwanie $[Ca^{2+}]_i$ z komórek śródbłonka izolowanych z aorty królika zachodzi z wykorzystaniem głównie trzech systemów: wymiennika sodowo-wapniowego (NCX) [65], Ca^{2+} -ATPazy z siateczki śródplazmatycznej (SERCA), funkcjonujących w sekwencji wynikającej z różnego powinowactwa dla jonów wapnia oraz szybkości ich transportu dla poszczególnych systemów i obniżających Ca^{2+} o około 50%, oraz ATPazy z błony plazmatycznej (PMCA) [66], która jest odpowiedzialna za usuwanie pozostałych 50% jonów wapnia [67]. Wykazano, że mechanizmy usuwania Ca^{2+} z cytosolu komórek śródbłonka różnią się od tych w komórkach naczyniowych mięśni gładkich [68]. Okazało się, że niezwykle istotna jest lokalizacja mitochondriów w pobliżu błony plazmatycznej oraz jej wpływ na regulację napływu Ca^{2+} . Zmiana przestrzennej lokalizacji mitochondriów w stosunku do błony plazmatycznej powoduje zaburzenie sygnalizacji pomiędzy ER a mitochondriami [69]. Ostatnie dane literaturowe wskazują, że nawet podczas obniżonego napływu Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej uzupełnienie siateczki śródplazmatycznej Ca^{2+} zostaje zachowane. Należy zauważyć, że uzupełnienie magazynów ER powoduje wyłączenie mechanizmu SOCE [70]. Niezwykle ważnym enzymem dla homeostazy jonów wapnia w komórce jest Na^+/K^+ -ATPaza z błony plazmatycznej. Enzym ten również występuje w komórkach śródbłonka [71,72]. Aktywność tego enzymu regulowana jest przez endogenne, jak również podane egzogenne glikozydy. Związkiem będącym w powszechnym użyciu w badaniach aktywności Na^+/K^+ -ATPazy jest, hamująca jego aktywność, ouabaina, która wpływa w sposób znaczący na funkcję komórek śródbłonka [73-75].

MITOCHONDRIA – AKTYWNY UCZESTNIK HOMEOSTAZY Ca^{2+} W KOMÓRKACH ŚRÓDBŁONKA

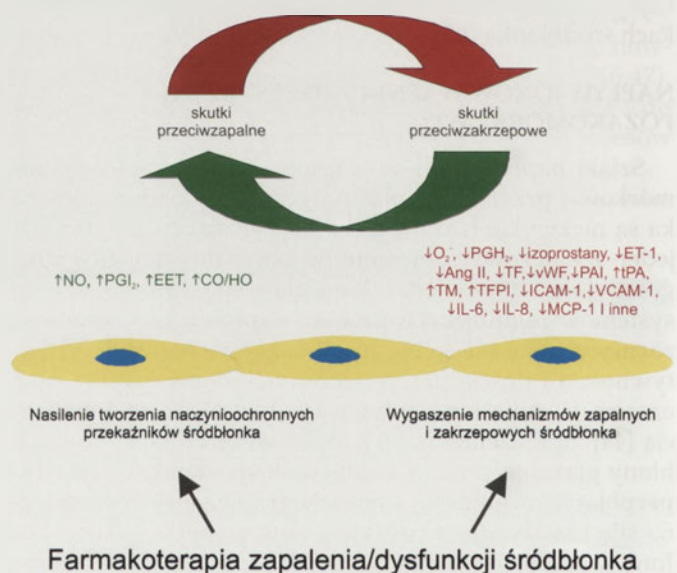
Pomimo znacznej dominacji ER w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia w śródbłonku, ok. 25% Ca^{2+} jest zgromadzonych w mitochondriach tych komórek [76]. Jony wapnia z kolei aktywują wiele białek poprzez ich zmiany konformacyjne [77], aktywują kinazy tyrozynowe, receptory IP_3 w siateczce śródplazmatycznej, co powoduje uwolnienie zmagazynowanego Ca^{2+} i przeważnie zapoczątkowuje SOCE. Wzrost stężenia $[Ca^{2+}]_i$ aktywuje MLCK (kinazy lekkiego łańcucha miozyny) [78].

Odkryto również szereg enzymów mitochondrialnych, których aktywność regulowana jest jonami wapnia, znajdującymi się w ich wnętrzu $[Ca^{2+}]_m$ [79,80]. Jak już wspomniano, wzrost $[Ca^{2+}]_m$ powoduje przyspieszenie wytwarzania ATP w różnych typach komórek, włączając w to komórki śródbłonka. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia uwalnianych z ER powoduje wzrost stężenia Ca^{2+} w macierzy mitochondrialnej [81,82].

Szlakiem odpowiedzialnym za akumulację jonów wapnia w mitochondriach jest uniporter wapniowy (CU). Napływ jonów wapnia przez CU jest napędzany przez elektrochemiczny gradient potencjału mitochondrialne-

go ($\Delta\psi_m$) występujący na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Zatem każda zmiana $\Delta\psi_m$ prowadzi do zmian transportu Ca^{2+} przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, a to w konsekwencji zmienia aktywność metaboliczną mitochondriów. Jednym z czynników obniżających $\Delta\psi_m$ jest, wytwarzany w komórkach śródbłonka, NO, którego aktywność prowadzi do zmniejszenia $[Ca^{2+}]_m$ w hodowli komórek śródbłonka izolowanych z cielecących naczyń płucnych [83]. W świetle istnienia izoformy mtNOS mitochondria mogą scalać wewnątrzkomórkową regulację mechanizmów zależnych od Ca^{2+} , NO i ROS, jak to zaproponowano dla komórek mięśni gładkich [84].

Wciąż nie znana jest odpowiedź na pytanie jakie jest źródło Ca^{2+} dla mitochondriów? Wydaje się, biorąc pod uwagę globalny wzrost stężenia $[Ca^{2+}]_i$, że nie osiąga on stężenia wystarczającego dla transportu przez uniporter Ca^{2+} . Jednak, jak wykazano, mitochondria znajdują się w pobliżu ER i są eksponowane do mikroobszarów o bardzo wysokim lokalnym stężeniu jonów wapnia uwalnianego z ER [85]. Chociaż nie musi to być prawdą dla komórek śródbłonka, gdyż w komórkach HUVEC tylko ok. 4% mitochondriów było zlokalizowanych w pobliżu błon ER [81]. Jedną z przyczyn takiego wyniku badań może być to, że unieśmiertelnione komórki nie do końca odzwierciedlają strukturę komórkową *in vivo*. Pomimo tego



Rycina 4. Farmakologia dysfunkcji śródbłonka. Stan zapalny (dysfunkcja) śródbłonka wyróżniają zwiększona synteza cytokin zapalnych, cząstek adhezyjnych i chemokin. Temu towarzyszy aktywacja mechanizmów zakrzeporodnych śródbłonka (np. $\uparrow PAI_1$ $\downarrow tPA$) i upośledzenie wytwarzania naczynioochronnych przekazników, takich jak NO i PGI_2 . Stan zapalny śródbłonka odgrywa kluczową rolę w rozwoju miażdżycy i innych chorób układu krążenia. Skuteczne leczenie stanów zapalnych śródbłonka winno przynieść: zahamowanie aktywacji zapalnej śródbłonka i mechanizmów zakrzeporodnych śródbłonka oraz wzmocnienie upośledzonej czynności naczynioochronnych przekazników śródbłonka. Statyny i ACE-I, antagoniści AT_1 i antagoniści aldosteronu, poprzez odmiennie mechanizmy, wywierają podobne szerokie spektrum zmian w śródbłonku [3,93,94-97]. Rysująca się w ostatnich latach wiedza o roli mechanizmów mitochondrialnych w zapaleniu śródbłonka powala przypuszczać, że farmakologiczna korekcja funkcji mitochondriów śródbłonka (np. modulacja aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych, modulacja wytwarzania ROS) może przynieść nowe sposoby skutecznego leczenia dysfunkcji śródbłonka.

istnieją dowody na to, że mitochondria komórek śródbłonna odpowiadają na wzrost cytosolowego stężenia jonów wapnia, ale dotyczy to tylko wzrostu Ca^{2+} w pobliżu błony plazmatycznej. W proces ten zaangażowany jest również wymiennik Na^+ / Ca^{2+} [86].

W innym modelu zakłada się, że podczas stymulacji komórek śródbłonna następuje ciągły napływ jonów wapnia do mitochondriów przez CU, które są następnie usuwane przez mitochondrialny wymiennik Na^+ / Ca^{2+} [82,87]. Takie działanie mitochondriów powoduje występowanie mikrorejjonów w cytosolu charakteryzujących się niskim stężeniem jonów wapnia. Rejony te przyspieszają pojemnościowy napływ Ca^{2+} (CCE ang. *capacitative Ca^{2+} entry*), który zachodzi przez SOC. Model ten nie wyjaśnia, jak wapń dostaje się do mitochondriów mimo niskiego powinowactwa CU do tego jonu. Zmiany lokalne stężenia Ca^{2+} w pobliżu błony plazmatycznej w komórkach śródbłonna mogą wpływać na zmiany aktywności ich mitochondriów.

Agoniści receptorów występujących na błonie komórkowej śródbłonna i działającymi poprzez generację IP_3 stymulują wypływ jonów wapnia z ER i to wpływa na modulację ich biologicznego działania. Zjawisko wypływu Ca^{2+} w procesie zwanym mitochondrialnym wypływem jonów wapnia stymulowanym jonami Ca^{2+} (mCICR, ang. *mitochondria Ca^{2+} -induce Ca^{2+} release*), zaobserwowano dla komórek śródbłonna. Pomimo zbieżności nazwy do procesu zachodzącego w mięśniu sercowym CICR (Ca^{2+} -induce Ca^{2+} release), podobieństwo tych procesów jest ograniczone. W przypadku CICR zaangażowany jest kanał RyR (receptor rianodynowy). Prawdopodobnie mCICR występuje, kiedy wysoki poziom wewnątrzmitochondrialnego Ca^{2+} indukuje otwarcie kompleksu białkowego odpowiedzialnego za uprzepuszczalność błony mitochondrialnej (PTP) [12,88].

Większość opisanych dotychczas mechanizmów regulujących wewnątrzkomórkowe i wewnątrzmitochondrialne stężenie jonów wapnia w komórkach śródbłonna dotyczy odpowiedzi na agonistę lub zmiany transportu wapnia. Niewiele jest wciąż prac analizujących zmiany homeostazy jonów wapnia w stanie dysfunkcji śródbłonna. Potrzebne są więc dalsze badania szlaków regulacji homeostazy wapnia w trakcie odpowiedzi zapalnej śródbłonna.

PODSUMOWANIE – PERSPEKTYWY FARMAKOLOGII ŚRÓDBŁONKA

Mechanizmy odpowiedzi zapalnej komórek śródbłonna są bardzo złożone. Odpowiedź może wywołać wiele czynników, np. angiotensyna II, końcowe produkty glikacji (przez aktywację receptorów RAGE), utlenione cząstki LDL (oxLDL), TXA_2 , trombina, IL-1 i TNF- α . W każdym przypadku odpowiedź zapalna śródbłonna obejmuje: 1) zwiększenie syntezy prozapalnych cytokin (np. IL-6), chemokin (np. MCP-1) i cząstek adhezyjnych (np. ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1), 2) zwiększenie gotowości prozakrzepowej śródbłonna (np. zmniejszenie syntezy trombomoduliny) oraz 3) upośledzenie wytwarzania na-

czynioochronnych przekaźników śródbłonna (PGI_2 i NO; Ryc. 4). Jak się wydaje, wszystkie wymienione składowe odpowiedzi zapalnej śródbłonna są uruchamiane w sposób zależny od zwiększonego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego w łańcuchu oddechowym mitochondriów śródbłonna lub przez oksydazy śródbłonkowe (oksydazę NADPH, oksydazę ksantynową, syntazę NO). Z pewnością względny udział puli anionorodnika ponadtlenkowego wytworzonej w mitochondriach, różni się w zależności do bodźca wywołującego zapalenie i typu komórek śródbłonna. Mimo istniejących niejasności, większość badaczy zgadza się, że w odpowiedzi zapalnej śródbłonna wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i powstających z niego produktów reakcji wewnątrzkomórkowych (H_2O_2 , ONOO) z jednej strony (przez mechanizmy transkrypcyjne) wywołuje wzrost wytwarzania cytokin zapalnych i chemokin oraz syntezy cząstek adhezyjnych, a z drugiej – prowadzi do niedoboru naczynioochronnych przekaźników śródbłonkowych (NO i PGI_2) [3, 89-91]. Odpowiedzi zapalnej śródbłonna i zwiększonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego towarzyszą również zmiany mechanizmów zależnej od mitochondriów homeostazy wapnia. Istotnie, ROS powstające w mitochondriach komórek śródbłonna są przekaźnikami odpowiedzialnymi za transmisję receptorowego sygnału Ca^{2+} i wychwytu Ca^{2+} do mitochondriów wywołanego przez trombinę w odpowiedzi na pro-zapalny sygnał transkrypcyjny. Ten ostatni uruchamia mechanizmy adhezji leukocytów do komórek śródbłonna, które stanowią centralny element odpowiedzi zapalnej śródbłonna [92].

Ostatnio zaproponowano, że zaburzenia funkcji mitochondriów mają znaczący udział w dysfunkcji śródbłonna wywołanej przez angiotensynę II [26]. Mitochondria komórek śródbłonna mogą więc stać się nowym celem farmakoterapii w chorobach układu krążenia. Istnieją już leki stosowane w chorobach układu krążenia (statyny, ACE-I, antagoniści receptora AT_1 , antagoniści aldosteronu), które hamują stany zapalne śródbłonna, jego gotowość prozakrzepową, przywracają prawidłową naczynioochronną funkcję śródbłonna, a ich stosowanie przynosi obniżenie śmiertelności wywołanej przez choroby układu krążenia [3,93,94-97]. Dalsze badania prowadzone w celu pełniejszego zrozumienia mitochondrialnych mechanizmów scalających szlaki przekazywania sygnałów zależne od Ca^{2+} i ROS w zapaleniu śródbłonna, pozwolą wyjaśnić sposoby działania tych leków na mitochondria i zaprojektować nowe leki, których celem będą mitochondria śródbłonna.

PIŚMIENNICTWO

1. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-175
2. Chłopicki S (2006) Zapalenie śródbłonna i nowe spojrzenie na atherothrombosis. W: Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W (red) Antagoniści receptora angiotensyny II w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. *Medycyna Praktyczna, Kraków*, str. 91-113
3. Chłopicki S (2005) Farmakologia śródbłonna w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 4: 60-68
4. Chłopicki S, Gryglewski RJ (2004) Endothelial Secretory Function and Atherothrombosis. W: Curtis-Prior P, (red) *The eicosanoids*. John Wiley & Sons Ltd Cambridge, str. 267-276

5. Gryglewski RJ (2005) Pharmacology of vascular endothelium. Delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *Febs J* 272: 2956-2967
6. Kmita H, Stobienia O (2006) Kanał VDAC jako regulator funkcji mitochondriów. *Postepy Biochem* 52: 129-136
7. Więckowski MR (2008) Mitochondrialny megakanał w fizjologii i patologii komórki — nowe spojrzenie. *Postepy Biochem* 54: 71-81
8. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148
9. Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S (2006) Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5379-5384
10. Palacios-Callender M, Hollis V, Mitchison M, Frakich N, Unitt D, Moncada S (2007) Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: a possible explanation for hypoxic vasodilation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18508-18513
11. Ward JP, Snetkov VA, Aaronson PI (2004) Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell Calcium* 36: 209-220
12. Davidson SM, Duchon MR (2007) Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ Res* 100: 1128-1141
13. Gulbins E, Dreschers S, Bock J (2003) Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88: 85-90
14. Ramachandran A, Moellering DR, Ceaser E, Shiva S, Xu J, Darley-Usmar V (2002) Inhibition of mitochondrial protein synthesis results in increased endothelial cell susceptibility to nitric oxide-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6643-6648
15. Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15: 691-699
16. He J, Xiao Y, Casiano CA, Zhang L (2000) Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in coronary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 896-903
17. Mailloux A, Bruneel A, Vaubourdolle M, Baudin B (2004) Cyclosporin A but not estradiol can protect endothelial cells against etoposide-induced apoptosis. *Endothelium* 11: 141-149
18. Mailloux A, Grenet K, Bruneel A, Beneteau-Burnat B, Vaubourdolle M, Baudin B (2001) Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. *Eur J Cell Biol* 80: 442-449
19. Czarna M, Jarmuszkiewicz W (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Postepy Biochem* 52: 145-156
20. Zhang H, Luo Y, Zhang W, He Y, Dai S, Zhang R, Huang Y, Bernatchez P, Giordano FJ, Shadel G, Sessa WC, Min W (2007) Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 170: 1108-1120
21. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
22. Kato K, Giulivi C (2006) Critical overview of mitochondrial nitric oxide synthase. *Front Biosci* 11: 2725-2738
23. Parihar MS, Nazarewicz RR, Kincaid E, Bringold U, Ghafourifar P (2008) Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 23-28
24. Parihar MS, Parihar A, Villamena FA, Vaccaro PS, Ghafourifar P (2008) Inactivation of mitochondrial respiratory chain complex I leads to mitochondrial nitric oxide synthase to become pro-oxidative. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 761-767
25. Zhang DX, Gutterman DD (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2023-H2031
26. Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 102: 488-496
27. Jezek P, Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2478-2503
28. Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR (2005) The role of reactive oxygen species in TNF α -dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1744: 213-223
29. Watanabe N, Zmijewski JW, Takabe W, Umezū-Goto M, Goffe CL, Sekine A, Landar A, Watanabe A, Aoki J, Arai H, Kodama T, Murphy MP, Kalyanaraman R, Darley-Usmar VM, Noguchi N (2006) Activation of mitogen-activated protein kinases by lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cells. *Am J Pathol* 168: 1737-1748
30. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD (2003) Mitochondrial Sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 93: 573-580
31. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150-166
32. Turko IV, Murad F (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 54: 619-634
33. Ballinger SW (2005) Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 38: 1278-1295
34. Puddu P, Puddu GM, Galletti L, Cravero E, Muscari A (2005) Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology* 103: 137-141
35. Traaseth N, Elfering S, Solien J, Haynes V, Giulivi C (2004) Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim Biophys Acta* 1658: 64-71
36. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529
37. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21
38. Berra-Romani R, Raqeeb A, Avelino-Cruz JE, Moccia F, Oldani A, Speroni F, Taglietti V, Tanzi F (2008) Ca²⁺ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. *Cell Calcium*, w druku
39. Nilius B, Viana F, Droogmans G (1997) Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 59: 145-170
40. Yamamoto Y, Chen G, Miwa K, Suzuki H (1992) Permeability and Mg²⁺ blockade of histamine-operated cation channel in endothelial cells of rat intrapulmonary artery. *J Physiol* 450: 395-408
41. Schmidt VJ, Wolfle SE, Boettcher M, de Wit C (2008) Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacol Rep* 60: 68-74
42. Silva HS, Kapela A, Tsoukias NM (2007) A mathematical model of plasma membrane electrophysiology and calcium dynamics in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C277-C293
43. Adams DJ, Hill MA (2004) Potassium channels and membrane potential in the modulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 598-610
44. Nilius B, Droogmans G (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415-1459
45. Luckhoff A, Busse R (1990) Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Arch* 416: 305-311
46. Cohen KD, Jackson WF (2005) Membrane hyperpolarization is not required for sustained muscarinic agonist-induced increases in intracellular Ca²⁺ in arteriolar endothelial cells. *Microcirculation* 12: 169-182
47. McSherry IN, Spitaler MM, Takano H, Dora KA (2005) Endothelial cell Ca²⁺ increases are independent of membrane potential in pressurized rat mesenteric arteries. *Cell Calcium* 38: 23-33

48. Liu Y, Jones AW, Sturek M (1995) Attenuated Ca²⁺ response to acetylcholine in endothelial cells from aorta of aldosterone-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8: 404-408
49. Kumar S, West DC, Ager A (1987) Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 36: 57-70
50. Umeda F, Masakado M, Takei A, Yamauchi T, Sekiguchi N, Hashimoto T, Nawata H (1997) Difference in serum-induced prostacyclin production by cultured aortic and capillary endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56: 51-55
51. Parekh AB, Putney JW Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85: 757-810
52. Figueroa XF, Chen CC, Campbell KP, Damon DN, Day KH, Ramos S, Duling BR (2007) Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1371-H1383
53. Zhou C, Chen H, Lu F, Sellak H, Daigle JA, Alexeyev MF, Xi Y, Ju J, van Mourik JA, Wu S (2007) Cav3.1 ($\alpha 1G$) controls von Willebrand factor secretion in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L833-L844
54. Zhang J, Xia SL, Block ER, Patel JM (2002) NO upregulation of a cyclic nucleotide-gated channel contributes to calcium elevation in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1080-C1089
55. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87: 165-217
56. Kwan HY, Huang Y, Yao X (2007) TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772: 907-914
57. Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE (2005) TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BK_{Ca} channels. *Circ Res* 97: 1270-1279
58. Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I_{CaT}, and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 8: 1003-1010
59. Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA (2006) Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 281: 28254-28264
60. Ali MH, Pearlstein DP, Mathieu CE, Schumacker PT (2004) Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L486-L496
61. Kwan H-Y, Leung P-C, Huang Y, Yao X (2003) Depletion of Intracellular Ca²⁺ Stores Sensitizes the Flow-Induced Ca²⁺ Influx in Rat Endothelial Cells. *Circ Res* 92: 286-292
62. Jousset H, Malli R, Girardin N, Graier WF, Demaurex N, Frieden M (2008) Evidence for a receptor-activated Ca²⁺ entry pathway independent from Ca²⁺ store depletion in endothelial cells. *Cell Calcium* 43: 83-94
63. Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev* 87: 593-658
64. Tomatis C, Fiorio Pla A, Munaron L (2007) Cytosolic calcium microdomains by arachidonic acid and nitric oxide in endothelial cells. *Cell Calcium* 41: 261-269
65. DiPolo R, Beauge L (2006) Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 86: 155-203
66. Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E (2008) The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys*, w druku
67. Wang X, Reznick S, Li P, Liang W, van Breemen C (2002) Ca²⁺ removal mechanisms in freshly isolated rabbit aortic endothelial cells. *Cell Calcium* 31: 265-277
68. Szweczyk MM, Davis KA, Samson SE, Simpson F, Rangachari PK, Grover AK (2007) Ca²⁺-pumps and Na⁺-Ca²⁺-exchangers in coronary artery endothelium versus smooth muscle. *J Cell Mol Med* 11: 129-138
69. Frieden M, Arnaudeau S, Castelbou C, Demaurex N (2005) Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 280: 43198-43208
70. Malli R, Frieden M, Hunkova M, Trenker M, Graier WF (2007) Ca²⁺ refilling of the endoplasmic reticulum is largely preserved albeit reduced Ca²⁺ entry in endothelial cells. *Cell Calcium* 41: 63-76
71. Horisberger JD (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* 19: 377-387
72. Bondarenko A, Sagach V (2006) Na⁺-K⁺-ATPase is involved in the sustained ACh-induced hyperpolarization of endothelial cells from rat aorta. *Br J Pharmacol* 149: 958-965
73. Qiu J, Gao HQ, Li BY, Shen L (2008) Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem*, w druku
74. Stahlh BE, Breitenstein A, Akhmedov A, Camici GG, Shojaati K, Bogdanov N, Steffel J, Ringli D, Luscher TF, Tanner FC (2007) Cardiac glycosides regulate endothelial tissue factor expression in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2769-2776
75. Trevisi L, Pighin I, Luciani S (2006) Vascular endothelium as a target for endogenous ouabain: studies on the effect of ouabain on human endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 52: 64-70
76. Wood PG, Gillespie JI (1998) Evidence for mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in permeabilised endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 543-548
77. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058
78. Tran QK, Ohashi K, Watanabe H (2000) Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 48: 13-22
79. Denton RM, McCormack JG (1990) Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu Rev Physiol* 52: 451-466
80. McCormack JG, Denton RM (1990) Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. *Proc Nutr Soc* 49: 57-75
81. Lawrie AM, Rizzuto R, Pozzan T, Simpson AW (1996) A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 10753-10759
82. Malli R, Frieden M, Osibow K, Zoratti C, Mayer M, Demaurex N, Graier WF (2003) Sustained Ca²⁺ Transfer across Mitochondria Is Essential for Mitochondrial Ca²⁺ Buffering, Store-operated Ca²⁺ Entry, and Ca²⁺ Store Refilling. *J Biol Chem* 278: 44769-44779
83. Dedkova EN, Blatter LA (2005) Modulation of mitochondrial Ca²⁺ by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C836-C845
84. Poburko D, Lee CH, van Breemen C (2004) Vascular smooth muscle mitochondria at the cross roads of Ca²⁺ regulation. *Cell Calcium* 35: 509-521
85. Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T (2004) Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE* 2004: re1
86. Graier WF, Paltauf-Doberzyńska J, Hill BJ, Fleischhacker E, Hoebel BG, Kostner GM, Sturek M (1998) Submaximal stimulation of porcine endothelial cells causes focal Ca²⁺ elevation beneath the cell membrane. *J Physiol* 506: 109-125
87. Sedova M, Blatter LA (2000) Intracellular sodium modulates mitochondrial calcium signaling in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 35402-35407
88. Graier WF, Frieden M, Malli R (2007) Mitochondria and Ca²⁺ signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* 455: 375-396
89. Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V (2005) Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol* 70: 811-823
90. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501
91. Loscalzo J (2003) Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans* 31: 1059-1061
92. Hawkins BJ, Solt LA, Chowdhury I, Kazi AS, Abid MR, Aird WC, May MJ, Foskett JK, Madesh M (2007) G protein-coupled receptor Ca²⁺-linked mitochondrial reactive oxygen species are essential for endothelial/leukocyte adherence. *Mol Cell Biol* 27: 7582-7593

93. Chłopicki S (2007) Endoteliocentryczne spojrzenie na miażdżycę. W: Więcek A, Kokot F (red) t. 4 Medycyna Praktyczna, Kraków, str. 11-21
94. Chłopicki S (2007) Śródbłonek w patogenezie i farmakoterapii powikłań miażdżycowych nadciśnienia tętniczego. W: Januszewicz A, Januszewicz W, Szczepańska-Sadowska E, Sznajderman M (red) t. 2 Medycyna Praktyczna, Kraków, str. 263-274
95. Chłopicki S, Gryglewski RJ (2005) ACE and HMG-CoA reductase inhibitors in the forefront of pharmacology of endothelium. *Pharmacol. Rep.* 57 suppl: 86-96
96. Drelicharz Ł, Jakubowski A, Chłopicki A (2006) Zarys farmakologii antagonistów receptora angiotenzyny II. Antagoniści receptorów angiotenzyny II w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Rużyło W, Januszewicz W, Januszewicz A (red) Medycyna Praktyczna, Kraków, str. 149-170
97. Drelicharz L, Mikita J, Chabielska E, Chłopicki S (2005) Śródbłonkowe działanie aldosteronu – Implikacje terapeutyczne płynące z badań podstawowych i klinicznych *Kardiologia Polska* 63, 4, supl 2, str. 462-471

Endothelial mitochondria – a novel target for pharmacology of endothelial dysfunction

Antoni Wrzosek¹, Agnieszka Lojek^{1,2}, Iwona Stanisławska³, Antonina Chmura-Skirlinska¹, Krzysztof Dolowy², Stefan Chłopicki^{3,✉}, Adam Szewczyk^{1,✉}

¹Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., PL 02-093 Warszawa, Poland

²Department of Biophysics, Warsaw University Life of Sciences-SGGW, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warszawa, Poland

³Department of Experimental Pharmacology, Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, 16 Grzegorzewska St., 31-531 Kraków, Poland

✉ e-mail: a.szewczyk@nencki.gov.pl, s.chlopicki@jmrc.org.pl

Key words: endothelium, mitochondria, ion channels, apoptosis, inflammation, endothelial dysfunction, endothelial pharmacology

ABSTRACT

Vascular endothelium the inside layer of the cardiovascular system is presently looked upon as an important paracrine, autocrine and endocrine organ that determines the health of the cardiovascular system. In fact, healthy endothelium is essential for homeostasis of cardiovascular system, while endothelial dysfunction leads to cardiovascular diseases including atherosclerosis, diabetes and heart failure. Endothelial dysfunction is tightly linked to the overproduction of reactive oxygen species, development of oxidant stress and inflammatory response of endothelium. Mitochondria of the vascular endothelium seem to be an important player in these processes. In contrast to numerous cell types, synthesis of ATP in endothelium occurs in major part via a glycolytic pathway and endothelium seem to be relatively independent of the mitochondrial pathway of energy supply. However, as evident from recent studies, mitochondrial pathways of free radicals production tightly linked to mitochondrial and cytosol changes in the ion homeostasis play an important role in the regulation of endothelial inflammatory response, in the development of oxidative stress and apoptosis of vascular endothelium. Therefore, endothelial mitochondria appears critical in the regulation of endothelial functions and represent a novel target in pharmacology of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases.

STRESZCZENIE

Mitochondria, poza dostarczaniem energii komórce, pełnią istotną funkcję scalającą sygnały prowadzące do przeżycia lub śmierci komórki. W ostatnich latach wiele badań wskazuje, że pod wpływem różnorodnych bodźców, kinazy białkowe mogą bezpośrednio oddziaływać z białkami mitochondrialnymi. Należą do nich: kinaza białkowa A, kinaza białkowa B/Akt, kinaza białkowa C, kinazy Raf-1, p38 MAPK, JNK, ERK1/2, Src, Fyn, i Csk. Badania koncentrują się na fosforylacji pro- i antyapoptotycznych białek (Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x_L) oraz na fosforylacji lub innego typu oddziaływaniach z białkami łańcucha oddechowego (kompleks I i oksydaza cytochromowi COIV), białkami ANT (ang. *adenine nucleotide translocase*) i VDAC (ang. *voltage dependent anion channel*) tworzącymi MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*), kompleksem białek wchodzących w skład kanału potasowego regulowanego przez ATP (mitoK_{ATP}) i skramblazą fosfolipidów 3 (PLSCR3). Ponadto, znalezienie w mitochondriach białek, przylączających kinazy białkowe i tworzących rusztowanie molekularne, które mogą ułatwiać powstawanie wielobiałkowych kompleksów w macierzy mitochondrialnej, wskazuje na istotną rolę, jaką w metabolizmie mitochondriów odgrywa przekazywanie sygnału przez kinazy białkowe. Różne metody obrazowania wykazały obecność kinaz białkowych związanych z zewnętrzną i wewnętrzną błoną oraz macierzą mitochondrialną w warunkach stymulacji komórek *in vitro*, w chorobach neurodegeneracyjnych oraz w procesie ischemicznego hartowania serca *in vivo*. Wydaje się także, że przemieszczanie kinaz białkowych do mitochondriów związane jest z tworzeniem reaktywnych form tlenu w mitochondriach, szczególnie ze stanami ischemii i reperfuzji w mózgu i w sercu. Pełne wyjaśnienie mechanizmów przemieszczania się kinaz białkowych do mitochondriów oraz funkcji, jakie mogłyby pełnić w oddziaływaniu z białkami docelowymi, wymagają dalszych badań.

WSTĘP

Żadna komórka eukariotyczna nie może prawidłowo funkcjonować bez sprawnej i szeroko rozwiniętej sieci przekazywania informacji. Gdyby szczegółowo opisać wszystkie szlaki sygnałowe w komórce, to średnio w każdy z nich zaangażowanych jest kilkadziesiąt białek [1-5]. Kinazy białkowe to najliczniejsza grupa wśród białek enzymatycznych biorących udział w kaskadowym przekazywaniu informacji docierających do komórki z otoczenia, jak i do poszczególnych organelli/przedziałów w każdej z nich (ang. *cross-talk*). Kinazy białkowe regulują aktywność wewnątrzkomórkowych białek poprzez ich fosforylację – najczęstszy rodzaj odwracalnej modyfikacji kowalencyjnej mogącej zmieniać konformację, a tym samym funkcję określonego substratu.

Kinazy białkowe biorą udział w niemal wszystkich procesach komórkowych, m.in. w proliferacji, różnicowaniu czy aktywacji reakcji obronnych organizmu. Odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie komórki, jej przeżycie, kontrolują apoptozę, wpływają na aktywność kanałów jonowych, modulując ich aktywność i funkcję, regulują uwalnianie przekaźników sygnału oraz oddziałują z receptorami zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej [6].

Niewiele wiadomo na temat kinaz białkowych zlokalizowanych w mitochondriach. Dane literaturowe wyraźnie wskazują na ich obecność, natomiast funkcja i oddziałujące z nimi białka wciąż nie są dobrze poznane [7]. W niniejszej pracy zebrano dane literaturowe opisujące najlepiej poznane kinazy białkowe bezpośrednio związane z mitochondriami. Ponadto, przedstawiono potencjalne białka docelowe tych kinaz oraz przypuszczalną rolę, jaką mogłyby odgrywać procesy fosforylacji i oddziaływania typu białko-białko na terenie mitochondriów i w efekcie w całej komórce (Ryc. 1).

KINAZA BIAŁKOWA A

Kinaza białkowa A (PKA), należąca do grupy kinaz serynowo-treoninowych, jest istotnym mediatorem większości szlaków sygnałowych zależnych od cyklicznego AMP (cAMP), co umiejscawia ją w grupie białek odgrywających waż-

Joanna Ewa Kowalczyk✉

Barbara Zabłocka

Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

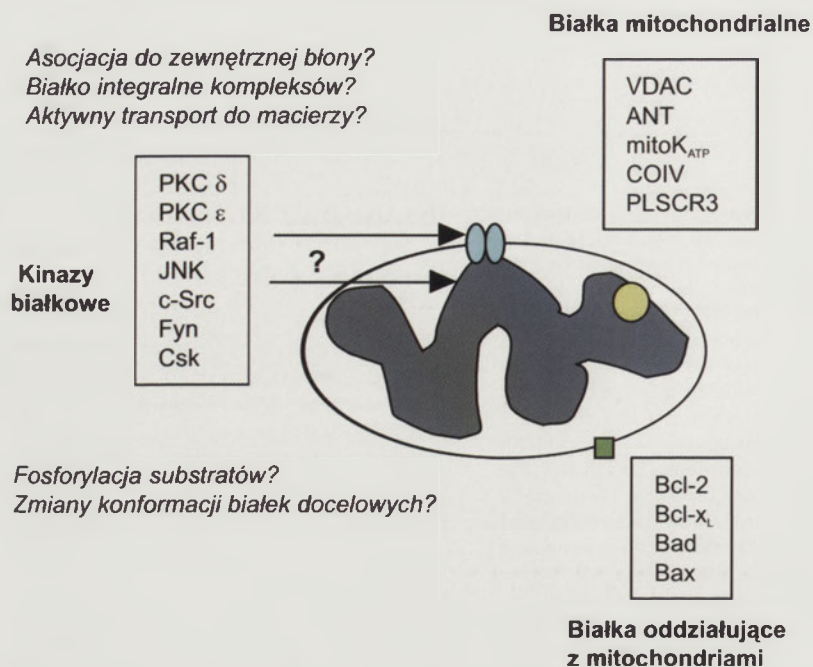
✉Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk, Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; tel.: (022) 60 86 487, e-mail: jkowalczyk@cmdik.pan.pl

Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2008 r.

Artykuł zaakceptowano 21 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: mitochondria, kinazy białkowe, przekazywanie sygnału, hartowanie ischemiczne, apoptoza

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Polską Sieć Mitochondrialną MitoNet.pl



Rycina 1. Proponowane kinazy białkowe oddziałujące z mitochondriami i ich mitochondrialne substraty lub białka, z którymi oddziałują. Kinazy białkowe zlokalizowane są w cytosolu komórki, a po aktywacji komórki mogą przemieszczać się do mitochondriów, gdzie łączą się z licznymi białkami, które fosforylują lub po połączeniu zmieniają ich konformację, wpływając na ich aktywność, a tym samym na losy komórki. Zjawiska te obejmują i) hamowanie tworzenia MPTP, ii) aktywację kanału potasowego mitoK_{ATP}, iii) wzrost produkcji ATP poprzez regulację aktywności COIV, iv) przebudowę architektury błon mitochondrialnych przez wzrost aktywności PLCSR3, v) obniżenie aktywności antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-x_L, vi) obniżenie aktywności proapoptotycznej białka Bad.

nią rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wielu procesów komórkowych. Aktywowana przez cAMP, PKA uwalnia dwie katalityczne podjednostki, które następnie fosforylują docelowe białka. Wykazano jej rolę, między innymi, w regulacji hormonalnej, gdzie pośredniczy w kontroli wieloetapowej odpowiedzi specyficznych komórek i tkanek na stymulację hormonami, np. progesteronem; od niej także zależy regulacja aktywności kanałów jonowych, fosforylacja białek chromosomowych (m.in. histonu H1) oraz jądrowych czynników transkrypcyjnych, takich jak CREB i NF- κ B [8].

Występowanie i aktywność PKA zaobserwowano również w mitochondriach. Metodą immunodetekcji wykryto zarówno podjednostki katalityczne, jak i regulatorowe w wewnętrznej błonie oraz macierzy mitochondriów otrzymanych z serca krowy [9]. Wykazano, że w komórkach mioblastów i wyizolowanych z nich mitoplastach, zależna od cAMP, fosforylacja 18 kDa podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego, zwiększa jego wydajność i jest niezbędna do zachowania prawidłowych funkcji oddechowych mitochondriów [10].

Trwają badania nad sposobem przemieszczania się kinaz do różnych organelli w obrębie komórki. Rolę w transporcie PKA do mitochondriów coraz częściej przypisuje się białku kotwiczącemu PKA – AKAP (ang. *A-kinase anchor protein*) [11]. Wykazano, że AKAP121 pośredniczy w przyłączaniu aktywnej kinazy PKA oraz cAMP do zewnętrznej błony mitochondrialnej [11,12]. Badania na embrionalnych komórkach ludzkich HEK 293 pokazały, że połączenie to prowadzi do fosforylacji proapoptotycznego białka Bad, uniemożliwia-

jąc mu zablokowanie białka antyapoptotycznego Bcl-2 [13]. W konsekwencji nie dochodzi do uwalniania cytochromu c do cytosolu i do apoptozy. Ponadto, są doniesienia o udziale AKAP121 w fosforylacji/aktywacji przez PKA białka StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) – mitochondrialnego czynnika promującego steroidogenezę, zlokalizowanego w mitochondriach komórek Leydiega w jądrach myszy, co wskazuje na udział PKA w biosyntezie hormonów [14-16]. Ostatnie badania na linii MA-10, transformowanych komórek Leydiega, wskazują, że wzrost aktywności PKA prowadzi do fosforylacji mitochondrialnej puli kinazy ERK1/2 [17], a maksymalna steroidogeneza zachodzi w obecności cholesterolu i oddziaływaniu pomiędzy StAR, ERK1/2 i PKA [18].

Uważa się, że PKA potrzebna jest do prawidłowego funkcjonowania mitochondriów, regulacji ekspresji białek mitochondrialnych oraz aktywacji mechanizmów ochronnych komórki [19].

KINAZA BIAŁKOWA B/Akt/PI3K

Serynowo-treoninowa kinaza białkowa B (PKB/Akt), aktywowana przez kinazę-3 fosfotyloinozytoli (PI3K), odgrywa główną rolę w proliferacji oraz w ochronie różnych typów komórek przed apoptozą [17].

Stymulacja IGF-1 lub insuliną komórek neuroblastoma i komórek nerki wyizolowanych z ludzkich embrionów powoduje bardzo szybkie przeniesienie ufosforylowanej/aktywnej kinazy Akt do mitochondriów [20]. Kinazę tę zlokalizowano w błonie zewnętrznej, jak i wewnętrznej oraz w macierzy mitochondriów. Dodatkowo wykazano, że zaburzenie potencjału mitochondrialnego uniemożliwia wnikanie Akt do mitochondriów nawet w warunkach stymulacji przez IGF-1, co może świadczyć o tym, że transport tej kinazy do mitochondriów zależy od potencjału ich wewnętrznej błony [20,21].

Przemieszczanie i akumulacja aktywnej kinazy Akt w mitochondriach nasunęła pytania o białka, z którymi może ona oddziaływać w mitochondriach. Metodą immunoprecypitacji i analizy spektrometrii mas wykazano, że zarówno w błonie zewnętrznej, jak i wewnętrznej Akt występuje w kompleksie z kinazą syntazy glikogenu 3 β (GSK3 β), konstytutywnie aktywnym białkiem, regulowanym przez fosforylację, występującym głównie w cytosolu [22]. GSK3 β , podobnie jak Akt, bierze udział w regulacji metabolizmu, różnicowaniu i przeżyciu komórek. Interesujący jest fakt, że fosforylacja reszty seryny w pozycji 9 GSK3 β przez PKB/Akt powoduje obniżenie jej aktywności [20]. Jednak mimo obecności GSK3 β w mitochondriach, w tym również w kontekście współwystępowania z Akt, funkcja GSK3 β w tym przedziale komórkowym pozostaje niewyjaśniona [23]. Istnieją doniesienia mówiące o udziale cytoplazmatycznej GSK3 β w przekazywaniu sygnału podczas apoptozy indukowanej staurosporyną oraz szokiem cieplnym w komór-

kach neuroblastoma [24]. Jednoczesne podanie litu, który jest inhibitorem GSK3 β , hamowało proapoptotyczne działanie tej kinazy [25,26]. Być może mitochondrialna forma GSK3 β pełni podobną funkcję, a jej zahamowanie w wyniku fosforylacji przez Akt mogłoby przyczynić się do ograniczenia apoptozy.

Stymulacja receptora erytropoetyny (Epo) w komórkach mięśniowych serca wydaje się aktywować wiele prożyciowych kinaz, takich jak PI3K, AKT, kinazę białkową C (PKC) i ERK1/2 [27,28]. Badania z ostatnich miesięcy potwierdziły doniesienia o występowaniu Akt w mitochondriach izolowanych z serca królika oraz wykazały oddziaływanie z białkiem ANT, które wchodzi w skład MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) [29]. Serca poddane 30 minutowej ischemii i dwugodzinnej reperfuzy, wcześniej traktowane Epo, wykazywały wielokrotnie mniejszy obszar uszkodzenia niż serca nie chronione Epo. Podanie LY294002, specyficznego inhibitora kinazy PI3K, hamowało kardioprotekcję. Autorzy sugerują, że Epo zwiększa ilość/stężenie ufosforylowanej kinazy Akt w mitochondriach i że poprzedzenie epizodu ischemicznego aktywacją szlaku PI3K/Akt i dalej tworzenie kompleksu z komponentami megakanalu, może być kluczowym procesem prowadzącym do ochrony serca przed skutkami jego niedokrwienia [29].

KINAZA BIAŁKOWA C

Kinazy białkowe C (PKC), to liczna rodzina kinaz serynowo-treoninowych. Aktywność izoform: a) klasycznych (α , β I, β II i γ) – zależy od stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu, od obecności wtórnego przekaźnika sygnału 1,2-diacylglicerolu (DAG) oraz od fosfatydyloseryny (PS), b) nowych (δ , ϵ , θ i η) – nie jest wrażliwa na zmiany stężeń Ca^{2+} , c) atypowych (ζ , μ i ι/λ) – nie jest regulowana ani przez Ca^{2+} ani DAG [30]. Występowanie PKC obserwuje się powszechnie u ssaków we wszystkich typach tkanek i komórek; jest ona obecna zarówno w cytosolu w formie rozpuszczalnej (nieaktywna), jak i związana z błonami (forma aktywna). Do podstawowych i najistotniejszych funkcji PKC należy pośredniczenie w odpowiedziach komórek eukariotycznych na różne sygnały docierające z otoczenia, zaangażowanie w regulację wzrostu, różnicowanie, apoptozę oraz aktywację czynników transkrypcyjnych [31-33]. Kinazy białkowe C związane są również z procesem uczenia się i zapamiętywania (LTP) [34]. W ostatnich latach coraz częściej określa się niektóre z izoform PKC kluczowymi mediatorami sygnału ischemicznego w mózgu i sercu, tym samym przypisując im bezpośredni udział w procesach związanych ze śmiercią komórki lub jej przeżyciem [35].

W połowie lat 90. XX-tego wieku PKC α i β zostały wykryte w mitochondriach komórek Müllera siatkówki oka karpia. Metodą mikroskopii elektronowej uwidoczniono ich obecność w grzebieniach mitochondrialnych [36]. Od tego momentu wzrosło zainteresowanie funkcją, jaką mogłyby pełnić poszczególne izoformy PKC w mitochondriach. Najwięcej danych sugeruje udział dwóch izoform PKC: δ i ϵ w dwóch procesach komórkowych nierozdzielnie związanych z mitochondriami: w apoptozie i w hartowaniu ischemicznym serca.

PKC δ

Udział w procesie apoptozy najczęściej przypisywany jest PKC δ , której aktywność nie jest bezpośrednio regulowana przez Ca^{2+} . Obserwowane przeniesienie tej izoformy do mitochondriów komórek nowotworowych, tj. keratynocytów, U-937 i MCF-7 [33], traktowanych estrami forbolu lub wodą utlenioną prowadziła do uwalniania cytochromu *c* z mitochondriów do cytosolu, co w konsekwencji prowadziło do indukcji apoptozy [37,38]. Podobne zjawisko obserwowano, gdy traktowano keratynocyty promieniowaniem UV. Następstwem translokacji PKC δ do mitochondriów było kolejno: zaburzenie potencjału błonowego tych organeli, aktywacja kaskady kaspaz i śmierć komórki [39]. Ciekawą wydaje się również fakt, że nadekspresja PKC δ prowadzi do apoptozy zarówno keranocytów zdrowych, jak i nowotworowych [40].

Większość doniesień podkreśla uwalnianie cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytosolu, jako następstwo licznych szlaków sygnałowych przebiegających w mitochondriach. Nie jest natomiast jasne, jakie białka mogą pośrednio lub bezpośrednio uczestniczyć w tym procesie. Metodą immunoprecypitacji mitochondriów wyizolowanych z komórek HeLa, wykazano, że PKC δ współwystępuje z izoformą 3 skramblazy fosfolipidów (PLSCR3) [41], enzymem odpowiedzialnym za prawidłowe rozmieszczenie fosfolipidów (w tym charakterystycznej dla mitochondriów kardiolipiny (CL)) w błonie mitochondrialnej [42]. PLSCR3 jest enzymem niezbędnym do nadania prawidłowej struktury lipidowej błon mitochondrialnych. Badania *in vitro* wykazały, że PLSCR3 jest fosforyzowana przez PKC δ , konsekwencją czego jest zmiana aktywności skramblazy, transport CL do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie wydaje się oddziaływać z białkiem proapoptotycznym tBid. Następstwem tej kaskady sygnałowej, prowadzącej do uprzepuszczelnienia błony mitochondrialnej, jest uwolnienie cytochromu *c* z mitochondriów [43,44]. Jednocześnie, wykazano znaczny przyrost CL w zewnętrznej błonie mitochondrialnej w czasie apoptozy, podczas gdy w fizjologicznych warunkach fosfolipid ten występuje głównie po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej [44]. Badania te potwierdzają hipotezę przemieszczenia kardiolipiny w błonach mitochondrialnych przy udziale ufosforylowanej przez PKC δ , aktywnej PLSCR3 [45].

Choć uważa się, że PKC δ jest głównie związana z apoptozą, istnieją doniesienia mówiące o jej udziale w kardioprotekcji. W kardiomiocytach szczurów poddanych krótkotrwałej, nieuszkodzającej ischemii i reperfuzy wykazano przemieszczanie PKC δ do mitochondriów, gdzie w wewnętrznej błonie oddziaływała z kanałem potasowym zależnym od ATP (mitoK_{ATP}), efektem czego była jego aktywacja prowadząca do kardioprotekcji [46].

PKC ϵ

Wiele badań wskazuje na to, że przeniesienie niezależnej od Ca^{2+} PKC ϵ do mitochondriów ma bezpośredni związek ze zjawiskiem hartowania mięśnia sercowego [47]. Krótkotrwały, nie uszkodzający komórki, epizod

niedokrwienny serca inicjuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałów, które zwiększają odporność komórek na długotrwałe niedotlenienie, w konsekwencji czego nie dochodzi do aż tak dużej utraty kardiomiocytów, jak w komórkach serca nie poddanych wcześniej pre-kondycjonowaniu [48]. Liczne prace z zastosowaniem zarówno modeli *in vivo*, *ex vitro* oraz *in vitro* pokazują, że selektywna aktywacja PKC ϵ prowadzi do kardioprotekcji [49]. Dane te potwierdzają doświadczenia z zastosowaniem chlorku cheleritryny – inhibitora izoform PKC, w których nie obserwuje się zjawiska ochrony indukowanego przez krótkotrwały epizod niedokrwienny. Sugerowanych jest kilka białek mitochondrialnych, które mogą być substratami/ białkami oddziałującymi z PKC ϵ . Należą do nich białka łańcucha oddechowego oraz białka kanałów jonowych [50]. W badaniach *in vitro* wykazano, że aktywacja kardiomiocytów izolowanych z zarodków szczurów aktywatorem PKC, PMA, prowadzi do fosforylacji podjednostki IV oksydazy cytochromowej (COIV), natomiast podanie selektywnego inhibitora PKC ϵ , ϵ V1-2, hamuje tę fosforylację [51]. Dalsze badania dowodzą, że poddanie hartowaniu płodowych kardiomiocytów myszy w wyniku hipoksji powoduje oddziaływanie PKC ϵ i COIV. Rezultatem tych oddziaływań jest fosforylacja COIV i obserwowany aż czterokrotny wzrost aktywności oksydazy cytochromowej, wzmożona synteza ATP, tym samym usprawnienie funkcji bioenergetycznej mitochondriów, co tłumaczyć może zwiększoną odporność na uszkodzenie ischemiczne serca [52].

Innym substratem PKC ϵ wydają się być białka tworzące MPTP: VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) w zewnętrznej oraz ANT (ang. *adenine nucleotide translocator*) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Z wykorzystaniem metody immunoprecypitacji udowodniono, że PKC ϵ fizycznie łączy się z białkiem ANT i VDAC, które dodatkowo jest fosforylowane [53]. Wydaje się, że w prawidłowo funkcjonującej komórce, nie poddanej żadnemu stresowi, megakanał jest prawdopodobnie zamknięty lub minimalnie otwarty. Całkowite otwarcie MPTP podczas reperfuzji poniedokrwiennej prowadzi do śmierci komórki [54]. Zaobserwowano, że inkubacja mitochondriów wyizolowanych z serca myszy z nadekspresją PKC ϵ obniżała otwarcie megakanału, a jego całkowite hamowanie miało miejsce w mitochondriach serca myszy z konstytutywnie aktywną PKC ϵ [53]. Badania te sugerują udział PKC ϵ w regulacji aktywności megakanału i jego otwarcia.

Innym kanałem zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, który prawdopodobnie oddziałuje z PKC ϵ , jest kanał potasowy, którego otwarcie regulowane jest przez ATP (mitoK_{ATP}). W niepobudzonej komórce, kiedy utrzymany jest stały poziom ATP, kanał ten jest zamknięty [55]. Jego otwarcie poprzedzone jest spadkiem ilości ATP, obserwowanym np. podczas niedokrwienia. Liczne doświadczenia wskazują, że krótkotrwałe otwarcie kanału mitoK_{ATP} wpływa na regulację objętości macierzy, poziom Ca²⁺ w mitochondriach i produkcję wolnych rodników [56,57]. Zaobserwowano, że kanał mitoK_{ATP} otwiera się po podaniu agonisty PKC ϵ – ψ ϵ RACK, a zamyka po podaniu antagonisty, ϵ V1-2 [58].

KINAZA C-Raf (Raf-1)

Kinaza Raf-1, należąca do kinaz serynowo-treoninowych, ma kluczowe znaczenie w przekazywaniu sygnałów zewnątrzkomórkowych zarówno w prawidłowych, jak i nowotworowych komórkach. Rezultatem kaskady fosforylacji zależnych od Raf-1 jest aktywacja licznych kinaz białkowych, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych i proliferacji komórek [59-61]. Po raz pierwszy powiązано kinazę Raf-1 z mitochondriami, prowadząc badania na ludzkich komórkach nerkowych 293 oraz na komórkach 32D.3, w których wykazano, że nadprodukcja białka anty-apoptycznego Bcl-2 powoduje przeniesienie kinazy Raf-1 do mitochondriów [62]. Dalsze doświadczenia pokazały, że Raf-1 fosforyluje, a tym samym inaktywuje proapoptyczne białko Bad w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, powodując zahamowanie apoptozy [63]. W mitochondriach izolowanych z mózgu chomika mongolskiego wykryto kinazę Raf-1, której poziom zmniejszył się w czasie reperfuzji po krótkotrwałym niedokrwieniu. Jednocześnie zwiększała się ilość kinazy JNK. Kinazy te fosforylują odpowiednio białka Bad i Bcl-2, zmieniając ich wzajemne powinowactwo i połączenie z błoną mitochondrialną. Badania te wskazały na udział kinazy Raf-1 i JNK w poischemicznej przebudowie zewnętrznej błony mitochondriów, co prowadzi do uszkodzeniach neuronów po niedokrwieniu mózgu [64].

Ciekawe wydają się obserwacje, że Raf-1 działa ochronnie również w komórkach, które nie ekspresjonują białka Bad i są ubogie w Bcl-2 [65]. Sugeruje to występowanie innych białek, z którymi oddziałuje Raf-1 w błonach mitochondrialnych. Badania metodą immunoprecypitacji pokazały, że w mysich komórkach nowotworowych 32Dcl.3 aktywna kinaza Raf-1 fizycznie oddziałuje z białkiem VDAC [66]. C-końcowy fragment kinazy Raf-1 łączy się z białkiem VDAC. To połączenie nie zmienia jednak aktywności MPTP współtworzonego przez VDAC. Sugerowany jest zatem udział jeszcze innych białek; w tym Bcl-2. Wydaje się, że bezpośrednio oddziaływanie Raf-1 i Bcl-2 z VDAC może zmienić jego konformację, w rezultacie zmniejszając liczbę tworzonych przez VDAC porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, obniżyć depolaryzację błony i zmniejszać wpływ cytochromu *c* z mitochondriów [66].

INNE KINAZY BIAŁKOWE

RODZINA KINAZ TYROZYNOWYCH Src

Obecność kinaz fosforylujących białka w mitochondriach wskazuje, że są one istotne dla funkcjonowania tych organelli. Oprócz kinaz serynowo-treoninowych znaleziono w mitochondriach kinazy tyrozynowe z rodziny Src. Traktowanie oczyszczonych mitochondriów wyizolowanych z mózgu szczura specyficznym inhibitorem kinaz Src (PP2) hamowało fosforylację reszt tyrozynowych wielu białek mitochondrialnych, co sugeruje obecność tych kinaz i ich substratów w badanej frakcji [67]. Badania z użyciem specyficznych przeciwciał potwierdziły obecność czterech z 11 kinaz z rodziny Src: c-Src, Fyn, Lyn oraz Csk. Oprócz kinazy Lyn, która wydaje się być zlokalizowana w grzebieniach, pozostałe kinazy występują w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [68]. Do dziasiaj tylko dla kinazy c-Src znaleziono substrat, którym jest oksydaza cytochromowa [69].

Wykazano też, że c-Src oddziałuje z kompleksem II łańcucha oddechowego. Jego fosforylacja wydaje się być niezbędna do prawidłowego przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy w komórkach o dużym zapotrzebowaniu na ATP, takich jak, bogate w mitochondria, osteoklasty [70]. Najnowsze badania sugerują również, że obecność kinazy c-Src w mitochondriach jest bezpośrednio związana z białkiem kotwiczącymi AKAP121 oraz białkiem PTPD1 (ang. *protein tyrosine phosphatase*), które biorą również udział w kotwiczeniu kinazy PKA w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [13].

RODZINA MAPK KINAZ

Kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) to grupa kinaz serynowo-treoninowych aktywowanych mitogenami, która reguluje odpowiedź na sygnały docierające do komórki z zewnątrz. Wpływają one m.in. na ekspresję genów, różnicowanie komórkowe, proliferację i apoptozę. Rodzinę kinaz MAP dzielimy na trzy grupy: kinazy p38, JNK (ang. *c-Jun terminal kinase*)/SAPK (ang. *stress-activated protein kinase*) oraz ERK1/2. Generalnie aktywacja szlaków JNK i p38 związana jest z reakcją komórek na stres i może prowadzić do ich śmierci. Szlak kinaz ERK1/2, zaangażowany głównie w procesy podziału i wzrostu komórki, jest aktywowany przez czynniki wzrostowe [71]. Nie ma zbyt wielu doniesień dotyczących kinazy p38 w mitochondriach; wiadomo, że jest ona związana z procesami apoptozy, w tym z przeniesieniem białka Bax z cytosolu do mitochondriów, niezależnym od kaspaz wypływem potasu oraz z transkrypcyjną regulacją TR3, białka, które transportowane jest z jądra do mitochondriów inicjując szlak apoptotyczny [72-74]. Epperly i współpracownicy (2002) wykazali transport kinazy p38 jak i JNK do mitochondriów hematopoetycznych komórek 32D cl 3 po naświetleniu promieniami X [75]. Głównym skutkiem działania kinazy JNK na mitochondria jest stymulacja apoptozy. Traktowanie aktywną kinazą JNK mitochondriów wyizolowanych z mózgu szczura powoduje hamowanie anty-apoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-x_l, prowadząc do uwalniania cytochromu c [76-78]. Badania metodą dwuhybrydową wykazały, że w komórkach drożdży kinaza JNK łączy się z białkiem Sab (SH3BP5), a badania immunocytochemiczne wskazują, że JNK występuje w mitochondriach w komórkach ludzkich (A431, HFF), mysich (KIM-2) i kurzych (CEF) [78]. Sugeruje się, że białko Sab oddziałuje z JNK w mitochondriach, gdzie może pełnić funkcję podobną do białek kotwiczących z rodziny AKAP. Nie wykluczone jest, że może pośredniczyć w szlaku przekazywania sygnałów przez JNK w mitochondriach [77]. Jak wspomniano wcześniej, ilość aktywnej, ufosforylowanej JNK związanej z mitochondriami w neuronach zwiększa się w przebiegu niedokrwiennej, opóźnionej neurodegeneracji, co wskazuje na udział JNK w procesie apoptozy, jak wykazano w modelu przejściowego niedokrwienia mózgu chomika mongolskiego [64].

Pierwsze doniesienia, które wskazują na mitochondrialną lokalizację ufosforylowanej/aktywnej kinazy ERK1/2, pochodzą z badań metodą western blot poszczególnych frakcji komórkowych [79]. Wykazano, że uszkodzenie komórek nerki (ang. *renal proximal tubular cells* – RPTC) cytostatykiem, cisplatyną, prowadzi do wzrostu ilości ak-

tywnej kinazy ERK1/2 oraz PKC α w mitochondriach, co wydaje się wpływać na zwiększenie potencjału błony mitochondrialnej, spadek aktywności oksydacyjnej fosforylacji, wzrost aktywności kaspazy 3 oraz apoptozę [79]. Podobnie, udział ERK1/2 w fosforylacji białek Bcl-2 i Bad wykazano z zastosowaniem metody ko-immunoprecypitacji aktywnej kinazy ERK1/2 z białkami z rodziny Bcl-2 [80]. Badania immunohistochemiczne w mikroskopie elektronowym potwierdziły obecność ufosforylowanej formy ERK1/2 w mitochondriach [81]. Kolejne badania pozwoliły dokładniej określić ich lokalizację w przestrzeni międzybłonowej oraz w macierzy mitochondrialnej [81]. Ich występowanie zaobserwowano m.in. w mitochondriach uszkodzonych komórek nerwowych pacjentów z chorobą Parkinsona [82].

PODSUMOWANIE

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach po raz kolejny potwierdzają, jak istotną rolę odgrywają w komórce mitochondria. W chwili obecnej wydaje się, że bez fosforylacji i defosforylacji białek związanych z mitochondriami przez kinazy serynowe-treoninowe czy tyrozynowe nie byłoby możliwe przekazywanie sygnałów z cytoplazmy do mitochondriów. Czyni to kinazy białkowe kluczowymi białkami niezbędnymi do utrzymania równowagi pomiędzy wieloma procesami w komórce, w tym pomiędzy procesami prożyciowymi a apoptozą. Liczne kinazy białkowe zostały zlokalizowane zarówno w błonach mitochondrialnych, w przestrzeni pomiędzy nimi, a także w macierzy mitochondrialnej.

Aby kinazy białkowe mogły wejść na „mitochondrialny szlak sygnałowy” i fosforylować bądź oddziaływać z białkami, tworząc z nimi kompleksy, a tym samym zmieniać ich konformację i modulować funkcje, enzymy te muszą się przemieścić z cytoplazmy do błon lub wnętrza mitochondriów. W niektórych przypadkach połączenie kinazy z błoną umożliwia jej aktywację. Nadal nie jest jednak znany mechanizm transportu kinaz białkowych PKA, Akt, PKC i JNK do mitochondriów. Nie są też w pełni opisane białka, które biorą udział w transporcie aktywnych domen kinaz białkowych. Wstępne badania sugerują udział białek transportujących TOM (ang. *translocase of outer membrane*) oraz TIM (ang. *translocase of inner membrane*) [83], białek zdających się być kotwicą dla kinaz, np. białek receptorowych RICK (ang. *receptors for inactive C kinase*) i RACK (ang. *receptors for activated C kinase*) dla izoform PKC [84,85], czy białek kotwiczących z rodziny AKAP dla PKA [19]. Dodatkowo, przypuszcza się, że białko PICK1 (ang. *protein that interact with protein C kinase*) przenosi PKC α z cytosolu do mitochondriów [86], natomiast białko β' COP (ang. *β' coatamer protein*) wydaje się być specyficznym białkiem RACK dla izoformy PKC ϵ [87]. Nie jest znany mechanizm transportu kinazy PKB/Akt do mitochondriów. Sugerowany jest udział translokazy białka szoku cieplnego w powiązaniu z białkiem TOM20 [29].

Dotatkowo istnieje szereg kinaz białkowych towarzyszących kinazom białkowym docelowo przenoszonym do błon oraz wnętrza mitochondriów, które pośrednio wpływają na aktywację szlaków sygnałowych prowadzących do przeżycia lub śmierci komórek [88-90]. Do takich kinaz należy m.in. cytoplazmatyczna kinaza białkowa G (PKG),

która w wyniku krótkotrwałego, hartującego niedokrwienia serca jest aktywowana przez cykliczne GMP (cGMP). PKG prawdopodobnie fosforyluje nieznanne białko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, które w wyniku niezbadanego mechanizmu przenosi dalej sygnał do znajdującej się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej PKC ϵ . Wiele doświadczeń wskazuje, że aktywna PKC ϵ oddziałuje następnie z kanałem potasowym $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Fosforylacja bądź inne modulacje kanału dają komórce wyraźny efekt ochronny[90].

PIŚMIENNICTWO

- Houslay MD (1991) 'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem* 195: 9-27
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 793-805
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Delouille JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca^{2+} stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21: 869-883
- Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G (2003) Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem* 278: 26715-26721
- Downward J (2001) The ins and outs of signalling. *Nature* 411: 759-762
- Nowak JZ, Zawilska JB (2004) Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, Wydanie drugie rozszerzone. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Thomson M (2002) Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 59: 213-219
- Horbinski C, Chu CT (2005) Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic Biol Med* 38: 2-11
- Technikova-Dobrova Z, Sardanelli AM, Stanca MR, Papa S (1994) cAMP-dependent protein phosphorylation in mitochondria of bovine heart. *FEBS Lett* 350: 187-191
- Technikova-Dobrova Z, Sardanelli AM, Speranza F, Scacco S, Signorile A, Lorusso V, Papa S (2001) Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of mammalian mitochondrial proteins: enzyme and substrate characterization and functional role. *Biochemistry* 40: 13941-13947
- Affaitati A, Cardone L, de Cristofaro T, Carlucci A, Ginsberg MD, Varrone S, Gottesman ME, Avvedimento EV, Feliciello A (2003) Essential role of A-kinase anchor protein 121 for cAMP signaling to mitochondria. *J Biol Chem* 278: 4286-4294
- Cardone L, Carlucci A, Affaitati A, Livigni A, DeCristofaro T, Garbi C, Varrone S, Ullrich A, Gottesman ME, Avvedimento EV, Feliciello A (2004) Mitochondrial AKAP121 binds and targets protein tyrosine phosphatase D1, a novel positive regulator of src signaling. *Mol Cell Biol* 24: 4613-4626
- Livigni A, Scorziello A, Agnese S, Adornetto A, Carlucci A, Garbi C, Castaldo I, Annunziato L, Avvedimento EV, Feliciello A (2006) Mitochondrial AKAP121 links cAMP and src signaling to oxidative metabolism. *Mol Biol Cell* 17: 263-271
- Dyson MT, Jones JK, Kowalewski MP, Manna PR, Alonso M, Gottesman ME, Stocco DM (2008) Mitochondrial A-kinase anchoring protein 121 binds type II protein kinase A and enhances steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biol Reprod* 78: 267-277
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19: 2647-2659
- Manna PR, Jo Y, Stocco DM (2007) Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol* 193: 53-63
- Downward J (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15: 177-182
- Poderoso C, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, Maciel FC, Paz C, Carreras MC, Poderoso JJ, Podesta EJ (2008) A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS ONE* 3: e1443
- Perkins GA, Wang L, Huang LJ, Humphries K, Yao VJ, Martone M, Deerinck TJ, Barraclough DM, Violin JD, Smith D, Newton A, Scott JD, Taylor SS, Ellisman MH (2001) PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci* 2: 17
- Bijur GN, Jope RS (2003) Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87: 1427-1435
- Kang BP, Urbonas A, Baddoo A, Baskin S, Malhotra A, Meggs LG (2003) IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1013-F1024
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65: 391-426
- Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA (2008) PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* 20: 21-30
- Bijur GN, Jope RS (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276: 37436-37442
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem* 275: 7583-7590
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20: 2567-2574
- Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM (2005) Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 100: 397-403
- Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E (2005) Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 19: 1323-1325
- Kobayashi H, Miura T, Ishida H, Miki T, Tanno M, Yano T, Sato T, Hotta H, Shimamoto K (2008) Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, w druku
- Parker PJ, Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* 117: 131-132
- Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC (2006) Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1761: 633-654
- Metzger F, Kapfhammer JP (2003) Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity. *Cerebellum* 2: 206-214
- Steinberg SF (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ . *Biochem J* 384: 449-459
- Ramakers GM, Pasinelli P, Hens JJ, Gispen WH, De Graan PN (1997) Protein kinase C in synaptic plasticity: changes in the in situ phosphorylation state of identified pre- and postsynaptic substrates. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 21: 455-486
- Nakajima T (2006) Signaling cascades in radiation-induced apoptosis: roles of protein kinase C in the apoptosis regulation. *Med Sci Monit* 12: RA220-RA224
- Fernandez E, Cuenca N, Garcia M, De Juan J (1995) Two types of mitochondria are evidenced by protein kinase C immunoreactivity in the Muller cells of the carp retina. *Neurosci Lett* 183: 202-205
- Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D (2000) Mitochondrial translocation of protein kinase

- C δ in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 275: 21793-21796
38. Majumder PK, Mishra NC, Sun X, Bharti A, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D (2001) Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ* 12: 465-470
 39. Denning MF, Wang Y, Tibudan S, Alkan S, Nickoloff BJ, Qin JZ (2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ* 9: 40-52
 40. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH (1999) Protein kinase C δ targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 19: 8547-8558
 41. He Y, Liu J, Grossman D, Durrant D, Sweatman T, Lothstein L, Epand RF, Epand RM, Lee RM (2007) Phosphorylation of mitochondrial phospholipid scramblase 3 by protein kinase C δ induces its activation and facilitates mitochondrial targeting of tBid. *J Cell Biochem* 101: 1210-1221
 42. Van Q, Liu J, Lu B, Feingold KR, Shi Y, Lee RM, Hatch GM (2007) Phospholipid scramblase-3 regulates cardiolipin de novo biosynthesis and its resynthesis in growing HeLa cells. *Biochem J* 401: 103-109
 43. Liu J, Chen J, Dai Q, Lee RM (2003) Phospholipid scramblase 3 is the mitochondrial target of protein kinase C delta-induced apoptosis. *Cancer Res* 63: 1153-1156
 44. Liu J, Dai Q, Chen J, Durrant D, Freeman A, Liu T, Grossman D, Lee RM (2003) Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol Cancer Res* 1: 892-902
 45. Liu J, Weiss A, Durrant D, Chi NW, Lee RM (2004) The cardiolipin-binding domain of Bid affects mitochondrial respiration and enhances cytochrome c release. *Apoptosis* 9: 533-541.
 46. Uecker M, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M (2003) Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 99: 138-147
 47. Inagaki K, Hahn HS, Dorn GW, Mochly-Rosen D (2003) Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. *Circulation* 108: 869-875
 48. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulini I (2007) The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1007-1031
 49. Budas GR, Churchill EN, Mochly-Rosen D (2007) Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* 55: 523-536
 50. Budas GR, Mochly-Rosen D (2007) Mitochondrial protein kinase Cepsilon (PKCepsilon): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. *Biochem Soc Trans* 35: 1052-1054
 51. Ogbi M, Chew CS, Pohl J, Stuchlik O, Ogbi S, Johnson JA (2004) Cytochrome c oxidase subunit IV as a marker of protein kinase Cepsilon function in neonatal cardiac myocytes: implications for cytochrome c oxidase activity. *Biochem J* 382: 923-932.
 52. Ogbi M, Johnson JA (2006) Protein kinase C ϵ interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochem J* 393: 191-199
 53. Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P (2003) Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 92: 873-880
 54. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166
 55. Szewczyk A, Wojtczak L (2002) Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54: 101-127
 56. Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A (2005) Matrix Mg²⁺ regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS Lett* 579: 1625-1632
 57. Otani H (2004) Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 6: 449-469
 58. Jaburek M, Costa AD, Burton JR, Costa CL, Garlid KD (2006) Mitochondrial PKC ϵ and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ Res* 99: 878-883
 59. Karandikar M, Xu S, Cobb MH (2000) MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* 275: 40120-40127
 60. Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA (2004) Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* 427: 256-260
 61. von Kriegsheim A, Pitt A, Grindlay GJ, Kolch W, Dhillon AS (2006) Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5. *Nat Cell Biol* 8: 1011-1016
 62. Wang HG, Rapp UR, Reed JC (1996) Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87: 629-638
 63. Wang HG, Reed JC (1998) Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors* 8: 13-16
 64. Dłuzniewska J, Beresewicz M, Wojewodzka U, Gajkowska B, Zablocka B. (2005) Transient cerebral ischemia induces delayed proapoptotic bad translocation to mitochondria in CA1 sector of hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 133: 274-280
 65. Zhong J, Troppmair J, Rapp UR (2001) Independent control of cell survival by Raf-1 and Bcl-2 at the mitochondria. *Oncogene* 20: 4807-4816
 66. Le Mellay V, Troppmair J, Benz R, Rapp UR (2002) Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 3: 14
 67. Salvi M, Brunati AM, Bordin L, La Rocca N, Clari G, Toninello A (2002) Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1589: 181-195
 68. Garcia FM, Troiano L, Moretti L, Pedrazzi J, Salvioli S, Castilla-Cortazar I, Cossarizza A (2000) Changes in intramitochondrial cardiolipin distribution in apoptosis-resistant HCW-2 cells, derived from the human promyelocytic leukemia HL-60. *FEBS Lett* 478: 290-294
 69. Miyazaki T, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R (2003) Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J Cell Biol* 160: 709-718
 70. Miyazaki T, Tanaka S, Sanjay A, Baron R (2006) The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* 16: 68-74
 71. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40
 72. Holmes WF, Soprano DR, Soprano KJ (2003) Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene* 22: 6377-6386
 73. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *NatMed* 10(Suppl): S2-S9
 74. Bossy-Wetzel E, Talantova MV, Lee WD, Scholzke MN, Harrop A, Mathews E, Gotz T, Han J, Ellisman MH, Perkins GA, Lipton SA (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron* 41: 351-365
 75. Epperly MW, Sikora CA, DeFilippi SJ, Gretton JA, Zhan Q, Kufe DW, Greenberger JS (2002) Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane. *Radiat Res* 157: 568-577
 76. Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C, Cadenas E (2003) c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J* 372: 359-369
 77. Wiltshire C, Gillespie DA, May GH (2004) Sab (SH3BP5), a novel mitochondria-localized JNK-interacting protein. *Biochem Soc Trans* 32: 1075-1077

78. Wiltshire C, Matsushita M, Tsukada S, Gillespie DA, May GH (2002) A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria. *Biochem J* 367: 577-585
79. Nowak G (2002) Protein kinase C- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 277: 43377-43388
80. Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS Jr (2000) Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1578-1583
81. Alonso M, Melani M, Converso D, Jaitovich A, Paz C, Carreras MC, Medina JH, Poderoso JJ (2004) Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *J Neurochem* 89: 248-256
82. Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT (2003) Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol* 13: 473-481
83. Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9: 42-49
84. Frazier AE, Chacinska A, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P (2003) Mitochondria use different mechanisms for transport of multi-spanning membrane proteins through the intermembrane space. *Mol Cell Biol* 23: 7818-7828
85. Truscott KN, Brandner K, Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13: R326-R337
86. Wang WL, Yeh SF, Chang YI, Hsiao SF, Lian WN, Lin CH, Huang CY, Lin WJ (2003) PICK1, an anchoring protein that specifically targets protein kinase C α to mitochondria selectively upon serum stimulation in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 278: 37705-37712
87. Csukai M, Chen CH, De Matteis MA, Mochly-Rosen D (1997) The coatamer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C ϵ . *J Biol Chem* 272: 29200-29206
88. Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 27: 317-323
89. Lasfer M, Davenne L, Vadrot N, Alexia C, Sadjji-Ouatas Z, Bringuier AF, Feldmann G, Pessayre D, Reyl-Desmars F (2006) Protein kinase PKC delta and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73 and Fas receptor. *FEBS Lett* 580: 2547-2552
90. Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD (2003) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res* 77: 344-352

Protein kinases in mitochondria

Joanna Ewa Kowalczyk[✉], Barbara Zabłocka

Molecular Biology Unit, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Science, 5 Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: jkowalczyk@cmdik.pan.pl

Key words: mitochondria, protein kinase, signal transduction, ischaemia preconditioning, apoptosis

ABSTRACT

Mitochondria, besides playing a central role in energy metabolism within the cell, are involved in a cohort of other processes like cellular differentiation and apoptosis. Investigations during recent few years have shown that protein kinases, including PKA, PKB/Akt, PKC, Raf-1, p38 MAPK, JNK, ERK1/2, Src, Fyn and Csk, may directly interact with mitochondrial proteins. Their role mainly concentrates at phosphorylation of pro- and anti-apoptotic proteins (Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-x_l), phosphorylation/modification of electron transport chain proteins (complex I, COIV), MPTP forming proteins VDAC and ANT, proteins of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mitoK_{ATP}) and phospholipid scramblase 3 (PLSCR3). Many experimental data showed the presence of protein kinases in the outer and inner mitochondrial membranes as well as in the mitochondrial matrix during *in vitro* cell stimulations, in neurodegenerative diseases and in *in vivo* ischaemia heart preconditioning. These data show that translocation of protein kinases to mitochondria plays an important role especially during ischaemia/reperfusion in brain and heart.

Zastosowanie elektroforezy „Blue Native” w badaniach mitochondrialnego łańcucha oddechowego w normie i patologii

STRESZCZENIE

Opracowana pod koniec XX wieku, elektroforeza „Blue Native” wykorzystywana jest do badania składu kompleksów białkowych oraz w diagnostyce chorób mitochondrialnych, związanych z uszkodzeniami łańcucha oddechowego. Białka i kompleksy białkowe rozdzielone w żelu za pomocą tej techniki zachowują swoją aktywność enzymatyczną. W artykule opisano kluczowe etapy elektroforezy „Blue Native” determinujące jakość rozdzielania oraz użyteczność tej techniki w badaniach mitochondrialnego łańcucha oddechowego w komórkach zdrowych i dotkniętych patologią.

WPROWADZENIE

Wiele białek oddziałuje ze sobą, tworząc kompleksy i dzięki temu mogą spełniać w komórce wyspecjalizowane funkcje. W ostatnim czasie nastąpił dynamiczny rozwój takich kierunków biologii molekularnej, jak badania kompleksów białkowych (ang. *complexomics*) oraz oddziaływania białko-białko (ang. *interactomics*). Sprawilo to, że niezbędne stało się opracowanie metod pozwalających na dokładniejsze poznanie i identyfikacje obecnych w komórce kompleksów białkowych. Do metod, które to umożliwiają należy elektroforeza „Blue Native” (BN-PAGE), immunoprecypitacja, dwustopniowe oczyszczanie metodą powinowactwa (ang. *two step affinity purification*) oraz drożdżowy system dwuhybrydowy (ang. *two hybryde system*).

Elektroforeza „Blue Native” jest jedną z najpopularniejszych metod badania białek w ich natywnej formie. Technika ta rozwija się intensywnie od początku lat 90. ubiegłego wieku i jest ciągle udoskonalana [1]. Jej twórcami są niemieccy badacze Schägger i Von Jagow [2]. Początkowo służyła głównie do badania kompleksów łańcucha oddechowego izolowanych z błon mitochondriów [2]. W ostatnich latach technika ta znalazła również szereg innych zastosowań, np. w diagnostyce chorób mitochondrialnych (związanych z uszkodzeniami łańcucha oddechowego) [3], czy jako metoda komplementarna do immunoprecypitacji w badaniach oddziaływań białek [4]. Ogromną zaletą BN-PAGE jest to, że w trakcie rozdzielania elektroforetycznego zachowywana jest oryginalna aktywność enzymatyczna oraz oddziaływania białek wchodzących w skład kompleksów [2]. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu optymalnych warunków zarówno podczas izolacji, jak i rozdzielania.

ELEKTROFOREZA „BLUE NATIVE” I SDS-PAGE – RÓŻNICE I PODOBIENSTWA

SDS-PAGE

Do rozdzielania elektroforetycznego typu SDS-PAGE białka należy zdenaturować i „opłaszczyc” jonowym detergentem dodecylosiarczanem sodu (SDS). Zasada rozdzielania białek z zastosowaniem SDS-PAGE jest stosunkowo prosta. SDS w trakcie przygotowania próbki wiąże się z białkami w stosunku masowym 4,1:1, nadając im ujemny ładunek elektryczny o stałej gęstości, bez względu na wielkość białka. W tego typu elektroforezie szybkość migracji białek w żelu nie jest determinowana przez wielkość ładunku elektrycznego, lecz zależy wyłącznie od masy białka. Białka rozdzielane są w żelu poliakryloamidowym na podstawie zróżnicowanej ruchliwości elektroforetycznej w polu elektrycznym. Ruchliwość ta jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu masy cząsteczkowej białka. W rzeczywistości białka rozdzielane są w SDS-PAGE na zasadzie filtracji, analogicznie do metody chromatograficznej (sączenie molekularne). Ten typ elektroforezy pozwala na rozdzielanie białek o masach cząsteczkowych w zakresie ok. 10–400 kDa [5].

Magdalena Lebedzińska

Jerzy Duszyński

Mariusz R. Więckowski✉

Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

✉Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: m.wieckowski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 14 kwietnia 2008 r.
Artykuł zaakceptowano 22 kwietnia 2008 r.

Słowa kluczowe: elektroforeza „Blue Native”, mitochondria, mitochondrialny łańcuch oddechowy, diagnostyka chorób mitochondrialnych, oddziaływania białek

Wykaz skrótów: BN-PAGE – elektroforeza „Blue Native” w żelu poliakryloamidowym; CN-PAGE – elektroforeza „Clear Native” w żelu poliakryloamidowym; DTT – ditiotreitól; OXPHOS – fosforylacja oksydacyjna; SDS – dodecylosiarczan sodu; SDS-PAGE – elektroforeza poliakryloamidowa białek w warunkach denaturujących

Podziękowania: Praca doświadczalna autorów oraz wyniki przedstawione na rycinach niniejszego opracowania zostały częściowo sfinansowane z funduszy przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na realizację projektu badawczego N301 092 32/3407 oraz przez Polską Sieć Mitochondrialną

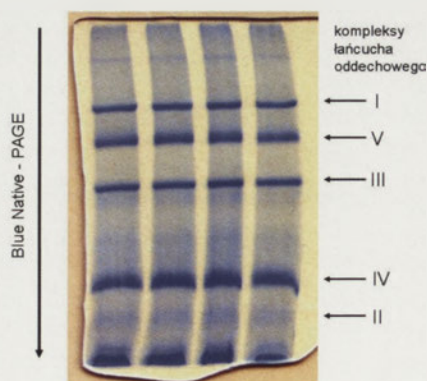
W odróżnieniu od elektroforezy denaturującej, na każdym etapie elektroforezy „Blue Native”, czyli podczas przygotowania próbki oraz jej rozdzielania w żelu, białka zachowują swoją strukturę drugo-, trzecio- i czwartorzędową. Elektroforeza „Blue Native” pozwala na rozdzielanie białek/kompleksów białkowych o znacznie większej masie w porównaniu z elektroforezą SDS-PAGE. Przy zastosowaniu standardowego poliakryloamidowego żelu gradientowego (4–16% poliakryloamid) można rozdzielić białka o masie od 100 kDa do 1,5–2 MDa. Dodatkowe obniżenie stężenia akryloamidu pozwala na rozszerzenie tego zakresu nawet do 4 MDa. Zastąpienie żelu poliakryloamidowego agarozowym przesunęło tę granicę jeszcze dalej – nawet do 10 ~ 15 MDa. Daje to możliwość badania dużych kompleksów białkowych, np. takich jak kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, który ma masę około 8 MDa [6]. Wykorzystywany w elektroforezie BN-PAGE barwnik Coomassie Brilliant Blue G-250 zmienia ładunek białek na ujemny oraz zmniejsza tendencję białek o dużych powierzchniach hydrofobowych do agregacji umożliwiając ich rozdzielanie elektroforetyczne. Przykładowy obraz rozdzielania kompleksów łańcucha oddechowego wyizolowanych z mitochondriów serca szczura przedstawiono na Ryc. 1.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ROZDZIAŁ KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH W ELEKTROFOREZIE „BLUE NATIVE”

Uzyskanie rozdzielania porównywalnego z przedstawionym na Ryc. 1 jest możliwe przy przestrzeganiu kilku zasad wymienionych poniżej.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO ROZDZIAŁU ELEKTROFORETYCZNEGO – WYBÓR ODPOWIEDNIEGO DETERGENTU

Jednym z ważniejszych etapów, zasługujących na szczególną uwagę, jest etap przygotowania próbki, która ma być poddawana rozdzielaniu elektroforetycznemu. W przypadku białek błonowych polega on na „wydobyciu” kompleksów białkowych z ich naturalnego środowiska lipidowego, w taki sposób, aby nie naruszyć struktury samego kompleksu. W elektroforezie „Blue Native”, ze



Rycina 1. Elektroforetyczny rozdzielanie kompleksów łańcucha oddechowego wyizolowanych z mitochondriów serca szczura przy użyciu elektroforezy „Blue Native”. Żel poliakryloamidowy (gradient 5–13%), n-dodecylo- β -D-maltozyd – 1%.

względu na potrzebę zachowania białek w formie niezdenaturowanej oraz oddziaływań pomiędzy białkami, nie jest możliwe zastosowanie tak silnego detergentu jonowego jakim jest SDS i dlatego wykorzystuje się detergenty niejonowe. Błony organelli komórek eukariotycznych charakteryzują się różnym składem lipidowym oraz zawartością białek. W związku z tym, w zależności od badanego materiału, niezbędne jest dobranie odpowiedniego detergentu oraz jego stężenia do solubilizacji błon. Użyty detergent nie może doprowadzić do rozpadu kompleksów białkowych, a jednocześnie powinien być na tyle efektywny żeby „rozerwać” wiązania pomiędzy białkami i lipidami. Do najczęściej stosowanych detergentów niejonowych należą n-dodecylo- β -D-maltozyd [2], digitonina [7], Triton X-100 [7], saponina [8] oraz Brij 96 [8]. W niektórych przypadkach stosuje się Big, CHAPS, NP-40 oraz n-dekanoilosacharozę [9]. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie najbardziej popularnych detergentów i ich zastosowanie.

SILA JONOWA

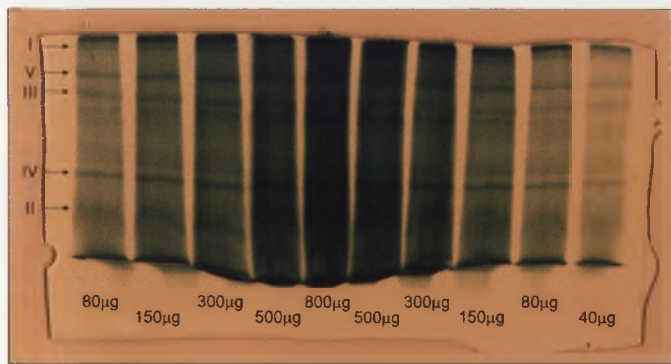
Czynnikiem wpływającym na wydajność ekstrakcji kompleksów z błon jest odpowiedni skład roztworu, w którym przeprowadza się solubilizację błon. Najczęściej do tego celu wykorzystuje się roztwory o niskiej sile jonowej. Warunki takie zapewnić może roztwór kwasu aminokapronowego, bądź octanu potasu. Rozpuszczalne kompleksy białkowe są szczególnie wrażliwe na warunki panujące w trakcie przygotowywania próbki, ponieważ oddziaływania pomiędzy białkami mogą ulegać osłabieniu nawet przy bardzo niskiej sile jonowej.

COOMASSIE BRILLIANT BLUE G-250

W niektórych przypadkach stabilność kompleksów może być zwiększona poprzez obniżenie stężenia Coomassie Brilliant Blue w próbce przygotowanej do elektroforezy. W tym przypadku ilość barwnika, który standardowo jest obecny w buforze katodowym, wystarcza do prawidłowego przebiegu elektroforezy i pozwala na rozdzielanie kompleksów białkowych. Kiedy bufor katodowy oraz próbka przygotowana do elektroforezy nie zawierają Coomassie Brilliant Blue mamy do czynienia z elektroforezą „Clear Native”-PAGE (CN-PAGE) [10]. Wykonuje się ją wtedy, gdy istnieje podejrzenie, że stabilność kompleksów, bądź superkompleksów białkowych może być obniżana przez obecny barwnik. Ten typ elektroforezy

Tabela 1. Detergenty wykorzystywane do ekstrakcji białek w elektroforezie „Blue Native”.

Detergent	Materiał	Stężenie
Digitonina	mitochondria ssaków	1–2%
	mitochondria roślin	1–2%
n-dodecylo- β -D-maltozyd	mitochondria ssaków	4 mg/mg białka
	mitochondria roślin	5 mg/mg białka
Triton X-100	mitochondria ssaków	1–3%
	mitochondria roślin	0,5%
	totalny ekstrakt komórkowy	0,1%
Saponina	totalny ekstrakt komórkowy	1%
Brij 96	totalny ekstrakt komórkowy	0,5%

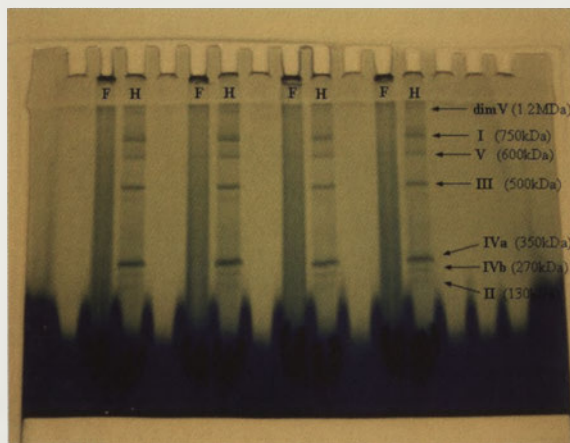


Rycina 2. Wpływ ilości białka na rozdzielanie kompleksów łańcucha oddechowego wyizolowanych z mitochondriów wątroby szczura przy użyciu elektroforezy „Blue Native”. Żel poliakryloamidowy (gradient 6–13%), n-dodecylo-β-D-maltozyd – 1% (wg [16], zmodyfikowane, za zgodą).

jest również z powodzeniem wykorzystywany w diagnostyce chorób mitochondrialnych [11].

RODZAJ ROZDZIELANYCH KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH

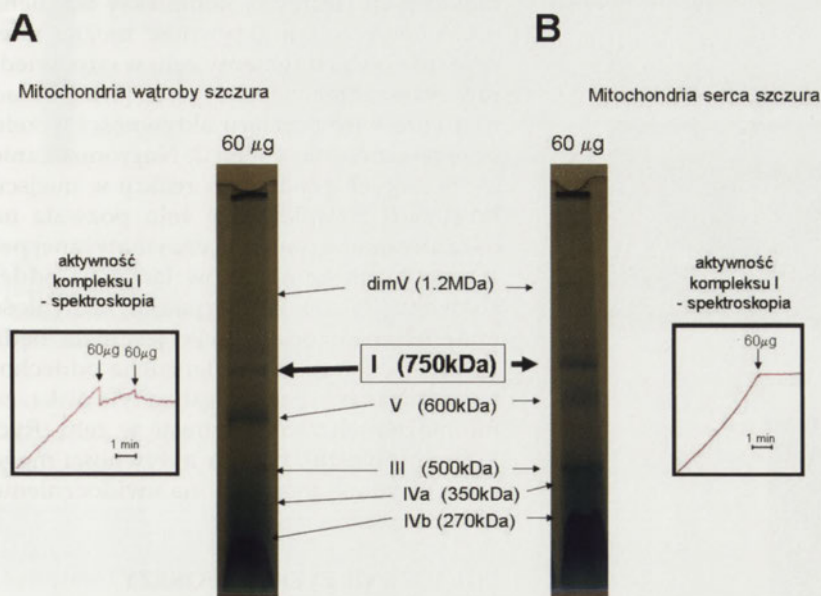
Najwięcej problemów przysparza badaczom wykonanie elektroforezy „Blue Native” z lizatu komórkowego zawierającego wszystkie białka komórki, zarówno błonowe, jak i rozpuszczalne (cytosolowe). Camacho-Carvajal i wsp. stwierdzili, że w cytosolu znajduje się niskocząsteczkowy (mniejszy niż 3,5 kDa) czynnik, który zaburza rozdzielanie elektroforetyczne [8]. Jakość rozdzielania kompleksów białkowych metodą BN-PAGE można poprawić pozbywając się tego czynnika, np. metodą dializy.



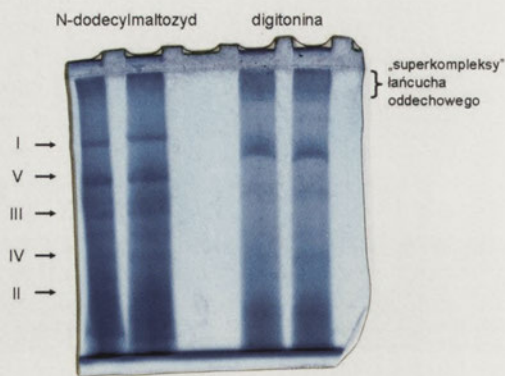
Rycina 3. Typowy obraz położenia kompleksów łańcucha mitochondrialnego w żelu „Blue Native” mitochondriów serca wołu (H) i fibroblastów (F). Żel poliakryloamidowy (gradient 5–12%), n-dodecylo-β-D-maltozyd – 1%, (wg [16], zmodyfikowane, za zgodą).

ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY – ZAWARTOŚĆ AKRYLOAMIDU W ŻELU ORAZ ILOŚĆ ROZDZIELANEGO MATERIAŁU

Kolejnymi parametrami w elektroforezie „Blue Native”, determinującymi jakość rozdzielania kompleksów łańcucha oddechowego, są stężenie akryloamidu w żelu oraz ilość materiału biologicznego nałożonego na żel [1]. Na przykładzie preparatu przygotowanego z mitochondriów wątroby szczura widać, że zwiększanie ilości białka nałożonego na ścieżkę w celu podniesienia widoczności kompleksów w żelu ma swoje ograniczenia, a przeladowanie przynosi wręcz odwrotny rezultat (Ryc. 2). Zastosowanie poliakryloamidowego żelu gradientowego (6–12%) pokazuje, że najlepszy rozdzielanie kompleksów łańcucha oddechowego obserwujemy w przedziale 500–100 kDa, czyli dla kompleksów III, IV i II. Zmiana gradientu na 5–12% skutkuje lepszym rozdzielaniem w zakresie 800–350 kDa, co umożliwi poprawienie rozdzielania kompleksów I, V, III i IV (Ryc. 3). Z kolei zastosowanie żelu o gradientzie 4–12% poprawia rozdzielanie znacznie większych kompleksów z zakresu 2 MDa – 600 kDa, np. dimeru ATPazy o masie 1,2 MDa (Ryc. 4). Prawidłowo przeprowadzona elektroforeza „Blue Native” pozwala na porównanie profili rozdzielonych kompleksów łańcucha oddechowego mitochondriów wyizolowanych z różnych tkanek lub narządów. Na przykładzie elektroforetycznego rozdzielania kompleksów białkowych z mitochondriów wątroby i serca szczura można stwierdzić, że w mitochondriach serca jest więcej kompleksu I niż w mitochondriach wątroby. Jest to zgodne z przeprowadzonymi spektrofotometrycznymi pomiarami w badanych mitochondriach aktywności kompleksu I. Aby zaobserwować porównywalną aktywność kompleksu I, należy użyć do pomiaru dwukrotnie więcej mitochondriów wątroby



Rycina 4. Porównanie rozdzielania kompleksów łańcucha oddechowego z mitochondriów wątroby i serca szczura przy użyciu elektroforezy „Blue Native”. Żel poliakryloamidowy (gradient 4–12%), n-dodecylo-β-D-maltozyd – 1%. Typowy obraz położenia kompleksów OXPHOS w żelu oraz spektrofotometryczny pomiar aktywności kompleksu I – (A) w mitochondriach wątroby szczura i (B) serca szczura (wg [16], zmodyfikowane, za zgodą).



Rycina 5. Wpływ detergentu na rodzaj izolowanych kompleksów łańcucha oddechowego. Elektroforeza „Blue Native” mitochondriów wątroby myszy. Żel poliakryloamidowy (gradient 5–12%), n-dodecyl- β -D-maltozyd – 1%, digitonina – 2%. Digitonina umożliwia wyizolowanie i rozdział „superkompleksów” łańcucha oddechowego.

(Ryc. 4). Obserwacja ta czyni z elektroforezy „Blue Native” metodę, którą można z powodzeniem stosować do określania poziomu poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w badanym materiale.

SOLUBILIZACJA

Jak już wcześniej wspomniano, niezwykle ważny jest staranny dobór detergentu i jego stężenia w zależności od materiału wykorzystywanego do badań. Ponadto, detergent może mieć wpływ na obraz rozdzielania elektroforetycznego, bowiem w zależności od tego, który detergent wykorzystany zostanie do „ekstrakcji” kompleksów łańcucha oddechowego z mitochondriów, otrzymamy różny

profil białkowy w żelu. W przypadku zastosowania n-dodecyl- β -D-maltozydu (lub Tritonu X-100) kompleksy łańcucha oddechowego występują w postaci monomerycznej (Ryc. 1–4), z wyjątkiem ATPazy, która może występować także jako dimer o masie 1,2 MDa. Gdy do ekstrakcji kompleksów użyje się digitoninę, w żelu można obserwować także „superkompleksy” tworzone przez kompleksy łańcucha oddechowego. Więcej na temat superkompleksów, tworzonych przez kompleksy łańcucha oddechowego można znaleźć w literaturze [7,12–15]. Różnice w profilu białkowym dla n-dodecylmaltozydu i digitoniny przedstawiono na Ryc. 5.

INNE PARAMETRY

Elektroforeza przebiega bez zakłóceń i jest powtarzalna wtedy, gdy utrzymuje się stałą, niską temperaturę (4°C) podczas przygotowywania próbki oraz w trakcie rozdzielania. Ważne jest także unikanie jonów soli oraz stosowanie się do reżimu zmian napięcia w trakcie elektroforezy. Przestrzeganie tych zasad sprawia, że elektroforeza „Blue Native” daje wiarygodne i powtarzalne wyniki. Na Ryc. 6 przedstawiono przykład nieudanego rozdzielania elektroforetycznego „Blue Native” w żelu akryloamidowym i agarozowym. W obu przypadkach można w żelu zaobserwować miejsce (charakterystyczna linia), gdzie ulegają rozpadowi kompleksy białkowe. Przyczyną takiego stanu rzeczy może być wysoka zawartość jonów w próbce lub przegrzewanie się żelu w trakcie elektroforezy.

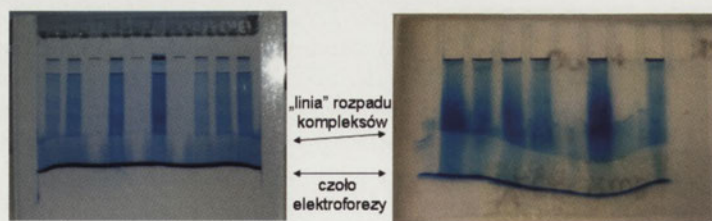
AKTYWNOŚĆ W ŻELU (ANG. IN GEL ACTIVITY ASSAY)

Jedną z zalet elektroforezy „Blue Native” jest to, że białka oraz kompleksy białkowe zachowują swoją aktywność enzymatyczną w trakcie rozdzielania elektroforetycznego. Dotyczy to również tak złożonych kompleksów białkowych jakimi są kompleksy łańcucha oddechowego. Ich aktywność można zmierzyć inkubując fragmenty żelu w odpowiednich mieszaninach reakcyjnych [3,16]. Skład roztworów do pomiaru aktywności w żelu przedstawiono w Tabeli 2. Nagromadzenie się barwnych produktów reakcji w miejscu lokalizacji kompleksu w żelu pozwala na oszacowanie aktywności enzymatycznej poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego (Ryc. 7). W przypadku, kiedy ilość materiału nałożonego na żel jest mała, bądź zawartość kompleksów łańcucha oddechowego w badanej próbce jest na tyle niska, że nie można ich zaobserwować w żelu (Ryc. 3, F- fibroblasty), pomiar aktywności może być jednym ze sposobów na uwidocznienie ich obecności w żelu.

POŁĄCZENIE ELEKTROFOREZY „BLUE NATIVE” Z SDS-PAGE

Połączenie elektroforezy „Blue Native” z innymi technikami stosowanymi w biologii molekularnej może pozwolić na dokładniejsze scharakteryzowanie słabo jeszcze po-

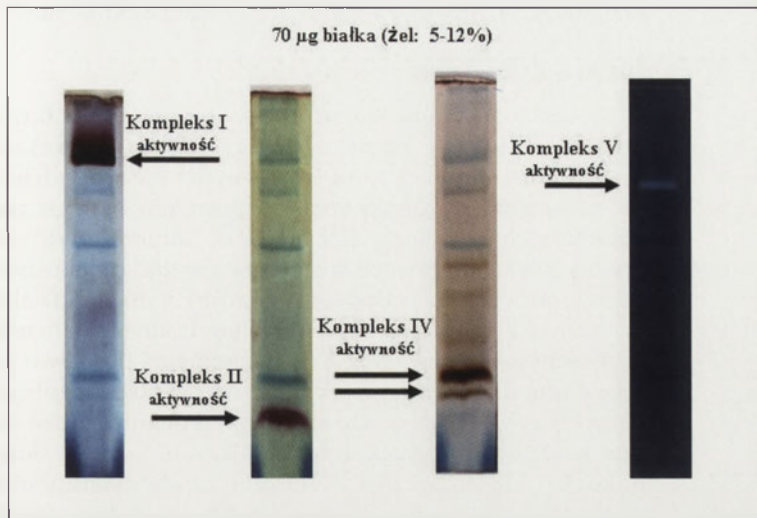
A Elektroforeza Blue Native w żelu poliakryloamidowym



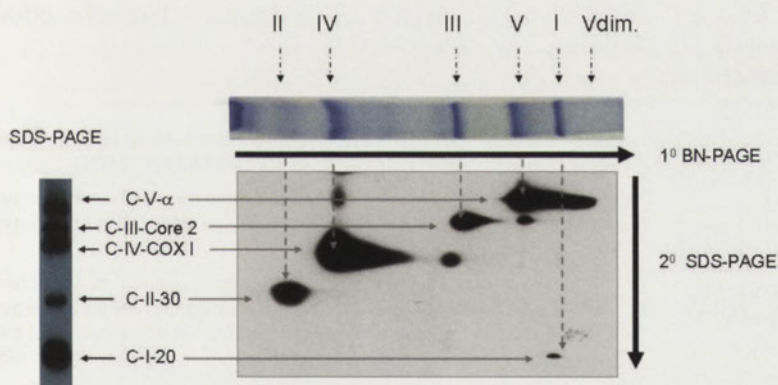
B Elektroforeza Blue Native w żelu agarozowym



Rycina 6. Przykłady nieudanego rozdzielania elektroforetycznego „Blue Native” w żelu akryloamidowym (A) i w żelu agarozowym (B).



Rycina 7. Test aktywności w żelu kompleksów łańcucha oddechowego mitochondriów wątroby szczura wykonany po przeprowadzeniu elektroforezy „Blue Native”. Żel poliakryloamidowy (gradient 5-12%), n-dodecylo-β-D-maltozyd – 1% (wg [16], zmodyfikowane, za zgodą).



Rycina 8. Elektroforeza dwukierunkowa „Blue Native”/SDS-PAGE mitochondriów serca szczura. Pierwszy kierunek – elektroforeza „Blue Native”, żel poliakryloamidowy (gradient 5-12%) wybarwiony Coomassie Brilliant Blue G250, n-dodecylo-β-D-maltozyd – 1%. Drugi kierunek – SDS-PAGE. Żel poliakryloamidowy 10%. Western Blot – przeciwciała monoklonalne 1:5000 (Total Oxphos MitoSciences).

Tabela 2. Skład roztworów do pomiaru aktywności w żelu na podstawie [3].

Kompleksy łańcucha oddechowego	Mieszniina reakcyjna
Kompleks I	3 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mg NADH, 5 mg nitrotetrazolium blue
Kompleks II	1.5 mM bufor fosforanowy (pH 7.4), 5 mM EDTA, 10 mM KCN, 0.2 mM phenazine methasulfate, 50 mM bursztynian sodu, 5 mg nitrotetrazolium blue
Kompleks IV	50 mM bufor fosforanowy (pH 7.4), 5 mg 3,3'-diamidobenzidine tetrahydrochloride, 200 µg katalazy, 10 mg cytochromu c, 750 mg sacharozy
Kompleks V	35 mM Tris-HCl, 270 mM glicyna, 14 mM MgSO ₄ (pH 7.8), 0.2% Pb(NO ₃) ₂ , 8 mM ATP

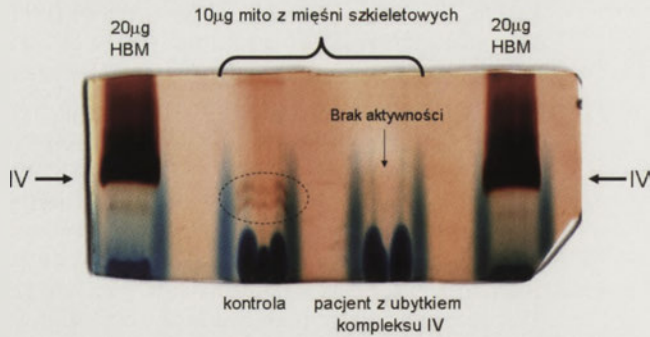
znanych kompleksów białkowych. Elektroforeza Blue Native wykonywana jest dla rozdzielu kompleksów białkowych. Elektroforeza SDS-PAGE jest zazwyczaj następnym krokiem (drugi kierunek rozdzielu) w badaniach składu kompleksów rozdzielonych podczas elektroforezy „Blue Native” [14]. Paski żelu z rozdzielonymi kompleksami inkubowane są w warunkach denaturujących i redukujących (w obecności SDS i 2-merkaptotolanolu lub DTT), aby doprowadzić do rozpadu kompleksów białkowych. Tak przygotowany materiał jest rozdzielany w żelu poliakryloamidowym, ale już tym razem w obecności SDS. Następnie, techniką Western Blot, za pomocą przeciwciał, może być badany ich skład. Na Ryc. 8 przedstawiono przykładowy rozdziel elektroforetyczny BN-PAGE/SDS-PAGE kompleksów łańcucha oddechowego wyizolowanych z mitochondriów serca szczura.

DIAGNOSTYKA CHOROÓB MITOCHONDRIALNYCH

Elektroforeza „Blue Native” w powiązaniu z techniką pomiaru aktywności w żelu i elektroforezą SDS-PAGE z powodzeniem może być wykorzystywana w badaniach defektów oksydacyjnej fosforylacji w tkankach pacjentów, u których podejrzewa się chorobę mitochondrialną [3,11,16]. Próbkę badane z zastosowaniem elektroforezy „Blue Native” mogą pochodzić z różnych tkanek, bądź z hodowli komórkowych, np fibroblastów pacjentów. Po każdym z etapów procedury diagnostycznej otrzymujemy cząstkowe wyniki, które zebrane pozwalają stwierdzić z jakiego rodzaju defektem łańcucha oddechowego mamy do czynienia. Jedną z zalet elektroforezy „Blue Native” (oraz testu aktywności w żelu) jest niewielka ilość materiału potrzebna do przeprowadzenia procedury diagnostycznej. Przykładowy obraz testu aktywności w żelu wykonany dla kompleksu IV wyizolowanego z mięśni szkieletowych pacjenta z podejrzeniem deficytu oksydazy cytochromowej przedstawiono na Ryc. 9. Wystarczy bowiem około 30 mg mięśnia sercowego, 50 mg mięśnia szkieletowego, bądź 30 mln fibroblastów pacjentów do wyizolowania mitochondriów oraz wykonania elektroforezy „Blue Native” i testu aktywności w żelu dla kompleksów I, II, IV i V [3,11,16]. Procedurę diagnostyczną z wykorzystaniem elektroforezy „Blue Native” możemy podzielić na następujące trzy etapy.

ETAP I

Obraz otrzymany po elektroforezie „Blue Native” odpowiada na pytanie czy w badanych mitochondriach obecne są



Rycina 9. Wykorzystanie testu aktywności w żelu w celach diagnostycznych. Reakcja w żelu w celu identyfikacji kompleksu IV. HBM – mitochondria serca wołu. Żel poliakryloamidowy (gradient 5–12%), n-dodecylo- β -D-maltozyd – 1% (wg [16], zmodyfikowane, za zgodą).

wszystkie kompleksy łańcucha oddechowego. Porównanie ich lokalizacji w żelu ze standardem wykonanym z mitochondriów od osoby zdrowej, wykaże czy posiadają one w przybliżeniu odpowiednią masę (zawierają wszystkie podjednostki) oraz czy nie mamy do czynienia z obniżoną ilością któregoś z kompleksów.

ETAP II

Pomiar aktywności w żelu pozwala na stwierdzenie czy kompleksy łańcucha oddechowego w badanej próbce posiadają aktywność enzymatyczną, taką jak materiał kontrolny. Może się bowiem zdarzyć, że profil rozdzielonych białek nie będzie odbiegał od kontroli (brak istotnych zmian w wielkości ani w ilości kompleksu) lecz będzie on mniej, bądź wcale nieaktywny.

ETAP III

Elektroforeza SDS-PAGE wykonana jako „drugi kierunek” rozdzielu może wskazać przyczynę braku aktywności kompleksów łańcucha oddechowego. Brak któregoś z podjednostek o małej masie, np. determinującej aktywność centrum katalitycznego kompleksu, może być niezauważony w obrazie „Blue Native”. Jednakże może to być stwierdzone z wykorzystaniem techniki Western Blot. W przypadku, kiedy potwierdzi się obecność wszystkich podjednostek wchodzących w skład kompleksów OXPHOS, brak aktywności, któregoś z nich może być wynikiem mutacji. Dlatego aby się o tym przekonać można przeprowadzić badania genetyczne.

W celu poznania przyczyny obserwowanego defektu mitochondrialnego łańcucha oddechowego procedurę diagnostyczną wzbogaca się, wykonując dodatkowe testy. Należą do nich np. immunocytochemia oraz immunohistochemia wykonana na materiale biopsyjnym, a także pomiary oddychania oraz mitochondrialnego potencjału w hodowlach komórkowych pochodzących od pacjentów. Immunocytochemia i immunohistochemia pozwalają na określenie czy zaburzenia aktywności, bądź ilości kompleksów łańcucha oddechowego dotyczą wszystkich komórek czy też mamy do czynienia ze zjawiskiem zwanym

heteroplazmą. W tym przypadku nie wszystkie komórki mają uszkodzony mitochondrialny łańcuch oddechowy.

UWAGI KOŃCOWE

Szerokie spektrum metod pozwala na badanie aktywności kompleksów łańcucha oddechowego w tkankach, liniach komórkowych oraz izolowanych mitochondriach, co może mieć duże znaczenie w poznaniu etologii choroby mitochondrialnej. Elektroforeza „Blue Native” jest obecnie wykorzystywana jako jedna z metod diagnostycznych w przypadku podejrzenia choroby mitochondrialnej związanej z uszkodzeniem mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Pozwala ona na jakościowe i ilościowe pomiary zarówno poziomu, jak i aktywności poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego. Ponadto, może ona stanowić pierwszy etap szeregu dalszych, bardziej skomplikowanych badań (np. elektroforeza dwukierunkowa, preparatywna, Western blot), prowadzących do poznania budowy i składu kompleksów białkowych znajdujących się w różnych przedziałach komórkowych. Porównanie różnych metod izolacji i rozdzielu kompleksów łańcucha oddechowego pokazało, że jakość i rozdzielczość elektroforezy „Blue Native” jest większa niż np. filtracji w żelu lub ultrawierowanie w gradiencie sacharozy. Wszystkie wymienione zalety oraz łatwość jej wykonania [17] czyni z elektroforezy „Blue Native” niezwykle przydatną technikę, która może być wykorzystywana w wielu aplikacjach biologii molekularnej oraz diagnostyce chorób mitochondrialnych związanych z uszkodzeniami łańcucha oddechowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Wittig I, Schägger H (2007) Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 80: 723-741
2. Schägger H, Von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199: 223-231
3. Van Coster R, Smet J, George E, De Meirleir L, Seneca S, Van Hove J, Sebire G, Verhelst H, De Bleecker J, Van Vlem B, Verlooy P, Leroy J (2001) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in diagnosis of oxidative phosphorylation defects. *Pediatr Res* 50: 658-65
4. Sun H, Pan YC (1999) Using native gel in two-dimensional PAGE for the detection of protein interactions in protein extract. *J Biochem Biophys Methods* 39: 143-151
5. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 194: 680-685
6. Suh MH, Ye P, Datta AB, Zhang M, Fu J (2005) An agarose-acrylamide composite native gel system suitable for separating ultra-large protein complexes. *Anal Biochem* 343: 166-75
7. Schägger H, Pfeiffer K (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 276: 37861-37867
8. Camacho-Carvajal MM, Wollscheid B, Aebersold R, Steimle V, Schamel WW (2004) Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 3: 176-182
9. Rivas S, Romeis T, Jones JD (2002) The Cf-9 disease resistance protein is present in an approximately 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* 14: 689-702
10. Wittig I, Schägger H (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5: 4338-4346

11. Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schägger H (2007) Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28: 3811-3820
12. Schägger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555: 154-159
13. Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52: 119-128
14. Sunderhaus S, Eubel H, Braun HP (2007) Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods Mol Biol* 372: 315-324
15. Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schägger H (2006) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1066-1072
16. Karkucińska-Więckowska A, Czajka K, Wasilewski M, Sykut-Cegielska J, Pronicki M, Pronicka E, Zabłocki K, Duszyński J, Więckowski MR (2006) Blue Native Electrophoresis: an additional useful tool to study deficiencies of mitochondrial respiratory chain complexes. *Ann Diagnostic Pediatric Pathology* 11: 75-78
17. Wittig I, Braun HP, Schägger H (2006) Blue native PAGE. *Nature Protocols* 1: 418-428

Application of „Blue Native” Electrophoresis in the studies of mitochondrial respiratory chain complexes in physiology and pathology

Magdalena Lebiedzińska, Jerzy Duszyński, Mariusz R. Więckowski 

Laboratory of Bioenergetic and Biomembranes, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: m.wieckowski@nencki.gov.pl

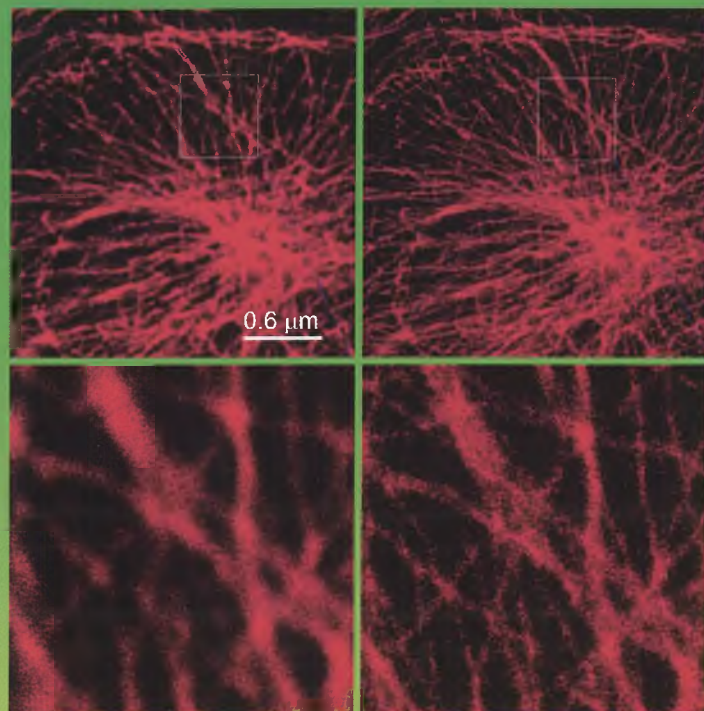
Key words: “Blue Native” Electrophoresis, mitochondria, mitochondrial respiratory chain complexes, diagnosis of mitochondrial disorders, protein interactions

“Blue Native” polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), originally described by Schägger and von Jagow in 1991, is an elegant method to study protein complexes from mitochondrial membranes. BN-PAGE, commonly used in molecular biology to study composition of protein complexes and protein-protein interactions, enables separation of respiratory chain complexes keeping their properties and enzymatic activities unchanged. BN-PAGE, supplemented by other methods, e.g. in gel activity assay, SDS-PAGE (as a first or second dimension) can be successfully adapted for diagnosis of mitochondrial diseases connected with abnormalities of the respiratory chain. Therefore, to make a correct diagnosis of the deficiency of respiratory chain complexes, other methods, as histochemical colorimetric reactions allowing evaluation of the OXPHOS catalytic activity in individual cells and spectrophotometric technique should be used simultaneously with BN-PAGE.

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

konwencjonalny mikroskop
konfokalny

mikroskop konfokalny
z systemem STED



mikrotubule w komórce nabłonkowej wyznakowane przeciwciałami skoniugowanymi z barwnikiem Atto 647

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

W ramach projektu zostaną również zakupione:

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



UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH

PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ



Projekt współfinansowany przez
UNIĘ EUROPEJSKĄ
ze środków
Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego

bim
CZT
KAMPUS - OCHOTA

<http://rcin.org.pl>

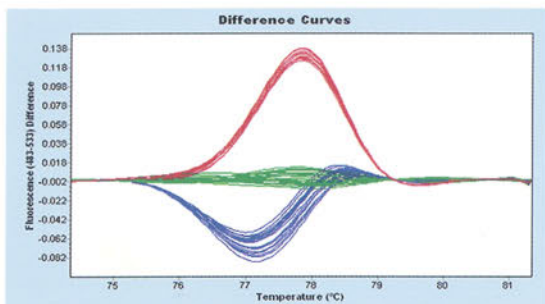


www.roche-applied-science.com

LightCycler® 480 Real-Time PCR System

Poluj na nowe cele:

*Topnienie wysokiej rozdzielczości
i wysokiej wydajności PCR w jednym*



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

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

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

**Przenieś poziom swojego PCR na nowe szczyty.
Dowiedz się więcej na stronie www.lightcycler480.com**

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

Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the PCR process, including homogeneous PCR methods described in U.S. Patents Nos. 5,994,056, 6,171,785, 6,569,827 and corresponding patents outside the United States, for life science research in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, i.e., an authorized thermal cycler. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights owned by Applied Biosystems are conveyed expressly, by implication or by estoppel. No rights for any other application, including any in vitro diagnostic application, are conveyed expressly, by implication or by estoppel under U.S. Patents Nos. 6,374,870 and 6,245,514 and corresponding patent claims outside the United States, or any other patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd, claiming real-time amplification and detection methods. The product is covered in-part by US 5,871,908, co-exclusively licensed from Evotec OAI AG. Parts of the Software used for the LightCycler® 480 System are licensed from Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA. LIGHTCYCLER is a trademark of Roche. Other brands or product names are trademarks of their respective holders. © 2007 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

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



<http://rcin.org.pl>