

PL ISSN 0324-833X

P2435

9.3.2001

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 28, 2001

Suplement nr 16

Redaktor: Zdzisław Żak

MOLEKULARNE ASPEKTY W BIOTECHNOLOGII
MOLECULAR ASPECTS OF BIOTECHNOLOGY

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*
Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*
Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*
Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*
Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*
Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*
Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*
Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia – immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*
Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology
address: www.mol.uj.edu.pl/pbk

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 25,0. Ark. druk.20,5. Podpisano do druku w grudniu 2000 r. Druk ukończono w styczniu 2001 r.

WSTĘP – INTRODUCTION

Trzydziesta rocznica powstania Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zyrzyckiego w Uniwersytecie Jagiellońskim była obchodzona w dniach od 29 kwietnia do 4 maja 2000 r. w Zakopanem. Podczas XXVII Seminarium Naukowego IBM UJ. Jubileusz miał szczególną rangę ze względu na przypadające obchody 600-lecia Odnowienia Akademii Krakowskiej. Ponadto w roku akademickim 1999/2000 ukończyli studia magisterskie pierwsi absolwenci kierunku biotechnologicznego.

Program seminarium na temat *Molekularne aspekty w biotechnologii* był realizowany w następujących sesjach:

- Synteza i działanie cytokin;
- Molekularne podstawy inżynierii komórkowej i tkankowej;
- Biologicznie aktywne peptydy;
- Proteolityc enzymes in biotechnology and in therapeutic treatment of diseases;
- Reakcje stresu komórkowego;
- Współczesne metody badania struktury i dynamiki białeczek;
- Interakcja ligand-białko w układach transportu witamin;
- Biogeneza chloroplastów i procesy oksydacyjno-redukcyjne związane z fotosyntezą.

Wybrane referaty przedstawione podczas obrad XXVII Seminarium Naukowego IBM UJ stanowią treść tego numeru Suplementu Postępów Biologii Komórki.

Ponadto odbyła się dyskusja okrągłego stołu na tematy dydaktyczne kierunku biotechnologicznego. Udział studentów i magistrantów był istotny w dyskusji nad dotychczas realizowanym programem studiów.

XXVII Seminarium Naukowe IBM UJ mogło odbyć się dzięki częściowemu finansowaniu przez: Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN, Bank Przemysłowo-Handlowy w Krakowie, Przedstawicielstwo Regionalne Małopolska firmy Merck i firmy Kucharczyk – Techniki Elektroforetyczne. Natomiast wydanie Suplementu Postępów Biologii Komórki było wspomagane przez Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej oraz fundusz 5 Programu Ramowego Unii Europejskiej uzyskany przez IBM UJ w ramach akcji *Support for Centers of Excellence*.

Wszystkim, którzy przyczynili się do pokrycia kosztów organizacyjnych, realizacji programu naukowego i wydania materiałów XXVII Seminarium Naukowego IBM UJ, Organizatorzy wyrażają wdzięczność. Jednocześnie jesteśmy głęboko przekonani, że korzyści płynące z przebiegu tego spotkania w postaci wymiany informacji między uczestnikami i niniejsza publikacja będą miały poważne znaczenie zarówno w przyszłej pracy badawczej zainteresowanych, jak i edukacyjne dla studiujących i młodych pracowników nauki.

Zdzisław Żak

Część pierwsza

SYNTEZA I DZIAŁANIE CYTOKIN



NIEKTÓRE CYTOKINY PRZECIWZAPALNE: WŁASNOŚCI I MECHANIZM DZIAŁANIA*

SOME ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES: PROPERTIES AND MECHANISM OF ACTION

Aleksander KOJ

Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Klasyfikacja cytokin opiera się na strukturze czynnych białek i ich receptorów, a także uwzględnia ich własności biologiczne. Do cytokin przeciwzapalnych zalicza się interleukinę-10 oraz spokrewnione ze sobą IL-4 i IL-13. Przekaz sygnału z receptorów tych cytokin angażuje kinazy białkowe JAK, TYK i szereg czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT. Wymienione trzy cytokiny hamują syntezę cytokin prozapalnych (IL-1, TNF α , IL-8) w komórkach krwi stymulowanych endotoksyną bakteryjną, natomiast mogą zwiększać produkcję cytokin prozapalnych w innych typach komórek. Mechanizm paradoksalnego efektu cytokin przeciwzapalnych nie jest dotychczas w pełni wyjaśniony. (*Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: 5–13*)

Słowa kluczowe: Cytokiny prozapalne i przeciwzapalne, IL-10, IL-4, IL-13, TNF α , IL-1, IL-6, przekaz sygnału, czynniki transkrypcyjne

Summary: Classification of cytokines is based on structure of active proteins and their receptors but it takes into account also their biological activities. Anti-inflammatory cytokines include IL-10 and related to each other IL-4 and IL-13. Transduction of signal from receptors of these cytokines requires protein kinases JAK, TYK and several transcription factors belonging to STAT family. The above-mentioned three cytokines inhibit synthesis of pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF α , IL-8) in the blood cells stimulated with endotoxin, but they may enhance production of pro-inflammatory cytokines in other types of cells. The mechanism of paradoxical effect of anti-inflammatory cytokines has not been so far fully elucidated.

(*Advances in Cell Biology 2001; Supl. 16: 5–13*)

Key words: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, IL-10, IL-4, IL-13, TNF α , IL-1, IL-6, signal transduction, transcription factors.

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, PB 0366/PO4/99/16.
Autor dziękuje prof. A. Kleinowi za krytyczne uwagi do maszynopisu.

KLASYFIKACJA CYTOKIN

Pod nazwą cytokin mieści się duża i heterogeniczna grupa niskocząsteczkowych białek, które działając w nanomolowych lub pikomolowych stężeniach regulują różne funkcje komórek, wpływają na ich wzrost, różnicowanie i wzajemne oddziaływania. Nathan i Sporn [14] zaliczyli cytokiny, obok hormonów, autakoidów i neuroprzekazników, do głównych cząsteczek sygnałowych organizmu zwierzęcego. W odróżnieniu od hormonów cytokiny są wytwarzane nie przez wyróżnicowane gruczoły dokrewne, ale przez aktywowane makrofagi, leukocyty, fibroblasty, komórki śródbłonna, keratynocyty oraz inne typy komórek. Cytokiny działają na komórki docelowe przez swoiste receptory błonowe uruchamiające złożone kaskady sygnalizacyjne. Więcej informacji o cytokinach znajdzie polski czytelnik m.in. w monografii Robaka [16] oraz pracy przeglądowej Kortylewskiego i Mackiewicza [9].

Tradycyjnie wśród cytokin wyróżnia się interferony, interleukiny, czynniki martwicy nowotworów, krwiotwórcze czynniki wzrostu, transformujące czynniki wzrostu, inne czynniki wzrostu oraz czynniki chemotaktyczne [16]. Chaos w systematyce i nomenklaturze cytokin pogłębia występowanie wielu synonimów stworzonych przez odkrywców danej aktywności biologicznej, zanim została ona przypisana jednej określonej cząsteczce białkowej. Większość cytokin wykazuje bowiem zjawisko plejotropii, tzn. zdolność do oddziaływania na rozmaite komórki docelowe, jeśli posiadają one określony receptor. Ponadto cytokiny z reguły charakteryzuje częściowa zastępowalność funkcji, nazywana także nadmiarowością lub redundancją, gdy różne cytokiny dają podobne efekty biologiczne. Przykładem mogą być cytokiny typu interleukiny-6, gdyż indukcję syntezy białek ostrej fazy w hepatocytach wywołuje nie tylko IL-6, ale także IL-11, onkostatyna M (OSM), czy też czynnik hamujący wzrost białaczki (LIF), choć każda cytokina daje nieco inny profil białkowy.

Biochemiczna klasyfikacja cytokin opiera się na strukturze cząsteczek cytokin oraz ich receptorów. Jak to przedstawia tabela 1, Debets i Savelkoul [3] wyróżnili sześć głównych rodzin cytokin, ale dotychczas ten racjonalny podział nie został powszechnie przyjęty.

Funkcjonalna klasyfikacja cytokin uwzględnia ich rolę biologiczną oraz znaczenie dla patologii i medycyny. Biorąc pod uwagę wpływ cytokin na procesy zapalne oraz przebieg reakcji ostrej fazy można wyróżnić trzy grupy cytokin (tab. 2 oraz [7]). Podział ten jest z pewnością uproszczeniem, gdyż wiele cytokin ma działanie wielofunkcyjne, a IL-6 może odgrywać różną rolę zależnie od etapu reakcji ostrej fazy. Odpowiednie zakończenie tej reakcji jest ważne dla uniknięcia chronicznych odczynów zapalnych i zwykle zachodzi przy udziale cytokin: IL-4, -13 i -10 [8]. Cytokiny te zostały wykryte przez badaczy z *DNAX Research Institute* w Kalifornii, którzy zaobserwowali, że różnicujące się limfocyty pomocnicze (*T-helper cells*)

TABELA 1. Strukturalne rodziny cytokin i ich receptorów (wg [3], zmodyfikowane)

Rodzina cytokin	Główne cytokiny	Nadrodzina (SF) receptorów
Hematopoetyny	IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF, CT-1 IL-3, IL-5, GM-CSF IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 IL-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ	Receptory klasy I wspólny gp130 wspólny łańcuch β wspólny łańcuch γ Receptory klasy II
IL-1,	IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, FGF α , FGF β	SF-Immunoglobuliny
TNF	TNF- α , TNF- β , LT- β	SF-receptory TNF
TGF- α	TGF- α , EGF	SF-kinazy tyrozyny
TGF- β	TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3	SF-receptory TGF- β
Chemokiny podrodzina α podrodzina β	IL-8, GRO- α , - β - γ , ENA-78 MCP-1,-3, RANTES, MIP-1 α , - β	SF-receptory chemokin

tworzą populacje komórek Th1 i Th2 wydzielających różne białka regulatorowe. Komórki Th1 oraz monocyty (makrofagi) wytwarzają m.in. TNF- α , IL-1, IFN- γ czy IL-12 i są odpowiedzialne za obronę komórkową skierowanym przeciw wewnątrzkomórkowym pasożytom i bakteriom. Natomiast komórki Th2 decydują o humoralnej odpowiedzi organizmu (synteza przeciwciał) i wytwarzają m.in. IL-4, IL-13, IL-10 oraz IL-5. Zatem cytokiny z grupy Th2 z jednej strony aktywują limfocyty B do syntezy przeciwciał, ale z drugiej hamują monocyty i komórki Th1 wytwarzające cytokiny prozapalne.

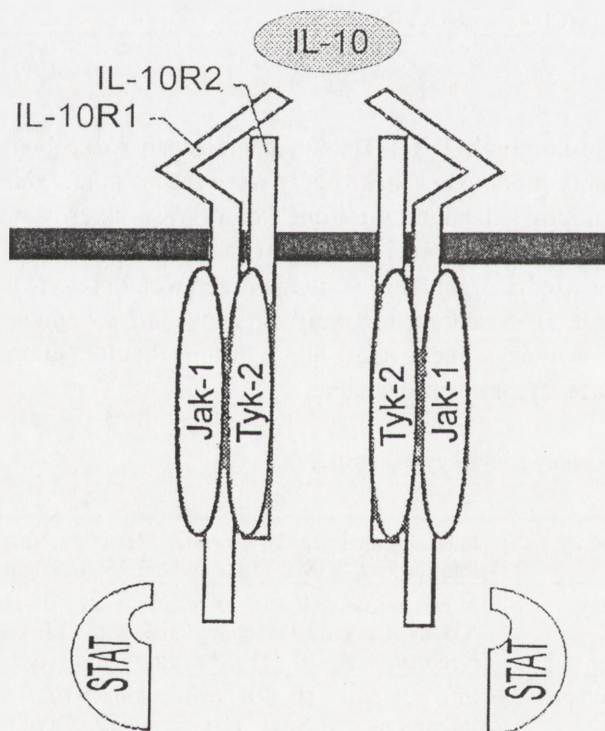
TABELA 2. Funkcjonalny podział cytokin ostrej fazy

Cytokiny prozapalne lub wczesne	Interleukina-1 (IL-1), Czynn timer Martwicy Nowotworów (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukina-15, Interleukina-8 (IL-8)
Cytokiny z rodziny interleukiny-6	Interleukina-6 (IL-6), Interleukina-11 (IL-11), Onkostatyna M (OSM), Czynn timer Hamujący Białaczkę (LIF), Rzęskowy Czynn timer Neurotroficzny (CNTF), Kardiotropina-1 (CT-1)
Cytokiny przeciwzapalne lub późne	Interleukina-10 (IL-10), Interleukina-4 (IL-4), Interleukina-13, Interferon- α (IFN- α), Transformujący Czynn timer Beta (TGF- β)

INTERLEUKINA-10

Interleukina-10 została zidentyfikowana w 1989 r. jako czynnik hamujący syntezę cytokin (*cytokine synthesis inhibitory factor* = CSIF). Aktywny polipeptyd ma masę cząst. ok. 18,5 kDa, lecz w płynach ustrojowych występuje jako dimer. IL-10 jest wytwarzana nie tylko w komórkach Th2, lecz także w aktywowanych monocytach, komórkach tucznych, keratynocytach i niektórych liniach nowotworowych. Po aktywacji komórek przez endotoksynę interleukina-10 powstaje zawsze później niż cytokiny prozapalne. W genomie wirusa Epsteina-Barra znaleziono gen niemal identyczny z genem IL-10 i przypuszcza się, że został on przechwycony przez wirusa dając mu w ten sposób ochronę przed zwalczaniem go przez układ immunologiczny organizmu gospodarza [6].

Receptor dla IL-10 wiąże jej dimer, zbudowany jest z 2 typów łańcuchów transbłonowych i wykazuje podobieństwo do receptorów rodziny interferonu (rys. 1). Przekaz sygnału z receptora do jądra komórkowego wymaga udziału kinaz biał-



RYSUNEK 1. Schemat struktury receptora dla IL-10 (zmodyfikowane wg [10]). Podwójny heterodimer IL-10R1-R2 wiąże dimer IL-10, co wywołuje przyłączenie kinaz JAK1 i TYK2, a następnie STAT

kowych JAK1 (*Janus Kinase-1*) i TYK2 (*Tyrosine Kinase-2*), a także białek pośredniczących STAT1, STAT3, a według niektórych badaczy także STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Można dopatrzeć się pewnego podobieństwa działania tego receptora oraz drogi sygnalizacyjnej interleukiny-6. Przypuszczalnie z tego powodu po transfekcji genu receptora IL-10 do komórek wątrobiaka HepG2 interleukina-10 indukuje syntezę białek ostrej fazy i wykazuje efekty synergii z interleukiną-1 dla białek typu 1, które wymagają zarówno IL-6, jak i IL-1 [11].

INTERLEUKINA-4 I INTERLEUKINA-13

IL-4 została początkowo opisana jako jeden z czynników wzrostu i różnicowania limfocytów B wytwarzanych przez komórki Th [2], ale dzisiaj wiemy, że jako typowa cytokina ma dużo szersze pole działania. Natomiast IL-13 została wykryta przez przeszukiwanie biblioteki genowej zaktywowanych komórek Th2 i wykazuje wiele podobieństw do IL-4. Obie cytokiny nie tylko hamują syntezę cytokin prozapalnych w komórkach hematopoetycznych, ale także wywołują ekspresję IgE (tzw. *immunoglobulin class switching*) i są zaangażowane w reakcjach alergicznych. Porównanie niektórych własności IL-4, -13 i -10 przedstawia tabela 3.

TABELA 3. Porównanie niektórych własności interleukin 10, 4 i 13

	IL-4	IL-13	IL-10
Lokalizacja genu u człowieka – chromosom Nr	5	5	1
Typ receptora: Nadrodzina	Hematopoetyny		Interferony
Wpływ na ekspresję:			
MHC II w monocytach	↑	↑	↓
Cytokiny prozapalne w monocytach	↓	↓	↓↓
NO w makrofagach myszy	↓	↓	↓
Białka ostrej fazy w hepatocytach	↓	?	↑
VCAM-1 w różnych komórkach	↑	↑	?
IL-1Ra w różnych komórkach	↑	↑	↑

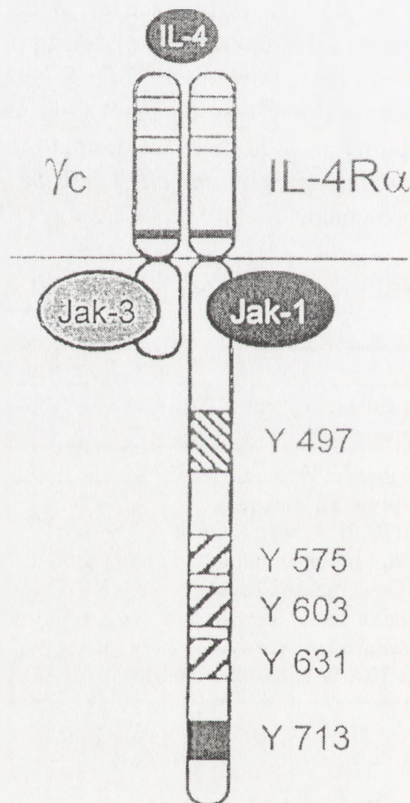
STRUKTURA RECEPTORA IL-4 I PRZEKAZ SYGNAŁU

IL-4 oraz IL-13 mogą użytkować wspólny receptor występujący w wielu typach komórek [13]. Głównym elementem wiążącym IL-4 jest łańcuch IL-4R α , który

dimeryzuje najczęściej z łańcuchem γc będącym także składnikiem receptora IL-2. Jednakże IL-4R α może także funkcjonować w kompleksie z IL-13R, który nie wymaga – i nie współdziała – z podjednostką γc . Samodzielny receptor IL-13 składa się z 2 podjednostek: IL-13R α i IL-13R α' . Mieszane kompleksy typu IL-4R α -IL-13R α' przeważają w tkankach niehematopoetycznych.

Dobrze poznany jest przekaz sygnału poprzez IL-4R α - γc [15]. Z domeną cytoplazmatyczną receptora 4R α wiąże się kinaza JAK1, a z łańcuchem γc JAK3 (rys. 2). W domenie tej znaleziono 5 reszt tyrozyny, których funkcje udało się zidentyfikować przez wprowadzanie mutacji punktowych: Tyr Y497 jest niezbędna dla sygnału proliferacji komórkowej, Tyr Y575, 603 i 631 są konieczne dla wiązania i aktywacji czynnika STAT6, a położona w pobliżu C-końca łańcucha białkowego tyrozyna Y713 służy za miejsce wiązania różnych fosfataz białkowych. Po związaniu IL-4 z receptorem następuje fosforylacja tyrozyn (przypuszczalnie przez kinazy JAK) i dopiero wówczas receptor może przekazać sygnał na jedną z trzech dróg:

- Fosfotyrozyna Y497 wiąże białko IRS1 lub IRS2 (*Insulin Receptor Substrate*), które ulega fosforylacji i wiąże podjednostkę p85 kinazy fosfatydyloinozytolu. Enzym ten tworzy fosfatydyloinozytyle aktywujące kinazę białkową C (PKC), co prowadzi do wzrostu i podziału komórek. Alternatywna droga na tym szlaku wykorzystuje białko adaptorowe Shc i niskocząsteczkowe GTP-azy, takie jak białko Ras aktywujące podziały komórkowe.
- Trzy fosfotyrozyny środkowego odcinka domeny cytoplazmatycznej receptora (rys. 2) wiążą STAT6, który po fosforylacji i dimeryzacji przemieszcza się do jądra, gdzie aktywuje geny regulowane przez IL-4. STAT6 wymaga kooperacji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. C/EBP α .
- Regulacja sygnału generowanego przez IL-4 może zachodzić przy udziale fosfataz SHP1, SHP2 (*Src-homology phosphatase*) i SHIP (*SH2 containing inositol-5-phosphatase*), które wiążą się z Y713 i defosforylują pozostałe fosfo-



RYSUNEK 2. Struktura receptora dla IL-4 i rola reszt tyrozyny (zmodyfikowane wg [15]); funkcja reszt tyrozyny Y497-Y713 opisana w tekście

tyrozyny domeny cytoplazmatycznej receptora, co prowadzi do zaniku sygnału. Ponadto aktywacja STAT6 uruchamia ekspresję całej rodziny inhibitorów kaskady JAK-STAT, takich jak: SOCS (*suppressors of cytokine signalling*), CIS (*cytokine-induced SH2*) i SSI (*STAT-induced STAT-inhibitor*). Te inhibitory przypuszczalnie hamują działanie kinaz JAK zapobiegając fosforylacji czynników STAT.

Tak więc działanie receptorów i przeniesienie sygnału od IL-4 może być modulowane na wielu drogach, co tworzy niezwykle złożony układ odpowiedzi komórkowej. Należy jeszcze dodać, że czynniki STAT6 i NF- κ B mogą tworzyć kompleksy [18] oraz współzawodniczyć o sąsiednie miejsca wiązania w promotorze [1].

MECHANIZM DZIAŁANIA CYTOKIN PRZECIWZAPALNYCH

Do najważniejszych efektów biologicznych interleukin 10, 4 i 13 należy hamowanie syntezy cytokin ostrej fazy: IL-1, TNF α , IL-8 i IL-6 w monocytach. Molekularny mechanizm tego zjawiska nie jest w pełni wyjaśniony, a w literaturze znaleźć można szereg sprzecznych doniesień. Mijatovic i wsp. [12] stwierdzili, że IL-4 i IL-13 wywierają niewielki wpływ na procesy transkrypcji genu TNF natomiast hamują translację mRNA dla TNF w komórkach linii makrofagowych myszy pobudzonych endotoksyną. Z kolei wg Takeshita i wsp. [19] IL-4 hamuje aktywność transkrypcyjną promotora genu IL-6 w ludzkich liniach monocytarnych THP-1 i U937 stymulowanych PMA i endotoksyną. Hamowanie to ma wynikać z blokowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, podczas gdy IL-10 przyspiesza degradację mRNA dla IL-6 bez wpływu na NF- κ B. Odwrotnego zdania są Wang i wsp. [20], którzy twierdzą, że w ludzkich monocytach aktywowanych przez LPS właśnie IL-10 selektywnie hamuje aktywację NF- κ B monocytów, podczas gdy IL-4 ma destabilizować mRNA cytokin prozapalnych. Natomiast Schottelius i wsp. [17] przekonująco wykazali, że IL-10 hamuje syntezę TNF α w komórkach monocytarnych poprzez oddziaływanie na NF- κ B na dwóch niezależnych poziomach: w etapie fosforylacji I κ B przez kinazę IKK oraz w etapie wiązania NF- κ B do specyficznych sekwencji DNA. Te sprzeczne doniesienia mogą częściowo wynikać z różnych odpowiedzi poszczególnych typów komórek na IL-4, -13 i -10.

PARADOKSALNE EFEKTY CYTOKIN PRZECIWZAPALNYCH

Już Donnelly i wsp. [4] zaobserwowali, że IL-4 hamuje syntezę IL-6 w makrofagach, ale nie w fibroblastach. Mając do dyspozycji rekombinantowe preparaty ludzkich cytokin IL-10, 4 i 13 użyczone przez *DNAX Research Institute* przeba-

TABELA 4. Wpływ IL-4 i IL-13 na syntezę IL-6 w komórkach HUVEC kontrolnych i stymulowanych endotoksyną [5]. IL-6 oznaczona w medium metodą ELISA po 24 godz hodowli komórek kontrolnych lub z endotoksyną (LPS, 0,2 µg/ml) w nieobecności lub przy obecności 100 j/ml IL-4 lub IL-13 (średnia 4 doświadczeń, ±SD).

Dodatki w hodowli	Przyrost IL-6 [ng/ml]
–	5,53±1,41
IL-4	16,60±2,83
IL-13	16,20±2,11
LPS	17,45±6,16
LPS + IL-4	25,66±7,58
LPS + IL-13	24,46±7,22

daliśmy ich działanie na różne komórki. Pełna krew ludzka reprezentuje naturalny model biologiczny i po 24 godz. inkubacji z endotoksyną można wykryć w niej wszystkie cytokiny prozapalne. Jeśli jednocześnie z endotoksyną dawaliśmy IL-10, 4 lub 13 w stężeniach rzędu kilkunastu ng/ml, przyrost wytworzonych cytokin: IL-1, IL-6 i TNF był znacznie niższy [5]. Najbardziej skuteczne hamowanie wykazywała interleukina-10. Natomiast w hodowli pierwotnej ludzkich komórek śródbłonkowych HUVEC IL-10 była bez wpływu, a IL-4 i IL-13 wyraźnie stymu-

lowały indukowaną przez endotoksynę syntezę TNF α i IL-6 (tab. 4). Wyjaśnienie mechanizmu zjawiska odwrócenia efektu biologicznego IL-4 i IL-13 w zależności od rodzaju komórek stanowi wyzwanie dla badań nad przekazem sygnału. Nasze dotychczasowe obserwacje wskazują, że kluczową rolę w tym zjawisku odgrywa czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Jednocześnie nasuwa się pytanie, czy nazwa „cytokiny przeciwzapalne” dla IL-4 i -13 jest w pełni uzasadniona, skoro w pewnych typach komórek nasilają one syntezę IL-1, TNF czy IL-6.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BENNETT BL, CRUZ R, LACSON RG, MANNING AM. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF- κ B. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10212–10219.
- [2] BROXMEIJER HE, LU L, COOPER S, RUBIN BY, GILLIS S, WILLIAMS DE. Synergistic effects of purified recombinant human and murine B-cell growth factor/IL-4 on colony formation *in vitro* by hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1988; **141**: 3852–3862.
- [3] DEBETS R, SAVELKOUL HFJ. Cytokines as cellular communicators. *Mediat Inflamm* 1996; **5**: 417–423.
- [4] DONNELLY RP, CROFFORD LJ, FREEMAN SL, BURAS J, REMMERS E, WILDER RL, FENTON MJ. Tissue-specific regulation of IL-6 production by IL-4. Differential effects of IL-4 on nuclear factor- κ B activity in monocytes and fibroblasts. *J Immunol* 1993; **151**: 5603–5612.
- [5] GUZDEK A, STALIŃSKA K, GUZIK K, KOJ A. Differential responses of hematopoietic and non-hematopoietic cells to anti-inflammatory cytokines: IL-4, IL-13 and IL-10. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 387–399.
- [6] HOWARD M, OGARRA A, ISHIDA H, DE WAAL MALEFYT R, DE VRIES J. Biological properties of interleukin-10. *J Clin Immunol* 1992; **12**: 239–247.
- [7] KOJ A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1317**: 84–94.

- [8] KOJ A. Termination of acute phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen Pharmacol* 1998; **31**: 9–18.
- [9] KORTYLEWSKI M, MACKIEWICZ A. Cytokiny i procesy przekazywania sygnału: grupa cytokin typu interleukiny-6 jako układ modelowy. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 213–227.
- [10] KOTENKO SV, KRAUSE CD, IZOTOVA LS, POLLACK BP, WU W, PESTKA S. Identification and functional characterization of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 1997; **16**: 5894–5903.
- [11] LAI CF, RIPPERGER J, MORELLA KK, JURLANDER J, HAWLEY TS, CARSON WE, KORDULA T, CALIGIURI MA, HAWLEY RG, FEY GH, BAUMANN H. Receptors for interleukin (IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6-reponse elements. *J Biol Chem* 1996; **271**: 13968–13975.
- [12] MIJATOVIĆ T, KRUYIS V, CAPUT D, DEFRAŃCEP, HUEZ G. Interleukin-4 and -13 inhibit tumor necrosis factor- α mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages. *J Biol Chem* 1997; **272**: 14394–14398.
- [13] MURATA T, OBIRI NI, DEBINSKI W, PURI RK. Structure of IL-13 receptor: analysis of subunit composition in cancer and immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 90–94.
- [14] NATHAN C, SPORN M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; **113**: 981–986.
- [15] NELMS K, KEAGAN AD, ZAMORANO J, RYAN JJ, PAUL WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 701–738.
- [16] ROBAK T. *Biologia i farmakologia cytokin*. PWN, Warszawa – Łódź 1995.
- [17] SCHOTTELIUS AJG, MAYOMW, SARTOR RB, BALDWIN ASJr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31868–31874.
- [18] SHEN CH, STAVNEZER J. Interaction of Stat6 and NF- κ B: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3395–3404.
- [19] TAKESHITA S, GAGE JR, KISHIMOTO T, VREDEVOE DL, MARTINEZ-MAZA O. Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J Immunol* 1996; **156**: 2591–2598.
- [20] WANG P, WU P, SIEGEL MI, EGAN RW, BILLAH MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9558–9563.

Adres autora: Zakład Biochemii Komórki,
Instytut Biologii Molekularnej UJ im. Jana Zurzyckiego
Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: koj@mol.uj.edu.pl

NIKTÓRE INHIBITORY PRZEKAZU SYGNAŁU WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO W HAMOWANIU SYNTEZY CYTOKIN

SOME INHIBITORS OF SIGNAL TRANSDUCTION IN THE DOWN-REGULATION OF CYTOKINE SYNTHESIS

Adrian ZARĘBSKI

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej, Kraków

Streszczenie: Odpowiedź ostrej fazy wywołana przez infekcje, wzrost nowotworu czy zranienia powoduje uwolnienie wtórnych mediatorów - cytokin, których rolą jest przywrócenie homeostazy w organizmie. Nadprodukcja cytokin prowadzi do wielu chorób lub nawet śmierci. Dlatego też stale poszukiwane są związki będące inhibitorami syntezy cytokin. Celem niniejszej pracy jest charakterystyka działania rooperolu, SB203580 i partenolidu – trzech inhibitorów przekazu sygnału, które z jednej strony mogą być narzędziami do badania molekularnych mechanizmów regulacji metabolizmu komórki, a z drugiej mogłyby być przydatne jako leki przeciwzapalne.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: (15–22)*)

Słowa kluczowe: odpowiedź ostrej fazy, rooperol, SB203580, partenolid, cytokiny, kinaza p38

Summary: Acute phase response caused by infections, tumor growth and injuries results in the release of secondary mediators – cytokines, which serve to restore the organism's homeostasis. Overexpression of the cytokines can lead to many diseases or even death. Therefore, substances with the ability to block cytokines' synthesis are being constantly searched for. The aim of this paper is to characterize action of rooperol, SB203580 and parthenolide – the three signal transduction inhibitors, which, on the one hand, could be tools in the investigation of the molecular mechanisms of cell metabolism regulation and, on the other hand, might be useful as antiinflammatory drugs.

(*Advances in Cell Biology 2001; Suppl. 16: 15–22*)

Key words: acute phase response, rooperol, SB203580, parthenolide, cytokines, p38 kinase

*Praca finansowana z grantu KBN 0366/P04/99/16. Autor składa podziękowania panu prof. dr hab. Aleksandrowi Kojowi za krytyczne uwagi przy redagowaniu pracy.

WSTĘP

Infekcje, zranienia czy wzrost nowotworu indukują serię reakcji miejscowych zwanych odpowiedzią ostrej fazy, w czasie której dochodzi do uwolnienia komórkowych mediatorów – cytokin. Wydzielone miejscowo cytokiny działają na inne komórki gospodarza prowadząc do reakcji systemowej manifestującej się gorączką, leukocytozą, zwiększonym poziomem hormonów i zmienionym składem białek osocza [13]. Cytokiny prozapalne IL-1, TNF α , IL-18 odgrywają kluczową rolę w pierwszych stadiach zapalenia [1]. Po związaniu do powierzchniowych receptorów na komórkach docelowych wywołują złożoną kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do aktywacji wielu czynników transkrypcyjnych, wśród których za najważniejsze uchodzą NF- κ B i AP-1. Czynniki te wiążą się do promotorów wielu genów odpowiedzialnych za rozwój późniejszych stadiów reakcji zapalnej, np. m.in. cytokin z rodziny IL-6 [2]. W komórkach wątroby, pod wpływem IL-6 związanej do powierzchniowych receptorów, obserwuje się zmiany w produkcji białek osocza zwanych białkami ostrej fazy. W proces ten zaangażowana jest kinaza JAK oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT [10].

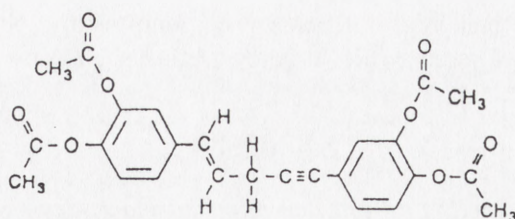
Reakcja ostrej fazy jest fizjologicznym procesem służącym przywróceniu homeostazy w organizmie. W niektórych przypadkach dochodzi jednak do nadprodukcji cytokin lub do chronicznego stanu zapalnego. To może być przyczyną destrukcji tkanek, wielu chorób, np. reumatoidalnego zapalenia stawów, astmy lub nawet śmierci (np. w szoku septycznym).

Stale poszukuje się związków o działaniu przeciwzapalnym, które mogłyby zostać wykorzystane w farmakologii. Intensywne badania prowadzi się nad cytokinami przeciwzapalnymi, które hamują reakcję zapalną. Od dawna jako leki stosowane są też glukokortykoidy. Związkami hamującymi odpowiedź ostrej fazy okazały się substancje pochodzenia roślinnego stosowane w ludowej medycynie różnych krajów. Potencjalnymi lekami przeciwzapalnymi wydają się być syntetyczne inhibitory przekazu sygnału w komórkach zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej [14].

ROOPEROL

Południowoafrykańska roślina *Hypoxis rooperi* stosowana od dawna w afrykańskiej medycynie ludowej jest źródłem dikatecholu zwanego rooperolem. Związek ten wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, stąd zainteresowanie naukowców zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów działania na poziomie molekularnym oraz potencjalnych zastosowań jako składnika leków.

W badaniach stosuje się estry rooperolu, najczęściej dwu- i czteroocian (rys. 1). Estryfikacja zapobiega niekorzystnemu efektowi: możliwości tworzenia się hydroperoksydów lipidów w obecności jonów metali przejściowych i rooperolu. Estryl-



RYSUNEK 1. Czteroocetan rooperolu

fikacja zwiększa również chemiczną stabilność cząsteczki. Forma aktywna inhibitora uwalniana jest w komórkach przy udziale esteraz wewnątrzkomórkowych [3].

W wysokich stężeniach rooperol okazał się być inhibitorem lipooksygenazy [21]. W stężeniach poniżej 10 μM wywołuje inne efekty bez hamowania aktywności lipooksygenazy. Obserwuje się hamowanie produkcji NO w makrofagach i komórkach śródbłonkowych [3]. Zahamowaniu ulega też synteza IL-1 β , TNF α i IL-6 w ludzkich i szczurzych makrofagach płucnych oraz monocytach krwi. Podobnie zahamowanie produkcji IL-1 β , TNF α i IL-6 na poziomie mRNA i białka obserwowano w monocytarnej linii U937 [8].

Wykazano zahamowanie aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1 w obecności rooperolu [8]. Przyjmuje się, że w aktywacji tych czynników w komórkach stymulowanych cytokinami prozapalnymi, czynnikami stresowymi oraz lipopolisacharydem generowane są reaktywne formy tlenu jako wtórne przekaźniki sygnału [20]. Rooperol charakteryzuje się własnościami oksydoredukcyjnymi, dlatego też jednym z proponowanych mechanizmów działania jest jego rola jako antyoksydanta zmiatającego wolne rodniki tlenowe. Dane te jednak wymagają dalszego potwierdzenia.

Rooperol hamuje ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu iNOS i białek adhezyjnych VCAM-1 w komórkach śródbłonka stymulowanych TNF α i IFN γ . VCAM-1 służy jako molekula adhezyjna dla monocytów. Przedłużona ekspresja białek adhezyjnych podczas stanu zapalnego może doprowadzić do uszkodzenia komórek endotelialnych. Zahamowanie ekspresji VCAM-1 wydaje się być efektem korzystnym również z powodu zahamowania rekrutacji leukocytów, w tym eozynofili, do płuc.

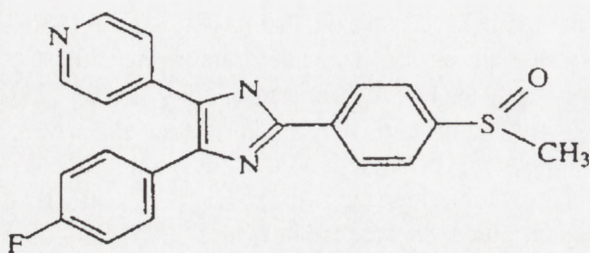
Molekularne mechanizmy działania rooperolu nie są znane i wymagają dalszych badań. Zakłada się możliwość hamowania kilku procesów w komórkach w wyniku działania na różnych etapach przekazu sygnału. Prawdopodobnie hamowany jest etap inicjacji transkrypcji, nie można też wykluczyć wpływu inhibitora na inne procesy, jak np. aktywacja kinaz białkowych czy wpływ na stabilność mRNA [8].

Dzięki temu, że rooperol hamuje produkcję cytokin prozapalnych bez wyraźnego wpływu na całkowitą syntezę białka, metabolizm i żywotność komórek, wydaje się być potencjalnym składnikiem leków przeciwzapalnych. Hamowanie syntezy

iNOS mogłoby być wykorzystane także w leczeniu astmy, ponieważ uwalnianie tlenku azotu odgrywa istotną rolę w patogenezie tej choroby [8].

SB203580

Firma farmaceutyczna *SmithKline Beecham Pharmaceuticals* wyprodukowała szereg syntetycznych inhibitorów kinaz białkowych, z których SB203580 okazał się



RYSUNEK 2. Pirydynylimidazol SB203580

być czynnikiem przeciwpalnym. Inhibitor ten o strukturze pirydynylimidazolu (rys. 2) z dużą swoistością hamuje aktywność kinazy p38 z rodziny kinaz MAP [16] (tab. 1).

Do grupy kinaz p38 zwanej też CSBP lub SAPK2 zaliczane są co najmniej cztery izoformy α , β , γ i δ . Wszystkie wykazują ok. 60–70% homo-

logii sekwencji aminokwasowej, α i β są powszechne, a γ charakterystyczna jest dla mięśni szkieletowych. Wspólną cechą strukturalną izoform jest występowanie 12-aminokwasowej pętli z motywem TGY. Cytokiny prozapalne, lipopolisacharyd oraz stres komórkowy uruchamiające kaskadową aktywację kinaz białkowych prowadzą do fosforylacji tyrozyny i treoniny w pętli aktywacyjnej. Forma nieufosforylowana kinazy nie wiąże ATP, związanie następuje dopiero po aktywacji. Inhibitor SB203580 konkuruje z ATP o miejsce wiązania w centrum aktywnym wiążąc się z jednakowym, wysokim powinowactwem zarówno do formy nieufosforylowanej, jak i ufosforylowanej kinazy [16].

Inhibitor SB203580 hamuje specyficznie tylko aktywność izoform α i β kinazy p38 bez wyraźnego wpływu na aktywność pozostałych izoform czy też innych kinaz białkowych.

SB203580 hamuje produkcję IL-1 i TNF α w makrofagach stymulowanych LPS. Zahamowanie obserwuje się na poziomie translacji bez wpływu na transkrypcję mRNA [17]. Podobnie zahamowanie syntezy IL-4, IL-5, IL-13 i TNF α

TABELA 1. Profil wrażliwości kinaz białkowych na SB203580 (wg [16], zmodyfikowane)

Kinaza	SB203580 (IC_{50} , nM)
p38 α	48
p38 β	50
p38 γ	>10000
p38 δ	>10000
JNK1	~5000
JNK2 β 1	280
JNK2 α 2	1900
ERK2	>100000
PKA	83000
PKC β 2	>50000
MAPKAP2	>10000
c-Raf	360

na etapie translacji stwierdzono w limfocytach T [14]. Wykazano, że kinaza p38 zaangażowana jest w fosforylację białka o masie 37–40 kDa związanego do regionu zawierającego sekwencję AUUUA na 3' końcu mRNA cytokin, np. IL-1, TNF α [16]. Białko to warunkuje stabilność mRNA, przypuszcza się też, że może ono oddziaływać z 5' końcem uczestnicząc w inicjacji translacji. Zahamowanie aktywności kinazy p38 powoduje akumulację transkryptu bez inicjacji translacji [18].

Inny mechanizm obserwuje się w przypadku hamowania syntezy IL-6 w fibroblastach stymulowanych IL-1 i TNF α [4], oraz uwalniania IFN γ i IL-10 przez limfocyty T [14]. Zahamowanie odbywa się na etapie inicjacji transkrypcji. Kinaza p38 bierze udział w fosforylacji czynników transkrypcyjnych, np. ATF2, białka Hsp 27 [16] oraz TBP (TATA binding protein) wiążącego się do sekwencji TATA box [6]. Zahamowanie fosforylacji uniemożliwia zwiążanie się czynników transkrypcyjnych i innych białek regulatorowych do regionów promotorowych genów cytokin. Kinaza p38 wydaje się nie mieć bezpośredniego wpływu na aktywację NF- κ B [11], jednak fosforylacja TBP jest niezbędna do inicjacji transkrypcji oraz do oddziaływania innych białek z NF- κ B, stąd też obserwuje się zahamowanie syntezy białek pozostających pod kontrolą NF- κ B w obecności SB203580 [6].

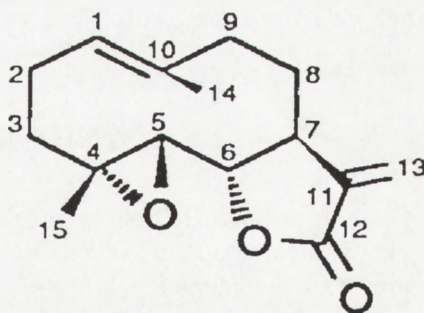
Ostatnie dane sugerują udział kinazy p38 w szlaku aktywacji czynników STAT przy udziale IL-6 w komórkach wątroby. Kinaza p38 wydaje się być także zaangażowana w modulację syntezy białek ostrej fazy [22].

Zdolność SB203580 do hamowania produkcji NO w chondrocytach stymulowanych IL-1 wskazuje na potencjalną możliwość zastosowań do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów [16]. Poza tym inhibitor ten jest szeroko stosowany do badania funkcji kinazy p38, która reguluje wiele istotnych procesów metabolicznych w komórce.

PARTENOLID

Partenolid jest związkiem występującym obficie w soku południowoamerykańskiej rośliny *Tanacetum parthenium*. Wcześniej przebadane zostało 54 gatunki roślin rosnących w Meksyku i stosowanych do leczenia chorób o charakterze zapalnym. Głównym składnikiem leczniczym kilku z nich okazały się być laktony seskwiterpenów. Do tej grupy należy także partenolid [5].

Cząsteczka partenolidu zawiera trzy charakterystyczne motywy: pierścień epoksydowy, pierścień laktonowy z grupą egzometylenową oraz pierścień izopreno-



RYSUNEK 3. Partenolid

dowy (rys. 3). Strukturą kluczową, warunkującą inhibitorowe własności partenolidu wydaje się być pierścień laktonowy z grupą egzometylenową. Wraz z pierścieniem izoprenoidowym tworzy on tzw. „reaktywny system Michaela”, który łatwo reaguje z resztami nukleofilowymi [9]. Proponowanym mechanizmem działania partenolidu jest nieodwracalne wiązanie się do grup –SH cystein w łańcuchu polipeptydowym. Częsteczkami targetowymi wydają się być kinazy białkowe z grupy kinaz MAP, leżące w centrum szlaków przekazu sygnału od różnych czynników wzrostowych, cytokin i hormonów. Stwierdzono zależne od dawki hamowanie aktywności kinazy p38, ERK1 i ERK2 oraz JNK1 w obecności mikromolowych stężeń partenolidu. Ten mechanizm potwierdzają doświadczenia z użyciem ditiotreitolu, β -merkaptopetanolu i L-cysteiny, które jako donory grup –SH znoszą inhibitorową aktywność partenolidu [12].

Wykazano hamowanie syntezy indukowalnej cyklooksygenazy (COX-2) oraz IL-1 i TNF α w obecności partenolidu w szczurzych makrofagach alweolarnych stymulowanych LPS [12]. Proces ten zachodzi na etapie aktywacji NF- κ B. Eksperymenty wskazują, że partenolid hamuje fosforylację, dysocjację i degradację w proteasomie inhibitora I κ B. Partenolid nie wykazuje własności antyoksydanta, nie blokuje też wiązania aktywnego NF- κ B do regionów promotorowych genów. Zahamowanie odbywa się prawdopodobnie na etapie kaskady kinaz białkowych prowadzących do fosforylacji inhibitora I κ B i aktywacji NF- κ B [9].

Udowodniono również wpływ partenolidu na zahamowanie syntezy białek ostrej fazy w komórkach wątroby. Pod wpływem partenolidu następuje zahamowanie fosforylacji tyrozyny STAT 3 w komórkach HepG2 stymulowanych onkostatyną M. To zapobiega dimeryzacji czynników STAT i ich migracji do jądra komórkowego. Prawdopodobnie partenolid hamuje aktywność kinazy JAK bądź innych białek modulujących jej aktywność [19].

Przeciwwzpalne działanie partenolidu związane jest z hamowaniem produkcji cytokin prozapalnych pozostających pod kontrolą NF- κ B, oraz hamowaniem syntezy białek ostrej fazy regulowanych przez czynniki STAT. Doniesiono, że partenolid znalazł zastosowanie jako składnik leku przeciw migrenie [9]. Konieczne są jednak dalsze badania prowadzące do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów działania partenolidu oraz możliwości jego zastosowań terapeutycznych.

WNIOSKI KOŃCOWE

Opisane powyżej inhibitory przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego są niezwykle przydatne do wyjaśnienia mechanizmów regulacji metabolizmu i ekspresji genów. Jest prawdopodobne, że mogą one także znaleźć zastosowania jako pomocnicze leki w niektórych schorzeniach zapalnych.

LITERATURA

- [1] BALDWIN AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 649-683.
- [2] BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; **15**: 74-80.
- [3] BERETA J, BERETA M, ALLISON AC, KRUGER BP, KOJ A. Inhibitory effect of dicatechol rooperol on VCAM-1 and iNOS expression in cytokine stimulated endothelium. *Life Sci* 1997; **60**: 325-334.
- [4] BEYAERT R, CUENDA A, VADEN BERGHE W, PLAISANCE S, LEE JC, HAEGEMAN G, COHEN P, FIERS W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996; **15**: 1914-1923.
- [5] BORK PM, SCHMITZ ML, KUHN M, ESHER C, HEINRICH M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 1997; **402**: 85-90.
- [6] CARTER BA, KNUDSON KL, MONICK MM, HUNNINGHAKE GW. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- κ B-dependent gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30858-30863.
- [7] GUZDEK A, NI \dot{z} ANKOWSKA E, ALLISON AC, KRUGER PB, KOJ A. Cytokine production in human and rat macrophages and dicatechol rooperol and esters. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 991-998.
- [8] GUZDEK A, ROKITA H, CICHY J, ALLISON AC, KOJ A. Rooperol tetraacetate decreases cytokine mRNA levels and binding capacity of transcription factors in U937 cells. *Mediat Inflamm* 1998; **7**: 13-18.
- [9] HEHNER SP, HEINRICH M, BORK PM, VOGT M, RATTER F, LEHMANN V, SCHULZE-OSTHOFF K, DROEGE W, SCHMITZ LM. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B- α and I κ B- β . *J Biol Chem* 1998; **273**: 1288-1297.
- [10] HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEWEN G, SCHAPER F, GRAEVEL L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp 130/Jak/STAT pathway. *Bioch J* 1998; **334**: 297-314.
- [11] HERLAAR E, BROWN Z. P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1999; **5**: 439-447.
- [12] HWANG D, FISCHER NH, JANG BC, TAK H, KIM JK, LEE W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **229**: 810-818.
- [13] KOJ A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1317**: 84-94.
- [14] KOJ A. Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen Pharmac* 1998; **31**: 9-18.
- [15] KOPRAK S, STARUCH MJ, DUMONT FJ. A specific inhibitor of the p38 mitogen activated protein kinase affects differentially the production of various cytokines by activated human T cells: dependence on CD28 signaling and preferential inhibition of IL-10 production. *Cell Immunol* 1999; **192**: 87-95.
- [16] LEE JC, KASSIS S, KUMAR S, BADGER A, ADAMS JL. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors-mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 1999; **82**: 389-397.

- [17] LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC, GALLAGHER TF, KUMAR S, GREEN D, MCNULTY D, BLUMENTHAL MJ, HEYS JR, LANDVATTER SV, STRICKLER JE, MCLAUGHLIN MM, SIEMENS IR, FISHER SM, LIVI GP, WHITE JR, ADAMS JL, YOUNG PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; **372**: 739–746.
- [18] LEE JC, YOUNG PR. Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 1996; **59**: 152–157.
- [19] SOBOTA R, SZWED M, KASZA A, BUGNO M, KORDULA T. Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 329–333.
- [20] SUZUKI YJ, MIZUMO M, PACKER L. Signal transduction for nuclear factor B activation. Proposed localization of antioxidant-inhibitable step. *J Immunol* 1994; **153**: 5008–5015.
- [21] VAN DER MERWE MJ, JENKINS K, THERON E, VAN DER VALT BJ. Interaction of the di-catechols rooperol and nordihydroguaiaretic acid with oxidative systems in the human blood. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 303–311.
- [22] ZAUBERMAN A, ZIPORI D, KRUPSKY M, BEN-LEVY R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 1999; **18**: 3886–3893.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: adrian@mol.uj.edu.pl

LEPTYNA – PRZEKAZ SYGNAŁU I WSPÓLDZIAŁANIE Z CYTOKINAMI*

LEPTIN – SIGNAL TRANSDUCTION AND INTERACTION WITH CYTOKINES

Karolina BAZELA

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej, Kraków

Streszczenie: Leptyna, białkowy produkt genu *ob*, jest produkowana głównie przez tkankę tłuszczową i odgrywa ważną rolę w regulacji wydatkowania energii, apetytu, wagi ciała. Receptor leptyny OB-R należy do receptorów rodziny cytokin klasy I i jest produkowany w kilku izoformach powstających w drodze alternatywnego składania transkryptu. Uważa się, że tylko długołańcuchowa izoforma receptora jest funkcjonalnym receptorem dla tego białka. Receptor leptyny OB-R aktywuje kinazy Janusa (JAK) oraz czynniki transkrypcyjne STAT. Początkowo większość badań dotyczyła wpływu leptyny na centralny układ nerwowy. Jednak ekspresja różnych izoform receptora leptyny nie jest ograniczona do mózgu, obecność receptorów stwierdzono w wątrobie, płucach, nerce, trzustce, jelicie cienkim. Leptyna to doskonały przykład funkcjonalnej pleiotropii, wydaje się być zaangażowana w różnorodne procesy fizjologiczne, takie jak: równowaga energetyczna, procesy rozrodu i działanie układu odpornościowego. (*Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: 23–34*)

Słowa kluczowe: leptyna, receptor leptyny OB-R, kinaza Janusowa (JAK), czynniki transkrypcyjne STAT, białka SOCS, cytokiny prozapalne, cytokiny przeciwzapalne

Summary: Leptin, the protein product of the *ob* gene, is secreted mainly by adipose tissue and plays an important role in the control of food intake, body weight and energy expenditure. The leptin receptors OB-R belong to the class I cytokine receptor family and are produced in several alternatively spliced isoforms. Only the full-length isoform, the OB-R_L is believed to be involved in leptin signaling and is considered to be the functional receptor. OB-R is known to act through Janus kinases (JAK) and signal transducers of transcription STAT. Initially most investigations focused on the effects of leptin on the central nervous system. However different leptin receptor isoforms are not only confined to the brain but exhibit widespread distribution including liver, lungs, kidneys, pancreas, small intestine. In this context leptin is a good example of functional pleiotropy as it seems to be involved in quite diverse physiological function such as energy balance, reproduction and immunology. (*Advances in Cell Biology 2001; Suppl. 16: 23–34*)

Key words: leptin, leptin receptor, Janus kinase (JAK), transcription factors STAT, SOCS proteins, proinflammatory cytokines, antiinflammatory cytokines

*Praca finansowana z grantu KBN 0366/P04/99/16

WSTĘP

Leptyną (z greckiego *leptos* znaczy gruby, otyły) nazwano nieglikozylowane białko o masie cząsteczkowej 16 kD kodowane przez gen *ob* [51]. Leptyna jest wydzielana przez tkankę tłuszczową do krwi i reguluje wydatkowanie energii, apetyt, wagę ciała. Stwierdzono, że białko to z krwi jest transportowane do mózgu, gdzie w podwzgórzu łączy się ze swoistymi receptorami powodując zahamowanie syntezy i sekrecji neuropeptydu Y. Obniżenie stężenia neuropeptydu Y w podwzgórzu prowadzi do obniżenia łaknienia, co może spowodować spadek masy ciała [10].

Mutacja genu *ob* prowadzi do niedoboru leptyny, co może wywołać wzrost masy ciała u myszy *ob/ob*. Podanie leptyny otyłym gryzoniom nie we wszystkich przypadkach powodowało normalizację wagi ciała, czego powodem mogą być także nieprawidłowości w budowie i działaniu receptora leptyny [38].

W miarę postępu badań nad leptyną okazało się, że działanie tego białka nie ogranicza się do wpływu na centralny system nerwowy. Leptyna wykazuje szerokie spektrum działania wywierając wpływ na śródbłonek naczyń krwionośnych [42, 38], tkankę tłuszczową [33, 11] oraz na szereg narządów, takich jak: trzustka [20, 37], wątroba [44], jelito [28, 32], układ krwiotwórczy [27, 46, 12], nadnercza [38, 12]. Plejotropowość działania leptyny, jej wpływ na procesy rozrodu, hematopoezę, funkcje układu immunologicznego uczyniły z leptyny interesujący obiekt badań.

RECEPTORY LEPTYNY I ICH LOKALIZACJA NARZĄDOWA

Receptor leptyny (OB-R), kodowany przez gen *db*, należy do receptorów rodziny cytokin klasy I [44, 45]. Podkreśla się zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne podobieństwo receptora leptyny do podjednostki gp130 biorącej udział w przekazie sygnału przez cytokiny z rodziny IL-6 [35,36]. Jednak receptor leptyny, w odróżnieniu od receptorów cytokin z rodziny IL-6, nie wymaga do przekazu sygnału obecności dodatkowych białek, takich jak np. LIFR (receptor czynnika hamującego białaczkę) [35, 44]. Po związaniu liganda zachodzi homodimeryzacja cząsteczek receptora leptyny [48]. Stąd można go zaliczyć do podrodziny receptorów hormonu wzrostu aktywowanych przez homodimeryzację [35, 48].

U myszy [5], szczura [18] i człowieka [16] zidentyfikowano kilka izoform receptora leptyny różniących się długością domeny cytoplazmatycznej. Powstają one w drodze alternatywnego składania transkryptu [44]. Fragment zewnątrzkomórkowy każdej z izoform receptora myszy, zbudowany z 816 aminokwasów, zawiera dwie powtarzające się pary domen, w skład których wchodzi kolejno cztery reszty cysteinowe oraz motyw aminokwasowy WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser). Za wiązanie

leptyny odpowiedzialna jest para domen położona bliżej błony plazmatycznej [38, 44].

Odcinek domeny cytoplazmatycznej złożony z 29 aminokwasów jest także identyczny w przypadku wszystkich izoform receptora leptyny. Wszystkie izoformy zawierają więc sekwencję zwaną box1 mogącą wiązać kinazę tyrozynową Janusa JAK. Najdłuższa izoforma receptora leptyny OB-R_L zawiera także sekwencję box2 (również odpowiedzialną za wiązanie kinaz JAK) oraz sekwencję pozwalającą na przyłączenie czynników transkrypcyjnych STAT zwaną box3 [38, 44, 48]. Budowę krótko- i długołańcuchowej (OB-R_S i OB-R_L) izoformy receptora leptyny myszy przedstawiono schematycznie na rysunku 1 [44].

U człowieka opisano cztery izoformy receptora leptyny wbudowane w błony. Tylko niewielka część ludzkich receptorów została wykryta w błonie komórkowej, większość zlokalizowana jest w przedziale wewnątrzkomórkowym, głównie retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego [1]. Ponadto stwierdzono, że wszystkie izoformy receptora leptyny są internalizowane w drodze endocytozy z udziałem klatryny. Najszybszą internalizację obserwowano dla długołańcuchowej izoformy receptora OB-R_L [1].

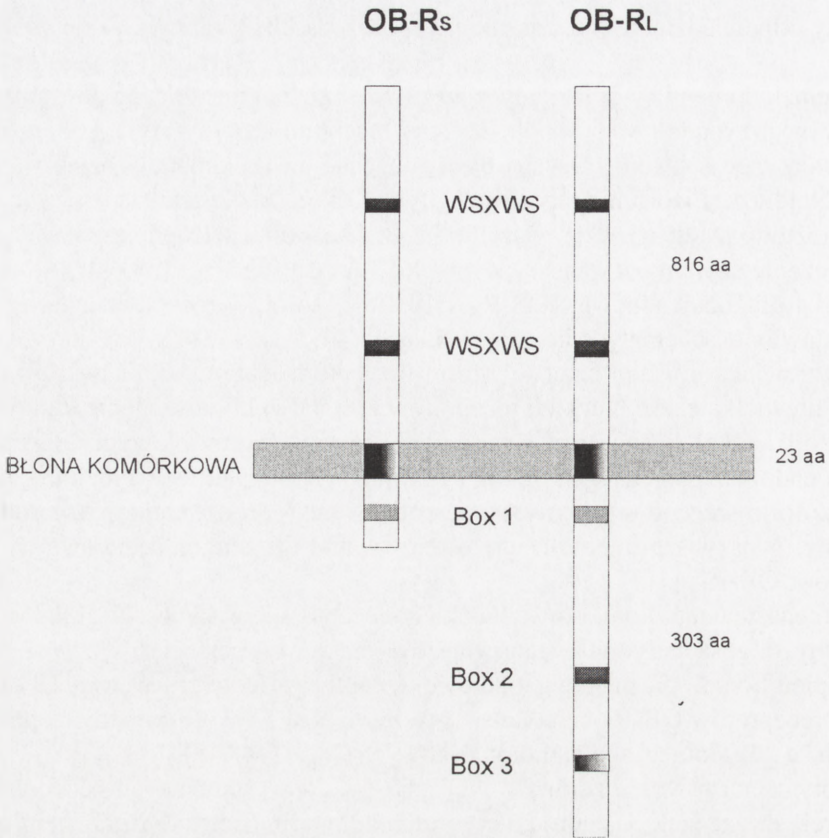
Domena zewnątrzkomórkowa ludzkiego receptora leptyny jest N-glikozylowana, łańcuchy oligosacharydowe stanowią 36% masy cząsteczki [16].

Stopień homologii międzygatunkowej receptorów leptyny jest wysoki. W przypadku receptorów OB-R_L człowieka i myszy wynosi 71% dla domen cytoplazmatycznych, a dla domen zewnątrzkomórkowych 78% [44, 45].

Leptyna ma również zdolność wiązania się do występujących na powierzchni komórek cząsteczek z nadrodziny immunoglobulin-Siglecs (*sialic acid-binding immunoglobulin superfamily member lectins*). W przeciwieństwie do większości cząsteczek z rodziny immunoglobulin rozpoznających ligandy białkowe, Siglecs specyficznie wiążą glikany zawierające kwas sjałowy. Cząsteczki te odpowiedzialne są za kontakt komórka-komórka, a ponadto mogą uczestniczyć w przekazie sygnału między komórkami poprzez aktywację białkowych kinaz i fosfataz. Wiążąca leptynę cząsteczka Siglecs-6 prawdopodobnie nie funkcjonuje jako receptor leptyny, ale jako białko wiążące [39].

W osoczu krwi stwierdzono obecność rozpuszczalnej formy receptora leptyny [6], która strukturalnie odpowiada domenom zewnątrzkomórkowym pozostałych izoform [13]. Rozpuszczalny receptor leptyny nie powstaje prawdopodobnie w drodze proteolizy pozostałych form tego receptora, lecz poprzez translację odpowiedniego mRNA [26]. Przypuszcza się, że rozpuszczalna forma receptora leptyny odpowiada za transport leptyny we krwi [26].

Obecność mRNA domeny zewnątrzkomórkowej identycznej dla wszystkich izoform receptora leptyny wykryto w wielu narządach [45, 13, 26, 17, 28]. U myszy mRNA krótkołańcuchowych form receptora leptyny OB-R_S znaleziono w większości narządów, najwyższą ekspresję tego mRNA stwierdzono w mózgu, płucach i nerce



RYSUNEK 1. Schemat budowy krótkołańcuchowej OB-R_S i długołańcuchowej OB-R_L izoformy receptora leptyny (wg [44])

[26, 17]. Uważa się, że OB-R_S umożliwiają transport leptyny przez barierę krew-mózg oraz usuwają leptynę z krwiobiegu [44]. Długołańcuchowa forma receptora leptyny występuje głównie w mózgu, gdzie odpowiada za kontrolę apetytu, gospodarki tłuszczowej i wydatkowania energii [31]. Jednak niską ekspresję tej izoformy wykryto także w płucach, nerkach, tkance tłuszczowej, wątrobie, łożysku oraz nadnerczach [38]. Jakiego znaczenia ma występowanie tak wielu form receptora leptyny i czy spełniają one funkcje fizjologiczne – dotychczas nie wiadomo.

PRZEKAZ SYGNAŁU PRZEZ RECEPTOR LEPTYNY

Zdolność przekazania sygnału do wnętrza komórki przypisuje się głównie długołańcuchowej formie receptora leptyny OB-R_L – tylko ta izoforma ma domenę box2 wiążącą kinazy tyrozynowe JAK oraz domenę box3 wiążącą białka STAT. Mechanizm przekazu sygnału przez OB-R_L poprzez szlak JAK/STAT przedstawiono

schematycznie na rysunku 2. Przyłączenie leptyny do receptora indukuje homodimeryzację cząsteczek receptora [48] oraz związanie i aktywację cząsteczek kinaz tyrozynowych JAK (rys. 2B). Zaktywowane kinazy fosforylują reszty tyrozynowe w obrębie sekwencji box3 receptora, co umożliwi dołączenie do tych sekwencji aktywatorów transkrypcji – białek STAT (rys. 2C). Białka STAT ulegają następnie fosforylacji przez kinazy JAK i tak zaktywowane w formie dimerów wędrują do jądra komórkowego, gdzie regulują transkrypcję odpowiednich genów (rys. 2D) [44, 38]. Stwierdzono, że leptyna ma zdolność aktywacji kinazy JAK2 oraz białek STAT1, 3, 5, 6 [44, 48, 38].

Oprócz szlaku JAK/STAT w przekazie sygnału przez leptynę mogą ponadto uczestniczyć kinazy aktywowane mitogenem MAP (Erk 1 i Erk2), substraty receptora insuliny IRS-1, IRS-2 oraz kinaza fosfatydyloinozytolu PI3K [36, 47, 3].

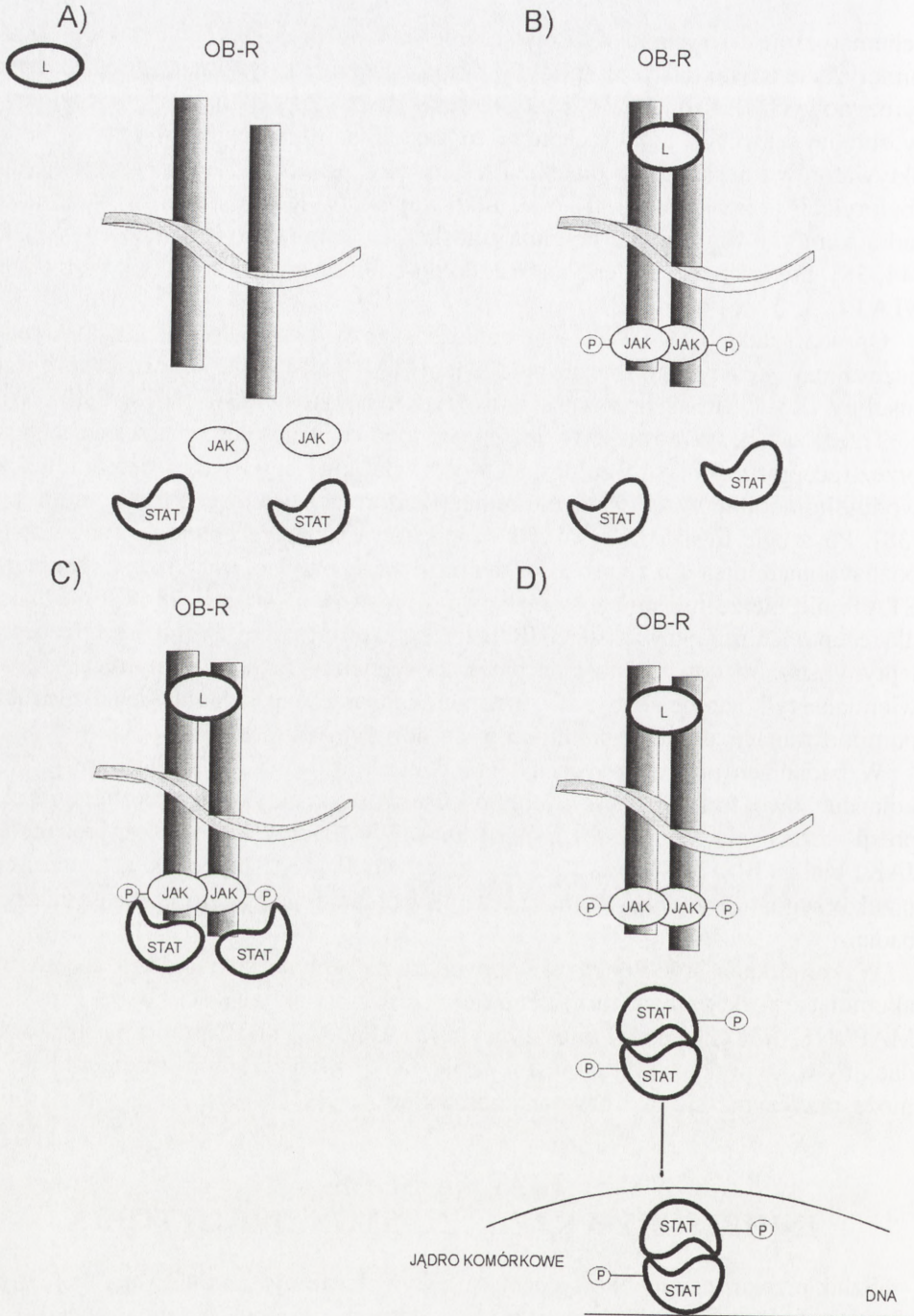
Trzeba zaznaczyć, że nie jest to jedyny proponowany mechanizm przekazu sygnału przez receptor leptyny – według niektórych wiązanie leptyny do receptora nie powoduje homodimeryzacji, a jedynie zmianę konformacji istniejącego już homodimeru [38]. Po drugie uważa się, że krótkołańcuchowa forma receptora leptyny OB-R_S pozbawiona domen box2 i box3, które umożliwiają przyłączenie kinaz JAK i białek STAT, nie bierze udziału w sygnalizacji komórkowej [44, 45, 25, 48]. Jednakże dla receptora hormonu wzrostu GHR, należącego do tej samej podrodziny co receptor leptyny, stwierdzono zdolność do przekazu sygnału skróconej formy receptora zawierającej tylko domenę box1. Do uruchomienia przekazu sygnału dochodziło także pomimo mutacji domeny box2 receptora hormonu wzrostu [3].

W badaniach prowadzonych na linii komórkowej wykazującą ekspresję krótkołańcuchowej formy receptora leptyny obserwowano aktywację przez leptynę ekspresji wczesnych genów *c-fos*, *c-jun* i *jun-B* [34], aktywację kinazy tyrozynowej JAK, białka IRS-1 [3] oraz kaskady kinaz MAP [50, 3]. Jednak ustalenie, czy przekaz sygnału przez OB-R_S ma znaczenie w organizmie żywym, wymaga dalszych badań.

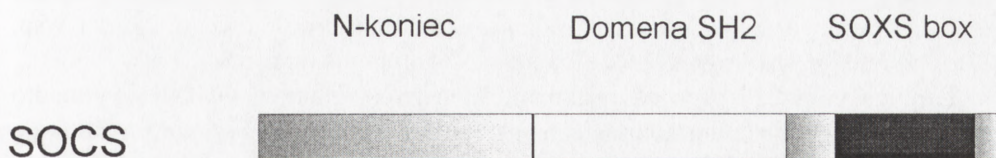
W komórkach śródbłonna w odpowiedzi na leptynę stwierdzono zwiększoną akumulację reaktywnych form tlenu, a także wzrost aktywności kinazy z rodziny MAP/JNK oraz czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFκB. Chroniczny stres oksydacyjny w komórkach śródbłonna wywoływany podwyższonym stężeniem leptyny może przyczynić się do rozwoju arteriosklerozy [4].

BIAŁKA SOCS- INHIBITORY PRZEKAZU SYGNAŁU CYTOKIN

Szlak przekazu sygnału od receptora leptyny może być modulowany na różnych etapach. Jednak niewiele dotychczas wiadomo, w jaki sposób sygnał generowany przez biologicznie aktywne peptydy może zostać wyłączony.



RYSUNEK 2. Mechanizm przekazu sygnału przez receptor leptyny (L – leptyna, OB-R – receptor leptyny, JAK – kinaza tyrozynowa, STAT – czynnik transkrypcyjny) (wg [38])



RYSUNEK 3. Schemat budowy białek SOCS (wg [43])

SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) to opisane 3 lata temu inhibitory przekazu sygnału cytokin, których ekspresja jest indukowana przez cytokiny [43]. Te stosunkowo małe białka są zbudowane według następującego schematu: różnej długości odcinek N-terminalny, część środkowa z domeną SH2 oraz 40aa konserwatywny C-końcowy motyw zwany SOCS-box [2, 7, 43]. Schematyczną budowę białek SOCS przedstawiono na rysunku 3 [43].

Hamowanie przekazu sygnału cytokin może odbywać się dwoma sposobami:

- przez związanie domen SH2 białek SOCS z ufosforylowaną tyrozyną receptora cytokin lub
- przez związanie domen SH2 z regionem katalitycznym kinaz JAK, co uniemożliwia aktywację białek STAT [2, 7, 43].

Z najnowszych danych wynika, że leptyna indukuje ekspresję jednego z białek SOCS: SOCS3, a zahamowanie przekazu sygnału zachodzi na skutek wiązania SOCS3 z kinazą tyrozynową JAK2 [2, 7].

U ludzi otyłych obserwuje się podwyższony poziom leptyny, co sugeruje, że otyłość może być związana ze zjawiskiem oporności na leptynę. Oporność na leptynę próbuje się tłumaczyć między innymi utrudnionym transportem leptyny przez barierę krew-mózg lub przez blokadę któregoś z etapów przekazu sygnału [12]. Indukcja ekspresji SOCS3 przez leptynę i w konsekwencji zahamowanie przekazu sygnału przez tę cząsteczkę może wyjaśnić zjawisko oporności na leptynę [3, 7].

LEPTYNA A REGULACJA FUNKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Podobieństwa w szlaku przekazu sygnału między leptyną a cytokinami z grupy IL-6 sprawiły, że zaproponowano udział leptyny w hematopoezie i odpowiedzi immunologicznej organizmu. Stwierdzono, że leptyna indukuje proliferację, różnicowanie i aktywację komórek hematopoetycznych, stymuluje proliferację komórek CD4⁺ oraz wzmaga produkcję cytokin, takich jak IL-2 i IFN γ , przez limfocyty Th1 [27]. W przypadku mysich makrofagów leptyna wzmaga produkcję GM-CSF i G-CSF [46] oraz nasila proces fagocytozy [12, 38]. Santoz-Alvarez i wsp. [40] wykazali, że leptyna aktywuje ludzkie monocyty indukując ich proliferację, ekspresję

markerów aktywacji oraz produkcję cytokin TNF α i IL-6. Pozbawienie organizmu środków odżywczych upośledza działanie układu odpornościowego, Lord i wsp. [27] stwierdzili, że leptyna może hamować tę immunosupresję.

Leptyna, poprzez wpływ na uwalnianie IL-1 i prostaglandyn, wydaje się ponadto regulować odpowiedź immunologiczną mózgu. Iniekcja leptyny szczurom indukuje wzrost temperatury ciała oraz zahamowanie apetytu, jak również prowadzi do wzrostu stężenia IL-1 β w podwzgórzu. Efekty te są hamowane przez antagonistę receptora IL-1 (IL-1ra). Stwierdzono także, że działanie pyrogenne leptyny jest znoszone przez inhibitor cyklooksygenazy [29].

Wyniki te wskazują na nową, ważną funkcję leptyny – regulację odpowiedzi immunologicznej organizmu. Prozapalne działanie leptyny może wskazywać na udział tego białka w patogenezie chorób o podłożu zapalnym.

Także w przypadku wątroby stwierdzono podobieństwo szlaku przekazu sygnału od receptora leptyny do szlaku biegnącego od cytokin z grupy IL-6 [47]. W odpowiedzi na leptynę zaobserwowano zarówno aktywację białek STAT 1, 3, 5, indukcję genów białek ostrej fazy – hemopeksyny i tiostatyny, jak i synergizm leptyny i IL-1 lub TNF α we wpływie na ekspresję genów białek ostrej fazy typu 1 [47]. Stwierdzono, że choć leptyna, podobnie do IL-6, nie jest zdolna do indukcji ekspresji genu dla α 1-kwaśnej glikoproteiny, wzmacna ona stymulowaną IL-1 lub TNF α ekspresję tego genu [47].

MODULACJA PRODUKCJI LEPTYNY PRZEZ CYTOKINY PRO- I PRZECIWZAPALNE

Szereg cytokin zapalnych, głównie TNF α i IL-1, indukuje anoreksję i obniżenie wagi ciała – zaburzenia często obserwowane w chronicznych i ostrych zapaleniach. Jedną z przyczyn wystąpienia tych zaburzeń może być podwyższenie poziomu leptyny.

LPS, IL-1 i TNF α zwiększają ekspresję genu *ob* oraz stężenie leptyny w surowicy krwi gryzoni [15, 41] i człowieka [49, 21]. Stwierdzono ponadto, że sIL-1R blokuje indukowany LPS wzrost stężenia leptyny w surowicy krwi szczurów, co wskazuje na zaangażowanie IL-1 w efekt wywoływany przez LPS. Także badania myszy pozbawionych genów dla IL-1 lub IL-6 potwierdzają, że tylko IL-1 pełni kluczową rolę w indukcji syntezy leptyny w odpowiedzi na LPS [8].

Badania *in vitro* na hodowlach adipocytów wydają się nie potwierdzać wyników eksperymentów *in vivo* odnośnie wpływu TNF α na syntezę leptyny. Kirschgessner i wsp. [23] stwierdzili, że TNF α stymuluje uwalnianie leptyny z adipocytów 3T3-L1. Natomiast wyniki badań dwóch zespołów na pierwotnej hodowli adipocytów są sprzeczne. Finck i wsp. [9] obserwowali stymulację uwalniania leptyny po 24 godzinach od podania TNF α . Natomiast Yamaguchi i wsp. [49] oraz Medina i wsp.

[30] stwierdzili, że chroniczna ekspozycja na $TNF\alpha$ powoduje zmniejszenie ekspresji genu *ob* oraz sekrecji leptyny. Spadek ilości mRNA dla leptyny zaobserwowano także pod wpływem cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6 i IL-11, a zwiększenie ilości tego mRNA pod wpływem cytokiny przeciwzapalnej TGF β [14]. Wyjaśnienie różnicowości wyników eksperymentów *in vivo* i *in vitro* dotyczących wpływu cytokin na ekspresję genu *ob* i sekrecję leptyny wymaga dalszych badań. Wyniki eksperymentów prowadzonych *in vivo* mogą wskazywać na pośredni efekt cytokin na produkcję leptyny. Być może iniekcja IL-1 czy $TNF\alpha$ indukuje u zwierząt szereg drugorzędowych mediatorów mogących wzmacniać ekspresję genu leptyny i sekrecję tego białka. Nie stwierdzono ponadto związku pomiędzy stężeniem leptyny we krwi pacjentów zarażonych HIV oraz pacjentów z rakiem płuc a utratą wagi ciała. Mechanizm alternatywny utraty wagi ciała w przypadku chorób nowotworowych i infekcji wirusem HIV zakłada, że cytokiny – $TNF\alpha$, IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ powodują wzrost ekspresji genu kortykoliberyny (CRH) i tym samym wpływają na sekrecję glukokortykoidów, które wzmagają z kolei syntezę leptyny. Co więcej, ze względu na strukturalne i funkcjonalne podobieństwo receptora leptyny do receptorów innych cytokin, cytokiny mogą wywierać efekt leptynopodobny na homeostazę energetyczną organizmu [12].

W chorobach o ostrym przebiegu zaobserwowano podwyższone stężenie zarówno IL-6, jak i leptyny. W badaniach *in vitro* oraz badaniach na zwierzętach stwierdzono, że IL-6 stymuluje sekrecję leptyny. W przypadku człowieka uważa się natomiast, że IL-6 stymuluje sekrecję kortyzolu, który wzmagają z kolei produkcję leptyny. Jednak u pacjentów z szokiem septycznym stwierdzono negatywną korelację poziomu IL-6 i leptyny. Niskie stężenie leptyny może prowadzić do upośledzenia funkcjonowania współczulnego układu nerwowego oraz zaburzeń w działaniu układu odporności [46].

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje Pani dr hab. Amalii Guzdek za cenne wskazówki przy redagowaniu pracy.

LITERATURA

- [1] BARR VA, LANE K, TAYLOR SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21416–21424.
- [2] BJORBEEK C, EL-HASCHIMI K, FRANTZ JD, FLIER JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30059–30065.
- [3] BJORBEEK C, UOTANI S, DA SILVA B, FLIER JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32686–32694.
- [4] BOULOUMIE A, MARUMO T, LAFONTAN M, BUSSE R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 1999; **13**: 1231–1238.

- [5] CHEN H, CHARLAT O, TARTAGLIA LA, WOOLF EA, WENG X, ELLIS SJ, LAKEY ND, CULPEPPER J, MOORE KJ, BREITBART RE, DUYK GM, TEPPER RI, MORGENSTERN JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1994; **84**: 491–495.
- [6] DIAMOND FB, EICHLER DC, DUCKETT G, JORGENSEN EV, SHULMANN D, ROOT AW. Demonstration of a leptin binding factor in human serum. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **233**: 818–822.
- [7] EMILSSON V, ARCH JRS, DE GROOT RP, LISTER CA, CAWTHORNE MA. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 1999; **455**: 170–174.
- [8] FAGGIONI R, FANTUZZI G, FULLER J, DINARELLO CA, FEINGOLD KR, GRUNFELD C. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Phys* 1998; **274**: 204–208.
- [9] FINCK BN, KELLEY KW, DANTZER R, JOHNSON RW. *In vivo* and *in vitro* evidence for the involvement of tumor necrosis factor- α in the induction of leptin by lipopolisaccharide. *Endocrinology* 1998; **139**: 2278–2283.
- [10] FRIEDMAN JM, HALLAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; **395**: 763–770.
- [11] FRÜHBECK G, AGUADO M., MARTINEZ JA. *In vitro* lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **240**: 590–594.
- [12] FRÜHBECK G, JEBB SA, PRENTICE AM. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Phys* 1998; **18**: 399–419.
- [13] GAVRILOVA O, BARR V, MARCUS-SAMUELS B, REITMAN M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30546–30551.
- [14] GRANOWITZ EV. Transforming growth factor- β enhances and pro-inflammatory cytokines inhibit *ob* gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **240**: 382–385.
- [15] GRUNFELD C, ZHAO C, FULLER J, POLLACK A, MONSTER A, FRIEDMAN J, FEINGOLD KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2152–2157.
- [16] HANIU M., ARAKAWA T, BURES EJ, YOUNG Y, HUI JO, ROHDE MF, WELCHER AA, HORAN T. Human leptin receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28691–28699.
- [17] HOGGARD N, MERCER J, RAYNER DV, MOAR K. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and *in situ* hybridization. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **232**: 383–387.
- [18] IIDA M, MURAKAMI T, ISHIDA K, MIZUNO A, KUWAJIMA M, SHIMA K. Phenotype-linked amino-acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker Fatty (*fa/fa*) rat. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; **222**: 19–26.
- [19] IMAGAWA K, NUMATA Y, KUTSUURA G, SAKAGUCHI I, MORITA A, KIKUOKA S, MATUMOTO Y, TSUJI T, TAMAKI M, SASAKURA K, TERAOKA H, HOSODA K, OGAWA Y, NAKAO K. Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 35245–35249.
- [20] ISLAM MS, MORTON NM, HANSSON A, EMILSSON V. Rat insulinoma-derived pancreatic β -cells express a functional leptin receptor that mediates a proliferative response. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **238**: 851–855.
- [21] JANIK JE, CURTI BD, CONSIDINE RV, RAGER HC, POWERS GC, ALVORD WG, SMITH JW, GAUSE BL, KOPP WC. Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3084–3086.
- [22] JONEYA B, WOJCHOWSKI DM. Mitogenic signaling and inhibition of apoptosis via the erythropoietin receptor box-1 domain. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10664–10670.

- [23] KIRCHGESSNER TG, UYSAL KT, WIESBROCK SM, MARINO MW, HOTAMISLIGIL GS. Tumor necrosis factor- α contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2777–2782.
- [24] LEBURN JJ, ALI S, ULLRICH A, KELLY PA. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolilin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10664–10670.
- [25] LEE GH, PROENCA R, MONTEZ J, CARROLL KM, DARISHZADEH JG, LEE JI, FRIEDMAN JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; **379**: 632–635.
- [26] LOELLMANN B, GRUENINGER S, STRICKER-KRONGRAD A, CHIESI M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants OB-Ra, b and e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **238**: 648–652.
- [27] LORD GM, MATARESE G, HOWARD JK, BAKER RJ, BLOOM SR, LECHLER RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; **394**: 897–901.
- [28] LOSTAO MP, URDANETA E, MARTINEZ-ANSO E, BARBER A, MARTINEZ JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett* 1998; **423**: 302–306.
- [29] LUHESI GN, GARDNER JD, RUSHFOTTH DA, LOUDON AS, ROTHWELL NJ. Leptin action on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7047–7052.
- [30] MEDINA EA, STANHOPE KL, MIZUNO TM, GREGOIRE F, HUBBARD NE, ERICKSON KL, HAVEL PJ. Effects of tumor necrosis factor α on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes* 1999; **23**: 896–903.
- [31] MERCER J, HOGGADR N, WILLIAMSLM, LAWRENCE CB, HANNAH LT, TRAY-HURN P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (OB-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by *in situ* hybridization. *FEBS Lett* 1996; **387**: 113–116.
- [32] MORTON NM, EMILSSON V, LIU YL, CAWTHORNE MA. Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26194–26201.
- [33] MULLER G, ERTLJ, GERLM, PREIBISCH G. Leptin impairs metabolic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10585–10593.
- [34] MURAKAMI T, YAMASHITA T, IIDA M, KUWAJIMA M, SHIMA K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **231**: 26–29.
- [35] NAKASHIMA K, NARAZAKI M, TAGA T. Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with closely related cytokine signal transducer gp 130. *FEBS Lett* 1997; **403**: 79–82.
- [36] NAKASHIMA K, NARAZAKI M, TAGA T. Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130. *FEBS Lett* 1997; **401**: 49–52.
- [37] PALLET AL, MORTON NM, CAWTHORNE MA, EMILSSON V. Leptin inhibits insulin secretion and reduced insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **238**: 267–270.
- [38] PANKIEWICZ A, ŚWIERCZYŃSKI J. Zaburzenia budowy i funkcji receptora leptyny – jedna z przyczyn otyłości? *Post Biochem* 1999; **45**: 218–225.
- [39] PATEL N, BRINKMAN-VAN DER LINDEN M, ALTMANN SW, GISH K, BALASUBRAMANIAN S, TIMANS JC, PETERSON D, BELL MP, BAZAN JF, VARKI A, KASTELEIN RA. OB-BP1/Siglec-6 A leptin and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22729–22738.
- [40] SANTOZ-ALVAREZ J, GOBERNA R, SNCHEZ-MARGALET V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999; **194**: 6–11.

- [41] SARRAF P, FREDERICH RC, TURNER EM, MA G, JASKOWIAK NT, RIVET DJ 3RD, FLIER JS, LOWELL BB, FRAKER DL, ALEXANDER HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997; **185**: 171–175.
- [42] SIERRA-HONIGMANN MR, NATH AK, MURAKAMI CH, GRACIA-CARDENA G, PAPAPETROPOULOS A, SESSA WC, MADGE LA, SCHECHNER JS, SCHWABB MB, POLVERINI PJ, FLORES-RIVEROS JR. Biological action of leptin as an angiogenetic factor. *Science* 1998; **281**: 1683–1686.
- [43] STARR R, HILTON DJ. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 1081–1085.
- [44] TARTAGLIA LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6093–6096.
- [45] TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, MUIR C, SANKER S, MORIARTY A, MOORE KJ, SMUTKO JS, MAYS GG, WOOLF EA, MONOROE CA, TEPPER RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; **83**: 1263–1271.
- [46] TORPY DJ, BORNSTEIN SR, CHROUSOS GP. Leptin and interleukin-6 in sepsis. *Horm Metab Res* 1998; **30**: 726–729.
- [47] WANG Y, KUROPATWINSKI K K, WHITE WW, HAWLEY TS, HAWLEY RG, TARTAGLIA LA, BAUMAN H. Leptin receptor action in hepatic cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16216–16223.
- [48] WHITE DW, KUROPATWINSKI KK, DEVOS R, BAUMANN H, TARTAGLIA LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**: 4065–4071.
- [49] YAMAGUCHI M, MURAKAMI T, TOMIMATSU T, NISHIO Y, MITSUDA N, KANZAKI T, KURACHI H, SHIMA K, AONO T, MURATA Y. Autocrine inhibition of leptin production by tumor necrosis factor- α (TNF- α) through TNF- α type-I receptor *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; **244**: 30–34.
- [50] YAMASHITA T, MURAKAMI T, OTANI S, KUWAJIMA M., SHIMA K. Leptin receptor signal transduction: OBRa and Obrb of fa type. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; **246**: 752–759.
- [51] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M., BARONE M. LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425–432.
- [52] ZUMBACH MS, BOEHME MW, WAHL P, STREMMEL W, ZIEGLER R, NAWROTH PP. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 4080–4082.

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: karo@mol.uj.edu.pl

RECEPTORY WIĄŻĄCE PÓŻNE PRODUKTY GLIKACJI

RECEPTORS FOR ADVANCED GLYCOSYLATION ENDPRODUCTS

Krystyna STALIŃSKA

Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Późne produkty glikacji – AGE – powstają na skutek nieenzymatycznej glikozylacji białek (reakcja Maillarda). AGE modyfikują funkcje komórek przez oddziaływanie ze specyficznymi receptorami powierzchniowymi: RAGE – receptor wiążący późne produkty glikacji, MSR – receptor *scavenger* oraz AGE-R1-R2-R3 – receptor złożony obecny w śródbłonku. Interakcja AGE/RAGE wywołuje w komórce stres oksydacyjny i aktywację czynnika jądrowego NFκB w drodze RAS/MAPK. Poza AGE, innymi ligandami dla RAGE są amfoteryna i amyloid-β. MSR jest receptorem odpowiedzialnym za fagocytozę i degradację AGE oraz za zjawiska adhezji makrofagów. AGE jest czynnikiem prozapalnym związanym z rozwojem wielu schorzeń, m.in. arteriosklerozy i nefropatii.
(*Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: 35–42*)

Słowa kluczowe: późne produkty glikacji, AGE, RAGE, receptor *scavenger*, glikacja

Summary: Advanced glycation end products (AGE) are formed as a result of nonenzymatic glycosylation of proteins, known as Maillard reaction. They modify cell function by interaction with three specific cell surface receptors: RAGE – receptor for advanced glycosylation endproducts, MSR – scavenger receptor, and AGE-R1-R2-R3 – complex receptor in endothelium. The interaction of AGE-RAGE is responsible for oxidative stress and activation of nuclear factor NFκB through Ras/MAPK pathway. Amphoterin and amyloid-β are the other ligands for RAGE. The MSR receptor mediates phagocytosis and degradation of AGE, and macrophage adhesion. As a proinflammatory factor, AGE is associated with development of many diseases, like atherosclerosis or nephropathy.
(*Advances in Cell Biology 2001; Suppl. 16: 35–42*)

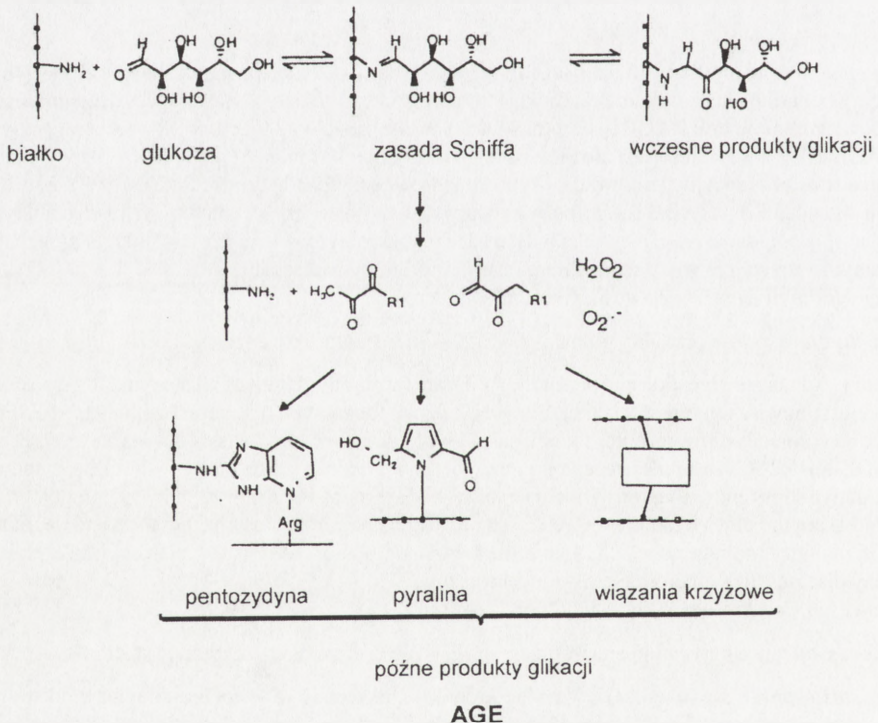
Key words: advanced glycation endproducts, AGE, RAGE, scavenger receptor, glycation

Wykaz stosowanych skrótów: AGE – późne produkty glikacji, EGF – epidermalny czynnik wzrostu, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, GM-CSF – czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makro-

fagowe, **ICAM** – cząstka adhezji międzykomórkowej, **IL** – interleukiny, **LDL** – lipoproteiny o niskiej gęstości, **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen, **MSR** – makrofagowy receptor *scavenger*, **NF- κ B** – jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B, **PDGF** – płytkopodobny czynnik wzrostu, **PI3K** – kinaza-3 fosfatydyloinozytolu, **PKC** – kinaza białkowa C, **RAGE** – receptor dla późnych produktów glikacji, **TNF** – czynnik martwicy nowotworu, **VCAM** – cząstka adhezji komórkowej naczyń.

WSTĘP

Glikacja jest jedną z potranslacyjnych modyfikacji białek. Jest to nieenzymatyczny proces zachodzący pomiędzy karbonyłowymi grupami cukrów redukujących a nukleofilowymi grupami białka. Produkt reakcji, zasada Schiffa, przechodzi w formę bardziej stabilnej ketoiminy (przegrupowanie Amadori), a następnie ulega dalszym, powolnym przemianom, takim jak: przegrupowanie wiązań, dehydratacja i oksydacja. Powstałe produkty reagują ponownie z wolnymi grupami aminowymi białka tworząc związki o cechach chromoforów, a utworzone wiązania krzyżowe wewnątrz- i międzycząsteczkowe powodują agregację białek. Podstawowymi epitetopami tych późnych produktów glikacji (*Advanced Glycation Endproducts* – AGE) są n-epsylon-karboksymetylolizyna, pyralina i pentozydyna [9, 34].



RYSUNEK 1. Schemat przedstawiający etapy formowania późnych produktów glikacji (AGE), reakcja Maillarda

Z uwagi na fakt, że reakcja Maillarda jest procesem powolnym (rzędu dni), glikacji podlegają białka o długim okresie półtrwania, przede wszystkim białka macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, laminina, krystalina oka), ale także białka i lipoproteiny osocza [2, 15]. Zwolniony obrót białek oraz podniesiony poziom cukru przyspieszają proces glikacji. Takie warunki pojawiają się w cukrzycy, w procesach starzenia oraz podczas długotrwałej dializy nerkowej. Przyjmuje się, że glikacja przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń m.in. arteriosklerozy, nefropatii czy choroby Alzheimera [16, 35, 37].

Glikacja wpływa zarówno na strukturę białek, jak i na funkcje komórek w odpowiedzi na wiązanie AGE. Praca omawia receptory wiążące glikowane białka. Spośród wielu białek opisanych jako wiążące późne produkty glikacji tylko niektóre spełniają warunki definiujące receptor:

1. **RAGE** – receptor wiążący późne produkty glikacji, obecny w błonie bardzo wielu typów komórek,
2. **MSR** – receptor *scavenger* (zmiatacz), typowy dla fagocytów,
3. **AGE-R1/R2/R3** – receptor złożony, charakterystyczny dla śródbłonka.

RAGE

RAGE (*Receptor for Advanced Glycosylation Endproducts*) należy do nadrodziny cząstek immunoglobulinopodobnych i wykazuje dużą homologię do czynnika adhezji komórek nerwowych (NCAM). Posiada domenę V i dwie domeny C odpowiedzialne za rozpoznanie komórka-komórka i komórka-podłoże, jak również miejsce wiążące antygen [18]. Receptor ten wiąże z dużą swoistością wszystkie dotychczas poznane naturalne i syntetyczne glikowane białka, a liczba receptorów w błonie komórkowej zależy od stężenia i czasu ekspozycji na ligand. Wykazano, że TNF- α , 17 β -estradiol oraz ligand -AGE, mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji receptora RAGE [10].

Związanie AGE z receptorem RAGE prowadzi do indukcji stresu oksydacyjnego w komórce [8, 11]. Uruchomiony zostaje szlak przekazu sygnału, w którym uczestniczą m.in. małe białka G z rodziny Ras oraz kinazy – MAP [6, 11]. Szlak Ras/MAPK aktywuje czynnik jądrowy NF κ B, będący ważnym elementem regulacji odpowiedzi zapalnej. Aktywację czynnika AP-1, innego białka jądrowego związanego z odpowiedzią zapalną, stwierdzono w komórkach tubularnych kanalika nerkowego [28]. W rejonie promotorowym wielu genów, których ekspresja jest modulowana przez AGE, znajdują się miejsca wiązania zarówno NF κ B, jak i AP-1. Również w rejonie regulatorowym genu *RAGE* wykazano istnienie dwóch miejsc wiązania NF κ B, co może świadczyć o autoregulacji ekspresji receptora [13].

Jednym z efektów wywołanych związaniem AGE z RAGE jest proliferacja m.in. fibroblastów, komórek mesangialnych nerki czy mięśni gładkich naczyń. Huang i wsp. [5] wykazali, że w przekazie sygnału uczestniczy kinaza Janusa JAK-2 oraz czynniki jądrowe STAT-1 i STAT-3. Szlak JAK/STAT aktywuje ekspresję

receptora epidermalnego czynnika wzrostu, głównego czynnika związanego z proliferacją komórek [5, 8, 33].

INNE LIGANDY RAGE

Silną ekspresję RAGE stwierdzono w mózgu w okresie pre- i wczesnym postnatalnym i dlatego uważa się, że glikowane białka nie mogą być głównym ligandem tego receptora. Wczesnym ligandem RAGE jest amfoteryna, polipeptyd wzmagający syntezę czynnika wzrostu komórek nerwowych (NGF). Amfoteryna warunkuje prawidłowy rozwój mózgu w okresie płodowym. W badaniach *in vitro* ustalono, że kompleks RAGE-amfoteryna aktywuje szlak Cdc42/Rac związany z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego i wydłużaniem neurytów [6].

W okresie postnatalnym amfoteryna traci znaczenie jako ligand receptora RAGE, jednak niektóre nowotwory są zdolne do syntezy tego polipeptydu. Zaobserwowano, że zablokowanie wiązania amfoteryny do RAGE prowadzi do zahamowania w komórkach nowotworowych szlaków przekazu sygnału zaangażowanych w aktywację wzrostu oraz zdolność tworzenia przerzutów [32].

W mózgu chorych na chorobę Alzheimera wykazano wzmoczoną ekspresję RAGE. Receptor ten wiąże amyloid β – składnik złożeń amyloidowych. *In vitro* ustalono, że wiązanie amyloidu β z receptorem RAGE w neuronach wywołuje długotrwały stres oksydacyjny prowadzący do apoptozy komórek [35].

Glikacja amyloidu β zwiększa tempo tworzenia zagregowanych form tego peptydu przez tworzenie wiązań krzyżowych, co dowodzi znaczenia nieenzymatycznej glikozylacji w etiologii choroby Alzheimera [17].

MAKROFAGOWY RECEPTOR TYPU *SCAVENGER* (MSR)

Receptor *scavenger* należy do rodziny makrofagowych receptorów zmiataczy typu 1 klasy A. Cechą wyróżniającą ten receptor spośród pozostałych receptorów zmiataczy jest obecność homotrimeru kolagenopodobnych włókien w układzie helisy oraz domeny wiążącej bogatej w cysteinę [22]. Receptor ten jest charakterystyczny dla fagocytów, ale jego obecność stwierdzono również w błonie komórek śródbłonna i mięśni gładkich [7, 14, 19]. MSR wiąże zarówno glikowane białka, jak i modyfikowane (acetylowane, utlenione) lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) i uczestniczy w ich internalizacji i degradacji [1, 31].

Podczas różnicowania monocytów w makrofagi liczba receptorów rośnie zgodnie z kierunkiem różnicowania i jest regulowana przez GM-CSF. Fagocyty tkankowe charakteryzują się najsilniejszą ekspresją MSR, a regulacja ekspresji tego receptora związana jest z aktywacją czynnika AP-1 [1, 26, 29].

Przyłączenie AGE do receptora *scavenger* uruchamia proces fagocytozy powiązany z aktywacją kinaz tyrozynowych Src/Syk, aktywacją enzymów związanych

z metabolizmem lipidów błonowych oraz poprzez PI3K z aktywacją kinazy białkowej C. Wzrastające stężenie AGE obniża indeks fagocytarny makrofagów. Podwyższony poziom glikowanych białek u chorych z cukrzycą może mieć więc związek ze spadkiem odporności u tych chorych. Insulina odwraca hamujący efekt AGE przez aktywację PI3K [26]. Suzuki i wsp. [31] ustalili, że MSR odpowiada nie tylko za usuwanie AGE czy modyfikowanych LDL, ale też jego obecność w błonie komórkowej jest niezbędna do adhezji monocytów/makrofagów. Jednocześnie wykazano, że adhezja do glikowanych powierzchni (kolagen typ IV-AGE), jak i indukowana rozpuszczalnym AGE obniża zdolność do fagocytozy acetylowanych-LDL [7, 23, 31].

RECEPTOR ZŁOŻONY DLA AGE

Oprócz receptorów RAGE i MSR znaleziono szereg innych białek wiążących AGE, lecz ich funkcja nie została dotychczas wyjaśniona [18, 32, 36]. Dwa spośród nich, opisane jako p60 i p90, znaleziono w wielu typach komórek, ale tylko w śródbłonku wykazano, że tworzą one razem z białkiem o masie 32 kDa receptor złożony AGE-R1/R2/R3 [30]. Podjednostka receptora AGE-R1 (p60) jest białkiem homologicznym do OST-48 – składnika kompleksu ryboforyny związanego z przeniesieniem oligosacharydów wielomannozowych na akceptor asparaginowy w retikulum endoplazmatycznym [27]. Ze względu na tę homologię postuluje się zaangażowanie p60 w transkomórkowym przejściu AGE do głębszych warstw naczyń. AGE-R2 opisane wcześniej jako p90 może ulegać fosforylacji w obecności AGE i przypuszczalnie uczestniczy w przekazie sygnału. AGE-R3 (Gal-3) jest galaktyną typu P. W obrębie kompleksu receptora jest podjednostką wiążącą AGE. Białko to nie posiada domeny transbłonowej, natomiast w kompleksie wiąże się z AGE-R2. W odróżnieniu od p60 i p90, które są białkami stale obecnymi w błonie, Gal-3 jest białkiem indukowalnym, a jego ilość zależy od stężenia AGE. Prawdopodobnie związanie AGE przez Gal-3 jest warunkiem formowania się kompleksu receptora.

Receptor złożony AGE-R1-R2-R3 jest dobrze scharakteryzowany w komórkach śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC) oraz w śródbłonku ludzkiej aorty, jakkolwiek przekaz sygnału wywołany związaniem AGE z tym receptorem nie jest jeszcze poznany.

Skutki oddziaływania AGE-receptora

Istotne zmiany wywołane procesem glikacji białek obserwowane są m.in. w układzie naczyniowym, nerkach i mózgu. W tych bowiem tkankach stwierdzono silną kumulację AGE, szczególnie w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, a wytworzone wiązania krzyżowe usztywniają struktury i zmniejszają ich elastyczność

[2, 15, 16]. Jednocześnie AGE działają chemotaktycznie, co powoduje migrację monocytów/makrofagów do miejsc nagromadzenia się AGE i lokalne uwolnienie mediatorów zapalnych. Modułacja funkcji makrofagów w odpowiedzi na interakcję z glikowanymi białkami wiąże się nie tylko z ich migracją i adhezją, ale także ze wzmożoną ekspresją genów cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, TNF- α [10, 19, 31].

W śródbłonku, związanie AGE z receptorami prowadzi, poprzez aktywację czynnika jądrowego NF κ B do modulacji ekspresji wielu genów, w tym genów: cytokin prozapalnych – TNF α , IL-6 [10, 19]; cząstek adhezji ICAM-1, VCAM-1 [14]; wielu enzymów: m.in. syntazy tlenku azotu, oksygenazy hemowej typu 1, katalazy [3, 9, 37]. Aktywacja wymienionych czynników jest związana bezpośrednio lub pośrednio z patologicznymi zmianami prowadzącymi do arteriosklerozy.

Zważywszy na fakt kumulacji AGE w głębszych warstwach ścian naczyń i obecności w endotelium wszystkich trzech typów receptorów dla AGE, można sądzić, że tkanka ta może być w sposób istotny narażona na patologiczne zmiany wywołane przez glikację białek.

Jak opisano wcześniej, związanie AGE z receptorem RAGE prowadzi do proliferacji komórek, w tym fibroblastów, komórek mesangialnych czy komórek mięśni gładkich naczyń. Może to mieć związek z obserwowanym przerostem ścian kanalików nerkowych oraz zwężeniem światła naczyń. Takie zmiany obserwuje się u chorych z cukrzycą i po długotrwałej dializie nerkowej. Równocześnie, w wyniku oddziaływania AGE/RAGE, stwierdza się wzmożoną syntezę kolagenowych i niekolagenowych białek macierzy, co może wzmacniać efekty związane z nadmierną proliferacją komórek [20, 33]. AGE indukuje syntezę enzymów degradujących białka macierzy, m.in. metaloproteinaz oraz powoduje spadek aktywności ich inhibitorów [3, 9, 37]. Późne produkty reakcji Maillarda działają zatem jak czynniki prozapalne, można więc sądzić, że mają istotny udział w destrukcyjnych przemianach macierzy.

LITERATURA

- [1] ARAKI N, HIGASHI T, MORI T, SHIBAYAMA R, KAWABE Y, KODAMA T, HORIUCHI S. Macrophage scavenger mediates the endocytic uptake of advanced glycation endproducts of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 1995; **230**: 405–415.
- [2] BRANCCACCIO D, GALLIENI M, NIWA T, BRAIDOTTI P, COGGI G. Ultrastructural localization of advanced glycation endproducts and beta2-microglobulin in dialysis amyloidosis. *J Nephrol* 2000; **13**: 129–136.
- [3] COOPER M, THALLAS V, FORBES J, SCALBERT E, SASTRA S, DARBY I, SOULIS T. The cross-link breaker, n-phenacyl thiazolinum bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia* 2000; **43**: 660–664.
- [4] HOFMANN M, DRURY S, FU C, QU W, TAGUCHI A, LU Y, AVILA C, NAWROTH P, SLATTERY T, BEACH D, McCLARY J, NAGASHIMA M, SCHMIDT AM. RAGE mediates

- a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17810–17814.
- [5] HUANG J, GUH J, HUNG W, YANG M, LAI YH, CHEN HC. Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription(STAT) cascade in advanced glycation endproducts-induced cellular mitogenesis. *Biochem J* 1999; **342**: 231–238.
- [6] HUTTUMAN H, FAGES C, RAUVALA H. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signalling pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19919–19924.
- [7] IVANOV G, KYURKCHIEV S. Effect of advanced glycation and products on the activity of integrins expressed on U937. *Hum Immunol* 1998; **59**: 325–330.
- [8] IWASHIMA Y, ETO M, HORIUCHI S, SANO H. Advanced glycation end product-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression in the cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 441–448.
- [9] KISLINGER T, FU C, HUBER B, QU W, TAGUCHI A, YAN S, HOFMANN M, STERN D, SCHMIDT AM. N-epsilon-carboxymethyl-lysine adducts of proteins are ligands for receptor for AGE that activate cell signaling pathways and gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31740–31749.
- [10] LALLA E, LAMSTER IB, FEIT M, HUANG L, SPESSOT A, QU W, KISLINGER T, LU Y, SCHMIDT AM. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1117–1124.
- [11] LANDER H, TAURAS J, OGIESTE J, HORI O, MOSS R, SCHMIDT AM. Activation of the receptor for AGE triggers a p21ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *Nature* 2000; **404**: 787–790.
- [12] LEWIS A, MANNING A. New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr Opin in Chem Biol* 1999; **3**: 483–494.
- [13] LI J, SCHMIDT AM. Characterisation and functional analysis of the promotor of RAGE the receptor for advanced glycation end products. 1997; **272**: 16498–14505.
- [14] MCCOURT H, SMEDSROD B, MELKKO J. Characterisation of hyaluronian receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. *Hepatology* 1999; **30**: 1276–1286.
- [15] MIYATA T, ISHIGURO N, YASUDA Y, ITO T, NANGAKU M, IWATA H, KUROKAWA K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**: 45–49.
- [16] MOE SM, SINGH GK, BAILAY AM. Beta2-microglobulin induces MMP-1 but not TIMP-1 expression in human synovial fibroblasts. *Kidney Int* 2000; **57**: 2023–2034.
- [17] MÜNCH G, MAYER S, MICHAELIS J, HIPKISS A, RIEDERE P, MÜLLER R. Influence of advance glycation endproducts and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerisation of β -amyloid peptide. *Biochem Biophys Acta* 1997; **1360**: 17–29.
- [18] NEEPER M, SCHMIDT AN, BRETT J, YAN SD, WANG F, PAN YE, ELLISON K, STERN D, SHAW A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14998–15004.
- [19] NEUMAN A, SHINZEL R, PALM D, RIEDERER P, MÜNCH G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproducts-induced NF- κ B activation and cytokine expression. *FEBS Lett* 1999; **453**: 283–287.
- [20] OWEN W, HOU F, STUART R, KAY J, BOYCE J, CHERTOW GM, SCHMIDT AM. 2-microglobulin modified with advanced glycation endproducts modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int* 1998; **53**: 1365–1373.
- [21] QU W, TAGUCHI A. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; **97**: 889–901.

- [22] RESNICK D, CHATTERTON J, SHWARTZ K, SLAYTER H, KRIEGER M. Structure of class A macrophage scavenger receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26924–26930.
- [23] RENIER G, DESFAITS AC, SERRI O. Gliclazide decreases low density lipoprotein oxidation and monocyte adhesion to the endothelium. *Metabolism* 2000; **49**: 17–22.
- [24] RITTIE L, BERTON A, MONBOISSE J, HORNEBECK W, GILLERY P. Decrease contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 488–492.
- [25] RHOATS R. Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30337–30340.
- [26] SANO H, HIGASHI T, MATSUMOTO K, MELKKO J, JINNOUCHI Y, IKEDA K, EBINA Y, MAKINO H, HORIUCHI S. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of AGE. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8630–8637.
- [27] SILBERSTEIN S, KELLEHER D, GILMORE R. The 48-kDa subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase complex is homologous to the essential yeast protein WBPI. *J Biol Chem* 1992; **267**: 23658–23664.
- [28] SIMM A, MÜNCH G, SEIF F, SCHENK O, HEIDLAND A, RICHTER H, VANVAKAS S, SCHINZEL R. Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK. *FEBS Lett* 1998; **410**: 481–484.
- [29] SMEDSORD B, MELKKO J, ARAKI N, SANO H, HORIUCHI S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1997; **322**: 567–573.
- [30] STITT A, HE C, VLASSARA H. Characterization of the advanced glycation endproduct receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**: 549–556.
- [31] SUZUKI H, KURIHARA Y, TAKEYA M, KOMADA N, KATAOKA M, SUZUKI T, GORDON S, KODAMA T. A role for macrophage scavenger receptors in arteriosclerosis and susceptibility to inflammation. *Nature* 1997; **386**: 292–296.
- [32] TAGUCHI A, BLOOD D, TORO G, CANET A, LEE D, QU W, TANJI N, LU Y, LALLA E, FU C, HOFMANN MA, KISLINGER T, INGHAM M, LU A, TANAKA H, HORI O, OGAWA S, STERN DM, SCHMIDT AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000; **405**: 354–360.
- [33] TSUJI H, IEHARA N, MASAGI T, IMURA M, OHKAWA J, HIDENORI A, ISHII K, KITA T, DOI T. Ribozyme targeting of receptor for advanced glycation endproducts in mouse mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**: 583–588.
- [34] VASAN S, ZHANG X, KAPURNIOTU A, BERNHAGEN J, TEICHBERG S, BASGEN J, WAGLE D, SHIH D. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1996; **382**: 275–278.
- [35] YAN S, CHEN X, FU J, CHEN M, ZHU H, ROHER A, SLATTERY T, ZHAO L, NAGASHIMA M, MORSER J, MIGHELI T, NAWROTH P, SCHMIDT AM. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimers disease. *Nature* 1996; **382**: 685–691.
- [36] YAN S, SCHMIDT A, ANDERSOM M, ZHANG J, BRETT J, ZOU YS, PINSKY D, STERN D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products which their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9889–9894.
- [37] ZHANG J, REN S, SHEN GX. Glycation amplifies lipoprotein(a)-induced alterations in the generation of fibrinolytic regulators from humans vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2000; **150**: 299–308.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-007 Kraków

WPLYW STANU REDOKS KOMÓRKI NA AKTYWACJĘ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH I EKSPRESJĘ GENÓW*

THE INFLUENCE OF CELLULAR REDOX STATE ON THE ACTIVATION OF TRANSCRIPTION FACTORS AND GENE EXPRESSION

Jarosław CISOWSKI

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Reaktywne formy tlenu (RFT) towarzyszą organizmom żywym od ponad 2 mld lat. Ponieważ stanowią one poważne zagrożenie dla wszystkich składników komórki, w toku ewolucji wykształcone zostały systemy obronne służące ich detoksyfikacji. Równocześnie jednak pojawiły się enzymy, których rola polega na celowej produkcji RFT pod wpływem określonych bodźców. Badania ostatnich lat wykazały, że rolą powstałych w ten sposób RFT może być udział w przekazie sygnałów wewnątrz komórki. W poniższej pracy zostanie omówiony udział RFT w szlakach prowadzących do aktywacji czynników transkrypcyjnych i ekspresji genów. Szczególny nacisk położony zostanie na aktywację czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1, pełniących kluczową rolę w aktywacji szeregu genów biorących udział w procesach zapalnych i odpowiedzi immunologicznej.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: 43–59*)

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, antyoksydanty, czynniki transkrypcyjne, ekspresja genów.

Summary: Reactive oxygen species (ROS) have accompanied living organisms for over 2 billion years. Because they constitute a serious threat to all components of the cell, during the course of evolution some defence systems evolved to detoxify them. At the same time some enzymes appeared, that play a role as producers of ROS upon special stimuli. The recent years' experiments have demonstrated, that ROS thus produced could take part in intracellular signalling. The paper is concerned with the role of ROS in pathways leading to the activation of transcription factors and gene expression. The special emphasis will be laid on the activation of NF- κ B and AP-1, transcription factors, that play a key role in the activation of a number of genes involved in inflammation and immune response.

(*Advances in Cell Biology 2001; Suppl. 16: 43–59*)

Key words: reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, transcription factors, gene expression.

*Praca finansowana z grantu KBN 0366/P04/99/16.

WSTĘP

Powszechnie przyjmuje się, że życie powstało i rozwinęło się około 3,5 mld lat temu. Na Ziemi panowały wówczas warunki silnie redukujące. Gdy więc przed około 2,5 mld lat stężenie tlenu w atmosferze ziemskiej zaczęło gwałtownie rosnać, przed komórkami otworzyły się nie tylko nowe, obiecujące perspektywy, ale stanęły one także w obliczu niespotykanych dotychczas zagrożeń.

Czteroelektronowa redukcja tlenu do wody prowadzi do uwolnienia dużej ilości energii, znacznie większej niż ta, która wydziela się w wyniku fermentacji. Gdy jednak, z jakichś przyczyn, dojdzie jedynie do częściowej (jedno- bądź dwuelektronowej) redukcji cząsteczki tlenu, to produktami takiej reakcji będą tzw. reaktywne formy tlenu (RFT). Dobrze znanymi RFT w układach biologicznych są: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy (OH^{\bullet}). Pierwotne RFT mogą dać początek wtórnym produktom, takim jak: kwas podchlorawy, nadtlenek azotu oraz nadtlenki lipidów.

RFT są zdolne do uszkodzania niemal wszystkich składników komórki. Na atak RFT niezwykle podatne są kwasy tłuszczowe błon (zwłaszcza nienasycone); uszkodzeniom ulegają także białka i DNA (oksydacyjne modyfikacje tego ostatniego związku są szczególnie niebezpieczne ze względu na ich dziedziczny charakter). Działaniu RFT nie są w stanie oprzeć się nawet cukrowce.

Głównym źródłem RFT w komórkach są reakcje obejmujące transport elektronów w łańcuchu oddechowym, peroksysomach i mikrosomach. RFT generowane są także w reakcjach katalizowanych przez takie enzymy, jak: oksydazy (NADPH, ksantynowa) i reduktazy.

Aby uchronić się przed falą RFT stanowiących na dłuższą metę duże zagrożenie, komórki wykształciły szereg mechanizmów obronnych. Należy do nich cała grupa związków niskocząsteczkowych, zarówno hydrofilowych jak i hydrofobowych, pochodzenia egzo- i endogennego, zdolnych do detoksyfikacji RFT. W procesie tym biorą także udział związki o znacznie wyższych masach cząsteczkowych, tzn. enzymy (np. dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza i peroksydazy), ściśle współpracujące ze sobą, jak również białka pozbawione aktywności enzymatycznej (np. tioredoksyna, Ref-1), często będące kosubstratami tych enzymów.

Mając na uwadze tak skomplikowane mechanizmy obronne może wydawać się czymś zdumiewającym, że wiele komórek wyposażonych jest w systemy służące celowej syntezie RFT z O_2 w odpowiedzi na bodźce pobudzające.

Najlepszym przykładem takich komórek są fagocyty zdolne do syntezy w krótkim czasie dużych ilości RFT w charakterze broni chemicznej skierowanej przeciwko mikroorganizmom (w tzw. wybuchu tlenowym fagocytów). Jednak wiele innych typów komórek jest również zdolnych do „mini” wybuchu tlenowego będącego następstwem pobudzenia specyficznych receptorów błonowych. Do takich komórek należą: fibroblasty, pewne linie komórek nowotworowych, komórki endotelialne

oraz limfocyty T i B. Wykazano, że wiele czynników, zarówno fizjologicznych jak i patofizjologicznych, jest zdolnych do indukcji stresu oksydacyjnego w tych komórkach. Należą do nich cytokiny prozapalne, infekcje bakteryjne i wirusowe, promieniowanie wysokoenergetyczne (UV i γ) oraz niektóre związki wywołujące transformację nowotworową. Ponadto, w komórkach wyższych kręgowców odkryto szereg enzymów zdolnych do indukowalnej syntezy RFT. Ich przykładem są oksydazy NADPH, cyklooksygenazy i lipooksygenazy.

Powyższe obserwacje doprowadziły do wysunięcia w 1991 roku hipotezy mówiącej, że nieznaczne podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia RFT do wartości, które nie są jeszcze cytotoksyczne, może pełnić funkcje sygnalizacyjne [54]. Hipoteza ta uzyskała silne poparcie, gdy okazało się, że dwa dobrze znane czynniki transkrypcyjne: NF- κ B i AP-1 ulegają aktywacji, gdy stężenie RFT wewnątrz komórki, odpowiednio, podnosi się bądź zmniejsza.

W artykule tym zaprezentowane zostaną dowody świadczące o wpływie stanu redoks komórki na aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów. Szczególnie dokładnie omówiony zostanie udział RFT w aktywacji czynników NF- κ B i AP-1 (więcej informacji znaleźć można w pracach przeglądowych [1, 14, 16, 28, 41, 57]).

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY NF- κ B

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest jednym z najważniejszych mediatorów biorących udział w odpowiedzi komórki na szereg sytuacji stresowych. Do sytuacji takich zaliczyć można stres fizyczny (promieniowanie UV i γ), czynniki zakaźne (bakterie, wirusy i pasożyty) oraz podwyższone stężenie cząsteczek sygnalizacyjnych (np. cytokin). NF- κ B występuje w cytoplazmie większości komórek jako homodimer bądź heterodimer składający się ze strukturalnie spokrewnionych białek należących do rodziny Rel. Każdy członek tej rodziny ma zakonserwowany w procesie ewolucji N-terminalny region zwany domeną homologii z białkiem Rel (ang. *Rel-homology domain*: RHD), w obrębie którego zlokalizowane są domeny odpowiedzialne za wiązanie do DNA, dimeryzację i translokację do jądra komórkowego [37].

W komórkach ssaków znanych jest dotychczas pięć białek należących do rodziny Rel: p65 (Rel A); c-Rel; Rel B; p50/p105 i p52/p100 (dwa ostatnie powstają jako białka prekursorowe o masach, odpowiednio, 105 i 100 kDa i przekształcane są następnie w krótsze, biologicznie aktywne formy). W niepobudzonych komórkach NF- κ B pozostaje w cytoplazmie związany niekowalencyjnie z białkami inhibitorowymi tzw. inhibitorami κ B (I κ B). Białka te tworzą funkcjonalnie i strukturalnie spokrewnioną rodzinę, do której zalicza się: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100 i p105. Po to, by NF- κ B mógł ulec aktywacji i translokacji do jądra, I κ B musi oddysocjować. Dysocjacja ta poprzedzona jest procesami fosforylacji i ubiquitynacji, których następstwem jest degradacja I κ B w proteasomie. W procesie

fosforylacji inhibitora κB udział biorą kinazy $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ i β ($\text{IKK}\alpha$ i β) [2, 9, 37]. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ występuje w bardzo wielu typach komórek i bierze udział w ekspresji znacznej liczby indukowalnych genów dla cytokin i czynników wzrostu; receptorów cytokin; białek stresowych; molekuł adhezyjnych i cząsteczek immunoregulatorowych.

WPLYW OKSYDANTÓW NA AKTYWACJĘ $\text{NF-}\kappa\text{B}$

W 1990 roku Roederer *et al.* [47] donieśli, że *N*-acetylo-L-cysteina (NAC) hamuje aktywację wirusa HIV-1 pod wpływem 12-mirystynianu, 13-octanu forbolu (PMA) i czynnika martwicy nowotworów α ($\text{TNF-}\alpha$), która to aktywacja jest zależna od indukcji $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Staal *et al.* [59] wykazali ponadto, że NAC w stężeniach mili-molarnych hamuje aktywację $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Obserwacje te skłoniły Schrecka *et al.* [56] do zbadania, czy RFT biorą bezpośredni udział w aktywacji $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Do stymulacji komórek Jurkat użyli oni mikromolarnych stężeń H_2O_2 . Wynikiem takiego działania było nasilenie wiązania $\text{NF-}\kappa\text{B}$ do DNA, co można było śledzić przy pomocy testu zmiany ruchliwości elektroforetycznej w żelu (testu EMSA). Wynikiem eksperymentów z czasową transfekcją komórek Jurkat przy pomocy genu reporterowego dla acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT) znajdującego się pod kontrolą długich terminalnych powtórzeń (LTR) z wirusa HIV-1 było ustalenie, że ekspresja tego genu pod wpływem H_2O_2 zależna jest od obecności nienaruszonych sekwencji wiążących $\text{NF-}\kappa\text{B}$ w obrębie LTR. Co więcej, H_2O_2 nie tylko sam aktywował $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ale także działał synergistycznie z takimi induktorami $\text{NF-}\kappa\text{B}$, jak: inhibitor fosfataz – kwas okadajowy (OA) i PMA [53, 56].

Zbadano także rolę innych RFT, jak również reaktywnych form azotu, w aktywacji $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Badania te prowadzono przy użyciu bardzo wrażliwej na H_2O_2 linii komórek wywodzących się z limfocytów T tzw. „komórek Wurzburg”. Tlen singletowy i różne związki wchodzące w cykle redoks (menadion, parakwat) nie były silnymi aktywatorami, podczas gdy nadtlenek butylu oraz reoksygenacja po hypoksji komórek HeLa okazały się silnymi induktorami aktywacji $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [41]. Ze wszystkich przetestowanych do tej pory RFT H_2O_2 wydaje się być najsilniejszym aktywatorem. Ta wybiórczość $\text{NF-}\kappa\text{B}$ w stosunku do nadtlenuków przypomina prokariotyczny czynnik transkrypcyjny oxyR.

Jednak nadtlenek wodoru nie inaktywuje bezpośrednio $\text{I}\kappa\text{B}$, ponieważ po jego dodaniu do ekstraktów komórkowych nie obserwuje się aktywacji $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [56]. Natomiast dodanie utleniacza, jakim jest diamid, do ekstraktów jądrowych zawierających zaktywowany $\text{NF-}\kappa\text{B}$ hamuje jego zdolność wiązania się do DNA. Dzieje się tak najprawdopodobniej w wyniku utlenienia reszt cystein odpowiedzialnych za wiązanie do DNA.

Wrażliwość $\text{NF-}\kappa\text{B}$ na zmiany stanu redoks komórki przyczyniła się do wysunięcia przez Dröge *et al.* [10] hipotezy mówiącej, że po stanie stresu oksydacyjnego, niezbędnego do oddysocjowania $\text{I}\kappa\text{B}$ od $\text{NF-}\kappa\text{B}$, musi nastąpić zmiana środowiska

w komórce na bardziej redukujące, czemu towarzyszy naprawa utlenionego NF- κ B przy udziale glutationu.

Bardzo intrygującą wydaje się być obserwacja, że wiele aktywatorów NF- κ B wywołuje jednocześnie stres oksydacyjny w komórkach. TNF- α np. zaburza łańcuch transportu elektronów w mitochondriach, czego wynikiem jest wzmożona synteza RFT, niezbędna zarówno dla efektów cytotoksycznych, jak i indukcji ekspresji genów przez tą cytokinę. PMA wywołuje produkcję RFT przez stymulację oksydazy NADPH i cyklooksygenazy. Podobnie, promieniowanie UV i γ oraz stymulacja CD28, CD3, IgG2AR, IL-1R i receptorów immunoglobulinowych indukuje syntezę RFT aktywując jednocześnie NF- κ B.

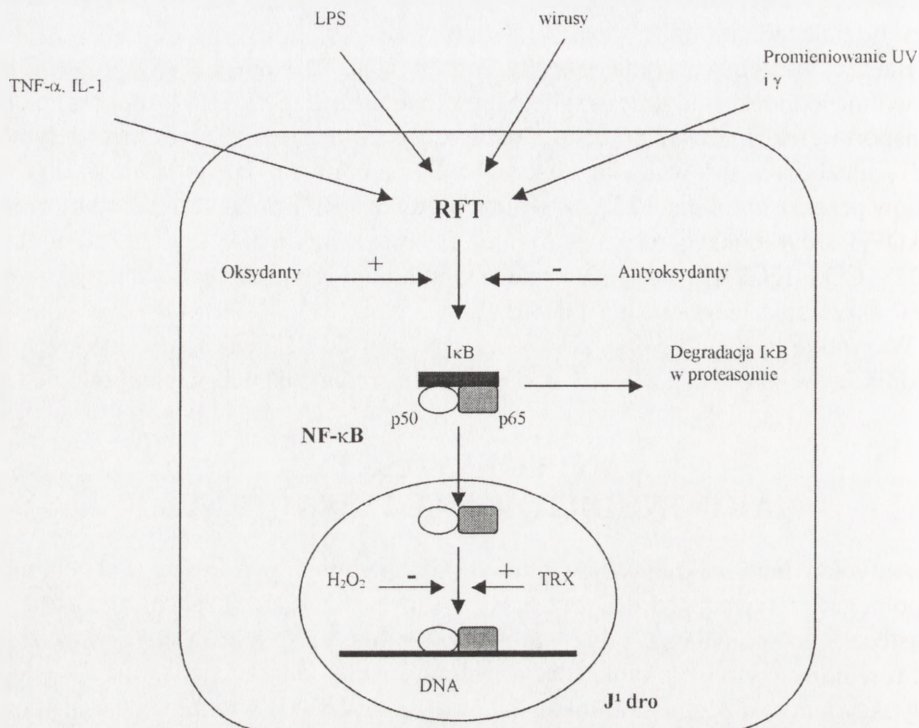
Wszystkie te dane wydają się wskazywać na rolę RFT jako uniwersalnych pośredników w aktywacji NF- κ B pod wpływem różnorodnych czynników.

ANTYOKSYDANTY JAKO INHIBITORY AKTYWACJI NF- κ B

Antyoksydanty, takie jak NAC albo ditiokarbaminian pyrrolidyny (PDTC), mogą zapobiegać aktywacji NF- κ B przez H_2O_2 . Efekt ten jest niezależny od struktury cząsteczki antyoksydanta, gdyż wiele strukturalnie niespokrewnionych związków, jak również enzymów antyoksydacyjnych wykazuje podobne działanie. Co więcej, antyoksydanty są zdolne do blokowania aktywacji NF- κ B w odpowiedzi na niemal wszystkie przetestowane do tej pory związki indukujące, takie jak TNF- α [64]; IL-1 [62]; LPS [61]; PMA [59]; IgG2A [41]; analogi aminokwasów [33] i przeładowanie retikulum endoplazmatycznego białkami [42] (rys. 1).

Dobrze znanymi antyoksydantami zdolnymi do hamowania aktywacji NF- κ B są: NAC [40]; ditiokarbaminian (DTC) i PDTC [62]; butylowany hydroksytoluen (BHT); witamina E i jej pochodne; kwas liponowy [41]; tepoksalina [29]; witamina C; ebselen; 2-merkptoetanol (2-ME); disulfiram; ortofenantrolina; desferrioksamina i pochodne katecholu [60]. Warto jednak zauważyć, że antyoksydanty mogą znacznie różnić się między sobą zdolnością do hamowania aktywacji NF- κ B. Ich działanie może być zależne od typu komórki, wychwytu przez komórkę, lokalizacji subkomórkowej, hydrofobowości i czasu półtrwania.

Jeśli chodzi o kwas okadajowy (OA) – inhibitor fosfataz i dobrze znany aktywator NF- κ B, to dane co do wpływu antyoksydantów na jego działanie są niejasne. Suzuki *et al.* nie stwierdzili hamowania przez NAC aktywacji NF- κ B po stymulacji komórek przy pomocy tego czynnika [60]. Późniejsze doświadczenia nie potwierdziły jednak tych rezultatów [52]. OA okazał się być silnym induktorem syntezy H_2O_2 i aktywatorem NF- κ B. Gdy produkcja H_2O_2 została zablokowana przy pomocy PDTC albo chelatora jonów wapnia, wtedy obniżał się także poziom aktywacji NF- κ B.



RYSUNEK 1. Schemat wpływu modulatorów stanu redoks komórki (oksydantów i antyoksydantów) na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Dla przejrzystości pominięto rolę kinaz białkowych IKK szczegółowo przedstawioną przez innych autorów [2, 9,37]. Czynniki, takie jak cytokiny, LPS, zakażenia wirusowe oraz promieniowanie UV i γ , działając na komórki indukują w nich syntezę reaktywnych form tlenu, czego efektem jest degradacja inhibitora κB w proteasomie i translokacja dimeru p50/p65 do jądra komórkowego. Etap ten jest hamowany przez antyoksydanty, a wzmagany przez oksydanty. W jądrze dimer p50/p65 wiąże się do odpowiednich sekwencji w DNA. Proces ten jest hamowany przez nadtlenek wodoru. Tioredoksyna natomiast ułatwia wiązanie NF-κB do DNA w wyniku redukcji specyficznych reszt cysteiny odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA

ROLA ENZYMÓW METABOLIZUJĄCYCH RFT W AKTYWACJI NF-κB

Jednymi z najważniejszych enzymów chroniących komórkę przed atakiem RFT są: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa i katalaza. Zahamowanie któregoś z tych enzymów przy pomocy specyficznych inhibitorów prowadzi do wzmożonej aktywacji NF-κB pod wpływem $\text{IL-1}\beta$ w ludzkiej linii fibroblastycznej WI-38 [46]. Podobnie, ekspresja genu reporterowego dla acetylotransferazy chloramfenikolu znajdującego się pod kontrolą czterech miejsc wiążących NF-κB była wyższa w komórkach poddanych działaniu 1,3-bis-(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznika, inhibitora reduktazy glutationowej [13].

Niezwykłe dogodnym modelem w badaniach aktywacji NF- κ B okazały się być linie wykazujące stałą nadekspresję enzymów metabolizujących RFT. Przykładem takich linii są klony wyprowadzone z komórek JB6 wywodzącej się z keratynocytów. Cechują się one nadekspresją katalazy bądź miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (Cu,Zn-SOD), przekraczającą 2,7 raza aktywność tych enzymów w linii wyjściowej JB6.

W przypadku nadekspresji katalazy stacjonarne stężenie H₂O₂ jest obniżone w wyniku wzmożonego jego rozkładu do H₂O i O₂, natomiast w przypadku nadekspresji Cu,Zn-SOD stacjonarne stężenie H₂O₂ jest podwyższone w wyniku wzmożonej dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. Nadekspresja katalazy hamowała aktywację NF- κ B w odpowiedzi na TNF- α [51] lub OA [52], przy czym komórki wykazujące nadekspresję katalazy miały taką samą ilość kompleksów NF- κ B-I κ B jak komórki wyjściowe, co wykazano poprzez nieenzymatyczną aktywację NF- κ B w ekstraktach komórkowych przy pomocy deoksychołanu. Co więcej, zahamowanie aktywności katalazy przy pomocy aminotriazolu podnosiło stopień aktywacji NF- κ B do poziomu kontroli. Nadekspresja Cu,Zn-SOD dawała z kolei efekt przeciwny. W komórkach tych aktywacja NF- κ B pod wpływem TNF- α bądź OA była silniejsza niż w komórkach niestransformowanych. Nadekspresja manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) w komórkach MCF-7 [55] hamowała natomiast aktywację NF- κ B pod wpływem PMA lub IL-1, a nasilała ją po stymulacji TNF- α . Doświadczenia te dostarczyły dalszych dowodów na poparcie teorii o selektywnej wrażliwości NF- κ B w stosunku do nadtlenków.

Niemniej cennych danych dostarczyły badania komórek wykazujących nadekspresję peroksydazy glutationowej (w rzeczywistości pod tą nazwą kryją się cztery różne enzymy o zróżnicowanej lokalizacji komórkowej i tkankowej [5]). O roli peroksydaz glutationowych w modulacji aktywności NF- κ B wydają się świadczyć następujące obserwacje:

- (i) inhibitory cyklooksygenaz i lipooksygenaz hamują aktywację NF- κ B [29];
- (ii) aktywność cyklooksygenaz zależy od ilości hydronadtlenków, która jest z kolei regulowana przez peroksydazy glutationowe;
- (iii) aktywacja NF- κ B hamowana była w komórkach wzbogaconych w selen, a wzmagana w komórkach hodowanych w warunkach niedoboru tego pierwiastka [36, 48].

W tym kontekście nie jest niczym zaskakującym, że nadekspresja klasycznej peroksydazy glutationowej (cGPx) w komórkach ludzkiej linii nowotworowej T47D hamowała aktywację NF- κ B pod wpływem TNF- α [32] i modulowała fosforylację hsp 27 po podaniu tej cytokiny [39]. W innych doświadczeniach wykazano z kolei, że nadekspresja peroksydazy glutationowej hydronadtlenków fosfolipidów (PHGPx), innego członka rodziny peroksydaz glutationowych, okazała się być lepszym sposobem hamowania aktywności lipooksygenaz i działania cytokin. Stała nadekspresja

PH GPx w ludzkich komórkach endotelialnych hamowała aktywację NF- κ B i stymulacji IL-1 [4].

TIOREDOKSYNA JAKO ANTYUTLENIACZ

Tioredoksyna (TRX) jest białkiem o masie 13 kDa biorącym udział w naprawie oksydacyjnie uszkodzonych białek. Wchodzi ona w skład systemu złożonego z reduktazy tioredoksynowej i peroksydazy tioredoksynowej, łączącego redukcję nadtlenków z utlenianiem NADPH [27].

Ludzka tioredoksyna może hamować aktywację NF- κ B pod wpływem TNF- α i PMA zarówno wówczas, gdy ulega czasowej nadekspresji w komórkach, jak i wtedy, gdy jest dodawana bezpośrednio do medium jako białko rekombinantowe. TRX może łatwo wchodzić do komórek, jak również je opuszczać, co może wskazywać na jej rolę w komunikacji międzykomórkowej [50]). Analogicznie do antyoksydantów TRX hamuje aktywację NF- κ B działając jednocześnie silnie stymulująco na AP-1. Podobnie jak antyoksydanty gra ona podwójną rolę w aktywacji NF- κ B: w cytoplazmie hamuje fosforylację i degradację I κ B, natomiast w jądrze wzmacnia wiązanie NF- κ B do DNA (wykazano, że TRX ulega translokacji do jądra po działaniu UVB [22]).

WPŁYW ZWIĄZKÓW MODULUJĄCYCH POZIOM WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO GLUTATIONU NA AKTYWACJĘ NF- κ B

Zredukowany glutation (GSH) jest głównym niskocząsteczkowym antyoksydantem występującym w komórkach w stężeniu 1–8 mM [17]. Pod względem chemicznym jest to tripeptyd: L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glicyna, pozbawiony toksyczności związanej z cysteiną, co czyni go wygodnym „buforem redoks” utrzymującym w komórce stały stosunek grup tiolowych do disiarczkowych [58]. Glutation bierze udział w rozmaitych procesach zachodzących w komórkach, takich jak: tworzenie koniugatów z metalami i związkami elektrofilowymi; metabolizm m.in. leukotrienu C₄, prostaglandyn, hepoksyliny, tlenku azotu, kwasu askorbinowego i dopaminy [66]; sygnalizacja międzykomórkowa i ekspresja genów [1]; apoptoza [65]; proliferacja komórek i rozwój osobniczy [7, 15] oraz w procesach rozrodczych [30].

Wykazano, że wiele sytuacji prowadzących do stresu oksydacyjnego powoduje ubytek GSH, czemu towarzyszy wzrost stężenia jego utlenionej formy (GSSG). Glutation jest kosubstratem dużej liczby wewnątrzkomórkowych enzymów antyoksydacyjnych katalizujących reakcje redukcji i detoksyfikacji nadtlenków.

Wewnątrzkomórkowym stężeniem glutationu można manipulować [17]. Dodanie NAC, prekursora syntezy glutationu, podnosi jego poziom w komórce. Z kolei podanie butionosulfoksyminy (BSO), inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteiny, kluczowego enzymu w syntezie glutationu, powoduje spadek jego stężenia. Oba te związki wpływają na aktywację NF- κ B w odpowiedzi na PMA i TNF- α . Sama BSO nie jest zdolna do znacznej indukcji NF- κ B, ale wzmacnia tę indukcję pod wpływem wielu bodźców. W przypadku NAC jest możliwe, że związek ten jest nie tylko prekursorem glutationu, ale jest także zdolny do bezpośredniego rozkładu H_2O_2 i innych RFT.

Podobnie jak w przypadku NAC, aktywację NF- κ B pod wpływem LPS w monocytach można zablokować przez podanie innego prekursora glutationu, jakim jest kwas oksatiozolidyno-4-karboksylowy (OTZ) [45].

W JAKI SPOSÓB KOMÓRKA „WYCZUWA” ZMIANY W STĘŻENIU RFT?

Nadtlenek wodoru jest jednym ze znanych czynników zdolnych do indukcji tworzenia mieszanych disiarczków między glutationem a resztami cysteiny białek. Proces ten, analogicznie do fosforylacji, może wzmacniać lub hamować aktywność białek. Zakłada się więc, że w procesie ewolucji powstały pewne enzymy, najprawdopodobniej kinazy bądź fosfatazy, zdolne do detekcji nieznacznych zmian w stężeniu wewnątrzkomórkowych RFT [41]. Wydaje się, że reszty cysteiny znajdujące się w otoczeniu aminokwasów zasadowych są szczególnie podatne na taką modyfikację.

Przykładem kinaz wrażliwych na zmiany stanu redoks komórki mogą być kinazy tyrozynowe p56^{lck} i p59^{fyn} biorące udział w przekazie sygnału do aktywacji NF- κ B w limfocytach T.

AP-1

Czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*) jest kolejnym przykładem czynnika regulowanego przez zmiany stanu redoks komórki. Czynnikiem ten wiąże się do tzw. elementu odpowiedzi na jeden z estrów forbolu, jakim jest TPA (ang. *Tetradecanoylphorbol 13-acetate*), – TRE (ang. *TPA response element*) znajdującego się w rejonie promotorowym wielu genów odpowiedzialnych za procesy proliferacji komórek i nowotworzenia. AP-1 jest aktywowany przez szereg bodźców, takich jak: czynniki wzrostu, cytokiny, aktywatory kinazy białkowej C i modulatory stanu redoks.

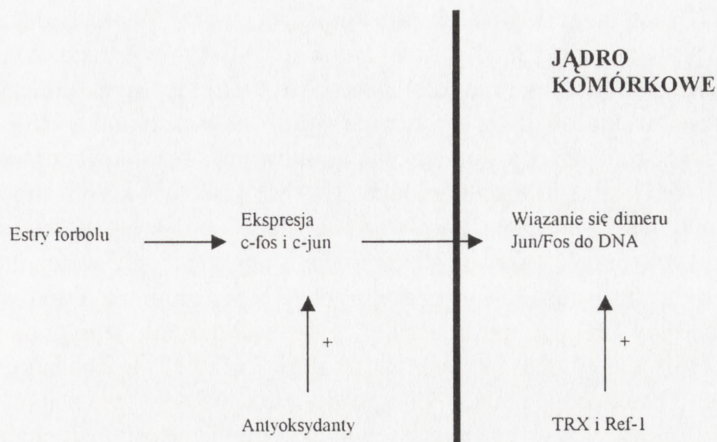
AP-1 jest dimerem złożonym z białek c-Jun i c-Fos, produktów protoonkogenów, odpowiednio, c-jun i c-fos. Znane są także inne białka spokrewnione z c-Jun i

c-Fos (JunB; JunD; FosB; Fra1 i Fra2) razem tworzące rodziny białek Jun i Fos. Tworzą one dimery dzięki oddziaływaniu domen o strukturze zamka leucynowego. Podczas gdy białka z rodziny Jun mogą tworzyć zarówno homo-, jak i heterodimery, białka z rodziny Fos tworzą wyłącznie heterodimery.

Z wyjątkiem homodimerów c-Jun, obecnych w komórce jeszcze przed aktywacją, głównym sposobem indukcji AP-1 jest synteza *de novo* tworzących go podjednostek. Ekspresja genów *c-jun* i *c-fos* jest stymulowana przez czynniki wzmagające syntezę RFT, takie jak: TNF- α , promieniowanie UV, nadtlenek wodoru i mitogeny [8, 35]. Późniejsze obserwacje wykazały jednak, że antyoksydanty są silniejszymi aktywatorami AP-1 niż prooksydanty. W przypadku komórek HeLa wiązanie się do DNA i aktywacja transkrypcji przez AP-1 były stymulowane przez PDTC i NAC lub w wyniku czasowej nadekspresji tioredoksyny. Tioredoksyna aktywowała AP-1 także jako białko rekombinantowe dodawane bezpośrednio do medium [49]. Podczas gdy antyoksydanty nasilają aktywację AP-1 pod wpływem PMA, H₂O₂ wykazuje działanie przeciwnie. Wiele badań wskazuje jednak, że działanie antyoksydantów tiolowych może być bardzo złożone. Tak na przykład, indukowana przez stres oksydacyjny ekspresja genów *c-jun* i *c-fos* pod wpływem azbestu była wzmagana przez NAC [25], który to czynnik zapobiegał ekspresji *c-jun* i *c-fos* pod wpływem nadtlenu wodoru [6]. AP-1 jest także aktywowany przez niektóre inne antyoksydanty, szczególnie hydrofobowe (d- α - tokoferol; butylowany hydroksytoluen i butylowany hydroksyanizol). AP-1 pełni więc rolę wtórnego czynnika transkrypcyjnego odpowiedzi na antyoksydanty, a TRE są uważane za potencjalne elementy odpowiedzi na antyoksydanty (ang. *antioxidant response elements*).

Badania przeprowadzone na komórkach HeLa potwierdziły, że czynniki transkrypcyjne AP-1 i NF- κ B odpowiadają w przeciwstawnym sposób na hypoksję i reoksygenację. Analogicznie do antyoksydantów, hypoksja silnie indukowała zdolność wiązania się AP-1 do DNA i aktywację transkrypcji. Reoksygenacja natomiast okazała się być silnym aktywatorem NF- κ B. Obserwacje te wydają się tłumaczyć indukcję wielu prozapalnych genów w tkankach poddanych reperfuzji po niedokrwieniu.

Bardzo intrygująca jest obserwacja dotycząca słabego wiązania się AP-1 do TRE w komórkach poddanych działaniu nadtlenu wodoru, co stoi w sprzeczności z silną indukcją ekspresji genów *c-jun* i *c-fos* pod wpływem tych czynników. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z zależnością wiązania się dimeru Fos-Jun do DNA od obecności zredukowanych form cysteiny w domenach odpowiedzialnych za oddziaływanie tych białek z DNA. Podstawienie cysteiny seryną (w przypadku c-Jun jest to cysteina 252) wzmacnia wiązanie się AP-1 do DNA, które przestaje być zależne od stanu redoks komórki. Podobną mutację obserwuje się w przypadku białka v-Jun, co sugeruje, że zdolność do wywoływania transformacji nowotworowej przez ten onkogen może wynikać, przynajmniej częściowo, ze zniknięcia reszty cysteiny krytycznej dla procesów regulacji jego aktywności. Wiązanie się dimeru



RYSUNEK 2. Pozytywny wpływ antyoksydantów na syntezę i funkcję czynnika transkrypcyjnego AP-1. Aktywacja AP-1 pod wpływem estrów forbolu jest zależna od syntezy *de novo* tworzących go podjednostek, białek Jun i Fos, i jest wzmagana przez antyoksydanty. Tioredoksyna i Ref-1, dzięki swym własnościom redukującym, stymulują z kolei wiązanie dimeru Jun/Fos do DNA. Więcej informacji można znaleźć w pracy Schenka *et al.* [49]

Fos-Jun do DNA jest ułatwiane przez białko Ref-1, które działa przez redukcję cysteiny 252 białka c-Jun. Utleniona forma Ref-1 jest regenerowana przy pomocy tioredoksyny [21] (rys. 2).

INNE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Chociaż czynniki transkrypcyjne NF- κ B i AP-1 należą do najlepiej zbadanych, nie są one jednak jedynymi czynnikami, których aktywność znajduje się pod wpływem stanu redoks komórki. Do czynników takich zalicza się także m.in. Elk-1. Czynnikiem ten jest w sposób ciągły związany, wraz z czynnikiem odpowiedzi na surowicę (ang. *serum response factor*: SRF), z sekwencją DNA tzw. elementem odpowiedzi na surowicę (ang. *serum response element*: SRE) w obrębie promotora genu *c-fos*. Czynnikiem ten jest przedstawicielem czynników transkrypcyjnych z rodziny *ets*. Elk-1 jest odpowiedzialny za indukcję transkrypcji genu *c-fos* zarówno przez antyoksydanty, jak i H_2O_2 . Wydaje się, że za przekaz informacji o zmianie stanu redoks zarówno w kierunku warunków bardziej utleniających, jak i bardziej redukujących odpowiedzialna jest kaskada kinaz MAP prowadząca do fosforylacji Elk-1 w obrębie C-końcowej domeny stymulującej transkrypcję [41].

HSF-1 (ang. *heat shock factor-1*) jest kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, na który ma wpływ stan redoks komórki. Należy on do rodziny czynników szoku cieplnego, których aktywacja i wiązanie do DNA są indukowane przez stesy zaburzące homeostazę związków tiolowych. Aktywacja HSF-1 polega na jego tri-

meryzacji i następującej po niej translokacji do jądra. Wielu badaczy starało się określić wpływ antyoksydantów na aktywację HSF-1. Wykazano, że inkubacja komórek z ditiotreitolem hamuje indukowaną szokiem cieplnym trimeryzację, fosforylację, translokację do jądra i wiązanie się do DNA czynnika HSF-1 [23]. DTT hamował także transkrypcję genu *hsp70* indukowaną nefrotoksycznymi koniugatami cysteiny (NCC) albo jodoacetamidem (IDAM) [34]. Wykonywano także eksperymenty nad wpływem obniżenia stężenia glutationu, które powoduje utlenienie grup tiolowych białek oraz ich denaturację i agregację [12]. Rezultatem takiego działania była aktywacja HSF-1 pod wpływem hipertermii, czynników alkilujących i prostaglandyny J2. Podobne działanie wykazywał diamid, jego podanie wzmagало wiązanie HSF-1 do DNA i transkrypcję genu *hsp70* [11]. Zbadano także wpływ 13 różnych induktorów reakcji stresowej w komórkach, włączając szok cieplny [68]. Wykazano, że wszystkie przetestowane czynniki wywołują utlenienie związków zawierających grupy tiolowe, a w szczególności glutationu, tworzenie mieszanych dwusiarczków typu glutation-białko i białko-białko, a jednocześnie stymulują trimeryzację HSF-1 i jego wiązanie do DNA. Obserwacje te, jak również brak aktywacji HSF-1 w warunkach braku tlenu, sugerują udział etapu zależnego od warunków redoks w ścieżce przekazu sygnału do aktywacji HSF-1.

Zdolność wiązania się do DNA czynnika HSF-1 była hamowana *in vitro* przez nadtlenek wodoru, diamid i czynniki alkilujące, takie jak kwas jodooctowy. *In vivo* natomiast, nadtlenek wodoru aktywował HSF-1, ale po znacznie dłuższym czasie w porównaniu z indukacją przez szok cieplny [24]. Obserwacje te doprowadziły do wysunięcia hipotezy o podwójnej regulacji HSF-1 przez czynniki utleniające. Z jednej strony H_2O_2 indukuje translokację HSF-1 do jądra, a z drugiej hamuje jego zdolność wiązania się do DNA, najprawdopodobniej w wyniku utleniania krytycznych reszt cysteiny. Co ciekawe, eksperymenty kinetyczne wykazały, że H_2O_2 jeszcze przed aktywacją HSF-1 zwiększał stężenie tioredoksyny. Dlatego można przypuszczać, że TRX czyni środowisko wewnątrz komórki bardziej redukującym, co jest niezbędne dla wiązania HSF-1 do DNA.

Białko supresorowe nowotworów p53 odgrywa kluczową rolę w obronie komórki przed czynnikami uszkodzającymi DNA. Działa ono poprzez indukcję transkrypcji szeregu genów wpływających na zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę [31]. Wiązanie się do DNA i aktywacja transkrypcji przez p53 znajdują się pod kontrolą stanu redoks związków tiolowych. Cztery spośród dziewięciu reszt cysteiny w domenie odpowiedzialnej za wiązanie się do DNA p53 są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tego białka. Ich utlenienie zmienia konformację p53 i jest odpowiedzialne za osłabienie jego wiązania do specyficznych sekwencji DNA [43]. Wykonano doświadczenia wskazujące, że PDTC może *in vivo* zachowywać się jak prooksydant i utleniać reszty cysteiny białka p53, co przyczynia się do osłabienia jego funkcji [67]. Aktywność p53 jest natomiast wzmagana przez Ref-1 [26] oraz wydaje się być regulowana przez tioredoksynę [44]. Na aktywność tego białka

mają także wpływ jony metali: jony cynku stabilizują konformację p53 [19], jony miedzi natomiast zaburzają ją, co upośledza zdolność wiązania się p53 do DNA [20, 63]. Donoszono także, że antyoksydanty, takie jak NAC albo dimerkapto-propanol, indukują apoptozę w wielu liniach komórek nowotworowych, ale nie w ich niestransformowanych odpowiednikach [3]. Za zjawisko to odpowiedzialna jest wzmożona ekspresja p53 w komórkach nowotworowych.

Wiele innych czynników transkrypcyjnych wykazuje zdolność wiązania się do DNA, która jest wrażliwa na utlenienie specyficznych reszt cysteiny. Należą do nich: NF-1; USF; E2F; IIC; κ U; Egr-1; vETS; białko E2 z bydłowego wirusa papilloma typu 1; Sp1; PB2/CBF; receptory dla glukokortykoidów i estrogenów; HoxB5 [1]; STAT [38] i HIF-1 α [18]. Ze względu na brak miejsca nie zostaną jednak one tutaj omówione.

PODZIĘKOWANIA

Autor składa serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. Aleksandrowi Kojowi za krytyczne przejrzenie maszynopisu i pomoc w zredagowaniu niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ARRIGO AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biol Med* 1999; **27**: 936–944.
- [2] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13–20.
- [3] BANDYOPADHYAY S, GRONOSTAJSKI RM. Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NF-1 family of DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29949–29955.
- [4] BRIGELIUS-FLOHÉ R, FRIEDRICHS B, MAURER S, SCHULTZ M., STREICHER R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J* 1997; **328**: 199–203.
- [5] BRIGELIUS-FLOHÉ R. Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol Med* 1999; **27**: 951–965.
- [6] COLLART FR, HORIO M., HUBERMAN E. Heterogeneity in c-jun gene expression in normal and malignant cells exposed to either ionizing radiation or hydrogen peroxide. *Radiat Res* 1995; **142**: 188–196.
- [7] COTGREAVE IA, GERDES RG. Recent trends in glutathione biochemistry- glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 1–9.
- [8] DATTA R, HALLAHAN DE, KHARBANDA SM, RUBIN E, SHAERMAN ML, HUBERMAN E, WEICHELBAUM RR, KUFU DW. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry* 1992; **31**: 8300–8306.
- [9] DELHASE M, HAYAKAWA M, CHEN Y, KARIN M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 1999; **284**: 309–313.

- [10] DRÖGE W, SCHULZE-OSTHOFF K, MIHM S, GALTER D, SHENK H, ECK HP, ROTH S, GMÜNDER H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994; **8**: 1131–1138.
- [11] FREEMAN ML, BORRELLI MJ, SYED C, SENISTERRA GA, LEPOCK J. Characterisation of a signal generated by oxidation of protein thiols that activates the heat shock transcription factor. *J Cell Physiol* 1995; **164**: 356–366.
- [12] FREEMAN ML, HUNTLEY S.A., MEREDITH MJ, SINISTERRA GA, LEPOCK J. Destabilisation and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. *Cell Stress Chaperones* 1997; **2**: 191–198.
- [13] GALTER D, MIHM S, DRÖGE W. Distinct effects of glutathione disulfide on the transcription factor κ B and the activator protein-1. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 639–648.
- [14] GAMALEY IA, KLYUBIN IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol* 1999; **188**: 203–255.
- [15] GARDINER CS, REED DJ. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys* 1995; **318**: 30–36.
- [16] GINN-PEASE ME, WHISLER RL. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radical Biol Med* 1998; **25**(3): 346–361.
- [17] GRIFFITH OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biol Med* 1999; **27**: 922–935.
- [18] HADDAD JJE, OLVER RE, LAND SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIVF-1 α and NF- κ B redox sensitivity: evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* (w druku).
- [19] HAINAUT P, MILNER J. Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding *in vitro*. *Cancer Res* 1993; **53**: 4469–4473.
- [20] HAINAUT P, ROLLEY N, DAVIES M., MILNER J. Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Oncogene* 1995; **10**: 27–32.
- [21] HIROTA K, MATSUI M., IWATA S, NISHIYAMA A, MORI K, YODOI J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3633–3638.
- [22] HIROTA K, MURATA M., SACHI Y, NAKAMURA H, TAKEUCHI J, MORI K, YODOI J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27891–27897.
- [23] HUANG LE, ZHANG H, BAE SW, LIU AY. Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transducing pathway. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30718–30725.
- [24] JACQUIER-SARLIN MR, POLLA B. Dual regulation of heat shock transcription factor (HSF) activation and DNA binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J* 1996; **318**: 187–193.
- [25] JANSSEN YMW, HEINTZ NH, MOSSMAN BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by N-acetyl-cysteine in mesothelial cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 2085–2089.
- [26] JAYARAMAN L, MURTHY KG, ZHU K, CURRAN T, XANTHOUDATHIS S, PRIVES C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 1997; **11**: 558–570.
- [27] JIN DY, CHAE HZ, RHEE SG, JEANG KT. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- κ B activation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30952–30961.
- [28] JURGOWIAK M, BIAŁKOWSKI K, OLIŃSKI R. Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów. *Post Biochem* 1996; **42**: 6–13.

- [29] KAZMI SM, PLANTE RK, VISCONTI V, TAYLOR GR, ZHOU L, LAU CY. Suppression of NF κ B activation and NF κ B-dependent gene expression by tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Cell Biochem* 1995; **57**: 299–310.
- [30] KNAPEN MF, ZUSTERZEEL PL, PETERS WH, STEEGERS EA. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; **82**: 171–184.
- [31] KO LJ, PRIVES C. P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; **10**: 1054–1072.
- [32] KRETZ-REMY C, MEHLEN P, MIRAULT ME, ARRIGO AP. Initiation of I κ B- α phosphorylation and degradation and subsequent NF- κ B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 1996; **133**: 1083–1093.
- [33] KRETZ-REMY C, BATES EEM, ARRIGO AP. Amino acid analogs activate NF- κ B through redox-dependent I κ B- α degradation by the proteasome without apparent I κ B- α phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; **6**(273): 3180–3191.
- [34] LIU H, LIGHTFOOT R, STEVENS JL. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4805–4812.
- [35] LO YYC, CRUZ TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11727–11730.
- [36] MAKROPOULOS U, BRUNING T, SCHULZE-OSTHOFF R. Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF- κ B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch Toxicol* 1996; **70**: 277–283.
- [37] MAY MJ, GHOSH S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998; **2**(19): 80–88.
- [38] MAZIERE C, ALIMARDANI G, DANTIN F, DUBOIS F, CONTE MA, MAZIERE JC. Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species. *FEBS Lett* 1999; **448**: 49–52.
- [39] MEHLEN P, KRETZ-REMY C, BRIOLAY J, FOSTAN P, MIRAULT ME, ARRIGO AP. Intracellular reactive species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organisation and phosphorylation in basal and tumor necrosis factor alpha-treated T47D human carcinoma cells. *Biochem J* 1995; **312**: 367–375.
- [40] MIHM S, GALTER D, DRÖGE W. Modulation of transcription factor NF- κ B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *FASEB J* 1995; **9**: 246–252.
- [41] MÜLLER JM, RUPEC RA, BAEUERLE PA. Study of gene regulation by NF- κ B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods* 1997; **11**: 301–312.
- [42] PAHL HL, BAEUERLE PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcriptional factor NF- κ B. *EMBO J* 1995; **14**: 2580–2588.
- [43] PARKS D, BOLINGER R, MANN R. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucl Acid Res* 1997; **25**: 1289–1295.
- [44] PEARSON GD, MERRIK GF. Deletion of *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5431–5434.
- [45] PENA LR, HILL DB, McCLAIN CJ. Treatment with glutathione precursor decreases cytokine activity. *J Parent Enter Nutrition* 1999; **1**: 1–6.
- [46] RENARD P, ZACHARY MD, BOUGELET C, MIRAULT ME, HAEGEMAN G, REMACLE J, RAES M. Effects of antioxidant modulations on Interleukin-1-induced Nuclear Factor- κ B activation. *Biochem Pharm* 1997; **53**: 149–160.
- [47] ROEDERER M., STAAL FJ, RAJU PA, ELA SW, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4884–4888.

- [48] SAPPEY C, LEGRAND-POELS S, BEST-BELPOMME M., FAVIER A, RENTIER B, PIETTE J. Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; **10**: 1451–1461.
- [49] SCHENK H, KLEIN M., ERDBRUGGER W, DRÖGE W, SCHULTZE-OSTHOFF K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1672–1676.
- [50] SCHENK H, VOGT M., DRÖGE W, SCHULTZE-OSTHOFF K. Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J Immunol* 1996; **156**: 765–771.
- [51] SCHMIDT KN, AMSTAD P, CERUTTI P, BAEUERLE PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chem Biol* 1995; **2**: 13–22.
- [52] SCHMIDT KN, TRAENCKNER EBM, MEIER B, BAEUERLE PA. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF- κ B. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27136–27142.
- [53] SCHRECK R, ALBERMANN K, BAEUERLE PA. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992; **17**: 221–237.
- [54] SCHRECK R, BAEUERLE PA. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1991; **1**: 39–42.
- [55] SCHRECK R, BAEUERLE PA. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappaB. *Methods Enzymol* 1994; **234**: 151–163.
- [56] SCHRECK R, RIEBER P, BAEUERLE PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; **10**: 2247–2258.
- [57] SENCK, PACKER L. Antioxidants and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; **10**(7): 709–720.
- [58] SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol Med* 1999; **27**: 916–921.
- [59] STAAL FJ, ROEDERER M., HERZENBERG LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor κ B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9943–9947.
- [60] SUZUKI YJ, MIZUNO M., PACKER L. Signal transduction for Nuclear Factor- κ B activation. *J Immunol* 1994; **153**: 5008–5015.
- [61] TANAKA K, KAMATA H, TAKESHITA H, YAGISAWA H, HIRATA H. Redox regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression mediated by NF- κ B and AP-1 in human astrocytoma U373 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **232**(2): 568–573.
- [62] TEWES F, BÖL GF, BRIGELIUS-FLOHÉ R. Thiol modulation inhibits the interleukin (IL)-1-mediated activation of an IL-1 receptor-associated protein kinase and NF- κ B. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 3015–3021.
- [63] VERHAEGH G, RIHARD MJ, HAINAUT P. Regulation of p53 by metal ions and antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5699–5706.
- [64] VLAHOPOULOS S, BOLDOGH J, CASOLA A, BRASIER AR. NF- κ B-dependent induction of IL-8 gene expression by TNF- α : evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 1999; **6**: 1878–1889.
- [65] VOEHRINGER DW. Bcl-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical Biol Med* 1999; **27**: 945–950.
- [66] WANG W, BALLATORI N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biologic functions. *Pharmacological Rev* 1998; **50**: 335–352.

- [67] WU HH, MOMAND J. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents p53 activation and promotes p53 cysteine residue oxidation. *J Biol Chem* 1998; 273: 18898–18905.
- [68] ZOU J, SALMINEN WF, ROBERTS SM, VOELLMY R. Correlation between glutathione oxidation and trimerisation of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3: 130–141.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: cisowski@mol.uj.edu.pl

Część druga

MOLEKULARNE PODSTAWY INŻYNIERII
KOMÓRKOWEJ I TKANKOWEJ

ZJAWISKO NAPROWADZANIA KOMÓREK ZWIERZĘCYCH PRZEZ KONTAKT Z PODŁOŻEM – WYKORZYSTANIE W PRAKTYCE KLINICZNEJ*

CONTACT GUIDANCE OF ANIMAL CELLS – CLINICAL APPLICATION

Jolanta SROKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: W pracy przedstawiono reakcje różnych typów komórek na rzeźbę podłoża i jego właściwości chemiczne oraz mechanizmy kontaktowego naprowadzania komórek. Właściwości fizyczne i chemiczne podłoża wpływają na morfologię, kierunek migracji komórek, reorganizację cytoszkieletu, zmiany aktywacji ekspresji genów oraz białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału w komórce. Wykorzystanie w praktyce klinicznej materiałów charakteryzujących się określoną rzeźbą podłoża jako rusztowania dla nowo tworzącej się tkanki może mieć znaczący wpływ na właściwości i budowę struktur tkankowych powstałych w wyniku procesu regeneracji.

(Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 63–80)

Słowa kluczowe: naprowadzanie przez kontakt, migracja komórek, inżynieria tkankowa

Summary: Reactions of cells to the topography and chemical properties of the substratum and mechanisms of contact guidance are outlined. Responses to the physical and chemical properties of the substratum include cell orientation, changes in cell shape and cell motility, reorganisation of the cytoskeleton, activation and inactivation of gene expression and activation of proteins involved in signal transduction. Contact guidance phenomenon is discussed in terms of application of patterned substrata as a scaffold for regenerating tissue in clinical practice.

(Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 63–80)

Key words: contact guidance, cell movement, tissue engineering

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6 P04C 051 16

I. WSTĘP

Ukierunkowana migracja komórek jest zjawiskiem powszechnym. Odgrywa ona istotną rolę podczas morfogenezy, gojenia się ran, tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe, a także zaangażowana jest w reakcje obronne organizmu [1, 26, 35, 36, 61, 67]. Jednym z czynników wpływających na ukierunkowanie wzrostu i ruchu komórek zwierzęcych oraz zmianę morfologii jest rzeźba podłoża oraz jego właściwości chemiczne [7, 8, 19, 22, 34, 45, 63, 64].

Komórki organizmów tkankowych żyją w środowisku, które charakteryzuje się określoną mikro-, a nawet nanotopografią. Macierz zewnątrzkomórkowa stanowiąca bezpośrednie otoczenie komórek, jej skład i organizacja przestrzenna elementów strukturalnych mogą wywierać wpływ na morfologię komórek oraz ich aktywność ruchową. Migrujące komórki mogą kierować się układem adhezyjnych białek substancji międzykomórkowej, takich jak: fibronektyny, kolageny czy lamininy. Również kształty komórek mogą determinować kierunkowość ruchu sąsiadujących komórek i stanowić szlaki, wzdłuż których komórki migrują [13, 15, 16, 23, 48].

Zjawisko naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem (*ang. contact guidance*) zostało opisane i nazwane tak po raz pierwszy w 1934 roku przez Paula Weissa, który zaobserwował orientację wypustek komórek nerwowych wzdłuż długiej osi włókien fibryny [cyt. za [14]]. W kolejnych latach Weiss wykazał, że wiele innych typów komórek wykazuje reakcję kontaktowego naprowadzania i zasugerował, że zjawisko to może mieć podstawowe znaczenie podczas procesu morfogenezy [56, 57, 58]. W 1964 roku Curtis i Varde badając zachowanie fibroblastów serca kurczącego na włóknach silikonowych wykazali zmianę orientacji i morfologii tych komórek [12]. W latach dziewięćdziesiątych dał się zaobserwować znaczny postęp w badaniach reakcji komórek na właściwości fizyczne i chemiczne podłoża dzięki wprowadzeniu nowych technik przygotowania podłoży o regularnie powtarzających się wzorach oraz zastosowaniu komputerowych metod analizy obrazu, pozwalających na dokonanie ilościowej analizy aktywności ruchowej oraz zmian kształtu i orientacji komórek.

II. PODŁOŻA WYKORZYSTYWANE DO BADAŃ ZJAWISKA NAPROWADZANIA KOMÓREK PRZEZ KONTAKT I SPOSOBY ICH PRZYGOTOWANIA

W badaniach zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek istotną rolę odgrywa wybór odpowiedniego podłoża. Badania często prowadzone są pod kątem wykorzystania podłoży charakteryzujących się określoną rzeźbą jako implantów, które wprowadzane są chirurgicznie do różnych tkanek i narządów organizmów zwierzęcych [18, 28, 49, 51, 55]. Takie materiały powinny aktywnie wpływać na

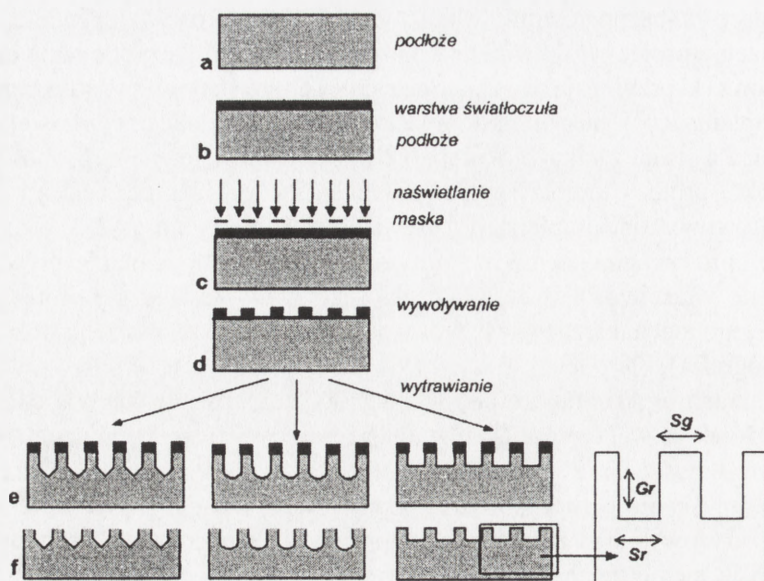
przebiegające w bezpośrednim sąsiedztwie implantu procesy regeneracji tkanek. Wprowadzenie protezy do tkanki powoduje wytworzenie łącznotkankowej torebki, w której komórki przylegają nawzajem do siebie i do substancji zewnątrzkomórkowej, a nie do implantu, co w znacznym stopniu utrudnia odtworzenie prawidłowej struktury tkankowej. Za jedną z miar biokompatybilności uważa się zatem grubość wytworzonej wokół protezy torebki łącznotkankowej. Im jest ona cieńsza, tym materiał, z którego wytworzono implant, jest bardziej biokompatybilny [2]. Uważa się, że na przebieg procesu gojenia ran zachodzącego wokół implantu mają wpływ fizyczne i chemiczne właściwości materiału, z którego przygotowuje się protezy, kształt implantu i jego mechaniczne właściwości oraz rzeźba jego powierzchni (czyli mikro- i nanotopografia).

W badaniach *in vitro* najczęściej wykorzystuje się rowkowane podłoża. Zwykle rowki ułożone są w regularnie powtarzające się wzory o wymiarach od 30 nm do 100 μm . Powszechnie wykorzystywane są także zorientowane włókna (tab. 1).

W celu uzyskania podłoża o określonym wzorze stosuje się różne techniki, od ręcznego zarysowywania powierzchni (np. przy użyciu proszku korundowego) do precyzyjnych metod mechanicznych, pozwalających na uzyskanie struktur o ściśle kontrolowanych parametrach [12, 13, 23, 45]. Nowoczesną techniką przenoszenia wzoru na powierzchnię podłoża jest fotolitografia. Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie kolejne etapy procesu fotolitograficznego. W metodzie tej powierzchnia, najczęściej krzemionki, pokrywana jest warstwą materiału światłoczułego (rys. 1b) i poddawana działaniu światła UV przez „maskę” o określonym wzorze (rys. 1c), czego efektem jest naświetlenie tylko określonych obszarów fotouczulacza. Reakcja fotochemiczna zachodząca w obrębie naświetlonych miejsc warstwy światłoczułej czyni te obszary mniej lub bardziej rozpuszczalnymi w roztworze zwanym wywoływaczem, w którym zanurzane jest następnie podłoże (rys. 1d). Obszary podłoża pozbawione działaniem wywoływacza substancji światłoczułej mogą być następnie wytrawiane przy użyciu fluorowodoru, wodorotlenku potasu czy reaktywnych jonów, dzięki czemu uzyskuje się podłoża o zróżnicowanym rowkowaniu (rys. 1e). Ostatnim etapem procesu fotolitograficznego jest usunięcie pozostałej warstwy substancji światłoczułej (rys. 1f) [23].

Do przygotowania podłoża o określonym urzeźbieniu wykorzystuje się również światło laserowe [41], promieniowanie rentgenowskie [68] i promieniowanie elektronowe [24].

Jak wcześniej wspomniano, jednym z głównych celów badań zjawiska naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem jest możliwość wykorzystania tego zjawiska w praktyce klinicznej. Istotne jest zatem zrozumienie zachowania komórek w przestrzeni trójwymiarowej w warunkach zbliżonych do warunków panujących *in vivo*, czyli w żelach kolagenowych i fibrynowych [46, 47, 48]. Włókna kolagenowe orientuje się przy użyciu pól magnetycznych o wysokiej częstotliwości.



RYSUNEK 1. Schemat kolejnych etapów procesu fotolitograficznego: Podłoże (a) pokrywane jest warstwą materiału światłoczułego (b), który jest następnie naświetlany przez „maskę” o określonym wzorze (c) i wywołany (d). Po odpłukaniu, regiony podłoża pozbawione warstwy materiału światłoczułego poddawane są procesowi wytrawiania w celu uzyskania rowków o określonym kształcie (e), po czym materiał światłoczuły zostaje całkowicie usunięty (f). Na powiększonym obrazie fragmentu podłoża (zaznaczonego kwadratem) przedstawiono podstawowe parametry, charakteryzujące jego rzeźbę: S_g – szerokość grzbietu; S_r – szerokość rowka; G_r – głębokość rowka (zmodyfikowane wg [23])

Prowadzone są również badania reakcji komórek wewnątrz wąskich tuneli, które uzyskiwane są metodą, polegającą na wprowadzeniu cienkich drucików do polimerów i szybkim ich usunięciu w momencie, gdy temperatura zbliża się do temperatury przejścia fazowego polimeru [14].

Obserwację kontaktowego naprowadzania komórek zwierzęcych przeprowadza się także na warstwie równoległe zorientowanych ludzkich fibroblastów zarówno żywych, jak i utrwalonych np. formaldehydem. Zwarta warstwa komórek oraz uporządkowane rozmieszczenie fibronektyny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej

TABELA 1. Podłoża wykorzystywane do badań zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek

Rzeźba podłoża	Materiał
Rowki	krzemionka, silikon, celuloza, szkło, polistyren, kwarc, tytan pokryty dwutlenkiem tytanu, złoto, poliuretan, platyna
Włókna	kolagen, fibronektyna, fibryna, krzemionka, nylon
Cylindry i kanały	krzemionka, polistyren

wzdłuż długiej osi fibroblastów po ich stronie grzbietowej, zapewniają regularną anizotropię środowiska [30, 45].

III. WPŁYW WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH I CHEMICZNYCH PODŁOŻA NA ZACHOWANIE KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Większość wcześniejszych doniesień na temat zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek ograniczała się do jakościowego opisu zmian kształtu i orientacji komórek oraz fotograficznej dokumentacji. Zastosowanie w latach dziewięćdziesiątych nowych metod badania reakcji komórek na poziomie molekularnym oraz wprowadzenie komputerowych metod analizy obrazu, umożliwiających określenie w sposób ilościowy zmian zarówno morfologii, jak i aktywności ruchowej komórek pod wpływem kontaktu z podłożem pozwoliło stwierdzić, że właściwości fizyczne i chemiczne podłoża wywołują szereg reakcji komórek, szczegółowo przedstawionych w tabeli 2.

Wiele typów komórek, wśród nich fibroblasty, makrofagi, komórki endotelialne i epitelialne, neurony, leukocyty, osteoblasty reaguje na rzeźbę podłoża [4, 7, 17, 20, 30, 31, 33, 65, 66]. Istnieje wiele sprzecznych doniesień na temat występowania reakcji kontaktowego naprowadzania nawet tych samych komórek. Wykazano, że np. leukocyty nie orientują się wzdłuż rowków [32], natomiast włókna fibrynowe wpływają na ukierunkowanie ruchu tych komórek [60]. Komórki epitelialne rosnące w płatach, a więc kontaktujące się ze sobą, wykazują całkowity brak reakcji na rzeźbę podłoża, podczas gdy izolowane zmieniają kształt na wydłużony i orientują się wzdłuż rowków [10]. Podobną reakcję wykazano w przypadku neuronów izolowanych ze zwojów rdzeniowych zarodków kurzczenia. Pojedyncze neurony reagowały na rysy w podłożu, natomiast w gęstych hodowlach neuronów aksony „ignorowały” rowki [45]. Także dobór odpowiedniego podłoża o charakterystycznym urzeźbieniu może wpływać na wystąpienie reakcji. Makrofagi P388D1 wykazują orientację w odpowiedzi na kontakt z rowkami o głębokości 30 nm [65], podczas gdy np. komórki endotelialne reagują dopiero na rysy o głębokości 100 nm i większej [14].

Większość badaczy ogranicza się w swoich pracach do jakościowego opisu zmian kształtu komórek oraz ich orientacji. W wielu przypadkach orientacja komórek wzdłuż długiej osi włókien i rowków oraz wydłużony kształt komórek są dobrze udokumentowane na fotografiach (rys. 2), konieczne jest jednak stosowanie precyzyjnych metod umożliwiających określenie zmian morfologii komórek pod wpływem kontaktu z podłożem.

Komputerowa analiza obrazu stosowana między innymi w Zakładzie Biologii Komórki IBM UJ pozwala na określenie wielu parametrów charakteryzujących

TABELA 2. Reakcje komórek na właściwości fizyczne i chemiczne podłoża

Typ komórki	Podłoże	Rzeźba podłoża [μm]	Reakcje komórek	Literatura
Makrofagi szczurze (P388D1)	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 10; Gr: 0,5; 5	Wzrost stopnia rozplaszczania; orientacja komórek wzdłuż rowków; przyspieszenie migracji; aktywacja LPS wpływa na wzrost ukierunkowania komórek	[64]
Fibroblasty chemiczne (BHK) Makrofagi szczurze (P388D1) Neurony szczurze	Fibronektyna	Włókna \varnothing : 0,2-0,5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; przyspieszenie migracji; wzrost persystencji ruchu	[66]
Fibroblasty chemiczne (BHK)	Kwarc	Równoległe rowki Sr: 5; 10; 25 Gr: 0,5; 1; 2, 5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; kolcemid wywołuje wzrost stopnia rozplaszczania komórek i znosi ich orientację; cytochalazyna D redukuje stopień rozplaszczania, znosi ich orientację i elongację; taksol redukuje wydłużenie komórek	[63]
Fibroblasty skóry ludzkiej	Tytan	V-rowki Gr: 3	Orientacja komórek wzdłuż rowków; kształt komórek wydłużony; ekspresja mRNA fibronektyny; 2-krotny wzrost ilości fibronektyny w macierzy zewnątrzkomórkowej	[7]
Fibroblasty skóry ludzkiej	Tytan	V-rowki Gr: 3	Wzrost ekspresji metaloproteinazy-2	[18]
Fibroblasty pochodz. śródskórne	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 10; Gr: 5	Orientacja komórek wzdłuż rowków; elongacja komórek; ukierunkowanie migracji; wzrost średniej prędkości migracji	[62]
Komórki epitelialne świni	Krzemionka pokryta tytanem	V-rowki Sr: 15; Gr: 3	Orientacja komórek wzdłuż rowków; orientacja filamentów aktynowych i mikrotubul wzdłuż ścian i krawędzi rowków	[37]
Fibroblasty skóry ludzkiej, keratynocyty drążka, neutrofile, monococyty, makrofagi	Krzemionka	Równoległe rowki Sr: 0,5; Gr: 1	Orientacja fibroblastów (100%) i makrofagów (20%) wzdłuż rowków; brak reakcji keratynocytów i neutrofilii na rzeźbę podłoża	[32]
Fibroblasty skóry szczura	Silikon	Równoległe rowki Sr: 2; 5; 10 Gr: 0,5	Mikrofilamenty i winkulina zorientowane wzdłuż rowków o szerokości 2 μm , w mniejszym stopniu wzdłuż rowków o szerokości 5 i 10 μm ; winkulina zlokalizowana wzdłuż krawędzi rowków; orientacja bydłocj oraz endogennej fibronektyny i witronektyny wzdłuż rowków	[19]
Ludzkie neutrofile	Szklono pokryte surowicą	Równoległe rowki Sr: 2 Gr: 2	Ukierunkowanie migracji wzdłuż rowków	[59]

TABELA 2 cd.

Typ komórek	Podłoże	Rzeźba podłoża [um]	Reakcje komórek	Literatura
Ludzkie neutrofile	Fibryna	Włókna	Ukierunkowanie migracji wzdłuż włókien; efektywniejsza reakcja chemotaktyczna (wzrost wartości przemieszczenia) neutrofile poruszających się wzdłuż włókien fibryny zorientowanych równoległe do kierunku rozwoju gradientu fMLP w porównaniu z odpowiednią komórek poruszających się w sieci włókien zorientowanych prostopadle	[60]
Komórki szczurzego mięsaka XC	Równoległe zorientowane fibroblasty		Polaryzacja kształtu komórek; migracja wzdłuż długiej osi fibroblastów; 5-krotny wzrost wartości przemieszczenia komórek wynikający ze wzrostu persystencji ruchu w porównaniu z komórkami poruszającymi się po gładkim podłożu szklanym i polistyrenowym	[30]
Makrofagi P388D1 Szczurze makrofagi otrzewnowe	Kwarc	Równoległe rowki Sr: 2; 10 Gr: 0,03-0,3	Orientacja komórek i ich ukierunkowany ruch; wzrost stopnia fagocytozy; akumulacja F-aktyny i winkuliny wzdłuż krawędzi rowków; wzrost fosforylacji tyrozyny związany ze wzrostem ilości F-aktyny w komórkach; pojawienie się mikrowypustek prostopadłych w stosunku do rowków	[65]
Neurony zarodków kurczęcia	Szkle	Równoległe rowki Sr: 2; Gr: 2	Filopodia stożków wzrostu neuronów rozpoznają rysy o średnicy 100–200 nm i orientują się wzdłuż długiej osi rys; lamella stożków wzrostu wykazuje ukierunkowany ruch wzdłuż długiej osi rowków	[45]
Neurony zarodków kurczęcia	Równoległe zorientowane fibroblasty		Agregaty neuronów przyjmują wrzecionowaty kształt; pojedyncze neurony orientują się wzdłuż długiej osi fibroblastów	[45]
Fibroblasty dziąsła ludzkiego	Tytan	Rysy Gr: 0,14; 0,41; 0,80 V-rowki	Komórki migrują wzdłuż nieregularnie ułożonych rys	[29]
Osteoblasty cielece	Tytan	V-rowki	Orientacja komórek wzdłuż rowków	[43]
Fibroblasty skóry Komórki epitelialne	Tytan	V-rowki Sr: 3; Gr: 40	Stymulacja migracji fibroblastów; kontaktowe zahamowanie migracji fibroblastów; brak kontaktowego zahamowania migracji epiteliocytów; wzrost stopnia inwazji fibroblastów do warstwy komórek epitelialnych	[17]
Fibroblasty skóry szczurzej	Polistyren	Równoległe rowki Sr: 1; 2; 5; 10; Gr: 1	Orientacja komórek wzdłuż długiej osi rowków; komórki ustawione wzdłuż krawędzi rowków o szerokości 1 i 2 µm; fibroblasty zdolne do penetracji rowków o szerokości 5 i 10 µm; orientacja filamentów aktynowych i kontaktów zogniskowanych	[50]

TABELA 2 cd.

Typ komórek	Podłoże	Rzeźba podłoża [µm]	Reakcje komórek	Lite-ratura
Szczurze osteoblasty	Polistyren	Rowki Gr: 0,5; 5	Przyspieszenie migracji; elongacja komórek; wzrost syntezy białek kolagenowych i niekolagenowych	[6]
Komórki epithelialne (MDCK)	Perspex	Równoległe rowki Gr: 0,2-1,9	Głębokość rowków najważniejszym czynnikiem determinującym orientację komórek wzdłuż ich długiej osi; pojedyncze komórki bardziej wrażliwe na rzeźbę podłoża niż komórki występujące w platach	[9]
Fibroblasty dziąsła ludzkiego	Tytan	Równoległe rowki Gr: 3	Rzeźba podłoża i stężenie surowicy w pożywce wpływają na syntezę tenascyny	[25]
Fibroblasty dziąsła ludzkiego	Tytan	Równoległe rowki Gr: 3	Rozbitec mikrotubul i mikrofilamentów kolcemidem i cytochalazyną B nie wpływa na orientację komórek wzdłuż długiej osi rowków	[38]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę szczura	Silikon	Struktury cylindryczne Ø: 50-500 Wysokość: 100-1000	Przyspieszenie wnikania naczyń krwionośnych do regenerowanej tkanki; redukcja grubości torebki łącznotkankowej dookoła implantu	[42]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę kozy	Polistyren	Równoległe rowki Sr: 1; 2; 5; 10; Gr: 1	Po 1 tygodniu od wprowadzenia implantu pojawienie się torebki łącznotkankowej o grubości 80 µm; obecność dużej liczby makrofagów, granulocytów i monocytów; po 4 tygodniach pojawienie się nowych naczyń krwionośnych; podobna reakcja tkanki na gładkim i rowkowym podłożu	[51]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu pod skórę świnki morskiej	Silikon	Równoległe rowki Sr: 2; 2,5; Gr: 0,5; 1; 1,5; 6	Po 10 tygodniach od wprowadzenia implantu pod skórę implant otoczył torebką łącznotkankową; cienka pojedyncza warstwa jedno i więcej drzazszych komórek fagocytycznych; brak istotnych różnic histomorfologicznych w odniesieniu do reakcji komórek na podłożu o różnym urzeźbieniu	[55]
Wprowadzenie <i>in vivo</i> implantu do kości cietemieniowej szczura	Tytan	Rowki Gr: 30-120	Penetracja rowków przez komórki; tkanka kościopodobna zorientowana na wzdłuż rowków; wzrost stopnia mineralizacji kości wraz ze wzrostem głębokości rowków	[4]

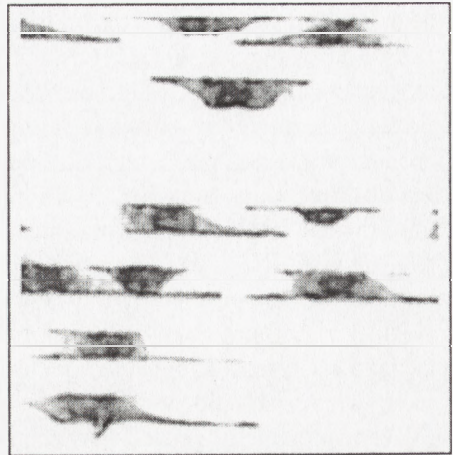
¹Sr – szerokość rowka; ²Gr – głębokość rowka

zarówno kształt, jak i orientację komórek, wśród nich wydłużenie komórek (ang. *elongation*), rozciągnięcie (ang. *extension*), rozproszenie (ang. *dispersion*) i orientację komórek względem wybranej osi. Umożliwia także dokonanie precyzyjnej analizy ilościowej aktywności ruchowej komórek [30, 45, 64].

Badania migracji komórek, zjawiska zaangażowanego w wiele procesów zachodzących w organizmach zwierzęcych, prowadzone są intensywnie w wielu pracowniach. W standardowych warunkach hodowli komórki poruszają się w sposób przypadkowy we wszystkich kierunkach z takim samym prawdopodobieństwem. W obrębie wielokomórkowych organizmów komórki poddawane są jednak bardzo często działaniu wielu bodźców naprowadzających, takich jak: gradient stężenia substancji chemicznej, gradient potencjału elektrycznego, gradient adhezji lub architektura tkanki [1, 36, 44, 52, 53, 61, 69]. Czynniki te wpływają na zmianę polaryzacji komórek oraz na ukierunkowanie ich ruchu.

Fibroblasty, makrofagi, leukocyty i neurony są najczęściej wykorzystywanymi komórkami do badań aktywności ruchowej na podłożach charakteryzujących się określoną rzeźbą. Jak wykazano, architektura podłoża ma wpływ zarówno na persistencję ruchu, jak i na zmiany prędkości migracji. Wójciak-Stothard i współpracownicy badając zachowanie makrofagów szczurzych, komórek szybko reagujących na czynniki chemotaktyczne, efektem czego jest ich akumulacja w miejscach zapalnych wykazali, że rowki o głębokości 0,5 μm i szerokości 10 μm wpływają w znaczący sposób na prędkość migracji tych komórek oraz kierunkowość ruchu. Wszystkie komórki reagowały na rzeźbę poruszając się wzdłuż rowków po torach zbliżonych do prostoliniowych [64]. Makrofagi wykazują także ukierunkowaną migrację w odpowiedzi na kontakt z podłożem o nanometrowej topografii. Reagują na rowki o głębokości 30 nm, co odpowiada średnicy pojedynczego włókna kolagenowego [65].

Jak wcześniej wspomniano, zdolność komórek do migracji po składnikach zewnętrznej macierzy odgrywa istotną rolę w czasie embriogenezy, gojenia się ran i regeneracji nerwów. Fibronektyna obok kolagenu jest głównym składnikiem substancji międzykomórkowej i zaangażowana jest w adhezję komórek, ich rozpląszczanie, organizację cytoszkieletu, przebudowę tkanek, odgrywa też znaczącą



RYSUNEK 2. Utrwalone i wybarwione Coomassie Brilliant Blue makrofagi szczurze (P388D1) hodowane na rowkowanym podłożu kwarcowym z równolegle zorientowanymi rowkami o głębokości 0,5 μm i szerokości 10 μm . Komórki przyjmują wydłużony kształt i orientują się wzdłuż długiej osi rowków

rolę w stymulowaniu ruchu komórek, szczególnie w ranach. W macierzy zewnątrzkomórkowej występuje pod postacią fibrylli. Wójciak-Stothard i współpracownicy zaobserwowali, że makrofagi szczurze, fibroblasty pochodzące ze ścięgna mięśnia zginacza szczura były znacznie lepiej przyłączone i rozplaszczone na włóknach fibronektyny niż na powierzchni szkła. Orientacja komórek wzdłuż długiej osi włókien obserwowana była już po 15 minutach inkubacji i włókna fibronektynowe stymulowały migrację makrofagów i fibroblastów w porównaniu z kontrolą na szkle. Obydwa typy komórek migrowały z prędkością blisko dwukrotnie większą, znacznie wzrosła również persystencja ruchu, co było wynikiem wyprostowania trajektorii ruchu komórek. Kontakt makrofagów z włóknami fibronektyny wpłynął znacząco na wzrost długości trajektorii i translokacji komórek. Również neuryty wykazywały znacznie wyższą persystencję ruchu [66].

Wykazano także, że zorientowane włókna fibryny mają wpływ na migrację i odpowiedź chemotaktyczną neutrofilów poruszających się w gradiencie stężenia fMLP. Komórki poruszały się w sposób ukierunkowany w stronę wyższego stężenia chemoatraktantu, zarówno w przypadku gdy włókna fibryny zorientowane są równolegle, jak i prostopadle do kierunku rozwoju gradientu, jednak włókna fibryny zorientowane równolegle wpływały na blisko dwukrotny wzrost wartości przemieszczenia reagujących chemotaktycznie komórek [64]. Tak więc architektura tkanki lub wprowadzenie implantu o określonej topografii mogą w znacznym stopniu wpływać na odpowiedź komórek układu immunologicznego.

Korohoda i Madeja przeprowadzając analizę aktywności ruchowej komórek nowotworowych (szczurzego mięsaka XC) na zwartej warstwie żywych fibroblastów ludzkich zaobserwowali, że komórki migrują wzdłuż długiej osi równolegle zorientowanych fibroblastów. Wykazali również, że komórki XC przemieszczały się na odległość blisko pięciokrotnie większą niż komórki poruszające się po gładkim podłożu szklanym i polistyrenowym. Wzrost translokacji komórek był spowodowany wyprostowaniem trajektorii ruchu i wzrostem persystencji migracji, a nie wynikiem przyspieszenia ruchu. Zaobserwowana reakcja komórek nowotworowych wskazuje, że zjawisko naprowadzania komórek przez kontakt z komórkami prawidłowymi może być zaangażowane w proces tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe [30].

Badano również wpływ zmian kształtu komórek wywołany reakcją na rzeźbę podłoża na ekspresję białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano wzrost ekspresji genu odpowiedzialnego za syntezę fibronektyny w fibroblastach skóry ludzkiej, reagujących na rowkowane podłoże tytanowe i znaczny wzrost ilości tego białka we frakcji zewnątrzkomórkowej po 90 godzinach inkubacji komórek na tym podłożu [7]. Zaobserwowano także wzrost ekspresji metaloproteiny-2 w tych komórkach [8]. W fibroblastach ścięgna reagujących na topografię wykazano aktywację przynajmniej 30 genów, w tym między innymi kinazy tymidyny, elastyny, receptora kinazy tyrozynowej, różnych rodzajów aminoglikozamidaz, enzymów zaangażowanych

zowanych w metabolizm fosfatydyloinozytoli [15]. W komórkach odpowiedzialnych za regenerację kości stwierdzono aktywację enzymów zaangażowanych w proces mineralizacji kości [4].

IV. PROPONOWANE MECHANIZMY REAKCJI KONTAKTOWEGO NAPROWADZANIA KOMÓREK

Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić mechanizm zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek. Pierwsza z nich została zaproponowana w 1976 roku przez Dunna i Heatha, którzy badali zachowanie fibroblastów na styku dwóch płaszczyzn szklanych, nachylonych w stosunku do siebie pod różnym kątem. Wykazali oni, że zdolność komórek do przechodzenia z jednej powierzchni na drugą jest uzależniona od kąta nachylenia płaszczyzn i występuje tylko wtedy gdy jest on mniejszy niż 16° . Zaobserwowali również tworzenie się nowych struktur cytoszkieletu w obszarach komórki oddzielonych krawędzią rowka. Struktury te nie wykazywały ciągłości z pozostałymi elementami cytoszkieletu, co pozwoliło autorom wysunąć hipotezę, że nieciągłości mikrofilamentów leżą u podstaw mechanizmu reakcji komórek na rzeźbę podłoża [21].

Kolejna hipoteza, wysunięta w 1979 roku Ohara i Buck sugeruje, że warunkiem wystąpienia reakcji komórki na kontakt z rowkami w podłożu lub włóknami jest wytworzenie kontaktów zogniskowanych (ang. *focal contacts*), co umożliwia ściśle przyleganie komórki do podłoża oraz związanie jej z podłożem przy udziale elementów cytoszkieletu [40]. Wiele obserwacji wskazuje na udział elementów cytoszkieletu w regulacji zjawiska naprowadzania komórek przez kontakt. Wykazano, że rozpad cytoszkieletu w znacznym stopniu zaburza reakcję komórek. Oakley i Brunette postulowali, że mikrotubule odgrywają najważniejszą rolę w reakcji komórek na rzeźbę podłoża i jako pierwsze ulegają reorganizacji w komórce [37]. Wyniki uzyskane przez Wójciak-Stothard wykazują jednak, że zmiany ilości i rozmieszczenia F-aktyny w komórce zachodzą znacznie szybciej niż orientacja struktur mikrotubularnych [65], a niektóre komórki, takie jak keratynocyty i neutrofile, reagują na topografię podłoża mimo, że mikrotubule nie są zaangażowane w reakcje ruchowe tych komórek [14]. Ponadto regularny układ winkuliny [65], polimeryzacja aktyny przy grzbiecie krawędzi rowka i występowanie kontaktów zogniskowanych [39] wskazują, że cytoszkielet aktynowy jest w znacznie większym stopniu zaangażowany w wystąpienie omawianych reakcji komórek niż układ mikrotubul w komórce. Przedstawione hipotezy kładące nacisk na udział elementów cytoszkieletu, a szczególnie kontaktów zogniskowanych w reakcjach naprowadzania komórek nie wyjaśniają jednak w jaki sposób zostaje zapoczątkowana reakcja komórek na topografię podłoża. Należy również zaznaczyć, że nie wszystkie komórki (np. neutrofile) reagujące na właściwości anizotropowe podłoża wytwarzają kontakty zogniskowane. Wy-

kazana przez Stępień i współpracowników reakcja filopodiów stożka wzrostu neuronów izolowanych ze zwojów rdzeniowych zarodka kurczenia także wskazuje, że kontakty zogniskowane nie mogą decydować o rozpoznawaniu krawędzi rysy. Autorzy zaobserwowali bowiem, że filopodia stożka wzrostu o średnicy 200 nm reagują na rysy o średnicy 100–200 nm, a więc pięciokrotnie mniejszej niż średnica kontaktów zogniskowanych [45]. Być może integryny i białka CAM występujące licznie w filopodiach zaangażowane są w przekazywanie sygnału zainicjowanego w tych wypustkach [3].

Wyniki te potwierdzają obserwacje Wójciak-Stothard i współpracowników, którzy wykazali akumulację aktyny, winkuliny i αV integryny w miejscach ścisłego kontaktu błony komórkowej makrofagów z krawędzią rowków o głębokości 30–70 nm. W komórkach tych zaobserwowano również fosforylację białek na resztach tyrozynowych towarzyszącą wzrostowi ilości F-aktyny. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników zasugerowali, że mechaniczna interakcja krawędzi z błoną komórkową odpowiedzialna jest za selektywną adhezję komórek, która następnie determinuje ich morfologię i orientację wzdłuż długiej osi rowków. Na powierzchni makrofagów zaobserwowano pojawienie się licznych mikrowypustek, charakterystycznych między innymi dla komórek stymulowanych czynnikami wzrostowymi, takimi jak EGF, PDGF i HGF/SF, inicjującymi przekazywanie sygnału w komórce poprzez aktywację fosforylacji receptora tyrozynowego. Wykazano również, że białka wiążące filamenty aktynowe (ABP), takie jak: ezryna, spektryna czy aneksyna II, są fosforylowane na tyrozynie w odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych. Dlatego sugeruje się, że białka te mogą być potencjalnymi mediatorami reakcji komórek na kontakt z podłożem [65].

Walboomers i Jansen na podstawie badań przeprowadzonych na fibroblastach skóry szczura wykazali, że cytoszkielet aktynowy nie jest bezpośrednio zaangażowany w wystąpienie reakcji naprowadzania komórek przez kontakt z podłożem, a orientacja elementów cytoszkieletu aktynowego w obrębie ciała komórki jest raczej wynikiem, a nie przyczyną ukierunkowania komórek. Również oni sugerują, że reakcja naprowadzania komórek przez kontakt jest indukowana przez kontakt filopodiów komórki z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie stabilizację tego kontaktu. Siły przyciągania i odpychania pomiędzy białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i mikrowypustką błony komórkowej są czynnikiem determinującym wystąpienie reakcji. Następnie dochodzi do akumulacji winkuliny i innych białek i ewentualnego powstania kontaktów zogniskowanych, które w dalszej kolejności indukują powstanie włókien naprężeniowych w cytoplazmie komórki. Autorzy zaobserwowali również, że wraz ze wzrostem głębokości rowków wzrasta tendencja komórek do przyczepiania się i rozplaszczania wzdłuż krawędzi rysy, a zjawisko to jest niezależne od rzeźby podłoża. Reakcja komórek zachodziła w przypadku napotkania przez nie nieciągłości powierzchni. Sugerują oni, że fizyczno-chemiczne właściwości podłoża determinują ilość oraz rozmieszczenie białek

macierzy zewnątrzkomórkowej, co z kolei wpływa na zachowanie komórek na podłożu charakteryzującym się określoną rzeźbą [54].

Na uwagę zasługuje również fakt naprowadzania komórek hodowanych na zwartej warstwie fibroblastów ludzkich. Zarówno neurony DRG (ang. *dorsal root ganglions*) izolowane z zarodków kurczęcia, jak i komórki szczurzego mięsaka XC wykazywały na takim podłożu reakcję kontaktowego naprowadzania [30, 45]. Pozostaje jednak niejasne, czy komórki reagują na urzeźbienie podłoża czy też na skład chemiczny białek wydzielanych i odkładanych przez fibroblasty. Migrujące fibroblasty odkładają wzdłuż przebytej drogi fibronektynę [27, 66], prawdopodobne jest zatem, że zarówno uporządkowanie fibroblastów, jak i uporządkowanie białek deponowanych na powierzchni tych komórek może być czynnikiem zaangażowanym w reakcję naprowadzania komórek przez kontakt [30, 45].

V. WPŁYW TOPOGRAFII PODŁOŻA NA ORGANIZACJĘ STRUKTUR TKANKOWYCH

Obserwacja reakcji naprowadzania pojedynczych komórek przez kontakt z podłożem skłoniła badaczy do sprawdzenia, w jaki sposób zjawisko to może wpływać na regenerację niektórych struktur tkankowych. Jednym z przykładów jest udział tej reakcji w procesie regeneracji ścięgna. Ścięgno stanowi bierną, niekurczliwą część mięśnia przytwierdzającą go do kości i przenoszącą jego siłę skurczu. Siłę i elastyczność warunkują podłużnie ułożone włókna kolagenowe, natomiast zdolność do ślizgania warstwa komórek maziowych, zwanych także komórkami ościęgnej lub pochewki ścięgna (ang. *epitenon cells*). Gdy ścięgno ulega uszkodzeniu, obserwuje się syntezę kolagenu i namnażanie komórek ościęgnej, które migrują w kierunku wytworzonej rany. W ciągu 3–4 tygodni dochodzi do regeneracji ścięgna, jednak obserwuje się wiele komplikacji towarzyszących temu zjawisku. Jedną z najczęstszych jest powstanie włóknistych połączeń w wyniku niekontrolowanej migracji komórek pomiędzy ścięgnem i pochewką maziową, znajdującą się pod ścięgnem, co uniemożliwia ruch ślizgowy ścięgna. Wójciak i współpracownicy badali zachowanie szczurzych komórek ościęgnej izolowanych ze ścięgien mięśnia zginacza na rowkowanym podłożu krzemowym. Komórki ościęgnej reagowały na rzeźbę podłoża zmianą kształtu z wielobiegunowego na wydłużony w porównaniu z komórkami rosnącymi na gładkiej powierzchni. Zaobserwowano także wzrost średniej prędkości migracji komórek poruszających się po rowkowanym podłożu.

Gdy umieszczono przerwane ścięgna na gładkiej lub rowkowanej powierzchni, po tygodniu zaobserwowano wymigrowywanie komórek ze ścięgna. Na gładkiej powierzchni komórki poruszały się w sposób przypadkowy we wszystkich kierunkach, natomiast na powierzchni rowkowanej komórki wykazywały zjawisko naprowadzania przez kontakt i tworzyły komórkowe mostki pomiędzy dwoma końcami

przerwanego ścięgna. Szerokość tych połączeń była równa szerokości ścięgna, albowiem komórki nie były zdolne do opuszczania rowków. Po 6 tygodniach pojawiały się w regenerowanej tkance włókna kolagenowe. Ścięgno jest strukturą wysoce uporządkowaną. Wykorzystanie podłoża zawierającego równolegle ułożone rowki przyspiesza gojenie ścięgien poprzez naprowadzanie komórek, ich ukierunkowaną migrację oraz przyspieszenie prędkości ruchu. Tak więc otoczenie gojącego się ścięgna specjalnie spreparowanym materiałem, którego struktura wpływa na orientację i migrację komórek może w znacznym stopniu przyspieszać proces jego regeneracji [62].

Zaobserwowano również, że użycie włókien węglowych ma pozytywny wpływ na proces gojenia się więzadeł ścięgniastych kończyn dolnych u ludzi, jednak zastosowanie ich w innych miejscach organizmu nie przyniosło oczekiwanych rezultatów [13].

Prowadzone były także badania nad wpływem rowkowanych implantów tytanowych na proces regeneracji kości. Osteoblasty powstające z mezenchymalnych komórek pnia muszą posiadać zdolność syntetyzowania i wydzielania białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zdolność regulowania procesu mineralizacji kości. Wykazano, że komórki te kontaktując się z rowkowanym podłożem wytwarzają znacznie więcej zawiązków kościo-podobnych w porównaniu komórkami umieszczonymi na gładkim podłożu. Topografia podłoża wzmacnia proces mineralizacji i wpływa na orientację zmineralizowanej tkanki wzdłuż rowków. Zaobserwowano również przyspieszenie migracji komórek [4].

Chen i współpracownicy wykorzystali substytuty tkankowe sporządzone na bazie macierzy kolagenowej pozbawionej komórek do rekonstrukcji cewki moczowej. Po dwóch tygodniach od operacji zaobserwowano penetrację komórek gospodarza do wnętrza macierzy kolagenowej oraz zachodzący proces angiogenezy. Po dwóch miesiącach wykazano ukierunkowaną migrację komórek włókien mięśniowych, a po 6 miesiącach prawidłową organizację mięśni. Tkanka została odtworzona w sposób prawidłowy i nie zaobserwowano objawów zwłóknienia, co może czynić macierz kolagenową użytecznym materiałem wykorzystywanym w medycynie [5].

Walboomers i współpracownicy wprowadzali pod skórę kozy implanty polistyrenowe o gładkim i rowkowanym podłożu (1–10 μm). Po tygodniu zaobserwowali oni pojawienie się łącznotkankowej torebki równomiernie rozmieszczonej wokół protezy oraz pojawienie się dużej liczby komórek stanu zapalnego w obydwu badanych przypadkach. Grubość włóknistej torebki (około 80 μm) nie malała nawet po 4 tygodniach od wszczęcia implantu, stwierdzono natomiast zagęszczenie macierzy kolagenowej oraz pojawienie się dużej liczby nowych naczyń krwionośnych w obrębie regenerowanej tkanki miękkiej [51]. Podskórne wprowadzenie implantu do świnki morskiej również wywołało wytworzenie cienkiej torebki łącznotkankowej oddzielonej od protezy przez pojedynczą warstwę jedno- i wielojądrzastych komórek fagocytujących [55].

Chociaż w niektórych przypadkach wykorzystane rowkowane podłoża nie ograniczały formowania włóknistej otoczki wokół implantu, jednak wyniki badań zjawiska kontaktowego naprowadzania komórek, przeprowadzanych w warunkach *in vitro* i *in vivo* wskazują na znaczącą rolę wpływu właściwości fizycznych i chemicznych podłoża na zachowanie komórek. Konieczne jest zatem poszukiwanie nowych podłoży, które mogą być stosowane jako rusztowanie dla nowo tworzących się tkanek. Ukierunkowanie migracji komórek wzdłuż rowków i włókien może mieć bowiem istotny wpływ na właściwości i budowę struktur tkankowych powstałych w wyniku procesu gojenia, odtwarzania dużych ubytków tkankowych, takich jak: rozszczepy podniebienia, rany pooparzeniowe oraz na przyspieszenie procesu regeneracji wysoce zorientowanych struktur, takich jak: ścięgna lub nerwy.

Należy spodziewać się zatem, że rozwój badań w tej dziedzinie będzie zmierzał w kierunku powszechnego wykorzystania w praktyce klinicznej materiałów, które charakteryzują się określoną rzeźbą powierzchni.

LITERATURA

- [1] BITTLEMAN DB, ERGER RA, CASALE TB. Cytokines induce selective granulocyte chemotactic responses. *Inflamm Res* 1996; **45**: 89–95.
- [2] BRUNETTE DM, CHEHROUDI B. The effect of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomech Eng* 1999; **121**: 49–57.
- [3] BURRIDGE K, CHRZANOWSKA-WODNICKA M. Focal adhesion, contractility and signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 463–519.
- [4] CHEHROUDI B, McDONNELL D, BRUNETTE DM. The effect of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Sci* 1997; **34**: 279–290.
- [5] CHEN F, YOO JJ, ATALA A. Acellular collagen matrix as a possible „off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999; **54**: 407–410.
- [6] CHESMEL KD, CLARK CC, BRIGHTON CT, BLACK J. Cellular response to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 1101–1110.
- [7] CHOU L, FIRTH JD, VELLI-JUKKA U, BRUNETTE DM. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci* 1995; **108**: 1563–1573.
- [8] CHOU L, FIRTH JD, UITTO VJ, BRUNETTE DM. Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1998; **39**: 437–445.
- [9] CLARK P, CONNOLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development* 1990; **108**: 635–644.
- [10] CLARK P, CONNOLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 73–77.
- [11] CLARK P, CONNOLY P, MOORES R. Cell guidance by micropatterned adhesiveness *in vitro*. *J Cell Sci* 1992; **103**: 287–292.
- [12] CURTIS ASG, VARDE M. Control of cell behavior. Topological factors. *J Natl Canc Inst* 1964; **31**: 15–26.

- [13] CURTIS ASG, WILKINSON CDW. Reaction of cell to topography. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1998; **9**: 1313–1329.
- [14] CURTIS A, WILKINSON C. Topographical control of cell migration. [w] Soll DR i Wessels D [red] Motion Analysis of Living Cells. New York, John Wiley & Sons, Inc., Publication 1998: 141–157.
- [15] CURTIS A, WILKINSON C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. [w] Lackie JM, Dunn GA, Jones GE [red] Cell Behaviour: Control and Mechanism of Motility, The Biochemical Society, London 1999: 15–27.
- [16] CZYŻ J. Zjawisko kontaktowego naprowadzania komórek. *Postępy Biologii Komórki* 1993; **20** (Supl.2): 125–135.
- [17] DAMJI A, WESTON L, BRUNETTE DM. Directed confrontations between fibroblasts and epithelial cells on micromachined grooved substrata. *Exp Cell Res* 1996; **228**: 114–124.
- [18] DEN BRABER ET, DE RUIJTER JE, JANSEN JA. The effect of a subcutaneous rubber implant with shallow surface microgrooves on the surrounding tissues in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1997; **37**: 539–547.
- [19] DEN BRABER ET, DE RUIJTER JE, GINSEL LA, VON RECUM AF, JANSEN JA. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; **40**: 291–300
- [20] DOOLABH VB, HERTL MC, MACKINNON SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci* 1996; **7**: 47–84.
- [21] DUNN GA, HEATH JP. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp Cell Biol* 1976; **101**: 1–14.
- [22] EISENBARTH E, MEYLE J, NACHTIGALL W, BREME J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* 1996; **17**: 1399–1403.
- [23] FLEMING RG, MURPHY CJ, ABRAMS GA, GOODMAN SL, NEALEY PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999; **20**: 573–588.
- [24] GOLD J, KASEMO B. Morphological and chemical characterization of microfabricated fibres for biological application. *J Mater Sci Mater Med* 1997; **8**: 251–263.
- [25] GOTO T, BRUNETTE DM. Surface topography and serum concentration affects the appearance of tenascin in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Exp Cell Biol* 1998; **244**: 474–480.
- [26] GRINELL F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 1992; **101**: 1–5.
- [27] HALFTER W, LIVERANI D, VIGNY M, MONARD D. Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. *Cell Tis Res* 1990; **262**: 467–481.
- [28] KELLER JC. Tissue compatibility to different surfaces of dental implants; *in vitro* studies. *Implant Dent* 1998; **7**: 331–337.
- [29] KONONEN M, HORMIA M, KIVALATHI J, HAUTANIEMI J, THESLEFF I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; **26**: 1325–1341.
- [30] KOROHODA W, MADEJA Z. Contacts of sarcoma cells with aligned fibroblasts accelerates their displacement: computer-assisted analysis of tumour cell locomotion in co-culture. *Biochem Cell Biol* 1997; **75**: 263–276.
- [31] MATSUZAKA K, WALBOOMERS XF, de RUIJTER JE, JANSEN JA. The effect of microgrooved poly-l-lactic acid on osteoblast-like cells *in vitro*. *Biomaterials* 1999; **20**: 1293–1301.
- [32] MEYLE J, GUTLIG K, NISCH W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *J Biomed Mater Res* 1995; **29**: 81–88.
- [33] MUDERA VC, PLEASS R, EASTWOOD M, TARNUZZER R, SCHILTZ G, KHAW P, McGROUTHER DA, BROWN RA. Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; **45**: 1–9.

- [34] NEHLS V, HERRMANN R, HUHNKEN M. Guided migration as a novel mechanism of capillary network remodelling is regulated by basic fibroblast growth factor. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 319–329.
- [35] NICOLSON GL, MENTER DG, HERRMANN J, CAVANAUGH P, JIA L, HAMADA J, YUN Z, NAKAJIMA M, MARCHETTI D. Tumor metastasis to brain: role of endothelial calls, neutrophins, and paracrine growth factor. *Critical Rev Oncogenesis* 1994; **5**: 451–471.
- [36] NOLTE C, MOLLER T, WALTER T, KETTENMANN H. Complement 5a controls motility of murine microglial cells *in vitro* via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neurosci* 1996; **73**: 1091–1107.
- [37] OAKLEY C, BRUNETTE DM. Response of single, pairs, and clusters of epithelial cells to substratum topography. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 473–489.
- [38] OAKLEY C, JAEGER NAF, BRUNETTE DM. Sensitivity of fibroblasts and their cytoskeletons to the substratum topographies: topographic guidance and topographic compensation by micromachined grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 1997; **232**: 413–424.
- [39] O'CONNOR TP, BENTLEY D. Accumulation of actin in subsets in pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues *in situ*. *J Cell Biol* 1993; **123**: 935–948.
- [40] OHARA PT, BUCK RC. Contact guidance *in vitro*. *Exp Cell Res* 1979; **121**: 235–249.
- [41] PHILLIPS HM, SAUERBREY RA. Excimer-laser-produced nanostructures in polymers. *Opt Eng* 1993; **32**: 2424–2436.
- [42] PICHA GJ, DRAKE RF. Pillared-surface microstructure and soft-tissue implants: effects of implant site and fixation. *J Biomed Mater Res* 1996; **30**: 305–312.
- [43] QU J, CHEHROUDI B, BRUNETTE DM. The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavior factors essential to osseointegration. *Oral Dis* 1996; **2**: 102–115.
- [44] RAJNICEK A, BRITLANDS, McCAIG. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J Cell Sci* 1997; **110**: 2905–2913.
- [45] STEPIEŃ E, STANISZ J, KOROHODA W. Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biol Inter* 1999; **23**: 105–116.
- [46] TRANQUILLO RT, DURRANI MA, MOON AG. Tissue engineering science: consequences of cell traction force. *Cytotechnology* 1992; **10**: 225–250.
- [47] TRANQUILLO RT, GIRTON TS, BROMBEREK BA, TRIEBES TG, MOORADAN L. Magnetically orientated tissue-equivalent tubes – Application to a circumferentially orientated media equivalent. *Biomaterials* 1996; **17**: 349–357.
- [48] TRANQUILLO RT. Self organization of tissue-equivalents: the nature and role of contact guidance. [w] Lackie JM, Dunn GA, Jones GE [red] Cell Behaviour: Control and Mechanism of Motility, The Biochemical Society, London 1999: 27–43.
- [49] URABE M, HOSOKAWA R, CHIBA D, SATO Y, AKAGAWA Y. Morphogenetic behavior of periodontum on inorganic implant materials: an experimental study of canines. *J Biomed Mater Res* 2000; **49**: 17–24.
- [50] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Growth behaviour of fibroblasts on microgrooved polystyrene. *Biomaterials* 1998; **19**: 1861–1868.
- [51] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Microgrooved subcutaneous implants in the goat. *J Biomed Mat Res* 1998; **42**: 634–641.
- [52] WALBOOMERS XF, CROES HJE, GINSEL LA, JANSEN JA. Contact guidance of rat fibroblasts on various implant materials. *J Biomed Mat Res* 1999; **47**: 204–212.
- [53] WALBOOMERS XF, MONAGHAN W, CURTIS ASG, JANSEN JA. Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *J Biomed Mat Res* 1999; **46**: 212–220.
- [54] WALBOOMERS XF, JANSEN JA. Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates. [w] Wasenaar RW, van der Steen RJT [red] Engineered Implant Surfaces: Modification of Cell and Tissue Response by Microgrooves 2000: 85–105.

- [55] WALBOOMERS XF, JANSEN JA. Microgrooved silicone subcutaneous implants in guinea pigs. [w] Wasenaar RW, van der Steen RJT [red] *Engineered Implant Surfaces: Modification of Cell and Tissue Response by Microgrooves 2000*: 139–152.
- [56] WEISS P, TAYLOR AC. Fish scales as substratum for uniform orientation of cells *in vitro*. *Anat Rec* 1956; **124**: 381.
- [57] WEISS P. Cell contact. *Int Rev Cytol* 1958; **7**: 391–423.
- [58] WEISS P. Cellular dynamics. [w] *Biophysical Science – A Study Program*. Oncley JL, Schmitt FO, Williams RC, Rosenberg MD, Bolt RH (red), New York, London, Sydney: John Wiley & Sons, INC, 1959: 11–20.
- [59] WILKINSON PC, SHIELDS JM, HASTON WS. Contact guidance of human neutrophil leukocytes. *Exp Cell Res* 1982; **140**: 55–62.
- [60] WILKINSON PC, LACKIE JM. The influence of contact guidance on chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Exp Cell Res* 1983; **145**: 255–264.
- [61] WILKINSON PC, KOMAI-KOMA M, NEWMAN I. Locomotion and chemotaxis of lymphocytes. *Autoimmunity* 1997; **26**: 55–72.
- [62] WÓJCIAK B, CROSSAN J, CURTIS ASG, WILKINSON CDW. Grooved substrata facilitate *in vitro* healing of completely divided flexor tendons. *J. Mater Sci : Materials in Medicine* 1995; **6**: 266–271.
- [63] WÓJCIAK-STOTHARD B, CURTIS ASG, MONAGHAN W, McGRATH M, SOMMER I, WILKINSON CDW. Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; **31**: 147–158.
- [64] WÓJCIAK-STOTHARD B, MADEJA Z, KOROHODA W, CURTIS A, WILKINSON C. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behavior. *Cell Biol Int* 1995; **19**: 485–490.
- [65] WÓJCIAK-STOTHARD B, CURTIS A, MONAGHAN W, McDONALD K, WILKINSON C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp Cell Res* 1996; **223**: 426–425.
- [66] WÓJCIAK-STOTHARD B, DENYER M, MISHRA M, BROWN RA. Adhesion, orientation, and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 1997; **33**: 110–117.
- [67] YOUNGS S, ALI SA, TAUB DD, REES RC. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int. J Cancer* 1997; **71**: 257–266.
- [68] XIA Y, KIM E, ZHAO XM, ROGERS JA, PRENTISS M, WHITESIDES GM. Complex optical surfaces formed by replica molding against elastomeric surfaces. *Science* 1996; **273**: 347–349.
- [69] ZHAO M, AGIUS-FERNANDEZ A, FORRESTER JV, McCAIG CD. Directed migration of corneal epithelial sheets in physiological electric fields. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1996; **37**: 2548–2558.

Adres autora Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

METODY BADANIA AKTYWNOŚCI INWAZYJNEJ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH*

ASSAYS FOR ANALYSIS OF TUMOUR INVASION

Zbigniew MADEJA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie: W artykule omówiono wybrane metody służące do badań zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. Dokonano przeglądu najważniejszych metod badania tego zjawiska zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Omówiono wykorzystanie metod videomikroskopii do bezpośredniej obserwacji tworzenia przerzutów *in vivo* oraz najważniejszych z metod *in vitro*: 2- i 3- wymiarowe konfrontacje populacji komórek nowotworowych i prawidłowych, metody przechodzenia przez pokryte białkami błony podstawnej filtry w komorach Boydena, hodowle organotypowe, metody badania aktywności ruchowej komórek nowotworowych w kokulturach z komórkami prawidłowymi oraz 3-wymiarowych żelach kolagenowych. W pracy przedstawiono podstawowe założenia wymienionych metod oraz omówiono ich ograniczenia.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 81–95)

Słowa kluczowe: metody badania inwazyjności, videomikroskopia, modele zwierzęce, migracja komórek, modele *in vitro*.

Summary: The paper reviews some qualitative and quantitative experimental assays for the analysis of tumour cell invasion. The current state of development of *in vivo* videomicroscopy, which permits direct observation of steps in formation of metastasis is discussed. Various invasion assays *in vitro* are also reviewed. The 2- and 3-dimensional confrontation models for cancer invasion, transmigration in two-compartment assays, organotypic cultures, and cell motility assays in dense cultures and 3-dimensional collagen gel lattices are compared. The limitations and advantages of the presented methods are considered.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *supl.* 16: 81–95)

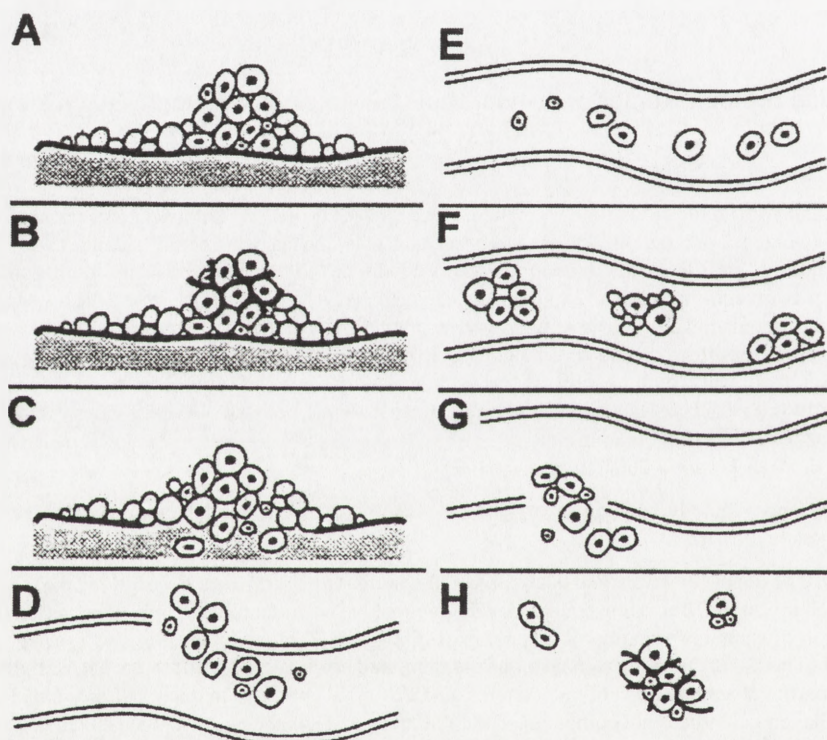
Key words: Invasion assays, videomicroscopy, animal models, cell motility, models of tumour cell invasion *in vitro*

*Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 P04C 051 16

I. WSTĘP

Jedną z najbardziej niebezpiecznych cech chorób nowotworowych jest zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. O ile nowotwory łagodne, tj. nie dające przerzutów, są stosunkowo łatwe w leczeniu, to nowotwory złośliwe bardzo często są powodem zgonu pacjenta. Z tego względu istnieje konieczność poznania mechanizmów rządzących procesem tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe. Badania te są jednak stosunkowo skomplikowane ze względu na złożoność i wieloetapowość procesu tworzenia przerzutów przez nowotwory.

Obecnie wyróżniane są już zasadnicze etapy całego procesu wytwarzania przerzutów (rys. 1) [8, 12, 31]. W pierwszym etapie rozwijający się nowotwór nie nacieka jeszcze sąsiednich tkanek i jest w fazie przedinwazyjnej. Aby taki guz

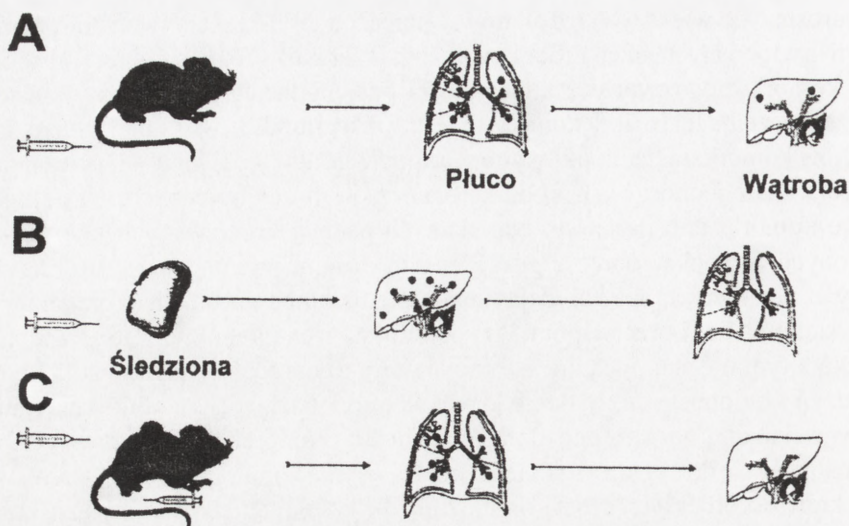


RYSUNEK 1. Etapy tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe: (A) guz w fazie przedinwazyjnej; (B) indukcja tworzenia własnych naczyń krwionośnych guza; (C) pierwszy etap tworzenia przerzutów – nabycie umiejętności przechodzenia przez błonę podstawną; (D) etap dostawiania się komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych; (E) bierne przenoszenie komórek nowotworowych przez krew do odległych części organizmu; (F) homo- i heterotypowe interakcje z innymi komórkami znajdującymi się w układzie krwionośnym; (G) ekstrawasacja – wyjście komórek nowotworowych poza naczynie krwionośne; (H) wytworzenie guzów wtórnych (wg [12] zmodyfikowane)

mógł urosnąć do większych rozmiarów, konieczna jest indukcja tworzenia własnych naczyń krwionośnych guza. Proces tworzenia przerzutów rozpoczyna się od zdobycia przez komórki nowotworowe umiejętności przechodzenia przez błony podstawne. Do przekroczenia tej bariery konieczny jest zanik naturalnie występujących połączeń pomiędzy komórkami nabłonkowymi oraz podjęcie aktywnej migracji przez komórki rakowe wraz z jednoczesną produkcją enzymów proteolitycznych. Następnie migrujące komórki dostają się do napotkanych naczyń krwionośnych albo do nowo tworzonych naczyń w obrębie guza. W tym drugim przypadku jest to ułatwione, ponieważ ściany tych naczyń mają niekompletną błonę podstawną i charakteryzują się występowaniem przerw pomiędzy komórkami endotelialnymi. Sądzi się, że w związku z tym nie stanowią one istotnej bariery dla procesów przenikania komórek do naczyń krwionośnych. Badanie krwi żyłnej powracającej z dobrze rozwiniętych guzów wskazuje, że każdego dnia duża liczba komórek nowotworowych może przedostawać się do układu krwionośnego. Następnie komórki są biernie przenoszone przez krew do odległych części organizmu. W kolejnych etapach inwazji komórki nowotworowe przyczepiają się do ścian naczyń krwionośnych w wyniku specyficznej adhezji lub też na skutek mechanicznego zatrzymania stosunkowo dużych komórek rakowych w obrębie najmniejszych naczyń krwionośnych. W miejscu zatrzymania, komórki nowotworowe tworzą ścisłe kontakty ze ścianami naczynia i wychodzą poza jego obręb dzięki poruszaniu się między komórkami endotelialnymi. Następnie komórki nowotworowe aktywnie migrują do wybranych miejsc, gdzie zaczynają proliferować i tworzyć guzy wtórne. Stosunkowo duża złożoność omawianego procesu zaowocowała szeregiem różnego rodzaju metod biologicznych pozwalających na badanie tego zjawiska.

II. EKSPERYMENTALNE MODELE BADANIA TWORZENIA PRZERZUTÓW *IN VIVO*

Popularnym układem do badań aktywności metastatycznej nowotworów *in vivo* są modele mysie, w których określona liczba komórek nowotworowych (zwykle kilkaset tysięcy do kilku milionów) jest wstrzykiwana do żyły ogonowej, śledziony lub podskórnicy, a następnie po określonym czasie określa się ilość i wielkość przerzutów powstałych w różnych organach ciała zwierzęcia (rys. 2) [28, 37]. Inną metodą jest badanie lokalnej inwazyjności przez miejscowe wstrzykiwanie komórek nowotworowych bezpośrednio do badanego organu i histologiczne określenie stopnia inwazyjności [32]. Dzięki zastosowaniu takich metod można stwierdzić, czy badane komórki nowotworowe są zdolne do tworzenia przerzutów oraz określić miejsce ich lokalizacji. Można również badać wpływ różnego rodzaju środków terapeutycznych na wydajność procesu tworzenia przerzutów. Największą zaletą takiej metody jest stosunkowo wierne odtworzenie całej złożoności układu. Głównym



RYSUNEK 2. Schemat postępowania w badaniach aktywności metastatycznej nowotworów *in vivo*. Określona liczba komórek nowotworowych jest wstrzykiwana do żyły ogonowej (A), śledziony (B) lub podskórnie (C), a następnie po określonym czasie określa się ilość i wielkość przerzutów (na schemacie czarne kropki) powstałych w różnych organach ciała zwierzęcia (wg [37] zmodyfikowane)

zaś ograniczeniem jest określanie jedynie początkowego i końcowego etapu całego procesu, tj. liczby komórek wstrzykiwanych i liczby powstałych guzów. Etapy pośrednie procesu tworzenia przerzutów nie są obserwowane bezpośrednio, dlatego wnioski dotyczące czasu i miejsca działania poszczególnych czynników wpływających na wynik końcowy oparte są jedynie na przypuszczeniach.

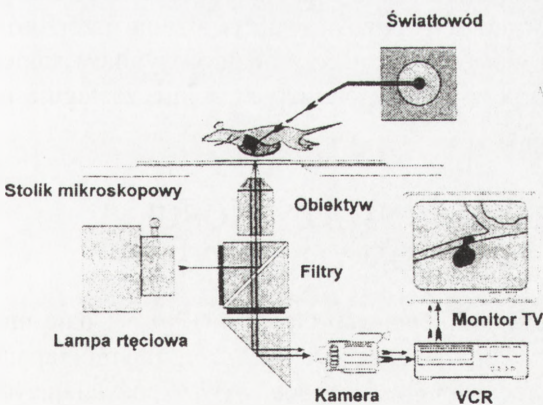
Próba omięcia wspomnianych ograniczeń było wprowadzenie do badań mechanizmów tworzenia przerzutów videomikroskopii *in vivo* [8, 9, 27, 28]. Celem wprowadzenia tej techniki było umożliwienie badania w drodze bezpośredniej obserwacji poszczególnych etapów procesu tworzenia przerzutów i scharakteryzowanie losu komórek rakowych od początkowego zatrzymania w układzie mikronaczyniowym aż do formowania unaczynionych guzów. Aby tego rodzaju obserwacje były możliwe, konieczne było opracowanie układu optycznego, który zapewniał spełnienie kilku warunków [28]:

- (1) umożliwiał identyfikację wstrzykniętych komórek nowotworowych w obrębie badanego organu;
- (2) pozwalał na ich wizualizację z wystarczającym kontrastem i rozdzielczością w celu określenia ich lokalizacji w sposób nieszkodliwy dla otaczających struktur;
- (3) stwarzał możliwość chirurgicznego eksponowania nie poddanych sekcji organów (wątroba, płuca, mięśnie itd.) do takiej głębokości, do jakiej komórki nowotworowe mogą się dostać dzięki niezaburzonemu, normalnemu przepływowi krwi;

- (4) wykorzystany w badaniach system optyczny musi mieć głębokość pola widzenia wystarczająco płytką, aby zapobiegać optycznemu rozwarstwieniu organu i zapobiegać nakładaniu się obrazów ze struktur leżących ponad i pod obserwowaną płaszczyzną;
- (5) konieczne jest utrzymanie nieruchomego pola widzenia żywego preparatu, w którym występuje ciągły ruch powodowany oddychaniem i biciem serca badanego zwierzęcia;
- (6) konieczne jest właściwe oświetlenie do zapewnienia wysokiej rozdzielczości obrazów video;
- (7) dla celów statystycznych możliwe musi być określenie liczby komórek, które dotarły do badanego obszaru oraz kontrolowanie stopnia ich przeżywalności.

Podstawowy sprzęt używany w tego typu badaniach zbliżony jest swoją budową do układów używanych do analizy obrazów mikroskopowych w biologii komórki [29, 30]. Dokładnie konstrukcję sprzętu stosowanego w videomikroskopii *in vivo* opisuje w swojej pracy MacDonald i wsp. [28]. W skład takiego układu wchodzi fluorescencyjny mikroskop odwrócony z oświetleniem epi i stolikiem wystarczająco dużym, aby zmieścić zwierzę doświadczalne (rys. 3). Uśpione zwierzę jest poddawane zabiegowi chirurgicznemu odsłaniającemu badany organ: wątrobę, płuco, śledzionę lub mięsień. Następnie zwierzę jest umieszczane na platformie posiadającej okienko zrobione ze szkła nakrywkowego, tak aby organ mógł być widoczny od spodu. W ten sposób powierzchnia tkanki spoczywającej na okienku pozostaje w płaszczyźnie ostrości, nawet jeśli górna powierzchnia podnosi się i opada w związku z oddychaniem i biciem serca zwierzęcia. Transiluminacja tkanki jest przeprowadzana za pomocą skośnie ustawianego światłowodu. Rejestracja obrazu następuje przy użyciu kamery i magnetowidu. Komórki nowotworowe są wcześniej znakowane

fluorescencyjnie i identyfikowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej z oświetleniem epi. Komórki wstrzykiwane bezpośrednio do krwioobiegu mogą być kierowane do określonych organów, a następnie możliwa jest obserwacja takich procesów, jak: zatrzymywanie komórek nowotworowych w naczyniach i ich aktywne opuszczenie, czyli ekstrwascjacja oraz przemieszczanie się komórek w obrębie kolonizowanego organu.



RYSUNEK 3. Schemat układu do videomikroskopii *in vivo* – opis w tekście (wg [29] zmodyfikowane)

Trudno omawiać tutaj dokładnie wszystkie wyniki otrzymane przy użyciu tej metody, jednak warto zwrócić uwagę na pewne ogólne obserwacje poczynione przez autorów, nie zawsze zgodne z powszechnie przyjętymi poglądami [8, 9, 27, 28]. W badanym przez siebie okresie czasu stwierdzili, że ogromna większość wstrzykiwanych komórek nowotworowych przeżywa w układzie krwionośnym. Przeżywalność w ciągu doby wynosiła 80–90%. Na podstawie badań *in vitro* dotychczas sądzono, że większość komórek nowotworowych jest niszczone przez ciśnienie hemodynamiczne w układzie krążenia; po zatrzymaniu w naczyniach włosowatych komórki miały ulegać deformacji i naciąganiu błony komórkowej aż do momentu jej pęknięcia [42, 43]. Dzięki videomikroskopii stwierdzono również, że większość komórek jest zatrzymywana na zasadzie mechanicznej, w pierwszym napotkanym układzie naczyń włosowatych i tam opuszcza naczynia. Wcześniejsze badania *in vitro* [38] oraz znany fakt, że określone typy nowotworów dają preferencyjne przerzuty do określonych organów zdają się nie potwierdzać tych obserwacji, należy jednak zwrócić uwagę, że zatrzymanie komórek nowotworowych w określonym organie nie przesądza jeszcze o rozwinięciu się w tym miejscu przerzutu. Zastosowanie videomikroskopii pozwoliło również stwierdzić, że praktycznie wszystkie zatrzymane w naczyniach włosowatych komórki nowotworowe aktywnie opuszczają naczynia krwionośne, lecz jedynie znikoma liczba komórek wychodzących z naczynia jest w stanie podjąć proliferację i wytworzyć mikroprzerzuty. Obserwacja ta sugeruje, że właśnie ten etap tworzenia przerzutów może mieć kluczowe znaczenie dla powstawania guzów wtórnych, potwierdzając pochodzącą jeszcze z końca XIX wieku koncepcję *seed and soil* podkreślającą istotne znaczenie środowiska wytwarzanego przez poszczególne tkanki dla podjęcia przez metastatyczną komórkę nowotworową wzrostu w nowym miejscu [36].

Omawiane badania przeprowadzono na wielu różnych liniach komórkowych i różnych zwierzętach doświadczalnych [8, 9, 27, 28]. Oczywiście otwarte pozostaje pytanie, na ile wiernie taki układ doświadczalny odwzorowuje tworzenie przerzutów w naturze. Jednak wydaje się, że wnioski wynikające z analizy wyników takich doświadczeń, często odbiegające od powszechnie przyjętych opinii, zasługują na uwagę.

III. MODELE BADANIA INWAZYJNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH *IN VITRO*

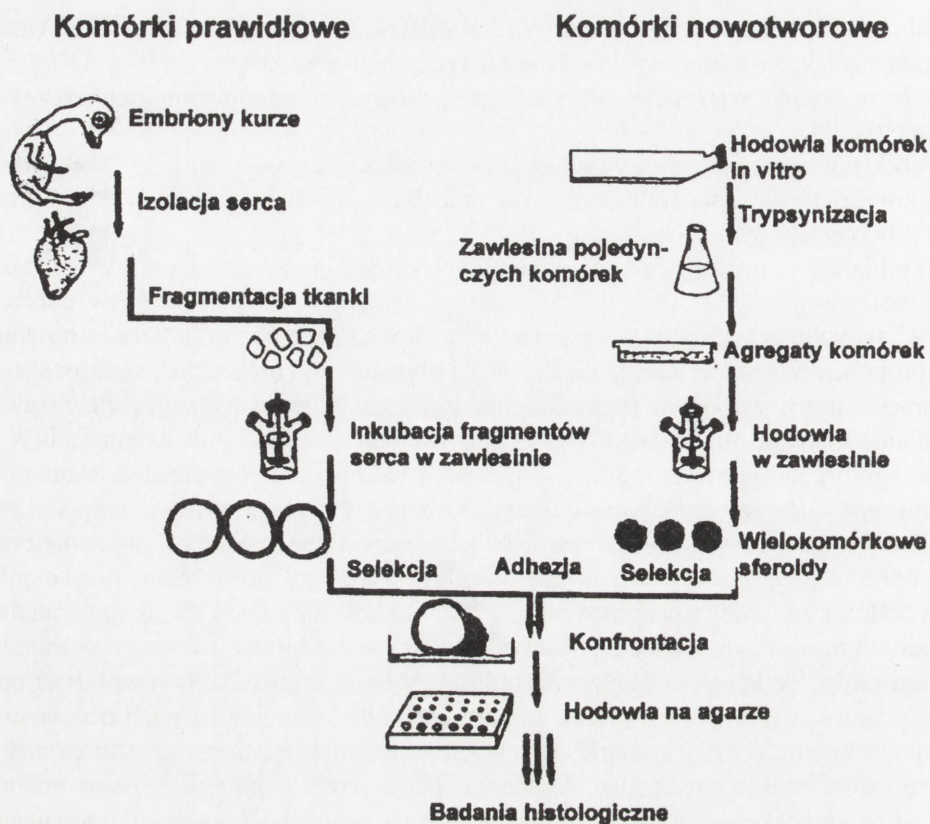
Zastosowanie nawet najbardziej skomplikowanych metod *in vivo* nie daje możliwości szczegółowych badań mechanizmów rządzących poszczególnymi etapami tworzenia przerzutów. W tym celu opracowano szereg modeli *in vitro* pozwalających na badanie poszczególnych etapów przerzutowania w kontrolowanych i powta-

rzalnych warunkach doświadczalnych. W zależności od potrzeb stosowane metody kładą nacisk na różne aspekty procesu tworzenia przerzutu:

- (1) wzrost nowotworu w określonym mikrośrodowisku stworzonym przez poszczególne tkanki;
- (2) oddziaływanie pomiędzy inwazyjnymi komórkami nowotworu a prawidłowymi komórkami gospodarza oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi w czasie inwazji;
- (3) oddziaływanie komórek nowotworowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej.

Ciekawym przykładem połączenia metod *in vivo* z metodami *in vitro* jest metoda zaproponowana przez R. Hoffmana i wsp. [10] (oparta na układach doświadczalnych opracowanych wcześniej przez Leightona [24, 25]), pozwalająca na długotrwałe badanie wzrostu guzów wtórnych (indukowanych u myszy w doświadczeniach *in vivo*) w organotypowych hodowlach *in vitro*. W metodzie tej transfekowane GFP (ang. *green fluorescent protein*) ludzkie komórki raka płuca wstrzykiwano do żyły ogonowej bezwłosych myszy i po 7 dniach obserwowano powstawanie przerzutów w obrębie płuc. Następnie kawałki płuca z powstałymi przerzutami przenoszono do hodowli organotypowej prowadzonej w żelu kolagenowym. W tak prowadzonej hodowli można było następnie obserwować wzrost komórek nowotworowych przez długi okres w kontrolowanych warunkach. Metoda ta pozwalała również na bezpośrednie umieszczenie komórek nowotworowych w obrębie różnych tkanek i badanie wzrostu kolonii komórek rakowych w obrębie badanego organu *in vitro*.

Spośród stosowanych metod badania inwazyjności komórek nowotworowych *in vitro* stosunkowo często stosowane są testy oparte na obserwacji zachowania się komórek podczas konfrontacji populacji potencjalnych komórek metatstatycznych z prawidłowymi komórkami lub tkankami [2, 11, 32, 39]. Metody tego typu możemy podzielić na modele konfrontacji w układach trójwymiarowych i dwuwymiarowych. W przypadku modeli trójwymiarowych komórki nowotworowe hodowane *in vitro* inkubuje się w odpowiednich warunkach, aby otrzymać wielokomórkowe sferoidy [rys. 4]. Równocześnie otrzymuje się fragmenty zdrowej tkanki, np. fragmenty serca kurczaka. Następnie doprowadza się do adhezji tych dwóch wielokomórkowych fragmentów, inkubuje się je przez określony czas (kilku do kilkunastu dni), utrzuwa, zatapia w parafinie, tnie na kilkumikrometrowe skrawki i barwi histologicznie lub przy użyciu specyficznych przeciwciał [7, 39]. W wyniku zastosowania takiej procedury powstaje preparat, na którym widzimy fragment prawidłowej tkanki, w obrębie której można zidentyfikować inwazyjne komórki nowotworowe. Trójwymiarowe metody konfrontacji bardziej przypominają sytuację obserwowaną w naturze niż metody dwuwymiarowe, jednak ich analiza opiera się na takich samych zasadach jak w przypadku guzów naturalnych – mianowicie przy zastosowaniu metod histologicznych lub mikroskopii elektronowej. Z tego względu podobnie jak większość metod *in vivo* jest to metoda pośrednia, w której obserwujemy jedynie sytuację



RYSUNEK 4. Schemat postępowania przy badaniu inwazyjności komórek nowotworowych metodą trójwymiarowej konfrontacji komórek metastatycznych z komórkami lub tkankami prawidłowymi. Opis poszczególnych etapów w tekście (wg [6] zmodyfikowane)

na początku i na końcu eksperymentu. Ponadto w większości przypadków metoda ta jest traktowana jako jakościowa, a nie ilościowa [32]

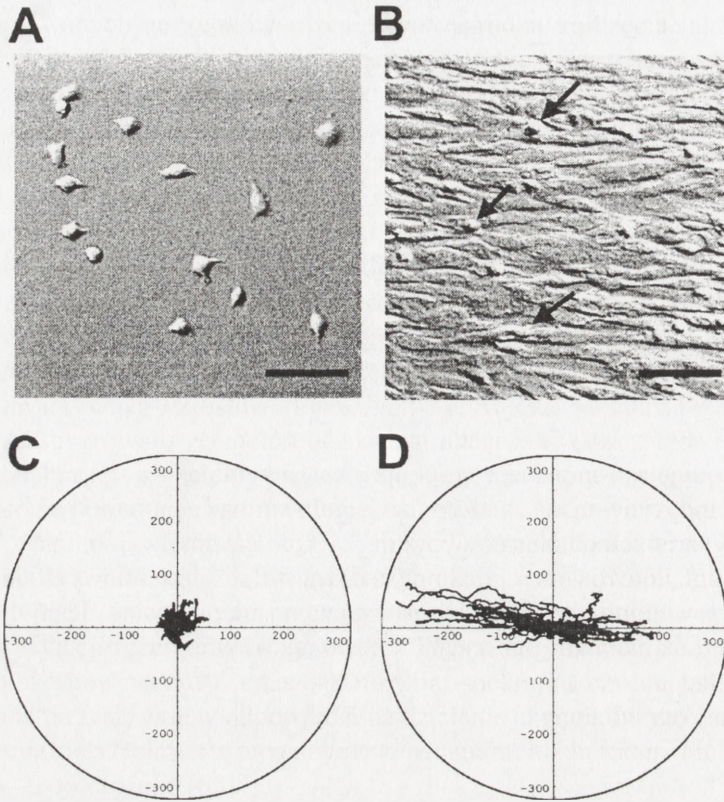
Bezpośrednia obserwacja dokonujących inwazji komórek nowotworowych możliwa jest dzięki zastosowaniu metod konfrontacji dwóch populacji komórek w układzie dwuwymiarowym [2, 11]. W tym przypadku fragmenty tkanki prawidłowej i nowotworowej umieszcza się w naczyniu hodowlanym w niewielkiej od siebie odległości. Migrujące z agregatu komórki nowotworowe napotyka na swojej drodze fragment tkanki prawidłowej i w zależności od stopnia inwazyjności z różną wydajnością przedostają się pomiędzy komórkami prawidłowymi na obszar zajmowany przez zdrową tkankę.

Modyfikację takiego sposobu badania stopnia inwazyjności komórek nowotworowych stosujemy w naszych własnych badaniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki IBM UJ. W badaniach tych koncentrujemy się na obserwacji zmian

aktywności ruchowej komórek nowotworowych w wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi. Zastosowanie takiej metody pozwala na długoczasowe obserwacje dowolnych komórek nowotworowych poruszających się po powierzchni lub w sąsiedztwie dowolnych komórek prawidłowych. Na rysunku 5 przedstawiono wyniki badań wpływu bezpośredniego kontaktu komórek mięsaka XC z prawidłowymi fibroblastami skóry [23]. W wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi średnie przemieszczenie migrujących komórek XC w trakcie 8 godzinnego doświadczenia wzrosło z 11 μm w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do 88 μm dla komórek migrujących po warstwie fibroblastów. Wzrostowi temu nie towarzyszył wzrost prędkości ruchu, a był on jedynie wynikiem polaryzacji ruchu związanej ze zjawiskiem naprowadzania kontaktowego. Podobną reakcję zaobserwowaliśmy również w przypadku komórek raka prostaty oraz w mniejszym stopniu komórek czerniaka.

Ponieważ w pierwszych etapach inwazji komórki nowotworowe poruszają się zwykle pozostając w kontakcie z sąsiednimi komórkami nowotworowymi, podobne podejście metodyczne zastosowaliśmy w badaniach wpływu na ich aktywność ruchową homotypowych oddziaływań pomiędzy komórkami (rys. 6). Dotychczas dominującym poglądem było, że o ile w przypadku komórek prawidłowych zwiększanie ilości kontaktów pomiędzy komórkami np. w wyniku wzrostu gęstości hodowli prowadzi do zahamowania ich ruchu (tzw. kontaktowe zahamowanie migracji), to w przypadku komórek nowotworowych zjawisko to nie występuje lub jest w jakimś stopniu ograniczone [1, 3, 17, 18]. W naszych badaniach wykazaliśmy ilościowo dla 4 linii komórek nowotworowych istnienie zjawiska odwrotnego od zahamowania kontaktowego migracji, tj. wzrostu prędkości ruchu i średniego przemieszczenia migrujących komórek nowotworowych pod wpływem wzajemnych kolizji (rys. 6). Przedstawione wykresy prezentują przykładowe trajektorie komórek nowotworowych poruszających się bez tworzenia wzajemnych kontaktów lub w gęstej hodowli oraz zależność prędkości ruchu od gęstości hodowli dla komórek prawidłowych i nowotworowych.

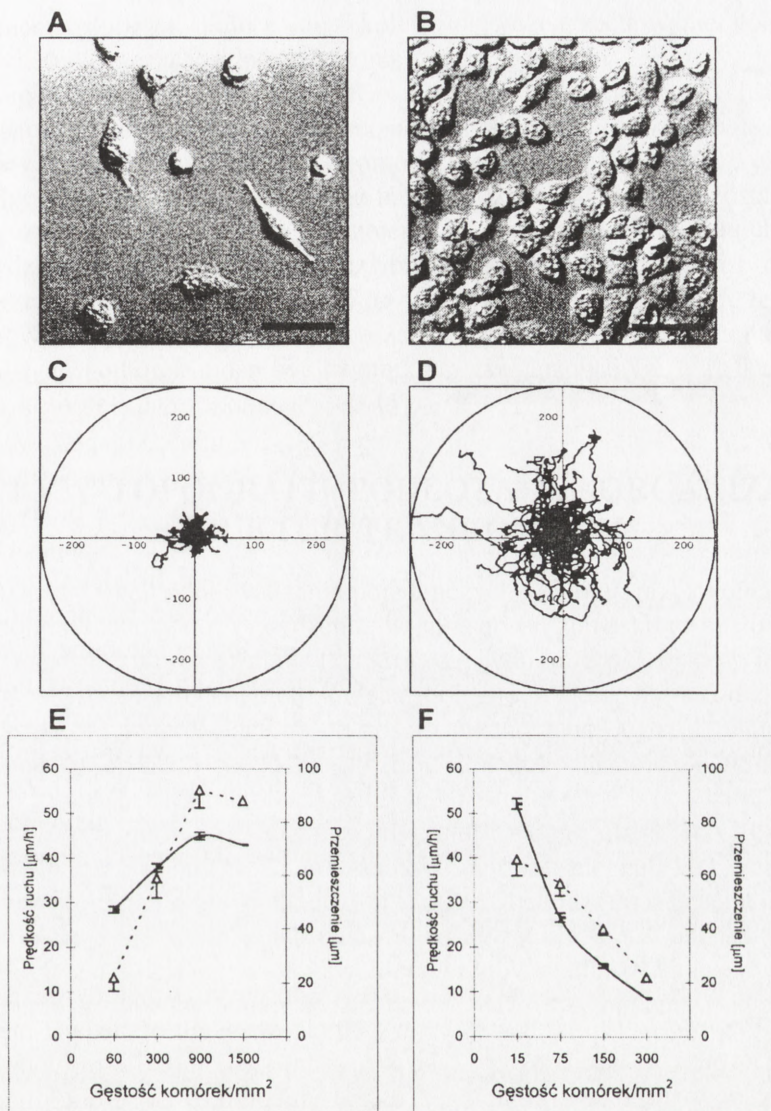
Trochę inne podejście do badania inwazyjności komórek nowotworowych w podobnym układzie doświadczalnym zaproponował Verschueren i wsp. [40, 41]. Opracowana przez jego zespół metoda polegała na zastosowaniu różnych rodzajów mikroskopii optycznej do oceny liczby komórek nowotworowych zdolnych do przechodzenia poprzez warstwę komórek prawidłowych. Komórki nowotworowe niezdolne do przechodzenia na drugą stronę warstwy komórek prawidłowych pozostawały okrągłe z charakterystycznym jasnym hallo widocznym w mikroskopii kontrastowo-fazowej. Natomiast komórki zdolne do przemieszczenia się na drugą stronę rozpląszczały się na podłożu wyraźnie różniąc się od komórek będących na powierzchni prawidłowych fibroblastów. Ewentualne wątpliwości, czy komórki rozpląszczyły się na powierzchni szkła czy na powierzchni fibroblastów można rozstrzygnąć obserwując równolegle badane komórki przy użyciu interferencyjnej



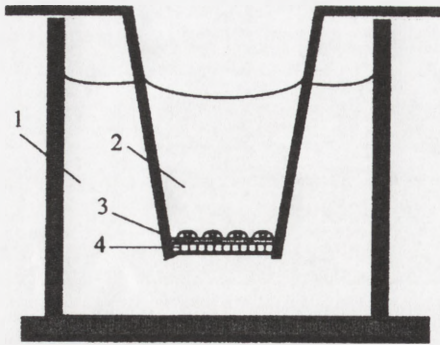
RYSUNEK 5. Wpływ heterotypowych oddziaływań komórka-komórka na aktywność ruchową komórek nowotworowych. Rysunek przedstawia wyniki badań migracji komórek mięsaka szczura XC po powierzchni zahamowanych kontaktowo prawidłowych fibroblastów. W wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi średnie przemieszczenie migrujących komórek XC w trakcie 8 godzinnego doświadczenia wzrosło z 11 μm w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do 88 μm dla komórek migrujących po warstwie fibroblastów. Wzrostowi temu nie towarzyszył wzrost prędkości ruchu, a był on jedynie wynikiem polaryzacji ruchu związanej ze zjawiskiem naprowadzania kontaktowego. Komórki XC wykazywały tendencję do poruszania się wzdłuż dłuższej osi komórek prawidłowych. (A) Komórki XC migrujące bez kontaktu z komórkami prawidłowymi, skala 100 μm ; (B) komórki XC migrujące po powierzchni fibroblastów, strzałki wskazują położenie komórek nowotworowych. (C) Trajektorie ruchu 50 komórek XC w kontroli i w warunkach kontaktu z fibroblastami (D). Wykresy te przedstawiają szlaki poruszających się komórek sprowadzone do jednego punktu wyjściowego znajdującego się w początku układu współrzędnych. Kierunek osi 0X odpowiada ułożeniu dłuższej osi fibroblastów

mikroskopii odbiciowej, w której obszary komórki mocno przyłączone do szkiełka dają charakterystyczne zaciemnienie obrazu.

Oprócz bezpośredniego oddziaływania z różnymi komórkami, komórki inwazyjne mają do pokonania na swojej drodze jeszcze inne bariery takie jak błona podstawna



RYSUNEK 6. Wpływ homotypowych oddziaływań komórka-komórka na aktywność ruchową komórek nowotworowych na przykładzie komórek czerniaka B16. W wyniku bezpośrednich kontaktów homotypowych średnie przemieszczenie migrujących komórek B16 w trakcie 7 godzinnego doświadczenia wzrosło z $21,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do $87,7 \pm 6,7 \mu\text{m}$ w warunkach kontaktu z komórkami sąsiednimi. Wzrostowi temu towarzyszył wzrost prędkości ruchu (odpowiednio $28,2 \pm 0,7 \mu\text{m/godz.}$ i $44,8 \pm 0,9 \mu\text{m/godz.}$). Efekt ten nie był wywołany aktywnością czynników wydzielanych przez komórki do pożywki. (A) Komórki B16 migrujące bez kontaktu z komórkami sąsiednimi, skala $50 \mu\text{m}$; (B) komórki B16 migrujące w gęstej hodowli w warunkach fizycznego kontaktu z komórkami sąsiednimi. Trajektorie ruchu 50 komórek B16 w migrujących bez kontaktu z komórkami sąsiednimi (C) i w warunkach umożliwiających taki kontakt (D). (E,F) Porównanie wpływu gęstości hodowli na aktywność ruchową nowotworowych komórek czerniaka B16 (E) i prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej (F). Na wykresach średnią prędkość ruchu komórek oznacza linia ciągła, a średnie przemieszczenie linia przerywana



RYSUNEK 7. Schemat modyfikacji komory Boydena używanej w badaniach aktywności metastatycznej komórek nowotworowych. (1,2) rozdzielone błoną z porami o określonej średnicy dwa przedziały komory; (3) badane komórki; (4) błona porowata pokryta matrygelem

oraz inne niekomórkowe elementy wchodzące w skład tkanki łącznej. Niewątpliwie ze względu na prostotę jednym z najpopularniejszych testów badających ten aspekt tworzenia przerzutów jest metoda oparta na zastosowaniu komór Boydena, w których standardową błonę z porami o określonej średnicy rozdzielającą dwa przedziały komory zastępuje analogiczna błona pokryta matrygelem (rys. 7) [6, 20, 21, 22, 34]. Matrygel jest ekstraktem z mięsaka myszy bogatym w składniki błony podstawnej takie, jak: laminina, kolagen IV i proteoglikany. Powleczony takim ekstraktem filtr dobrze naśladuje budowę błony podstawnej. Podobną technikę, opierającą się o wykorzystanie komór Boydena, można również zastosować badając przemieszczanie się komórek przez naturalne błony biologiczne takie, jak np. błona owodniowa [19]

lub cienkie skrawki żywej tkanki [35]. We wszystkich wymienionych przypadkach badane komórki wysiewa się na jedną stronę filtra i po pewnym czasie liczy się, ile komórek przedostało się przez pory w filtrze na drugą stronę (rys. 7). Zwiększona liczba komórek przechodzących przez filtr świadczy o większej aktywności metastatycznej. Końcowy wynik jest jednak wypadkową aktywności migracyjnej komórek, ich zdolności do przeciskania się przez wąskie pory błony oraz zdolności do aktywnego trawienia pozakomórkowej macierzy białkowej.

Znacznie więcej informacji na temat zjawisk zachodzących w czasie poruszania się komórki w macierzy zewnątrzkomórkowej dostarczają metody bezpośredniej obserwacji komórek. P. Friedl wraz ze współpracownikami opracował metodę pozwalającą na precyzyjną charakterystykę poruszania się komórki w trójwymiarowym żelu kolagenowym. Dzięki kombinacji metod videomikroskopii oraz mikroskopii konfokalnej możliwe jest nie tylko wyznaczenie dokładnych szlaków migracji komórek i ich precyzyjny pomiar ilościowy, ale również opis wzajemnego oddziaływania komórek z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i rozkładu określonych białek receptorowych na powierzchni komórki [13, 14, 15, 16, 33].

Istotnym elementem procesu tworzenia przerzutów jest zdolność komórek metastatycznych do adhezji do określonych komórek i struktur tkankowych [8, 12, 26, 31]. Istnieje wiele dowodów na istnienie wybiórczej adhezji komórek nowotworowych do śródbłonna pochodzącego z określonych tkanek [4, 5]. W badaniach

tych stosuje się takie same metody jak we wszystkich innych badaniach adhezji komórek. Z tego względu metody te nie będą tutaj szerzej omawiane.

IV. PODSUMOWANIE

Trwające od wielu lat intensywne badania mechanizmów tworzenia przerzutów zaowocowały opracowaniem wielu różnych metod badawczych. Stosowane obecnie techniki pozwalają na badania mechanizmów tworzenia przerzutów zarówno w układach *in vivo*, jak i *in vitro*. Różnorodność stosowanych metod pozwala na szczegółowe badania kolejnych etapów całego procesu w kontrolowanych warunkach doświadczalnych. Poszczególne rodzaje metod kładą nacisk na różne aspekty tworzenia przerzutów. Pozwala to na badania mechanizmów kontrolujących kolejne etapy tworzenia przerzutów i stwarza nadzieję na pełniejsze zrozumienie całego procesu, konieczne do opracowania skuteczniejszych metod leczenia chorób nowotworowych.

LITERATURA

- [1] ABERCROMBIE M. Contact inhibition and malignancy. *Nature* 1979; **281**: 259–262.
- [2] ABERCROMBIE M., HEAYS MAN JEM. Invasive behavior between sarcoma and fibroblast populations in cell culture. *J Natl Cancer Inst* 1976; **56**: 561–570.
- [3] ABERCROMBIE M., TURNER AA. Contact reactions influencing cell locomotion of a mouse sarcoma cells in culture. *Med Biol* 1978; **56**: 299–303.
- [4] ALBY L, AUERBACH R. Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1984; **81**: 5739–5743.
- [5] AUERBACH R, LU CW, PARDON E, GUMKOWSKI F, KAMINSKA G, KAMINSKI M. Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: An *in vitro* correlate of preferential metastasis *in vivo*. *Cancer Res* 1987; **47**: 1492–1496.
- [6] BIROCCIO A, CANDILORO A, MOTTOLESE M, SAPORA O, ALBINI A, ZUPI G, DEL BUFALO D. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and *in vivo* angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J* 2000; **14**: 652–660.
- [7] BRÄUNER T. Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Verlag Stöfler & Schütz, Stuttgart 1987.
- [8] CHAMBERS AF. The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncology Res* 1999; **11**: 161–168.
- [9] CHAMBERS AF, MACDONALD IC, SCHMIDT EE, KOOP S, MORRIS VL, KHOKHA R, GROOM AC. Steps in tumor metastasis: New concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 1995; **14**: 279–301.
- [10] CHISHIMA T, YANG M., MIYAGI Y, LI L, TAN Y, BARANOV E, SHIMADA H, MOOSSA AR, PENMAN S, HOFFMAN RM. Governing step of metastasis visualized *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 11573–11576.
- [11] EASTY GC, HAEMMERLI G, EASTY DM, STRAULI P. Interaction between normal epithelial and squamous carcinoma cells in monolayer culture. *Cancer Res* 1982; **42**: 4248–4255.

- [12] EFFERT PJ, STROHMEYER TG. Theories on the metastatic process and possible therapeutic options. *Urol Res* 1995; **23**: 11–19.
- [13] FRIEDL P, NOBLE PB, ZÄNKER KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* 1993; **165**: 157–165.
- [14] FRIEDL P, NOBLE PB, ZÄNKER KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Expression and function of cell adhesion molecules. *J Immunol* 1995; **154**: 4973–4985.
- [15] FRIEDL P, MAASER K, KLEIN E, NIGGEMANN B, KROHNE G, ZÄNKER KS. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of 2 and integrins and CD44. *Cancer Res* 1997; **57**: 2061–2070.
- [16] FRIEDL P, ZÄNKER KS, BRÖCKER EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 1998; **43**: 369–378.
- [17] GAIL M. Time lapse studies on the motility of fibroblasts in tissue culture. [w] R Porter, DW Fitzsimons [red] Locomotion of Tissue Cells. Ciba Found. Symposium 14, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, London, New York, 1973: 297–310.
- [18] GAIL MH, BOONE CW. Density inhibition of motility in 3T3 fibroblasts and their SV40 transformants. *Exp Cell Res* 1971; **64**: 156–162.
- [19] GRIMSTAD IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp Cell Res* 1987; **173**: 515–523.
- [20] HAJITOU A, DEROANNE C, NOEL A, COLLETTE J, NUSGENS B, FOIDART JM, CALBERG-BACQ CM. Progression in MCF-7 breast cancer cell tumorigenicity: compared effect of FGF-3 and FGF-4. *Breast Cancer Res Tr* 2000; **60**: 15–28.
- [21] KIM JW, CHO HS, KIM JH, HUR SY, KIM TE, LEE JM, KIM IK, NAMKOONG SE. AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest* 2000; **80**: 587–594.
- [22] KOLI K, KESKI-OJA J. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ* 2000; **11**: 221–229.
- [23] KOROHOODA W, MADEJA Z. Contact of sarcoma cells with aligned fibroblasts accelerated their displacement: computer-assisted analysis of tumour cell locomotion in co-culture. *Biochem Cell Biol* 1997; **75**: 263–276.
- [24] LEIGHTON J. A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells *in vitro*. *J Nat Cancer Inst* 1951; **12**: 545–562.
- [25] LEIGHTON J, TCHAO R. The propagation of cancer, a process of tissue remodeling. Studies in histophysiologic gradient culture. *Cancer Met Rev* 1984; **3**: 81–97.
- [26] LEWALLE JM, BAJOU K, DESREUX J, MAREEL M., DEJANA E, NOEL A, FOIDART JM. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction *in vitro*. *Exp Cell Res* 1997; **237**: 347–356.
- [27] MACDONALD IC, SCHMIDT EE, MORRIS VL, CHAMBERS AF, GROOM AC. Intravital videomicroscopy of the chorioallantoic microcirculation: A model system for studying metastasis. *Microvasc Res* 1992; **44**: 185–199.
- [28] MACDONALD IC, SCHMIDT EE, MORRIS VL, GROOM AC, CHAMBERS AF. *In vivo* videomicroscopy of experimental hematogenous metastasis: cancer cell arrest, extravasation, and migration. [w] Soll DR, Wessels D [red.] Motion analysis of living cells. New York: Wiley-Liss 1998: 263–287.
- [29] MADEJA Z. Ilościowe metody analizy obrazu w genetyce molekularnej. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 87–100.

- [30] MADEJA Z, KOROHODA W. Niektóre zastosowania komputerowych metod analizy obrazu (cytometrii obrazowej) w biologii komórki. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 457–476.
- [31] MAREEL MM, VAN ROY FM, BRACKE ME. How and when do tumor cells metastasize. *Crit Rev Oncol* 1993; **4**: 559–594.
- [32] MAREEL MM, VAN ROY FM, MESSIAEN LM, BOGHAERT ER, BRUYNEEL EA. Qualitative and quantitative analysis of tumour invasion *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 141–163.
- [33] NIGGEMANN B, MAASER K, LU H, KROCZEK R, ZÄNKER KS, FRIEDL P. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in three-dimensional collagen lattice. *Cancer Lett* 1997; **118**: 173–180.
- [34] O-CHAROENRAT P, RHYS-EVANS P, MODJTAHEDI H, COURT W, BOX G, ECCLES S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and *in vitro* invasion. *Int J Cancer* 2000; **86**: 307–317.
- [35] OHNISHI T, MATSUMURA H, IZUMOTO S, HIRAGA S, HAYAKAWA T. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 1998; **58**: 2935–2940.
- [36] PAGET S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; **1**: 571–573.
- [37] RUSCIANOD, LORENZONI P., BURGER MM. Murine models of liver metastasis. *Invasion Metastasis* 1995; **14**: 349–361.
- [38] SCHERBARTH S, ORR FW. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: Effects of interleukin-1 on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res* 1997; **57**: 4105–4110.
- [39] VERMEULEN SJ, BRUYNEEL EA, BRACKE ME, DE BRUYNE GK, VENNEKENS KM, VLEMINCKX KL, BREX GJ, VAN ROY FM, MAREEL MM. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of α -catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 4722–4728.
- [40] VERSCHUEREN H, DE BAETSELIER P., DE BRAEKELEER J, DEWIT J, AKTORIES K, JUST I. ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *EJCB* 1997; **73**: 182–187.
- [41] VERSCHUEREN H, DEWIT J, DE BRAEKELEER J, SCHIRRMACHER V, DE BAETSELIER P. Motility and invasive potency of murine T-lymphoma cells: Effect of microtubule inhibitors. *Cell Biol Int* 1994; **18**: 11–19.
- [42] WEISS L, HARLOS JP, ELKIN G, BIXLER B. Mechanisms for the biomechanical destruction of L1210 leukemia cells: A rate regulator for metastasis. *Cell Biophys* 1990; **16**: 149–159.
- [43] WEISS L, ORR FW, HONN KV. Interaction between cancer cells and microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1989; **7**: 127–167.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3,
e-mail: Zibi@mol.uj.edu.pl

KOKULTURY KOMÓRKOWE W REKONSTRUKCJI SKÓRY W ZASTOSOWANIU KLINICZNYM*

CELL COCULTURES IN SKIN RECONSTRUCTION FOR CLINICAL APPLICATIONS

Justyna DRUKAŁA

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie: Umiejętność uzyskania masowych hodowli z niewielkich wycinków tkanek ludzkich i modyfikowania ich zachowania się *in vitro* doprowadziła do wzrostu zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć w biologii i medycynie. Konwencjonalne metody leczenia ubytków skórnych nie zawsze są skuteczne i występuje potrzeba konstruowania substytutów skórnych. Mogą one zastępować naskórek, ale także opracowane zostały ekwiwalenty pełnej grubości skóry. Mają one jednak obok licznych zalet i wady, które skłaniają badaczy do poszukiwania nowych rozwiązań. Doświadczenia własne w tym zakresie dotyczą zastosowania hodowanych *in vitro* autologicznych komórek naskórka w leczeniu troficznych owrzodzeń podudzi. Obok zastosowań klinicznych rekonstruowana skóra znajduje również wykorzystanie w badaniach podstawowych, między innymi do analizy toksyczności rozmaitych substancji i inwazyjności nowotworów. Wytwarzane *in vitro* substytuty skóry okazały się środkiem umożliwiającym zamykanie nie gojących się ran, lecz masowe ich stosowanie jest ograniczone z powodu wysokich kosztów produkcji.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 97–110)

Słowa kluczowe: gojenie ran, keratynocyt, substytut skóry, hodowla *in vitro*

Summary: The ability of carrying out large-scale cultures from small human tissue biopsies and to modify their behaviour *in vitro* led to the increase in interest in practical use of these achievements in biology and medicine. Conventional methods of skin wound healing are not sufficiently efficient and there is a need to construct skin equivalents. A full thickness skin equivalent has been constructed and it may substitute epidermis. The latter has a lot of advantages but also disadvantages, which stimulate further research. Our experience in this field concerns the use of cultured autologous keratinocytes for healing of trophic leg ulcers. Reconstructed skin is used not only in medicine but also in basic research for example in analysis of toxicity of various substances and to study the tumour invasiveness.

*Praca finansowana w ramach grantu KBN (projekt nr 6 P04B 027 14)

Reconstructed *in vitro* skin equivalents appear to be efficient substitutes enabling wound healing, but their large-scale use is limited because of high costs of their production.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 97–110*)

Key words: wound healing, keratinocyte, skin substitute, *in vitro* culture

WSTĘP

W ostatnim 20-leciu nastąpił gwałtowny rozwój nowych technik hodowli komórek i tkanek ludzkich *in vitro*. Możliwość uzyskania masowych hodowli z niewielkich wycinków tkanek, postęp w poznaniu biologii wielu typów komórek, a także umiejętność modyfikowania ich zachowania się w hodowlach, doprowadziły do wzrostu zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć w biologii i medycynie.

Skóra jest tkanką najbardziej ekspozowaną i jednocześnie narażoną na stropy środowiskowe. Budowana jest przez wiele wyspecjalizowanych typów komórek zaangażowanych w funkcje ochronne organizmu. Dzięki swojej wytrzymałości, elastyczności i półprzepuszczalności chroni całe ciało przed uszkodzeniami mechanicznymi, utratą płynów fizjologicznych, inwazją drobnoustrojów i szkodliwym promieniowaniem [3, 6].

Zbudowana jest z wielowarstwowego nabłonka płaskiego – naskórka i skóry właściwej [43]. W skórze właściwej najliczniej reprezentowane są fibroblasty, które produkują i wydzielają składniki macierzy międzykomórkowej, a wśród nich: glikozaminoglikany, takie jak: kwas hialuronowy, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu, siarczan heparanu, heparyna, siarczan keratanu oraz białka fibrylarne, kolageny (I, III, IV, V, VI, VII, XII, XIV), elastynę i białka adhezyjne, m.in. fibronektynę, lamininę, tenascynę. Oprócz fibroblastów w skórze właściwej obecne są makrofagi, komórki tuczne, komórki dendrytyczne, limfocyty T.

Naskórek jest ciągle odnawiającą się wielowarstwową strukturą. Składa się z warstwy rozrodczej, kolczystej, ziarnistej i zrogowaciałej. Jest tkanką szczególnie dogodną do hodowli, ponieważ w ponad 90% składa się z jednego rodzaju komórek – keratynocytów i zawiera znikomą ilość składników substancji międzykomórkowej. Oprócz keratynocytów w naskórku występują melanocyty, komórki Langerhansa, komórki dendrytyczne i neurowydzielnicze komórki Merkla. W odpowiednich porożkach keratynocyty nie tracą zdolności do proliferacji i różnicowania *in vitro*.

Skóra – największy pod względem zajmowanego obszaru organ ustroju pod wpływem urazu termicznego traci częściowo swoje funkcje. Ludzie, którzy ulegają tragicznym wypadkom tracą duży procent powierzchni skóry, są ciężko chorzy z powodu infekcji i utraty elektrolitów [18]. Uraz termiczny należy do najcięższych spośród spotykanych w praktyce klinicznej, a spowodowany nim hypermetabolizm jest proporcjonalny do rozległości i stopnia oparzenia. Pacjenci, którzy przeszli tę ciężką chorobę, muszą z kolei radzić sobie z obecnością głębokich, deformujących blizn i ograniczających ruchliwość przykurców.

Gojenie ran jest procesem złożonym i wiąże się z wysoce złożoną odpowiedzią organizmu na uszkodzenie tkanki skórnej i utratę jej integralności. Obejmuje ona współdziałanie układu odpornościowego, tkanki łącznej, komórek epitelialnych i systemu naczyniowego. Procesy związane z gojeniem ran regulowane przez cytokiny i czynniki wzrostu przebiegają w obrębie substancji międzykomórkowej.

Wiele czynników ma wpływ na przebieg gojenia, ale najistotniejszym z nich jest zamknięcie rany. Czyste pod względem bakteriologicznym rany cięte goją się szybko, natomiast rany, w których stwierdza się florę bakteryjną i rany z ubytkiem tkanki nie zamykają się łatwo. Rany chroniczne (owrzodzenia) zwykle nie są zamknięte i stale narażone są na wpływ czynników zewnętrznych. Możliwość hodowli *in vitro* komórek skóry sprawiła, że w ostatnich latach opracowano metody wytwarzania substytutów skóry ludzkiej [33, 4]. Wykorzystywane są one do przeszczepów w przypadku rozległych ran oparzeniowych, gdy obszar uszkodzonej powierzchni jest zbyt duży, aby doszło do spontanicznego zagojenia się rany lub zastosowanie autoprzeszczepów z nieuszkodzonej powierzchni ciała. Również, gdy rana jest głęboka i zniszczony jest nie tylko naskórek, ale także mieszki włosowe i gruczoły łojowe z keratynocytami zdolnymi do odtwarzania naskórka, konieczne jest dostarczenie do rany nowych komórek. Zanim jednak pojawiły się takie możliwości stosowano metody konwencjonalne, które do dziś są najczęściej stosowaną metodą leczenia ubytków skórnych.

METODY LECZENIA UBYTKÓW SKÓRNYCH

Historia leczenia oparzeń i zamykania ran z wykorzystaniem skóry jako opatrunku sięga początków XIX wieku. Pierwsze próby miały charakter eksperymentów i kończyły się niepowodzeniami, dały jednak początek poszukiwaniom skutecznych metod zamykania ran oparzeniowych i troficznym (tab. 1).

TABELA 1. Pierwsze próby przeszczepiania skóry

Rok	Autor	
1803	Baronio	jako pierwszy stwierdził, że skóra może być przeszczepiona z jednej części ciała na inną (badania na owcy)
1869	Reverdin	dokonał pierwszego autoprzeszczepu naskórka u człowieka
1871	Pollock	wykonał pierwszy alloprzeszczep kawałków swojej skóry zmieszanych z kawałkami skóry oparzonego pacjenta
1881	Girdner	dużą ranę oparzeniową opatrzył skórą pobraną ze zwłok; opisał odrzucenie tego przeszczepu

W XX wieku zaczęto wykonywać przeszczepy allograftów, tj. tkanek innych osobników tego samego gatunku (nazywanych także homograftami lub izograftami). Opisywano początkowe przyjmowanie się przeszczepu, a później jego stopniowe odrzucanie przez organizm biorcy. Allografty zostały wprowadzone jako rutynowe postępowanie w leczeniu oparzeń w latach pięćdziesiątych jako czasowe opatrunki. Były także używane do pokrywania siatkowych autoprzeszczepów. W Chinach z powodzeniem stosowano metodę pokrywania ran oparzeniowych płatami allograftów, pod którymi umieszczano małe kawałki autoprzeszczepów, których rozrost wypierał z czasem odrzucały allograft. Poważnym ograniczeniem stosowania allograftów było i jest nie tylko odrzucanie przeszczepu, ale i możliwość przenoszenia chorób wirusowych od dawcy.

Pośredniej grubości autoprzeszczepy siatkowe są wciąż najczęściej stosowaną, konwencjonalną metodą gojenia ran. Istnieje jednak wiele ograniczeń jej stosowania. Najczęściej wynikają one z braku miejsc, z których można pobrać skórę do przeszczepu (tzw. miejsc donorowych). Niewątpliwą wadą tej metody, mniej istotną wprawdzie z punktu widzenia ratowania życia oparzonego pacjenta, są blizny pozostające w miejscach donorowych (tab. 2). W przypadku oparzeń głębokich obejmujących ponad 60% całkowitej powierzchni ciała brakuje zdrowej skóry, aby wykonać autoprzeszczep. Dodatkowo potrzebna jest skóra do zrekonstruowania ubytków, przykurczów i częstych zniekształceń powierzchni ciała.

W leczeniu chronicznych ran, troficznych owrzodzeń, które najczęściej wynikają z braku prawidłowego ukrwienia kończyn, można stosować autoprzeszczepy. Dostępność miejsc donorowych nie jest w tych przypadkach czynnikiem ograniczającym wykorzystanie autoprzeszczepów. Bardzo istotny jest natomiast ogólny stan pacjenta, ponieważ istnieje duże ryzyko, że nie zagoją się miejsca pobrania skóry do przeszczepu.

Odkąd Green i in. w 1975 r. odnieśli sukces w hodowli keratynocytów i otrzymali wielowarstwowy płat naskórka przeszczepiając go po raz pierwszy w 1979 r., a O'Conner i Gallico w latach 1981 i 1984 jako pierwsi przeszczepili wyhodowany naskórek pacjentom, rozpoczęto intensywne badania nad udoskonaleniem metod hodowli naskórka i skóry *in vitro* [37, 30, 29]. Obecnie hodowany naskórek jest dostępny komercyjnie w USA [38]. Przeszczepy naskórków hodowanych *in vitro* dawały i dają dobre rezultaty w leczeniu oparzeń sięgających 60% powierzchni ciała.

Dr Carolyn Campton z Bostonu, w swoich 5-letnich badaniach histologicznych przeszczepionego hodowanego naskórka wykazała, że hodowany naskórek ostatecznie różnicuje i w wyniku *remodelingu* staje się normalnym naskórkiem z błoną podstawną. Ponadto stymuluje prawidłową rekonstrukcję skóry właściwej. Jednakże bardzo mała grubość hodowanego naskórka powoduje ściąganie rany nim pokrytej i co się z tym wiąże, niezadowalający efekt kosmetyczny [7, 17, 48].

DOŚWIADCZENIA WŁASNE Z HODOWANYMI KERATYNOCYTAMI

Badania własne prowadzone we współpracy z dr Cieślikiem, ordynatorem Oddziału Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej WSS im. L. Rydygiera wykorzystujące metodę leczenia troficznych owrzodzeń podudzi z użyciem hodowanych *in vitro* autologicznych keratynocytów wykazały, że znacznie szybciej goją się rany pokrywane zawiesiną komórek w fibrynowym kleju fizjologicznym niż płatem naskórka. Wyniki badań własnych potwierdzają korzyści wynikające z zastosowania metody autoprzeszczepu keratynocytów hodowanych *in vitro* [10].

Metoda ta pozwala uzyskać natychmiast po pokryciu rany hodowanymi keratynocytami zniesienie bólu i zmniejszenie się wydzieliny z rany. Po przypadkowym uszkodzeniu powierzchni z powstałym *de novo* naskórkiem w czasie zmiany opatrunku następowała szybka odnowa naskóra od brzegów i dna rany. Zaobserwowano lepsze wyniki terapeutyczne przy zastosowaniu mieszaniny hodowanych keratynocytów i kleju fibrynowego w porównaniu z przeszczepami uwarstwionymi. Klej zapewnia bardzo dobrą przyczepność komórek do podłoża, co pozwala uniknąć uszkodzeń autoprzeszczepu w trakcie kolejnych zmian opatrunku.

ZALETY I WADY STOSOWANYCH AUTO- I ALLOGRAFTÓW

Zaletą hodowanych do przeszczepu własnych komórek pacjenta jest zdolność do szybkiego wzrostu, trwałe zabezpieczenie rany, bezpieczeństwo oraz udokumentowana, długotrwała skuteczność ich stosowania [14, 23]. Jednakże poważną wadą jest długi okres (ok. 3–4 tyg.) oczekiwania na przygotowanie hodowli do przeszczepu (tab. 2).

Autologiczne keratynocyty są bardzo delikatne, podatne na infekcje bakteryjne i uszkodzenia mechaniczne. Regeneracja tkanki łącznej pod nałożonym autoprzeszczepem naskórka trwa miesiące, a nawet lata. Hodowane do przeszczepu komórki od innego osobnika tzw. allografty (pierwszy raz użyte w 1983 r.) mają liczne zalety [9, 16, 24, 25]. Nie ma konieczności oczekiwania na przeszczep, nie stwierdzono odrzucania alloprzeszczepu. Pierwotnie uważano, że allogeniczne keratynocyty stanowią przeszczep permanentny (wiadomo, że komórki Langerhansa, uważane za krytyczne w odrzucaniu przeszczepu są eliminowane po 7 dniach trwania hodowli). Postulowano, że usunięcie tych komórek może prowadzić do trwałej tolerancji immunologicznej. Obecnie wiadomo, że hodowane komórki innego osobnika nie stanowią trwałego przeszczepu. Wiele badań z użyciem technik genetycznych wykazało, że allogeniczne keratynocyty zastępowane są z czasem własnymi. Alloprzeszczepy keratynocytów są zatem czasowym opatrunkiem, stymulującym gojenie

TABELA 2. Zalety i wady biologicznych substytutów skóry

Rodzaj substytutu	Zalety	Wady	Litera tura
Pośredniej grubości przeszczep autologiczny	natychniastowa dostępność trwałe pokrycie rany	bolesne miejsce pobrania przeszczepu ograniczona dostępność	[51, 52]
Allografty ze włók	natychniastowa dostępność	odrzućcie przeniesienia zakażenia	[41]
Hodowane autologiczne keratynocyty	pokrycie dużego obszaru z małej biopsji trwałe pokrycie rany akceptowalne efekty kosmetyczne	3-tygod. okres oczekiwania na wyhodowany przeszczep b. delikatny, podatny na zakażenia bakteryjne i mechaniczne uszkodzenie długotrwały proces odtworzenia skóry właściwej	[37, 44, 46]
Hodowane allogeniczne keratynocyty	natychniastowa dostępność przyspieszenie gojenia ran pośredniej głębokości	odrzućcie przeszczepu możliwe przeniesienie zakażenia brak skuteczności w leczeniu ran głębokich	[47, 12, 21]
GRAFTSKIN – żel kolagenowy z fibroblastami i keratynocytami	łatwy w użyciu dobre czasowe zabezpieczenie rany	podatność na trawienie enzymatyczne	[15]
GAG + kolagen zasiedlony fibroblastami	łatwy w użyciu	podatność na trawienie enzymatyczne i liżę bakteryjną ograniczona powierzchnia	[56, 57]
INTEGRA – kolagen błękitny + siarczan chondroitynu + zlamonowana błona silikonowa	łatwy w użyciu natychniastowa dostępność zadawalające efekty kosmetyczne	konieczny przeszczep skóry pośredniej grubości	[56, 57]
DERMAGRAFT - fibroblasty w bioresorbowalnej siatce (produkt bezkomórkowy)	łatwy w użyciu natychniastowa dostępność dostępny komercyjnie	konieczny przeszczep naskórka	
TRANSCYTE (ekwiwalent skóry właściwej z żywymi fibroblastami)	łatwy w użyciu skuteczny opatrunek dostarczający cytokiny do rany dostępny komercyjnie	konieczny przeszczep naskórka	
APLIGRAF (GRAFTSKIN)	łatwy w użyciu – całkowicie odtworzona skóra pełnej grubości z żywymi składnikami komórkowymi – dostępny komercyjnie	mała powierzchnia jednostkowych substytutów	[34, 54]

się ran od brzegów i resztek przydatków skórnych, szczególnie gdy obecna jest skóra właściwa. Keratynocyty produkują wiele czynników wzrostu w tym Il-1,3,6,8, TNF- α , bFGF, PDGF, TGF α i TGF β , a także składniki substancji zewnątrzkomórkowej (m.in. kwas hialuronowy). Wszystkie te czynniki stymulują gojenie się ran, pobudzając śródbłonek naczyń i reepitelializację [30, 35].

Wykazano również, że zliofilizowane keratynocyty podane na ranę działają mitogenicznie, a nałożenie ich na ranę stymuluje jej gojenie [11]. Zanim wyjaśnione zostały podstawy immunologii transplantacyjnej, wszelkie próby wykorzystania alloprzeszczepów i ksenoprzeszczepów kończyły się niepowodzeniem. Allografty są odrzucane po 2–3 tygodniach od wykonania przeszczepu z powodu braku immunokompatybilności. W roku 1944 Medewar jako pierwszy zaobserwował, że allogeniczna skóra właściwa pozbawiona naskórka była mniej immunoreaktywna niż składnik epidermalny. Wykorzystano ten fakt w rekonstrukcji skóry z allogenicznej skóry właściwej i autologicznych komórek naskórka [27]. W trakcie namnażania allogenicznych komórek naskórka w kolejnych pasażach usuwa się komórki Langerhansa, których obecność wiąże się z silną immunogennością przeszczepu. Liczne próby kliniczne wykazały, że hodowane allogeniczne komórki naskórka użyte jako przeszczep nie były odrzucane przez organizm biorcy [1, 2, 16]. Trudno jest w sposób przekonywujący udowodnić trwałość i skuteczność takich przeszczepów, ponieważ rany ulegają autoepitelializacji od brzegów lub z pozostałych szczątków skóry własnej w obrębie rany. Badania wykazały, że naskórek allogeniczny ostatecznie jest zastępowany własnym. Nie ulega jednak wątpliwości, że allogenne komórki naskórka i ich ekstrakty stymulują epitelializację ran dzięki produkowanym przez nie czynnikom wzrostowym [31, 40].

ZŁOŻONE SUBSTYTUTY SKÓRNE

Wady hodowanych naskórków doprowadziły do skonstruowania bardziej złożonych substytutów skórnych składających się z warstwy będącej odpowiednikiem skóry właściwej oraz warstwy naskórka [22, 36]. Stało się to możliwe dzięki doświadczeniom i obserwacjom przeprowadzonym wcześniej przez Eugenea Bella, który w latach sześćdziesiątych stwierdził, że fibroblasty mogą migrować do żelu kolagenowego, a w 1981 r. wykazał, że na warstwie fibroblastów da się hodować keratynocyty oraz badaniom Hawarda Greena, którego dziełem jest opracowanie metody hodowania fragmentów naskórka na potrzeby ofiar oparzeń. Podjęto zatem badania nad stworzeniem ekwiwalentu skóry przez połączenie hodowanego naskórka z substytutem skóry właściwej, w celu poprawienia „wgajania” naskórka, stabilności naskórka we wczesnych etapach leczenia, funkcjonalności i ostatecznego efektu kosmetycznego.

W wielu pracowniach na świecie wprowadza się do leczenia ekwiwalent skóry właściwej. Początkowo izolowano skórę właściwą ze skóry pobranej ze zwłok

i pokrywano nią ranę. Na taki alloprzeszczep nakładano hodowany autogeny naskórek.

Metoda była bardzo zadowalająca do czasu, kiedy z powodu użycia alloprzeszczepu doszło do zakażenia wirusowego. Obecnie pracuje się nad uzyskaniem optymalnego biopolimeru zastępującego skórę właściwą [53].

Johan Burke i Ioannis Yannas [5, 54, 55] z *Massachusetts Institute of Technology* skonstruowali prowizoryczne substytuty skóry składające się z porowatego, fibrylarnego rusztowania kolagenowego i siarczanu chondroityny, pokryte elastycznym, silikonowym płatem. Macierz zasiedlona była fibroblastami autologicznymi, a kilka tygodni po przeszczepieniu ekwiwalentu zewnętrzna warstwa silikonowa była usuwana i zastępowana autologicznym przeszczepem siatkowym pośredniej grubości. Substytuty te stosowane u ciężko oparzonych wstrzymywały utratę wody i pobudzały regenerację skóry.

Matsuda [26] zmodyfikował technikę Yannasa wprowadzając pod syntetyczny naskórek mikrosfery (kapsułki z kwasu poli L- mlekowego) zawierające antybiotyki.

Nieco później pojawiła się nowa propozycja przygotowania przeszczepu skóry tzw. *skin culture sandwich* – opracowana w 1989 r. (Hansborough), w którym składnik epidermalny (hodowane keratynocyty) i składnik dermalny (kolagen-glikozaminoglikan z autologicznymi fibroblastami) przygotowano *in vitro* i przeniesiono jako jednostkę na ranę. Te złożone przeszczepy łatwiej wgajały się do rany niż płaty naskórka i przyjmowały się w 50–100% [8]. Żel kolagenowy z fibroblastami pokryty komórkami epitelialnymi wydawał się być bardzo obiecujący we wstępnych badaniach, ale wyniki kliniczne były wysoce niezadowalające [20] (tab. 2).

Dalszy postęp zawdzięczamy Hansbrough i Boyce [15], którzy zrekonstruowali złożony ekwiwalent skóry. Wyhodowali autologiczne keratynocyty na podłożu kolagenowo-glikozaminoglikanowym, na które wcześniej wysiano autologiczne fibroblasty.

Inne wytworzone i testowane w klinice ekwiwalenty skóry właściwej to: kolagen – GAG z chitosanem jako rusztowanie dla naskórka [46], gąbki z hialuronianu [19], gąbki z poliuretanu [41], tlenku polietylenu, poliglikolu, kwasu mlekowego, a na nich naskórek.

Biodegradowalne ekwiwalenty skóry właściwej działają czasowo i są zastępowane przez formującą się *de novo* skórę właściwą (*neodermis*). Kiedy ekwiwalent skóry właściwej ulegnie waskularyzacji i dostępna jest już skóra do przeszczepu, usuwa się syntetyczną warstwę naskórka i na ukrwiony substytut nakłada się autologiczny przeszczep.

Ostatnie lata przyniosły dostępne już na rynku pierwsze produkty inżynierii tkankowej stosowane w klinice. W 1997 został zatwierdzony przez FDA „TRANSCYTE” [(Advanced Tissue Sciences, La Jolla, California), bezkomórkowy materiał osłaniający rany oparzeniowe 2 i 3 stopnia. Powstaje on w zamkniętych sterylnych układach z polimerami stanowiącymi rusztowanie dla rosnących komórek. Warunki

hodowli przypominają naturalne otoczenie komórek w organizmie – komórki dzielą się i wytwarzają czynniki wzrostu, kolagen i inne białka – powstaje funkcjonalna warstwa skóry właściwej. Później zamraża się cały substytut i do użycia podawany jest produkt bezkomórkowy. W 1998 zatwierdzono „DERMAGRAFT” (*Advanced Tissue Sciences*, La Jolla, California) jako środek do leczenia troficznych owrzodzeń.

Różni się on od TRANSCYTE tym, że pozostaje żywą tkanką po rozmrożeniu – może być zatem użyty w leczeniu troficznych owrzodzeń, ran powstałych na tle cukrzycy (przedwcześnie starzejące się komórki nie są zdolne do wytwarzania odpowiednich ilości białek substancji międzykomórkowej), odleżyn. Rany takie wymagają czynników wzrostu i innych białek wytwarzanych przez żywą tkankę w procesie gojenia. Aby ułatwić transport i magazynowanie, dermagraft jest również zamrażany w taki sposób, że po odmrożeniu ponad 50% komórek jest żywych (kriokonserwacja).

ŻYWY SUBSTYTUT SKÓRY

Wszystkie wyżej opisane doświadczenia i próby wytworzenia ekwiwalentu skóry (tab. 2) doprowadziły ostatecznie do konstrukcji żywego substytutu pełnej grubości skóry (LSE – ang. *living skin equivalent*). W 1998 został zatwierdzony „APLIGRAF” (Organogenesis, Inc., Canton, Massachusetts). Jest to pierwsza ludzka sztuczna skóra, świeży produkt o okresie trwałości 5 dni w temp. pokojowej. W przeciwieństwie do hodowli komórkowych, gdzie celem jest osiągnięcie szybkiej proliferacji komórek, w hodowlach organotypowych kluczem do osiągnięcia sukcesu jest ograniczanie proliferacji i zachowanie żywotności komórek. LSE jest produkowany jako jednostkowy produkt w odpowiednich naczyniach hodowlanych z wkładkami [52]. Kształt i rozmiar jednostki jest określony przez rozmiar i kształt wkładki (200 cm² – prostokąt, 44 i 2 cm² – kółka). Wytwarzanie LSE przebiega w kilku etapach. Najpierw wykonuje się odlew bydlęcego kolagenu I z 10-krotnie stężonym koncentratem pożywki hodowlanej w naczyniu ze studzienką z błoną polikarbonylową z 3 μm porami. Po żelifikacji tej warstwy nakładą się na nią podobną mieszaninę zawierającą 30 tysięcy ludzkich fibroblastów na cm³ w objętości trzykrotnie większej niż pierwsza warstwa. Warstwy łączą się ze sobą po żelifikacji. Cały proces przebiega w medium hodowlanym, w temperaturze 37°C i w obecności 5% CO₂. Fibroblasty powodują obkurczanie i kondensację kolagenu, w wyniku czego w ciągu 6 dni tworzy się fibrylarna, symulująca tkankę łączną dermalna sieć. Po tym czasie medium hodowlane jest usuwane w celu ekspozycji powierzchni substytutu skóry właściwej, na którą nakłada się zawieszinę hodowanych, seryjnie pasażowanych keratynocytów w początkowej gęstości 100 tysięcy komórek /cm². Cała konstrukcja jest następnie zanurzana w medium, aby komórki mogły się rozpląszczyć i pokryć powierzchnię dermis w ciągu ok. 4 dni inkubacji. Po tym czasie zmienia się stężenie jonów wapnia w pożywce z 0,08 mM do 1,8 mM i usuwa się epidermalny czynnik wzrostu.

Rozwijający się dwuwarstwowy LSE jest następnie inkubowany na granicy faz i medium jest zmieniane na pożywkę MSBM (ang. *Minimally Supplemented Basal Medium*) z 2% bydlęcej surowicy płodowej, przeznaczoną do różnicowania i stratyfikacji warstwy epidermalnej i umożliwiającą długoterminowe utrzymanie fibroblastów. Po 7–10 dniach inkubacji na granicy faz (17–20 dni *in vitro*) LSE jest przygotowany do użycia klinicznego.

Hodowane komórki wykorzystywane w praktyce klinicznej muszą być poddane dokładnemu badaniu na obecność patogenów i tumorogenność. Ponieważ jest to kosztowny, czasochłonny proces, hodowla komórek z jednego, znanego źródła jest bezpieczna i stanowi najbardziej efektywną drogę produkcji dużej ilości materiału do użytku klinicznego. Dermalne fibroblasty i naskórkowe keratynocyty pochodzą zwykle z napełtków noworodkowych.

Skóra z napełtka jest wielokrotnie przepłukiwana w soli fizjologicznej w obecności 50 µg/mL gentamycyny i 250 µg/mL amfoterycyny B. Tkanka jest następnie powierzchniowo odkażana przez 1-minutowe przepłukiwanie w 95% etanolu i przeniesiona do PBS. Oczyszcza się następnie skórę z tkanki podskórnej, a 1/4 napełtka traktuje się mieszaniną trypsyny (1,2 mg/mL) i kolagenazy (5 mg/mL). Otrzymaną zawiesinę komórek umieszcza się w naczyniach hodowlanych z pożywką DMEM10 NBCS w celu uzyskania pierwotnej hodowli fibroblastów. Pozostałe 3/4 tkanki rozdrabnia się mechanicznie na 1–2 mm² kawałki i nakłada się do naczyń wieloślodkowych pokrytych kolagenem w celu uzyskania pierwotnej hodowli keratynocytów. Kiedy uzyska się w hodowli pierwotnej keratynocyty i fibroblasty, pasażuje się je i hoduje w odpowiednio zdefiniowanych pożywkach hodowlanych.

Z kolei namnożone komórki bankuje się – fibroblasty zwykle po 5–6 pasażu, keratynocyty po 3 pasażu.

Reaktywność immunologiczna

Żywy ekwiwalent skóry ma dwie główne komponenty, które potencjalnie mogą wywoływać reakcję immunologiczną: komórki i kolagen. Jednakże komórki układu immunologicznego naskórka (komórki Langerhansa) są eliminowane podczas serii pasażów keratynocytów w mediach zdefiniowanych tylko dla keratynocytów. Komórki są wcześniej testowane *in vitro* na zdolność wywoływania odpowiedzi komórkowej. Oba typy komórek traktowane interferonem gamma w celu ekspresji antygenów zgodności tkankowej II nie wykazują odpowiedzi immunologicznej w reakcji mieszanych limfocytów (ang. *mixed lymphocyte reaction*). Kolagen testowano na małej grupie wolontariuszy, którym wstrzykiwano 1 mg dawki kolagenu. Nie stwierdzono wczesnej i późnej reakcji immunologicznej, a także reakcji komórkowej na kolagen.

Tworzenie żywego ekwiwalentu skóry (LSE) to złożony proces, w którym można kontrolować rozmiar przygotowanego substytutu, utrzymywana jest polarność

warstw, a materiał, z którego powstaje LSE, jest łatwo dostępny i produkt może być dostarczony do klinik bez uszkodzeń.

PODSUMOWANIE

Wytwarzane *in vitro* żywe substytuty skóry są stosowane w nielicznych ośrodkach klinicznych na świecie, mimo że w toku wieloletnich udoskonaleń okazały się skutecznym środkiem leczniczym w gojeniu ran, nierzadko ratującym życie. Niewątpliwym utrudnieniem w ich stosowaniu są koszty produkcji. Obok zastosowań klinicznych rekonstruowana skóra znajduje również wykorzystanie w badaniach podstawowych np. do badania procesów reepitelializacji, czynników wpływających na efektywność wgajania się przeszczepów, toksyczności rozmaitych substancji, a także reakcji immunologicznych po przeszczepie tkanki [13, 21, 28, 32, 51].

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARÁMBULA H, SIERRA-MARTÍNEZ E, GONZÁLEZ-AGUIRRE NE, RODRÍGUEZ-PÉREZ A, JUAREZ-AGUILAR E, MARSCH-MORENO M, KURI-HARCUCH W. Frozen human epidermal allogeneic cultures promote rapid healing of facial dermabrasion wounds. *Dermatol Surg* 1999; **25**: 708–712.
- [2] BEELE H, NAEYAERT JM, GOETEYN M, De MIL M, KINT A. Repeated cultured epidermal allografts in the treatment of chronic leg ulcers of various origins. *Dermatologica* 1991; **183**: 31–35.
- [3] BERTHOD F, ROUABHIA M. Exhaustive review of clinical alternatives for damaged skin replacement. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 23–45.
- [4] BOYCE ST. Cultured skin for wound closure. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 75–102.
- [5] BURKE JF. Observations on the development and clinical use of artificial skin – an attempt to employ regeneration rather than scar formation in wound healing. *Jpn J Surg* 1987; **17**: 431–438.
- [6] CHOUINARD N, LEBLANC R, ROUABHIA M. *In vitro* engineered human skin substitutes for UVB harmful effect assessment. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 153–175.
- [7] COMPTON CC. Cultured epithelial autografts for burn wound resurfacing: review of observations from an 11-year biopsy study. *Wounds* 1996; **8**: 125–133.
- [8] COMPTON CC, HICKERSON W, NADIRE K, PRESS W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil* 1993; **14**: 653–662.
- [9] CONY M, DONATIEN PH, BEYLOT C, GÉNIAUX M, MALEVILLE J, BÉZIAN JH, TAĐEB A. Treatment of leg ulcers with an allogeneic cultured-keratinocyte-collagen dressing. *Clinic Exp Dermatol* 1990; **15**: 410–414.
- [10] CIEŚLIK K, DRUKAŁA J, ŻABIŃSKA E, KOROHODA W. Zastosowanie hodowanych *in vitro* keratynocytów w leczeniu trudno gojących się ran podudzia. *Przegląd Dermatologiczny* 1998; **5**: 353–359.

- [11] DUINSLAEGER L, VERBECEN G, REPER P, DELAEY B, VANHALLE S, VANDERKELEN A. Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin autograft-covered burn wounds with efficiency similar to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. *Plast Reconstr Surg* 1996; **98**: 110–117.
- [12] EAGLSTEIN WH, IRIONDO M, LASZLO K. A composite skin substitute (Graftskin) for surgical wounds. *Dermatol Surg* 1995; **21**: 839–843.
- [13] GARLICK JA, TAICHMAN LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 1994; **70**: 916–924.
- [14] GOBET R, RAGHUNATH M, ALTERMATT S, MEULI-SIMMEN C, BENATHAN M, DIETL A, MEULI M. Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery. *Surgery* 1997; **121**: 654–661.
- [15] HANSBROUGH JF, MORGAN J, GREENLEAF G, PARIKH M, NOLTE C, WILKINS L. Evaluation of Graftskin* composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil* 1994; **15**: 346–353.
- [16] HARVIMA IT, VIRNES S, KAUPPINEN L, HUTTUNEN M, KIVINEN P, NISKANEN L, HORSMANHEIMO M. Cultured allogeneic skin cells are effective in the treatment of chronic diabetic leg and foot ulcers. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1999; **79**: 217–220.
- [17] HICKERSON WL, COMPTON C, FLETCHALL S, SMITH LR. Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. *Burns* 1994; **20**: S52–S56.
- [18] HUNT TK, HOPF HW. Wound healing and wound infection. *Wound Healing* 1997; **77**: 587–606.
- [19] KAGEYAMA H, KUROYANAGI Y. Pre-clinical experiment of hyaluronic acid spongy sheet: the effect of a synthetic antithrombin agent. *Wounds* 1995; **7**: 220–227.
- [20] KUROYANAGI Y, KENMOCHI M, ISHIHARA S, TAKEDA A, SHIRAIISHI A, OOTAKE N, UHINUMA E, TORIKAI K, SHIOYA N. A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials. *Ann Plast Surg* 1993; **31**: 340–351.
- [21] KUROYANAGI Y, SHIRAIISHI A, TANAKA M, KAGEYAMA H, OOTAKE N, SHIOYA N. Cytotoxicity tests for antimicrobial agents using cultured skin substitutes fixed at interface of air and culture medium. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1996; **7**: 1005–1015.
- [22] LANGDON RC, CUONO CB, BIRCHALL N, MADRIJA, KUKLINSKA E, MCGUIRE J, MOELLMANN GE. Reconstruction of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogeneic dermis and autologous cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988; **91**: 478–485.
- [23] LIMAT A, MAURI D, HUNZIKER T. Successful treatment of chronic ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer sheath cells. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 128–135.
- [24] LINDGREN C, MARCUSSON JA, TOFTGLRD R. Treatment of venous leg ulcers with cryopreserved cultured allogeneic keratinocytes: a prospective open controlled study. *Br J Surg* 1998; **139**: 271–275.
- [25] ŁAWNICZEK T, BOGDANOWSKI T, BIAŁAS B, WYGŁĘDOWSKA-KANIA M, PALEŃ P, TUSTANOWSKI J. Allogeniczne keratynocyty z hodowli – próba zastosowania w owrzodzeniach żyłakowych podudzi. *Przegląd Dermatologiczny* 1995; **4**: 298–302.
- [26] MATSUDA K, SUZUKI S, ISSHIKI N, YOSHIOKA K, WADA R, HYON SH, IKADA Y. Evaluation of a bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic. *Biomaterials* 1992; **13**: 119–122.
- [27] McKAY I, WOODWARD B, WOOD K, NAVSARIA HA, HOEKSTRA H, GREEN C. Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns* 1994; **20**: S19–S22.

- [28] MONTEIRO-RIVIERE NA, INMAN AO, SNIDER TH, BLANK JA, HOBSON DW. Comparison of an *in vitro* skin model to normal human skin for dermatological research. *Microsc Res Tech* 1997; **37**: 172–179.
- [29] MYERS S, NAVSARIA H, SANDERS R, GREEN C, LEIGH I. Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. *Am J Surg* 1995; **170**: 75–83.
- [30] NAVSARIA HA, MYERS SR, LEIGH IM, McKAY IA. Culturing skin *in vitro* for wound therapy. *Trends in Biotechnology* 1995; **13**: 91–100.
- [31] NUÑEZ-GUTIÉRREZ H, CASTRO-MUÑOZLEDO F, KURI-HARCUCH W. Combined use of allograft and autograft epidermal cultures in therapy of burns. *Plast Reconstr Surg* 1996; **98**: 929–939.
- [32] PARENTEAU N, SABOLINSKI M, PROSKY S, NOLTE C, OLESON M, KRIWET K, BILBO P. Biological and physical factors influencing the successful engraftment of a cultured human skin substitute. *Biotechnol Bioeng* 1996; **52**: 3–14.
- [33] PARENTEAU NL, BILBO P, NOLTE CJM, VALERIE S, ROSENBERG M, ROSENBERG M. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 1992; **9**: 163–171.
- [34] PELLEGRINI G, BONDANZA S, GUERRA L, De LUCA M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**: 778–790.
- [35] PHILLIPS TJ. Cultured epidermal allografts – a temporary or permanent solution? *Transplantation* 1991; **51**: 937–941.
- [36] PHILLIPS TJ. Biologic Skin Substitutes. *J Dermatol Surg Oncol* 1993; **19**: 794–800.
- [37] PHILLIPS TJ. Keratinocyte Grafts for Wound Healing. *Clin Dermatol* 1994; **12**: 171–181.
- [38] PHILLIPS TJ. New Skin for Old. Developments in Biological Skin Substitutes. *Arch Dermatol* 1998; **134**: 344–349.
- [39] PHILLIPS TJ, GILCHREST BA. Clinical Applications of Cultured Epithelium. *Epith Cell Biol* 1992; **1**: 39–46.
- [40] REGAUER S, COMPTON CC. Cultured keratinocyte sheets enhance spontaneous re-epithelialization in a dermal explant model of partial-thickness wound healing. *J Invest Dermatol* 1990; **95**: 341–346.
- [41] RENNEKAMPFF HO, HANSBROUGH JF, KIESSING V, ABIEZZI S, WOODS VJ. Wound closure with human keratinocytes cultured on a polyurethane dressing overlaid on a cultured human dermal replacement. *Surgery* 1996; **120**: 16–22.
- [42] ROUABHIA M. *In vitro* production and transplantation of immunologically active skin equivalents. *Lab Invest* 1996; **75**: 503–517.
- [43] ROUABHIA M. Structural and functional complexity of the skin. [w] Rouabhia M [red.] . Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bioscience 1997: 3–22.
- [44] ROUABHIA M, GERMAIN L, AUGER FA. Cultured epithelium for skin trauma treatment: clinical and experimental studies. *Transplant P* 1993; **25**: 2348–2349.
- [45] SABOLINSKI ML, ALVAREZ O, AULETTA M, MULDER G, PARENTEAU NL. Cultured skin as a smart material for venous ulcers. *Biomaterials* 1996; **17**: 311–320.
- [46] SAINTIGNY G, BONNARD M, DAMOUR O, COLLOMBEL C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effects of fibroblasts. *Acta Derm-Venerol* 1993; **73**: 175–180.
- [47] SEAH CS. Skin graft and skin equivalent in burns. *Ann Acad Med* 1992; **21**: 685–688.
- [48] SIWY BK, COMPTON CC. Cultured epidermis: Indiana University Medical Centers experience. *J Burn Care Rehabil* 1992; **13**: 130–137.
- [49] SPENCE RJ, WONG L. The enhancement of wound healing with human skin allograft. *Wound Healing* 1997; **77**: 731–745.

- [50] STARK GB, KAISER HW. Cologne Burn Centre experience with glycerol-preserved allogeneic skin: Part II: Combination with autologous cultured keratinocytes. *Burns* 1994; **20**: S34–S38.
- [51] STRANDE LF, FOLEY ST, DOOLIN EJ, HEWITT CW. *In vitro* bioartificial skin culture model of tissue rejection and inflammatory/immune mechanism. *Transplant P* 1997; **29**: 2118–2119.
- [52] WILKINS LM, WATSON SR, PROSKY SJ, MEUNIER SF, PARENTEAU NL. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol Bioeng* 1994; **43**: 747–756.
- [53] WOLLINA U, KNÖLL B, PRÜK, BARTH A, MÜLLER D, HUSCHENBECK J. Synthetic wound dressings – evaluation of interactions with epithelial and dermal cells *in vitro*. *Skin Pharmacol* 1996; **9**: 35–42.
- [54] YANNAS IV, BURKE JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 65–81.
- [55] YANNAS IV, BURKE JF, GORDON PL, RUBENSTEIN RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 107–131.

31-120 Kraków, al. Mickiewicza 3

e-mail: Justyna@mol.uj.edu.pl

EGF-PODOBNE CZYNNIKI WZROSTOWE I ICH UDZIAŁ W PROCESACH REGENERACJI NASKÓRKA

EGF-LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR CONTRIBUTION IN EPIDERMIS REGENERATION

Andrzej KLEIN*, Anna SIŃCZAK, Aleksandra JUREK

*Zakład Biochemii Ogólnej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Jednym z ważniejszych obszarów działania czynników wzrostowych zaliczanych do rodziny EGF jest regulacja wzrostu i różnicowania komórek naskórka i nabłonka. Wzajemne oddziaływanie EGF-podobnych polipeptydów oraz ich receptorów (ErbB) są przedmiotem ogromnej liczby prac, opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu. Jednak nawet najnowsze doniesienia nie rozstrzygają ostatecznie, które czynniki EGF-podobne są istotne fizjologicznie oraz jaki jest mechanizm regulacji wzrostu, różnicowania i programowanej śmierci keratynocytów. Przedmiotem artykułu są wybrane zagadnienia dotyczące struktury ssaczych EGF-podobnych czynników wzrostowych, receptorów ErbB oraz ich współdziałania w stymulacji prawidłowego i patologicznego wzrostu komórek naskórka. (*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 111–133*)

Słowa kluczowe: epidermalne czynniki wzrostowe, regeneracja naskórka

Summary: One of important activity areas of EGF growth factors activity is epidermal and epithelial cells differentiation and growth regulation. In recent ten years, there is a great deal of publications related to EGF-like polypeptides and their participation in specific receptors (ErbB) activation. Little, however, is known about physiological regulation of keratinocytes growth, differentiation and apoptosis by EGF-like peptides. Basic informations concerning structure and function of mammalian EGF-like growth factors, ErbB receptors and their cooperation in normal and pathological growth of epidermal cells are described. (*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 111–133*)

Key words: epidermal growth factors, epidermis regeneration

Stosowane skróty: **AR** – amfiregulina, **BTC** – beta cellulina, **cdk** – kinaza cyklino-zależna, **Cip** – białko oddziałujące z cdk, **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy, **ER** – epiregulina, **ErbB** – komórkowy homolog białka transformującego ptasiej erytroblastoma, **ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo, **FGF** – fibroblastyczny czynnik wzrostowy, **GDS** – stymulator dysocjacji (nukleotydów) guanylowych, **Grb** – białko wiążące receptor (czynnika) wzrostu, **GRF** – czynnik wymiany (nukleotydów) guanylowych, **HB-EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy wiążący się z heparyną, **HGF** – czynnik

wzrostowy hepatocytów, **HGR/NGR** – heregulina/neuregulina, **IGF** – insulino-podobny czynnik wzrostowy, **INK** – inhibitor kinazy (cyklino-zależnej), **KGF** – czynnik wzrostowy keratynocytów, **Kip** – białko hamujące kinazę (cyklino-zależną), **MAP** – białko aktywowane mitogenem, **MAPK** – kinaza MAP, **MEK** – kinaza MAPK/ERK, **MHC** – główny układ zgodności tkankowej, **MMP** – metaloproteazy matryksu, **mSOS** (ang. *son of sevenless*) – myszy homolog drożdżowego czynnika wymiany nukleotydów, **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostowy, **PI3K** – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, **PKB** – kinaza białkowa B, **pRb** – białko retinoblastomy, **PTB** – domena wiążąca fosfotyrozynę, **Ras** – małe białko wiążące nukleotydy guanylowe, kodowane przez gen *n-ras*, **SH2** – domena homologiczna do domeny 2 białka kodowanego przez gen *src*, **Shc** – (białko) zawierające domenę SH2, **STAM** – cząsteczka adaptorowa przenosząca sygnał, **TGF** – transformujący czynnik wzrostowy, **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu, **VEGF** – czynnik wzrostowy komórek endotelialnych.

WSTĘP

Naskórek jest wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym nabłonkiem, w skład którego wchodzi komórki nabłonkowe pochodzenia ektodermalnego (keratynocyty) oraz w znacznie mniejszej liczbie melanocyty, komórki Langerhansa i neuroendokryjne komórki Merkla. Grubość naskórka waha się w granicach od ok. 0,1 mm (powierzchnia tułowia) do ok. 1 mm (dłonie, podeszwy) [21, 57].

W naskórku można wyróżnić kolejne, licząc od błony podstawnej warstwy: podstawną, kolczystą, ziarnistą, świetlaną i warstwę zrogowaciałą. Warstwa podstawna (rozrodcza) zbudowana jest z jednego pokładu komórek kubicznych lub walcowatych. W tej warstwie znajdują się komórki, które w wyniku podziałów dają kolejne komórki rozrodcze oraz komórki różnicujące się. Tempo namnażania komórek zależy od grubości naskórka i wyraźnie wzrasta po zniszczeniu warstw powierzchniowych. Warstwa kolczysta składa się z kilku do kilkunastu pokładów wielobocznych komórek, połączonych ze sobą wieloma desmosomami. W warstwach kolczystej i podstawnej obecne są liczne tonofilamenty zbudowane z białek należących do grupy cytokeratyn. Warstwa ziarnista tworzona jest przez 3–5 pokładów komórek spłaszczonych, w przekroju wrzecionowatych, zawierających liczne ziarnistości (ziarna F, ziarna L i keratynosomy), ważne przy wytwarzaniu w naskórku bariery nieprzepuszczalnej dla wody. Warstwę świetlaną tworzy pasmo złożone z 2–3 pokładów spłaszczonych komórek, ułożonych mniej więcej równoległe do powierzchni naskórka. W komórkach tych obserwuje się zanik wielu organelli cytoplazmatycznych, a nawet jąder komórkowych. Warstwa zrogowaciała zawiera płytki rogowe, bezjądrzaste i martwe. Jej dolna część zawiera komórki utrzymujące się jeszcze w obrębie naskórka, a górna część to komórki podlegające złuszczeniu [21].

Melanocyty zlokalizowane są w obrębie warstwy podstawnej naskórka, zawierają melanicę, barwnik istotny dla ochrony organizmu przed promieniowaniem UV. Komórki Langerhansa wykazują na swojej powierzchni obecność antygenów MHC klasy II i receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał oraz składnika C3 dopełniacza, co umożliwia im wychwytywanie antygenów skórnych, przetrzymywanie, a następnie

prezentację ich limfocytom. Natomiast komórki Merkla są prawdopodobnie swoistymi receptorami czuciowymi [21].

KERATYNOCYTY

Keratynocyty są dominującym typem komórek występujących w naskórku. Funkcje biologiczne keratynocytów są wielostronne. Komórki te są m.in. odpowiedzialne za tworzenie bariery mechanicznej, immunologicznej obrony przeciw patogenom i innym czynnikom zewnętrznym oraz za zapobieganie utracie wody z organizmu. Keratynocyty są komórkami nabłonkowymi podlegającymi procesowi rogowacenia (keratynizacji), w wyniku którego żywe początkowo komórki ulegają przekształceniu w martwe rogowe płytki ulegające złuszczeniu. Ubytek komórek na powierzchni uzupełniany jest w wyniku podziałów komórek macierzystych, które są zlokalizowane w najgłębszej warstwie naskórka, a komórki z warstw najwyższych degenerują i obumierają. Cały cykl przemian od komórki dzielącej się do obumarłej jest różnej długości w zależności od grubości warstwy naskórkowej i trwa od 2 do 4 tygodni [21]. Poznanie mechanizmu regulacji proliferacji keratynocytów jest niezwykle ważne nie tylko z fizjologicznego punktu widzenia, ale także dlatego, że zaburzenia wzrostu keratynocytów są odpowiedzialne za patogenezę wielu powszechnych chorób skórnych, takich jak: łuszczyca, chroniczne zaburzenia w gojeniu ran skórnych i nowotwory skóry [91].

Cykl komórkowy keratynocytów jest zdeterminowany głównie trzema czynnikami: stopniem zróżnicowania komórek, adhezją do macierzy pozakomórkowej oraz równowagą w działaniu czynników wzrostowych i ich inhibitorów. Ostatecznie zróżnicowane keratynocyty, usytuowane w warstwie ponadpodstawnej nie proliferują, w przeciwieństwie do keratynocytów warstwy podstawnej, które można podzielić na dwie subpopulacje: komórki macierzyste i komórki przejściowo zaktywowane (*amplifying*). Komórki macierzyste posiadają duży potencjał rozrodczy (proliferacyjny), ale dzielą się rzadko, dlatego w prawidłowym naskórku szybkość proliferacji jest prawdopodobnie zdeterminowana przez populację keratynocytów przejściowo zaktywowanych. Keratynocyty te są bardziej dojrzałe niż komórki macierzyste i po przejściu kilku rund mitoz tworzą ostatecznie zróżnicowane komórki naskórka. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za regulację wzrostu komórkowego są złożone i nie w pełni poznane. Nie ulega wątpliwości, że jednym z ważniejszych elementów tej regulacji są oddziaływania komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa [2, 25]. Oddziaływania międzykomórkowe są utrzymywane głównie za pośrednictwem odpowiednich połączeń i desmosomów. W ich skład wchodzi wiele białek m.in. kadheryny, desmogleiny, desmokoliny [25, 35, 40]. W oddziaływaniach komórek z macierzą zewnątrzkomórkową główną rolę odgrywają integryny [36, 37]. Tylko względnie mało zróżnicowane keratynocyty (komórki macierzyste i przejściowo zaktywowane) silnie przylegające do podłoża,

odpowiadają na swoiste czynniki wzrostowe. Doświadczenia prowadzone na hodowlach keratynocytów i na zwierzętach wykazały, że w regulację wzrostu i różnicowania keratynocytów *in vivo* zaangażowanych może być potencjalnie wiele różnych substancji, takich jak: czynniki wzrostowe, interleukiny, neurotransmitery, ceramidy, steroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach i ich pochodne. Większość autorów jest jednak zgodna co do tego, że kluczową rolę w rozwoju tych komórek odgrywają EGF-podobne czynniki wzrostowe.

RODZINA EPIDERMALNEGO CZYNNIKA WZROSTOWEGO

EGF-podobne czynniki wzrostowe (EGFs) są rodziną polipeptydów, którym przypisuje się istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych (embriogeneza, regulacja aktywności wydzielniczej, naprawa i regeneracja tkanek), jak i patologicznych (chOROBY nowotworowe, łuszczyca). Od czasu odkrycia protoplasty tej rodziny – epidermalnego czynnika wzrostowego przez S. Cohena w roku 1962 [22] scharakteryzowano kilka innych peptydów o strukturze III-rzędowej podobnej do EGF, działających przez homologiczne receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. Do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (tab. 1) zalicza się: transformujący czynnik wzrostowy typu α (TGF- α), wiążący heparynę epidermalny czynnik wzrostowy (HB-EGF), amfiregulinę (AR), epiregulinę (ER), betacelulinę (BTC), heparulinę (HRG) oraz czynniki wzrostowe wirusów: Vaccinia, Myxoma i Pox [89]. Wszystkie wymienione peptydy zawierają w swojej cząsteczce „jednostkę EGF” (rys. 1), sekwencję 35–50 reszt aminokwasowych, spiętą trzema mostkami disiarczkowymi, nadającymi im charakterystyczną strukturę przestrzenną trzech pętli aminokwasowych, odpowiedzialną za wiązanie z receptorem. W niniejszym opracowaniu pominięto dwa peptydy o ograniczonej homologii z EGF, określane

TABELA 1. Wybrane właściwości EGF-podobnych czynników wzrostowych ssaków

Czynnik wzrostowy	Masa cząsteczkowa [kDa]	Liczba aminokwasów	Glikozylacja	Komórki źródłowe*	Magazyn
EGF	6	53			Płytki krwi
TGF α	5,5	50		K, M ϕ	Płytki krwi
ER	5	47		M ϕ	
AR	9,5	84		K, M ϕ	Macierz z.k.
HB-EGF	19–23**	86	O-glikozylowany	K	Macierz z.k.
BTC	32**	80	O- i N-glikozyl.		Macierz z.k.
HRG α	44**	240	O- i N-glikozyl	F	Macierz z.k.

* – dotyczy wyłącznie komórek skóry; ** – oznaczana metodą SDS-PAGE

EGF	1	N S Y P G	C	P S S Y D G Y	C	L N ¹ G ¹ G V	C	M H I E S
ER	1	V Q I T K	C	S S D M D G Y	C	L ¹ H ¹ G ¹ Q -	C	I Y L V D
TGF α	3S H F N K	C	P D S H T Q Y	C	F ¹ H ¹ G ¹ T -	C	R F L V Q
HB-EGF	30K K R D P	C	L R K Y K D Y	C	I ¹ H ¹ G ¹ E -	C	R Y L Q E
BTC	33T H F S R	C	P K Q Y K H Y	C	I ¹ H ¹ G ¹ R -	C	R F V V D
AR	41K K K N P	C	N A E F Q N F	C	I ¹ H ¹ G ¹ E -	C	K Y I E H
HRE α	177P A I R L	C	G P E G D G Y	C	L ¹ H ¹ - G D	C	I H A R D
EGF		L D S Y T	C	N C V I G ¹ Y ¹ S G ¹ D R ¹	C	Q T R D I ¹ R W W E L R		
ER		M R E K F	C	R C E V I G ¹ Y ¹ T G ¹ L R ¹	C	E H F F L ¹ . . .		
TGF α		E E K P A	C	V C H S G ¹ Y ¹ V G ¹ V R ¹	C	E H A D I ¹ L ¹ . . .		
HB-EGF		F R T P S	C	K C L P G ¹ Y ¹ H G ¹ H R ¹	C	H G L T L ¹ L ¹ . . .		
BTC		E Q T P S	C	I C E K G ¹ Y ¹ F G ¹ A R ¹	C	E R V D L ¹		
AR		L E A V T	C	K C Q Q E Y ¹ F G ¹ E R ¹	C	G E K S M . . .		
HRE α		L S N P S R Y L	C	K C Q P G ¹ F T G ¹ A R ¹	C	T E N V P . . .		

RYSUNEK 1. Porównanie struktury I-rzędowej domeny EGF-podobnej peptydów ssaczych zaliczanych do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (wg [102] zmodyfikowane)

jako Cripto-1 [20] i Cryptic [86], ponieważ nie ma dowodów, że działają one przez receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych.

Wszystkie wymienione w tabeli 1 czynniki EGF-podobne syntetyzowane są w formie znacznie większego białka prekursorowego i wbudowywane w błonę cytoplazmatyczną. Prekursorowa, transbłonowa postać tych czynników może oddziaływać na komórki sąsiednie w sposób justakryny, ale podstawowe znacznie biologiczne mają rozpuszczalne formy EGF-podobnych czynników wzrostowych, wycinane enzymatycznie z zewnątrzkomórkowej części prekursora [16, 49]. Niektóre z omawianych czynników są zdolne do wiązania się z heparyną i siarczanem heparanu (HB-EGF, AR, HR, BTC) i dlatego zaliczane są do grupy czynników wzrostowych wiążących się z heparyną (HB-GF). Konsekwencje wiązania tych czynników z proteoglikanami macierzy zewnątrzkomórkowej lub błony komórkowej zawierającymi siarczan heparanu mogą być różnorodne. Wiązanie takie przede wszystkim: a) pozwala na magazynowanie znacznych ilości czynników wzrostowych i uwalnianie ich w formie aktywnej, z pominięciem etapu syntezy nowych białek, b) reguluje lokalne stężenie czynników wzrostowych i ułatwia ich wiązanie do swoistych receptorów błonowych.

Dojrzały epidermalny czynnik wzrostowy jest nieglikozylowanym polipeptydem o m. cz. 6 kDa, występującym powszechnie w wielu zwierzęcych i ludzkich tkankach i płynach ustrojowych [10]. Obecność tego peptydu stwierdzono w płucach, żołądku, nerkach, dwunastnicy, trzustce, skórze, tarczycy, jajnikach, macicy, łożysku, gruczołach ślinowych i przysadce mózgowej [7, 8, 10]. EGF wchodzi w skład wielu płynów ustrojowych, takich jak: krew, mocz, płyn rdzeniowo-mózgowy, płyn na-

sienny, mleko, ślina, łzy i sok żołądkowy [7, 8, 10]. EGF stymuluje proliferację i różnicowanie wielu różnych komórek, głównie pochodzenia epidermalnego i epitelialnego [10, 49]. Peptyd ten jest także chemoatraktantem dla komórek epitelialnych i fibroblastów [10, 49]. Magazynem EGF w krwi ssaków są α -granule płytek krwi, skąd wydzielany jest łącznie z innymi czynnikami wzrostowymi (PDGF, HGF, TGF β , TGF α), zaangażowanymi m.in. w proces gojenia ran.

Transformujący czynnik wzrostowy typu α (TGF α) jest małym polipeptydem (50 reszt aa), podobnym strukturalnie i funkcjonalnie do EGF, syntetyzowanym głównie przez komórki embrionalne i nowotworowe [52]. W warunkach fizjologicznych ekspresję genu tego czynnika wykazano w nerkach, wątrobie, skórze, mózgu, łożysku oraz w komórkach stymulowanych makrofagów [52, 62]. TGF α stymuluje proliferację, migrację i różnicowanie komórek epitelialnych i mezenchymalnych [51].

Epiregulina (ER) jest nieglikozylovanym polipeptydem o m.cz. około 5 kDa, o umiarkowanym (24–50%) podobieństwie sekwencji aminokwasowej do innych czynników EGF-podobnych [102]. W warunkach fizjologicznych EP jest syntetyzowana głównie przez monocyty/makrofagi krwi obwodowej oraz przez komórki łożyska, a jej poziom wzrasta gwałtownie w wielu typach nowotworów nabłonkowych [101, 102]. Epiregulina jest mitogenem dla komórek epitelialnych, fibroblastów, hepatocytów i znacznie słabszym dla komórek mięśni gładkich [101, 102].

Amfiregulina jest polipeptydem zbudowanym z 84 reszt aminokwasowych, powstającym z 252 aminokwasowego prekursora transbłonowego drogą proteolizy [99]. AR jest syntetyzowana w wielu tkankach prawidłowych (piersi, okrężnica, nerki, wątroba, płuca, trzustka, jajniki, łożysko, śledziona, jądra, skóra) oraz przez komórki nowotworów piersi, trzusi, nerek, okrężnicy, jajników [48, 67]. AR jest mitogenem dla fibroblastów i keratynocytów [30] i autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla keratynocytów, komórek nowotworowych piersi, okrężnicy i pęcherza [13].

Natywny wiążący heparynę epidermalny czynnik wzrostowy (HB-EGF) jest O-glikozylovanym polipeptydem o zbliżonej liczbie (86 reszt aa) i sekwencji aminokwasów do AR oraz umiarkowanym podobieństwie sekwencji aminokwasowej do EGF (w rejonie trzypętlowym wynosi ono 34%) [48]. HB-EGF jest syntetyzowany przez limfocyty T CD4+, keratynocyty i aktywowane makrofagi, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [7, 8, 32]. Peptyd ten jest mitogenem dla fibroblastów, keratynocytów, komórek mięśni gładkich i hepatocytów [8, 102] oraz autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla keratynocytów i komórek nabłonka pęcherza (prawidłowych i nowotworowych) [32, 82].

Betacellulina (BTC) jest glikoproteiną o m. cz. 32 kDa. Około 40% masy cząsteczkowej tego czynnika stanowią węglowodany. Powstaje z 178-aminokwasowego prekursora transbłonowego, po proteolitycznym odcięciu 80 aminokwasów N-końcowych [84]. Jej obecność wykazano przede wszystkim w trzustce i jelicie cienkim

[90]. BTC jest mitogenem dla naczyńiowych komórek epitelialnych i fibroblastów oraz dla nowotworowych komórek beta trzustki [90].

Hereguliny/neureguliny (HRG/NRG) są rodziną polipeptydów powstających w drodze alternatywnego składania produktu transkrypcji jednego genu [17]. Wyróżnia się trzy typy tych czynników wzrostowych, oznaczane jako HRG/NRG (1, 2 i 3), z których dwa pierwsze mogą występować w dwóch formach (α i β) różniących się sekwencją aminokwasów w domenie EGF-podobnej [17, 105]. Różnice w wielkości dojrzałych form HRE nie wpływają na specyficzność wiązania z swoistymi receptorami [4].

RECEPTORY EGF-PODOBNYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Scharakteryzowano cztery różne receptory czynników EGF-podobnych, określane najczęściej jako ErbB1-ErbB4 [27]. Receptory te są białkami transbłonowymi o podobnej budowie cząsteczki, kodowanymi przez protoonkogeny z rodziny erbB. Receptor ErbB1 (rys. 2a) jest glikoproteina zbudowaną z 1186 reszt aminokwasowych o m.c. około 170 kDa, z czego około 40 kDa stanowią N-glikozydowo przyłączone oligosacharydy [10, 49]. N-końcowa część zewnątrzkomórkowa (621 reszt aminokwasowych) zawiera domeny wiążące ligand i sekwencje odpowiedzialne za dimeryzację kompleksów ligand-receptor. Sekwencja aminokwasów 622-644 reprezentuje pojedynczy region transbłonowy (zakotwiczący receptor w błonie komórkowej), a sekwencja 645-1186 część wewnątrzkomórkową, zawierającą domenę kinazy tyrozynowej (reszty 694-937) oraz fragment C-końcowy, tzw. obszar autofosforylacji. Przyłączenie EGF do receptora powoduje dimeryzację kompleksów czynnik wzrostu-receptor, aktywację tyrozyno-swoistej kinazy, fosforylującej różne substraty wewnątrzkomórkowe, w tym także sam receptor (autofosforylacja). Obecność rodziny receptorów ErbB wykazano praktycznie u wszystkich gatunków ssaków i w bardzo wielu rodzajach komórek (oprócz komórek hematopoetycznych). Komórki prawidłowe mają 10^4 – 10^5 receptorów ErbB1, komórki niektórych nowotworów mogą posiadać znacznie większą liczbę tych receptorów, w niektórych przypadkach (np. ustalona linia komórek A431) do 2×10^6 [49].

Podstawowe znaczenie dla specyficzności przekazywania sygnału inicjowanego jednym ligandem ma zdolność ErbB do tworzenia homo- i heterodimerów [43]. Poszczególne receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych różnią się zarówno aktywnością kinazową, jak i swoistością wiązania przedstawicieli tej rodziny czynników wzrostowych. Receptor ErbB3 w odróżnieniu od wszystkich pozostałych ma upośledzoną zdolność do fosforylacji. Niektóre receptory EGFs wiążą większość ligandów omawianej grupy polipeptydów, inne tylko wybrane [43]. Szczególnym przypadkiem jest ErbB2 odkryty jako receptor swoisty dla neureguliny/hereguliny.

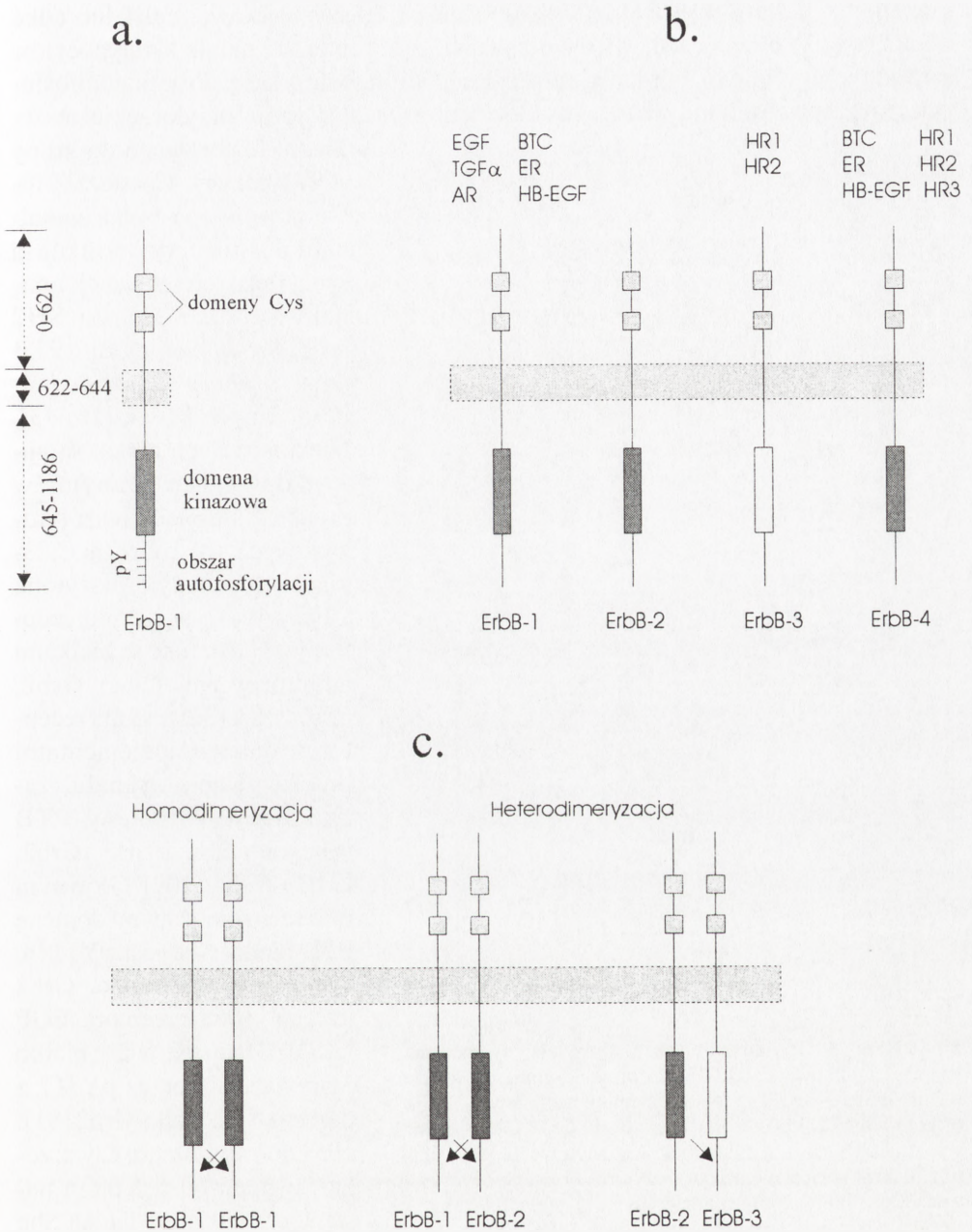
Okazało się jednak, że receptor ten pośredniczy w działaniu EGF-podobnych czynników wzrostowych tylko pośrednio, poprzez heterodimeryzację z innymi białkami ErbB. W roku 1998 Tzahar E, Yarden Y [103] zaproponowali biwalencyjny model interakcji ErbBs-EGFs. Zgodnie z tą hipotezą każdy z EGF-podobnych czynników wzrostowych ma dwa miejsca wiążące receptor. Jedno miejsce wiązałoby receptor o niskim powinowactwie (np. ErbB2), a drugie receptor o wysokim powinowactwie (Erb1, ErbB3 lub ErbB4). Trudno powiedzieć dziś, czy hipoteza ta jest prawdziwa. Faktem jest, że homodimery ErbB2-ErbB2 i ErbB3-ErbB3 nie uczestniczą w przekazywaniu sygnału indukowanego EGFs, natomiast heterodimery zawierające ErbB2 i/lub ErbB3 pośredniczą w działaniu większości EGFs [103]. Swoistość wiązania EGF-podobnych czynników wzrostowych oraz przykłady homo- i heterodimeryzacji receptorów należących do rodziny ErbB przedstawia rysunek 2b. Istotnym problemem w wyjaśnieniu mechanizmu sygnalizacji transbłonowej jest swoistość odpowiedzi komórkowej na działanie różnych ligandów EGF-podobnych. Wiadomo, że różne czynniki wzrostowe działające przez ten sam receptor mogą inicjować odmiennie drogi przekazu sygnału. Z drugiej strony ten sam ligand może stymulować odmienną odpowiedź biologiczną zależnie od typu receptora, przez który działa [22, 43].

W trakcie ostatnich kilku lat pojawiły się dobrze udokumentowane informacje o istotnej roli heterodimeryzacji receptorów ErbB w różnicowaniu odpowiedzi biologicznej komórek na działanie czynników EGF-podobnych. Szczególną rolę w tym procesie przypisuje się receptorowi sierocemu ErbB-2 (rys. 2c), ponieważ receptor ten jest preferowanym partnerem w heterodimeryzacji innych receptorów tej rodziny [27]. Niezależnie od składu utworzonego heterodimeru każdy z tych kompleksów ma różny zestaw miejsc ulegających autofosforylacji, co pozwala na przyłączanie do nich odmiennych białek mających domeny SH2 i/lub PTB. Wielość ligandów EGF-podobnych i tworzenie heterodimerów pomiędzy różnymi receptorami ErbB wyjaśniają przynajmniej w części obserwowane różnice w odpowiedzi komórkowej indukowanej przez omawiane czynniki wzrostowe.

Istotnym uzupełnieniem wiadomości o mechanizmie przekazu sygnału inicjowanego przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej są doniesienia o transaktywacji receptorów ErbB przez receptory metabotropowe, jonotropowe i receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi [43].

HIPOTETYCZNY MECHANIZM REGULACJI WZROSTU KERATYNOCYTÓW STYMULOWANYCH EGF

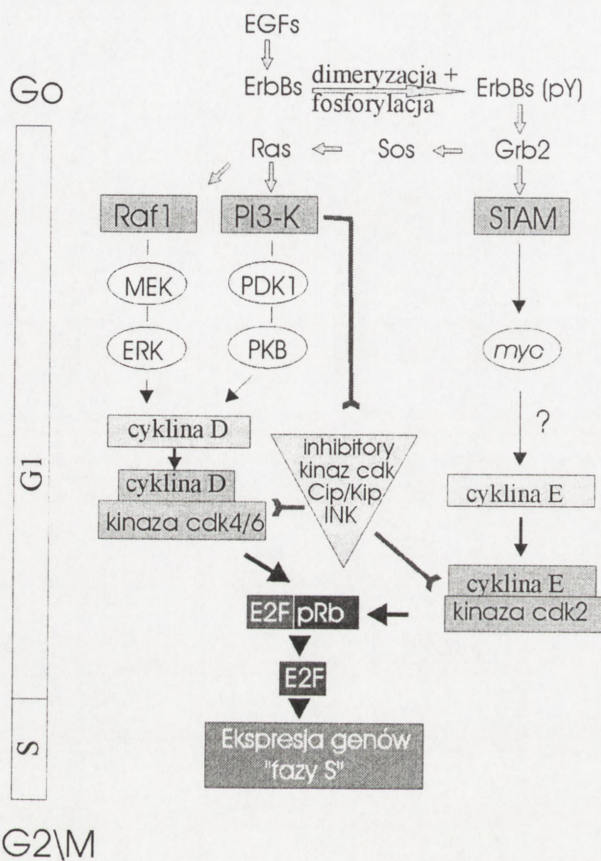
Kontrola proliferacji komórek somatycznych ssaków jest procesem bardzo złożonym. W świetle dotychczasowych wyników, kluczowe zdarzenia regulujące ten proces zachodzą w fazie G1 cyklu komórkowego. Głównymi uczestnikami tego procesu są: receptory czynników wzrostowych, małe białka wiążące nukleotydy



RYSUNEK 2. Receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych. Schemat budowy ErbB1 (a), ligandy receptorów rodziny ErbB (b), przykładowe homo- i heterodimery receptorów ErbB (c)

guanylowe, cykliny D i E oraz cyklino-zależne kinazy białkowe: cdk4 lub cdk6 i cdk2 (rys. 3). Przyłączenie EGFs do swojego receptora w błonie keratynocytów powoduje jego homo- lub heterodimeryzację i autofosforylację. Proces autofosforylacji receptorów modyfikuje kowalencyjnie receptor przez przyłączenie reszty

kwasu fosforowego do grupy -OH tyrozyny. Cząsteczki fosfotyrozyny (pY) mają unikalną zdolność do wiązania specyficznych sekwencji aminokwasowych: domen SH2 (ang. *Src-homology 2*) i PTB (ang. *phosphotyrosine-binding*) innych białek [10, 43]. Niektóre z tych białek są enzymami aktywowanymi w drodze fosforylacji reszt tyrozynowych (fosfolipaza C, 3-kinaza fosfatydylo-inozytolu, kinazy tyrozynowe niereceptorowe) [10]. Inne są białkami adaptorowymi (Shc, Grb2, Grb7, Nck) łączącymi receptor z dalszymi elementami przekazywania sygnału, zawierającymi domeny PTB (Shc) lub SH2 i SH3 (Grb2, Grb7 i Nck) [109]. Głównym miejscem wiążącym domenę PTB białka Shc jest pY1148, a domeny SH2 białka Grb2 jest pY 1068 receptora EGF [3,83]. Ufosforylowane białko Shc wiąże się przez pY317 z domeną SH2 białka Grb2 [81]. Niezależnie od tego, czy przekaz sygnału od receptora następuje z udziałem białka Shc czy bez jego udziału, białko Grb2 wiąże się swoimi domenami SH3 z jednym z białek stymulujących wymianę nu-



RYSUNEK 3. Uproszczony schemat przekazu sygnału mitogenowego, indukowanego EGF-podobnymi czynnikami wzrostowymi: EGFs – EGF-podobne czynniki wzrostowe, ErbBs – receptory ErbB, Grb2 – białko adaptorowe Grb2, GRF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guanylowych, Ras – białko p21^{ras}, Raf1 – kinaza białkowa serynowo/treoninowa stymulowana Ras, PI3K – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, STAM – cząsteczka adaptorowa przenosząca sygnał, MEK/ERK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami, PDK1 – zależna od PIP₃ kinaza białkowa 1, PKB – kinaza białkowa B, kinaza cdk4/6 – cyklino-zależne kinazy 4 i 6, kinaza cdk2 – cyklino-zależna kinaza 2, E2F – czynnik transkrypcyjny E2F, pRb – białko retinoblastoma

kleotydwów guanylowych (mSos, GRF, GDS), które aktywują białka Ras. Te z kolei mogą aktywować wiele różnych szlaków metabolicznych, między innymi te, które prowadzą do stymulacji cyklino-zależnych kinaz białkowych [59, 60]. Wykazano ponadto, że szereg innych białek może uczestniczyć w przekazaniu sygnału od białka Grb2, między innymi: białka STAM (ang. *signal transducing adaptor molecule*), którym przypisuje się stymulację genu c-myc i w kolejności aktywację cykliny E [97]. Hipotetyczny mechanizm regulacji aktywności kinaz cyklino-zależnych, stymulowanej działaniem EGF-podobnych czynników wzrostowych przedstawia rysunek 2. Przynajmniej dwie drogi przekazywania sygnału od białek Ras są niezbędne do stymulacji odpowiedzi mitogennej [59, 60]. Pierwsza, to stymulacja kaskady enzymatycznej kinaz MAP (ang. *mitogen activated protein*), a druga to aktywacja kinazy 3-fosfatydoinozytolu (PI3K). Stymulacja kaskady kinaz MAP jest niezbędna (ale niewystarczająca) do wejścia komórek w fazę S. Dodanie swojego inhibitora kinazy MEK (PD098059) do hodowli komórek spoczynkowych stymulowanych czynnikami wzrostowymi całkowicie hamuje syntezę DNA. Stymulacja kaskady kinaz MAP powoduje ekspresję genu cykliny D1, kluczowego regulatora syntezy DNA w komórkach keratynocytów [78]. Aktywacja PI3K powoduje z jednej strony degradację inhibitora p27Kip1, a z drugiej stymulację syntezy cykliny D, prawdopodobnie przez kolejną aktywację kinazy zależnej od fosfatydoinozytolo-3-fosforanu i kinazy białkowej B. Stymulacja działania cdk obejmuje: syntezę cyklin (D i E), tworzenie kompleksów cyklina-cdk, fosforylację kinaz cdk przez kinazy aktywujące (CAKs) i przemieszczenie kompleksów cyklina-cdk do jądra komórkowego [59]. Przyjmuje się obecnie, że procesem koniecznym do wyjścia komórek z fazy Go jest indukowana kinazami cyklino-zależnymi fosforylacja rodziny białek retinoblastomy (pRb, p130, 107), powodująca uwolnienie z kompleksu pRb-E2F czynnika transkrypcyjnego E2F (i innych białek jądrowych) [59, 60]. Zdarzenia te powodują wejście komórek w fazę S i umożliwiają dalsze etapy reakcji wewnątrzkomórkowych, które prowadzą do mitozy.

Hamowanie aktywności kinaz cyklino-zależnych zachodzi poprzez ich asocjacje z swoistymi inhibitorami. Znane są dwie rodziny tych inhibitorów: Cip/Kip (p21Cip/Waf, p27Kip1 i p57Kip2) i INK4 (p15INK4A, p16INK4B, p18INK4C, p19INK4D) [87]. Inhibitory z rodziny INK4 działają wyłącznie na kinazy cdk4 i cdk6, a białka z rodziny Cip/Kip na wszystkie kinazy cdk, działające w fazie G1. Większość danych doświadczalnych wskazuje, że jedynym fizjologicznym inhibitorem wzrostu naskórka jest TGF β . Przemawia za tym obecność TGF β , w ponadpodstawnej warstwie naskórka, jak i zdolność do aktywacji inhibitorów cdk w fazie G1 oraz do hamowania fosforylacji pRb [53, 77]. Udowodniono także, że nadekspresja TGF β zapobiega indukowanej estrami forbole hiperplazji naskórka [26].

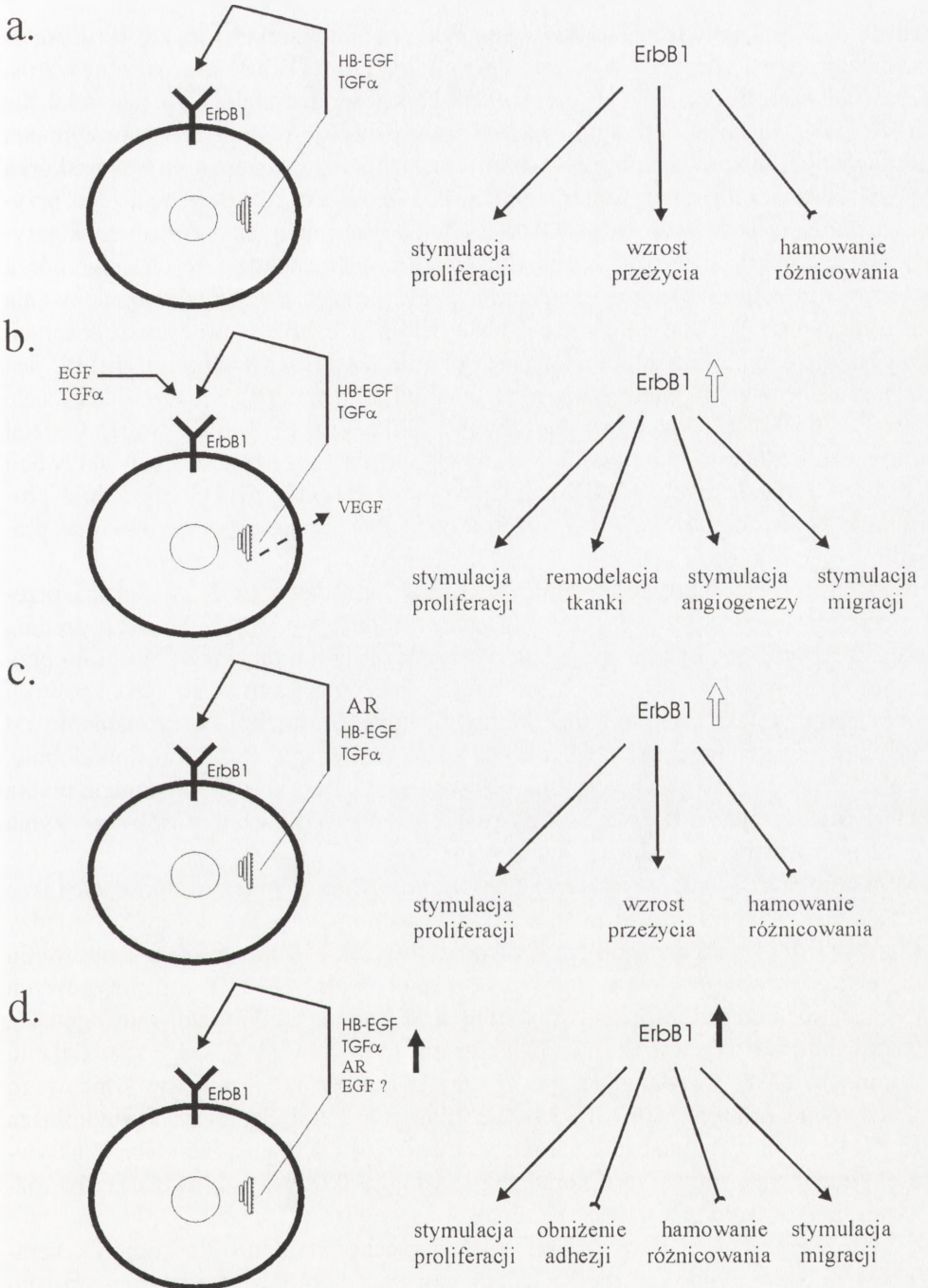
ROLA EGF-PODOBNYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH W REGENERACJI NASKÓRKA

Peptydy zaliczane do rodziny EGF regulują bardzo wiele różnych procesów biologicznych, m.in. odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i różnicowania keratynocytów. Regulacja ta uzależniona jest od dostępności czynników EGFs w naskórku oraz jakości i liczby ich receptorów w komórkach docelowych (keratynocytach). Jeśli chodzi o dostępność czynników wzrostowych, to inna będzie w prawidłowo regenerującym naskórku, inna w procesach gojenia ran, a jeszcze inna w patologicznej proliferacji keratynocytów, np. w łuszczycy lub nowotworach skóry (rys. 4). W stanach związanych ze wzmożoną proliferacją keratynocytów zmienia się również poziom ekspresji genów receptorów ErbB.

Regeneracja naskórka

W naskórku obserwuje się ekspresję tylko trzech typów receptorów z rodziny ErbB: ErbB1, ErbB2 i ErbB3 [1, 58]. W prawidłowym naskórku, receptory te uczestniczą w autokrynnym wzroście odnawiającej się tkanki, supresji końcowego różnicowania, promocji przeżywania komórek i regulacji migracji komórek podczas morfogenezy. Naturalnym ligandem dla receptorów EGFs keratynocytów wydaje się TGF α (lub HB-EGF), ponieważ ani EGF, ani amfiregulina nie są syntetyzowane w prawidłowym naskórku w ilościach usprawiedliwiających ich udział w procesie fizjologicznej regeneracji naskórka. HB-EGF jest obecny zarówno w formie transbłonowej, jak i w formie rozpuszczalnej, chociaż w niskim stężeniu. Działanie TGF α w hodowli keratynocytów może być zastąpione przez inne czynniki wzrostowe, takie jak KGF (FGF7) lub IGFI [37], ale nie można wykluczyć, że ma to miejsce w drodze pośredniej stymulacji ErbB1. Wzmożona synteza amfireguliny lub TGF α , podobnie jak KGF i IGFI, indukuje hiperplazję naskórka [23, 42]. IGFI jest prawdopodobnie niedostępny dla keratynocytów w tkance prawidłowej, ponieważ jego głównym źródłem jest krew (a zastępczym fibroblasty skóry). Wykazano także, że myszy pozbawione genów TGF α i KGF nie wykazują zaburzeń zarówno w prawidłowej, jak i w indukowanej uszkodzeniem tkanki regeneracji naskórka [41].

Ponieważ keratynocyty mają zdolność do syntezy TGF α , AR i HB-EGF, nie można wykluczyć udziału wszystkich trzech czynników w regeneracji komórek naskórka, TGF α i HB-EGF w warunkach fizjologicznych, a amfireguliny w stanach patologicznych [38]. Jeśli tak, to jedynym (lub przynajmniej głównym) przekaznikiem sygnału przez błonę komórkową jest ErbB1 (patrz rys. 2). Potwierdzają to liczne fakty doświadczalne. Historyczne już dziś doświadczenia *in vivo* pokazały, że ErbB1 bierze udział w dojrzewaniu skóry oraz przyrastaniu jej na grubość [14]. Badania wykonane na myszach, z uszkodzonym receptorem ErbB1 wykazały, że powstały naskórek był cienki i nie wykształcony całkowicie. Dodatkowo obser-



RYSUNEK 4. Hipotetyczna rola EGF-podobnych czynników wzrostowych oraz zmiany w ekspresji receptora ErbB1 w: regeneracji prawidłowego naskórka (a), procesie gojenia ran (b), łuszczycy (c) i nowotworach skóry (d)

wowano także upośledzenie funkcji innych tkanek epitelialnych [66, 88, 100]. Autonomiczny wzrost keratynocytów jest zależny od obecności ErbB1. Autokrywny wzrost keratynocytów *in vitro* był w ponad 90% hamowany działaniem przeciwciał dla ErbB1 [30]. Wiele funkcji regulowanych przez ErbB1 jest istotnych dla utrzymania odpowiedniej równowagi pomiędzy proliferacją i różnicowaniem komórek naskórka [4, 29, 50]. Lokalizacja receptora EGF w naskórku jest konsekwencją jego przypuszczalnej roli we wzroście naskórka [50]. W normalnych, dojrzałych keratynocytach, ErbB1 jest zlokalizowany głównie na powierzchni dzielących się komórek bazalnych, a ekspresja genu tego receptora obniża się wraz z wzrostem zróżnicowania keratynocytów [50, 108]. Rola receptorów ErbB2 i ErbB3 w procesie regeneracji naskórka jest mniej zrozumiała. Można domniemywać, że główną rolą ErbB2 jest różnicowanie sygnału indukowanego czynnikami EGFs, poprzez heterodimeryzację z ErbB1 lub ErbB3. Natomiast podstawową funkcją ErbB3 wydaje się jego udział w stymulacji kinazy fosfatydyloinozytolu [15], enzymu uczestniczącego w aktywacji kinaz cyklicznych. HRG β działająca przez receptor ErbB3, stymuluje proliferację keratynocytów *in vitro*, ale trudno podać źródło tego czynnika w prawidłowym naskórku [58].

Od dawna wiadomo, że czynniki wzrostowe z rodziny EGF zwiększają przeżywalność keratynocytów *in vitro*. Obecnie próbuje się wyjaśniać bezpośrednią rolę ErbB1 w zapobieganiu apoptozie keratynocytów. Inhibicja tego receptora przy użyciu przeciwciał lub swoistych inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych powodowała selektywną apoptozę keratynocytów [6, 79, 94], w odróżnieniu od innych typów komórek, takich jak fibroblasty czy melanocyty [80]. Prawdopodobnie, mechanizm tego zjawiska związany jest z wewnątrzkomórkowym poziomem białka Bcl-xl. Stymulacja ErbB1 zwiększa ekspresję genu bcl-xL i w ten sposób przyczynia się do wzrostu przeżywalności keratynocytów [45, 71].

Epidermalne czynniki wzrostowe nie tylko wpływają na przeżywalność, ale także na różnicowanie keratynocytów. *In vivo* zauważono odwrotną zależność pomiędzy ekspresją ErbB1 a różnicowaniem keratynocytów, jak również to, że w hamowaniu dojrzewania keratynocytów uczestniczy receptor ErbB1 [23]. W organotypowych modelach różnicowania się keratynocytów, EGF hamuje epidermalną morfogenezę, uwarstwianie i przede wszystkim zróżnicowanie fenotypowe [18, 75]. Po zadziałaniu czynnikiem EGF, wytwarzanie specyficznych markerów w procesie końcowego różnicowania keratynocytów, takich jak: filagryna, keratyna 1 i transglutaminaza keratynocytowa, jest znacznie ograniczone [67, 76], natomiast hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej receptora ErbB1 wzmacnia ekspresję takich markerów różnicowania, jak keratyna 1 i 10 [72].

Wiele czynników z rodziny EGF jest chemoatraktantami dla komórek keratynocytów, a wiadomo, że regulacja migracji tych komórek jest istotna zarówno w procesie gojenia ran, jak i w procesach patologicznego wzrostu tej tkanki. Aktywacja receptorów EGF-podobnych czynników wzrostowych może modulować mi-

grację nie wpływając na tempo proliferacji keratynocytów. W hodowli prawidłowych ludzkich keratynocytów, TGF- α i EGF wywołują identyczną odpowiedź mitogenną, ale TGF- α daje znacznie silniejszy efekt mitogeny [4]. Jest to tym istotniejsze, że w prawidłowym naskórku EGF nie odgrywa istotnej roli, natomiast poziom TGF- α tak.

REGENERACJA NASKÓRKA W PROCESIE GOJENIA RAN

Wiele czynników wzrostowych (PDGF, IGF1, FGF2, VEGF, TGF β) w tym EGF-podobne czynniki wzrostowe, odgrywają istotną rolę w procesie gojenia ran [6, 24]. Wykazano, że EGF przyspiesza gojenie ran powstałych w wyniku poparzeń, ran pooperacyjnych, uszkodzeń rogówkowo-nabłonkowych, wrzodów żołądkowych i żylnych. Badania na wielu modelach zwierzęcych pokazały, że egzogenne podanie czynnika EGF powoduje zwiększenie tworzenia się kolagenu, rozwój granulacji tkanek, odnawianie epitelium i odnowę unaczynienia w gojących się ranach [45, 91]. W zranionej skórze, liczba receptorów ErbB1 zwiększa się, przez co odgrywają one znaczącą rolę w stymulacji proliferacji i odnowy komórek nabłonka w ranie. Wykazano m.in., że EGF i TGF- α wzmagają nie tylko proliferację keratynocytów, ale również migrację tych komórek z obrzeży do wnętrza rany.

Wyniki publikowane w latach dziewięćdziesiątych dowodzą, że ErbB1 jest centralnym ogniwem, pośredniczącym we wczesnych etapach gojenia ran. Przede wszystkim dlatego, że:

- a) poziom tego receptora wzrasta i poprzedza odpowiedź hipertroficzną [95],
- b) synteza stymulatora przepuszczalności naczyniowej i angiogenezy mikronaczyniowych komórek epitelialnych VEGF jest stymulowana działaniem EGF i TGF α na keratynocyty [28],
- c) geny keratyny 6 i 16, silnie stymulowane podczas procesu gojenia ran, zawierają elementy regulatorowe zależne od aktywacji ErbB1 [70, 47],
- d) aktywator plazminogenu typu urokinazy (odpowiedzialny za lokalną aktywację kolagenazy typu IV), odmiennie od metaloproteinaz i TGF β [96] jest silnie stymulowany w keratynocytach traktowanych EGF [46].

Keratynocyty wykazują mitogenną i chemotaktyczną odpowiedź na różne czynniki wzrostowe, które są obecne w gojących się ranach. Szczególne znaczenia w tym procesie przypisuje się receptorom ErbB, których ligandy są obecne w środowisku gojących się ran. Są to EGF i TGF α wydzielane z α -granul płytek krwi oraz HB-EGF (i TGF α) wytwarzane przez keratynocyty i makrofagi [61, 85]. Indukowany uszkodzeniem tkanki wzrost syntezy EGFs oraz ich receptorów przez keratynocyty, jednoznacznie wskazuje na istotny udział tych białek w procesie gojenia ran. Optymalne warunki odnowy nabłonka wymagają proliferacji i migracji bazalnych kera-

tynocytów w głąb zranionej powierzchni [61, 85]. Wiele procesów zachodzących w komórkach musi być odpowiednio modulowanych tak, aby umożliwić przemieszczanie się komórek w głąb rany: dynamiczne rozkładanie i składanie przylegających połączeń między komórkami, ponowne modelowanie matriks komórkowej, utrata polarności komórki i ukierunkowany ruch. Utrata ścisłej kontroli nad tymi procesami prowadzi do patologii np. inwazji komórek nowotworowych [9, 11, 31, 39, 55].

PATOLOGICZNY WZROST KERATYNOCYTÓW

Zaburzenia wzrostu i różnicowania keratynocytów związane są z wieloma chorobami skóry. Nie ulega wątpliwości, że w hiperplastycznych chorobach skóry (łuszczyca, zapalne schorzenia alergiczne, chroniczne owrzodzenia itp.) keratynocyty realizują patologiczną drogę dojrzewania, manifestującą się wzmożonym tempem proliferacji, nienormalną lub wyolbrzymioną odpowiedzią na czynniki wzrostowe, upośledzonym różnicowaniem i zwiększoną zdolnością do migracji. Jednym z najlepiej udokumentowanych przykładów wpływu EGFs na patologiczną proliferację keratynocytów jest łuszczyca. W chorobie tej wykazano podwyższoną ekspresję genów TGF α i amfireguliny. [52, 73, 74]. Wiele receptorów EGF jest wytwarzanych w sposób ciągły w anormalnie różnicującej się warstwie zewnętrznej łuszcącego się naskórka. Również podwyższona ekspresja genu amfireguliny w bazalnych keratynocytach w naskórku daje w efekcie fenotyp podatny na łuszczenie się.

Podwyższona synteza receptorów ErbB jest charakterystyczna dla wielu nowotworów tkanek nabłonkowych [16, 33]. Zjawisku temu towarzyszy zazwyczaj wzmożony poziom syntezy wielu peptydów EGF-podobnych (TGF α , AR, HB-EGF, BTC) [33].

W przypadku nowotworów skóry, zauważa się zmienioną ekspresję lub aktywację ErbB1, co odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w progresji guza nowotworowego. Wiele procesów komórkowych, takich jak: zmieniona adhezja komórek, ekspresja białek degradujących matriks zewnątrzkomórkową i przemieszczanie się komórek, jest wspólnych dla keratynocytów zarówno w procesie gojenia ran, jak i w guzach metastatycznych. ErbB1 jest regulatorem każdego z tych procesów komórkowych i sugeruje się, że przejściowe i dynamiczne podwyższenie poziomu ErbB1 podczas procesu gojenia ran lub znacznej hiperekspresji w guzach nowotworowych, wskazuje na istotny udział tego białka w migracji i inwazyjnym potencjale keratynocytów [45]. Zaobserwowano także podwyższony poziom mRNA ErbB1 w późnym stadium brodawczaka u myszy, co sugeruje, że wzrost ekspresji genu tego receptora jest wczesnym sygnałem rozwoju przednowotworowych zmian keratynocytów [29]. Utrata integralności nabłonka jest obserwowana po zaktywowaniu receptora EGF [9, 12, 39, 44, 92, 98, 104] i fosforylacji tyrozyn białek połączeń komórkowych, co może reprezentować przykładowy mechanizm, przez który EGF reguluje adhezję komórkową [5, 107]. Interakcje w matriks komórkowej odbywają się poprzez pół-

desmosomy i kontakty zogniskowane, których transbłonowe części składają się receptorów integryn [34, 107]. Połączenie keratynocytów z błoną podstawną jest utrzymywane przez hemidesmosomy i integrynę $\alpha 6\beta 4$. EGF rozrywa to połączenie [56]. Cały proces jest związany z fosforylacją tyrozyny podjednostki $\beta 4$ integryny. Czynniki wzrostu mogą także wpływać na profil ekspresji integryn i rozmieszczenie na powierzchni komórki [63]. Zaobserwowano, że EGF powoduje wzrost ekspresji integryny $\alpha 2\beta 1$ w keratynocytach oraz że indukowana ligandem migracja może być zahamowana poprzez działanie przeciwciał dla integryny $\alpha 2\beta 1$ [19].

Zarówno inwazja komórek nowotworowych, jak i proces gojenia ran wymagają degradacji i powtórnego tworzenia zewnątrzkomórkowej matriks [9, 55, 93]. Procesy te są regulowane przez metaloproteiny matriks i niektóre proteiny serynowe np. plazminę [106]. Proteiny serynowe i metaloproteiny odgrywają znaczącą rolę w migracji i procesie gojenia ran [85]. EGF pełni tu rolę induktora ekspresji metaloproteiny matriks (MMP)-9 i aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA) w keratynocytach [11, 50, 54, 64], choć nie tylko EGF jest odpowiedzialny za wzrost poziomu ekspresji uPA [50].

Dowiedziano, że zwiększenie ekspresji receptorów EGF zmienia funkcjonowanie komórek keratynocytów normalnych i tumorogennych. Zarówno w komórkach normalnych, jak i neoplastycznych obserwuje się odwrotną zależność pomiędzy ekspresją receptora EGF a różnicowaniem [67]. Wiele zmian dotyczących funkcjonowania komórki jest związanych z nadekspresją ErbB1 i może się cofnąć częściowo lub całkowicie po obniżeniu poziomu tego receptora [34, 69]. Ponieważ nadprodukcja receptora ErbB1 jest skorelowana ze wzmocnieniem potencjału inwazji lub metastazy w SCC (ang. *squamous cell carcinoma*), istotne jest postawienie pytania, czy zmiana liczby tych receptorów jest istotna, aby doszło do zmiany poszczególnych funkcji w komórce. Przejściowa nadprodukcja ErbB1 podczas odnowy nabłonka [85] wskazuje, że odpowiednia regulacja ekspresji genu tego receptora ma istotne znaczenie w migracji keratynocytów. Sugeruje to, że odpowiedź komórkowa jest nie tylko modulowana na poziomie stężenia lub dostępności liganda, ale również znaczenie ma tu gęstość rozmieszczenia receptora. Aby potwierdzić tę hipotezę, wykonano odpowiednie doświadczenia na ludzkiej linii SCC i stwierdzono korelację pomiędzy migracją komórek zależną od EGF i ekspresją receptora EGF w normalnych keratynocytach i kilku liniach SCC [65].

Reasumując EGF-podobne czynniki wzrostowe wpływają na liczne procesy, istotne zarówno w odnowie, jak i w patologicznym wzroście komórek naskórka. W warunkach fizjologicznych proliferacja keratynocytów jest regulowana bezpośrednio (w drodze autokrynej stymulacji wzrostu, głównie przez $TGF\alpha$ lub HB-EGF) oraz w sposób pośredni poprzez supresję końcowego różnicowania i hamowanie apoptozy. Precyzyjna regulacja liczby odnawianych komórek jest niezbędna dla podtrzymania odpowiedniej struktury i funkcji naskórka. W procesach gojenia ran, regeneracja naskórka może być stymulowana również przez inne EGF-podobne

czynniki wzrostowe, magazynowane w płytkach krwi (EGF) lub syntetyzowane przez aktywowane komórki warstwy brodawkowej skóry (ER, HGR). Niewątpliwie, najważniejszą rolę w odbiorze sygnału indukowanego EGF-podobnymi czynnikami wzrostowymi odgrywa ErbB1, tak w odnowie tkanki prawidłowej, jak i zranionej, a jego heterodimeryzacja z ErbB2 i ErbB3 różnicuje sygnał i odpowiedź biologiczną komórki. Dobrze udokumentowane doświadczalnie są także hipotezy o korelacji pomiędzy hiperekspresją EGF-podobnych czynników wzrostowych i ich receptorów w chorobach związanych z patologiczną proliferacją komórek naskórka (łuszczyca, nowotwory nabłonkowe).

PIŚMIENNICTWO

- [1] AARONSON SA, RUBIN JS, FINCH PW, WONG J, MARCHESE C, FALCO J, TAYLOR WG, KRAUS MH. Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respi Dis* 1990; **142**: S7–10.
- [2] BARTH AI, NATHKE IS, NELSON WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeleton complexes and signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 690–693.
- [3] BATZER AG, ROTIN D, URENA JM, SKOLNIK EY, SCHLESSINGER J. Hierarchy of binding sites for Gbr2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5192–5201.
- [4] BEERLI R, HYNES N. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6071–6076.
- [5] BEHRENS J, VAKAET L, FRIIS R, WINTERHAGER E, VAN ROY F, MAREEL MM, BIRCHMEIER W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/catenin complex in cells transformed with temperature sensitive v-src gene. *J Cell Biol* 1993; **120**: 757–766.
- [6] BELLO YM, PHILLIPS TJ. Recent advances in wound healing. *JAMA* 2000; **283**: 716–718.
- [7] BENNETT NT, SCHULTZ GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surgery* 1993; **165**: 728733.
- [8] BENNETT NT, SCHULTZ GS. Growth factors and wound healing: part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surgery* 1993; **166**: 74–81.
- [9] BIRCHMEIER C, MEYER D, RIETHMACHER D. Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. *Int Rev Cytol* 1995; **160**: 221–266.
- [10] BOONSTRA J, RIJKEN Ph, HUMBEL B, CREMERS F, VERKLEIJ A, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Intern* 1995; **19**: 413–430.
- [11] BOYD D. Invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1996; **15**: 77–89.
- [12] BOYER B, THIERY JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* 1993; **101**: 257–268.
- [13] BURGESS AW, THUMWOOD CM. Growth factors and their receptors: new opportunities for cancer treatment. *Pathology* 1994; **26**: 453–463.
- [14] CARPENTER G, COHEN S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; **48**: 193–216.
- [15] CARRAWAY KL, CANTLEY LC. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994; **78**: 5–8.
- [16] CASCI T, FREEMAN M. Control of EGF receptor signalling: Lessons from fruitflies. *Cancer Metast Rev* 1999; **18**: 181–201.
- [17] CHANG H, RIESE DJ, GILBERT W, STERN DF, MCMAHAN UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 1997; **387**: 509–512.

- [18] CHEN CS, LAVKER PM, RODECK U, RISSE B, JENSEN PJ. Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 107–112.
- [19] CHEN JD, KIM JP, ZHANG K., SARRET Y, WYNN KC, KRAMER, RH, WOODLEY DT. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* 1993; **209**: 216–223.
- [20] CICCODICOLA A, DONOR, OBICI S, SIMEONE A, ZOLLO M, PRESICO MG. Molecular characterization of gene of the EGF family expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *EMBO J* 1989; **8**: 1987–1991.
- [21] CICHOCKI T, LITWIN JA, MIRECKA J. Kompendium histologii. WUJ 1998; 212–225.
- [22] COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in new born animal. *J Biol Chem* 1962; **237**: 1555–1562.
- [23] COOK P., PIEPKORN M., CLEGG CH, PLOWMAN GD, DEMAY JM, BROWN JR, PITTELKOW MR. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2286–2294.
- [24] COOPER DM. Wound healing: new understandings. *Nurse Practitioner Forum* 1999; **10**: 74–86.
- [25] COWIN P, BURKE B. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 56–65.
- [26] CUI W, FOWLIS DJ, COUSINS FM, DUFFIE E, BRYSON S, BALMAIN A, AKHURST RJ. Concerted action of TGF and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev* 1995; **9**: 945–955.
- [27] DALY RJ. Take your partners, please – signal diversification by the ErbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth factors* 1999; **16**: 255–263.
- [28] DETMAR M., YEO KT, NAGY J, VAN DE WATER L, BROWN BR, BERSE BR, LEDBETTER S, DVORAK H. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 44–50.
- [29] DiGIOVANNI J. Role of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in multistage mouse skin carcinogenesis. [w] H. Mukhtar [red.] Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance. CRC Press, Boca Raton, 1995: 181–197.
- [30] DOWNING MT, BRIGSTOCK DR, LUQUETTE MH, CRISSMAN-COMBS M, BESNER GE. Immunohistochemical localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in normal skin and skin cancers. *Histochem J* 1997; **29**: 735–744.
- [31] ECCLES SA, MODJTAHEDI H, BOX G, COURT W, SANDLE J, DEAN CJ. Significance of the c-erbB family of receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as targets for immunotherapy. *Invas Metast* 1995; **14**: 337–348.
- [32] FREEMAN MR, YOO JJ, RAAB G, SOKER S, ADAM TM, SCHNECK FX, RENSHAW AA, KLAGSBRUN M, ATALA A. Heparin binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1028–1036.
- [33] FERNANDES AM, HAMBURGER AW, GERWIN BI. Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells. *Cancer Lett* 1999; **142**: 55–63.
- [34] FUJII K. Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor results in loss of epithelial phenotype and impaired RGD-sensitive integrin function in HSC-1 cells. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 195–202.
- [35] GARROD DR. Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 30–40.
- [36] GINACOTTI FG, RUOSLAHTI E. Integrin signaling. *Science* 1999; **285**: 1028–1032.
- [37] GNIADECKI R. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its 20-epi analogues (MC 1288, MC 1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for differentiation of keratinocyte

- stem cells and analysis of the modulatory effects of cytokines. *Br J Pharmacol* 1997; **120**: 1119–1127.
- [38] GNIADZECKI R. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol* 1998; **30**: 619–622.
- [39] GRANDIS JR, TWEARDY DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993a; **53**: 3579–3584.
- [40] GREEN KJ, STAPPENBECK TS. The desmosomal plaque: role in attachment of intermediate filaments to the cell surface. In: *Molecular Mechanisms of Epithelial Junctions: From Development to Disease*. S. Citi, ed. Austin, TX, R.G. Landes Co. 1994; pp 157–171.
- [41] GUO L, DEGENSTEIN L, FUCHS E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 1996; **10**: 1165–175.
- [42] GUO L, YU QC, FUCHS E. Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits sticking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J* 1993; **12**: 973–986.
- [43] HACKEL PO, ZWICK E, PRENZEL N, ULLRICH A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; **11**: 184–189.
- [44] HAZAN RB, NORTON L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; **273**: 90778–90784.
- [45] HUDSON LG, McCAWLEY LJ. Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech* 1998; **43**: 444–455.
- [46] JENSON PJ, RODECK U. Autocrine/paracrine regulation of keratinocyte urokinase plasminogen activator through the TGF-alpha/EGF receptor. *J Cell Physiol* 1993; **155**: 333–339.
- [47] JIANG CK, MAGNALDO T, OHTSUKI M, FREEDBERGVIM, BERNERD F, BLUMBERG M. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6786–6790.
- [48] KARNES WE Jr, WELLER SG, ADJEI PN, KOTTKE TJ, GLENN KS, GORES GJ, KAUFMANN SH. Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 1998; **114**: 930–939.
- [49] KHAZAIE K, SCHIRRMACHER V, LICHTER RB. EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993; **12**: 255–274.
- [50] KING LE Jr., GATES RE, STOSCHECK CM, NANNEY LB. The EGF/TGF alpha receptor in skin. *J Invest Dermatol* 1990; **94** (Suppl): 164S–170S.
- [51] LEE DC, CHAN KW, CHAN SY. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in adult polycystic kidney disease. *J Urology* 1998; **159**: 291–296.
- [52] LEE DC, LUETTEKE VC, QIU TH, CHEN X, BERKOWITZ EA. Transforming growth factor-alpha. Its expression, regulation, and role in transformation. [w] RC Tsang, JA Lemons i WF Balisren [red.] Growth factors in perinatal development. Raven Press, New York: 1993: 21–38.
- [53] LI JM, HU PP, SHEN X, YU Y, WANG XF. E2F4-Rb and E2F4-p1107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor through E2F binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4948–4953.
- [54] LYONS JG, BIRKEDAL-HANSEN B, PIERSON MC, WHITELOCK JM, BIRKEDAL-HANSEN H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19143–19151.
- [55] MacDOUGALL JR, MATRISIAN LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1995; **14**: 351–362.

- [56] MAINIERO F, PEPE A, YEON M, REN Y, GIANCOTTI F. The intracellular functions of $\alpha 6 \beta 4$ integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol* 1996; **134**: 241–253.
- [57] MAREWICZ E. Hodowle skóry w transplantologii i biotechnologii. *Post Biol Kom* 1994; **21** (supl. nr 3): 73–87.
- [58] MARIKOVSKY M, LAVI S, PINKAS-KRAMARSKI R, KARUNAGRAN D, LIU N, WEN D, YARDEN Y. ErbB-3 mediates differential mitogenic effects of NDF/heregulin isoforms on mouse keratinocytes. *Oncogene* 1995; **10**: 1403–1411.
- [59] MARSHALL CJ. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 732–736.
- [60] MARSHALL CJ. Small GTPases and cell cycle regulation. *Biochem Soc Transactions* 1999; **27**: 363–370.
- [61] MARTIN P. Wound Healing: Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; **276**: 75–81.
- [62] MASSAQUE J. Transforming growth factor. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21393–21396.
- [63] MATSUMOTO K, ZIOBER BL, YAO CC, KRAMER RH. Growth factor regulation of integrin mediated motility. *Cancer Metast Rev* 1995; **14**: 205–217.
- [64] McCAWLEY LJ, OBRIEN P, HUDSON LG. Epidermal growth factor (EGF) and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 1998; **176**: 255–265.
- [65] McCAWLEY LJ, O'BRIEN P, HUDSON LG. Overexpression of the EGF receptor contributes to enhanced ligand-mediated motility in keratinocytes. *Endocrinology* 1997; **138**: 1–7.
- [66] MIETTINEN PJ, BERGER JE, MENESES J, PHUNG Y, PEDERSEN RA, WERB Z, DERYNCK R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995; **376**: 337–341.
- [67] MONZON R, MCWILLIAMS N, HUDSON LG. Suppression of cornified envelope formation and Type I transglutaminase by epidermal growth factor (EGF) in neoplastic keratinocytes. *Endocrinology* 1996; **137**: 1727–1734.
- [68] MODJTAHEDI H, ECCLES S, SANDLE J, BOX G, TITLEY J, DEAN C. Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 1994; **154** (7): 1695–1701.
- [69] MORONI MC, WILLINGHAM MC, BEGUINOT L. EGF-R antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and suppresses the transforming phenotype of a human carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2714–2722.
- [70] PALADINI RD, TAKAHASHI NS, BRAVO NS, COULOMBE PA. Onset or re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound healing adage keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996; **132**: 381–397.
- [71] PENA JC, FUCHS E, THOMPSON CB. Bcl-x expression influences keratinocyte survival but not terminal differentiation. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 619–629.
- [72] PEUS D, HAMACHER L, PITTELKOW MR. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 1997; **109**: 751–756.
- [73] PIEPKORN M, UNDERWOOD RA, HENNEMAN C, SMITH LT. Expression of amphiregulin is regulated in cultured human keratinocytes and in developing fetal skin. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 802–809.
- [74] PIEPKORN M. Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. *Am J Dermatopathol* 1996; **18**: 165–171.
- [75] PONEC M, GIBBS S, WEERHEIM A, KEMPENAAR J, MULDER A, MOMMAAS AM. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* 1997; **289**: 317–326.

- [76] POUMAY Y, PITTELKOW MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 271–276.
- [77] REYNIDOTTIR I, POLYAK K, IAVARONE A, MASSAQUE J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF. *Genes Dev* 1995; **9**: 11831–1845.
- [78] ROBLES AI, LARCHER F, WHLIN RB, MURILLAS R, RICHI E, GIMENEZ-CONTI IB, JORCANO JL, CONTI CJ. Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7634–7638.
- [79] RODECK U, JOST M, DUHADAWAY J, KARI C, JENSEN PJ, RISSE B, EWERT DL. Regulation of Bcl-xL expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997a; **94**: 5067–5072.
- [80] RODECK U, JOST M, KARI C, SHIH DT, LAVKER PM, EWERT DL, JENSEN PJ. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997b; **110**: 113–121.
- [81] ROZAKIS-ADCOCK M, FERNLEY R, WADE J, PAWSON T, BOWTELL D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 1993; **363**: 83–85.
- [82] RUCK A, PAULIE S. EGF, TGF, AR and HB-EGF are autocrine growth factors for human bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 1998; **18**:1447–1452.
- [83] SAKAGUCHI K et al. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 536–543.
- [84] SASADA R, ONO Y, TANIYAMA Y, SHING Y, FOLKMAN J, IGARISHI K. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **190**: 1173–1179.
- [85] SCHAFFER CJ, NANNEY LB. Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol* 1996; **169**: 151–181.
- [86] SHEN MM, WANG H, LEDER P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* 1997; **124**: 429–442.
- [87] SHERR CJ, ROBERTS JM. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; **13**: 1501–1512.
- [88] SIBILIA M, WAGNER EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; **269**: 234–238.
- [89] SIEGFRIED JM. Strategies for identification of peptide growth factors. *Pharmac Ther* 1992; **56**: 233–245.
- [90] SHING YG, CHRISTOFORI D, HANAHAHAN Y, ONO R, SASADA K, IGARASHI K, FOLKMAN J. Betacellulin a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 1993; **259**: 1604–1607.
- [91] SINGER AJ, CLARK RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; **341**: 738–746.
- [92] SOLIC N, DAVIES DE. Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration on colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1997; **234**: 465–476.
- [93] STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* 1993; **9**: 541–573.
- [94] STOLL SW, BENEDICT M, MITRA R, HINIKER A, ELDER JT, NUNEZ G. EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene* 1998; **16**: 1493–1499.
- [95] STOSCHECK CM, NANNEY LB, KING LE Jr. Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing. *J Investig Dermatol* 1992; **99**: 645–649.

- [96] TAIPALE JKK, KESKI-OJA J. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25378–25384.
- [97] TANAKA N et al Possible involvement of a novel STAM-associated molecule AMSH in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19129–19135.
- [98] THIERY JP, BOYER B. The junction between cytokines and cell adhesion. *Curr Op Cell Biol* 1992; **4**: 782–792.
- [99] THOMPSON SA, HARRIS A, HOANG D, FERRER M, JOHNSON GR. COOH-terminal extended recombinant ampiregulin with bioactivity comparable with naturally derived growth factor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17927–17931.
- [100] THREADGILL DW, DLUGOZ AA, HANSEN LA, TENNENBAUM T, LICHTI U., YEE D, LAMANT C, MOURTON T, HERRUP K, HARRIS RC, BARNARD JA, YUSPA SH, COFFEY RJ, MAGNUSON T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; **269**: 230–234.
- [101] TOYODA H, KOMURASAKI T, UCHIDA D, MORIMOTO S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997; **326**: 69–75.
- [102] TOYODA H, KOMURASAKI T, UCHIDA D, TAKAYAMA Y, ISOBE T, OKUYAMA T, HANADA K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 7495–7500.
- [103] TZAHAR E, YARDEN Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochem Biophys Acta* 1998; **1377**: M25–37.
- [104] WATABE M, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, TAKEICHI M. Effect of hepatocyte growth factor on cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell Struct Funct* 1993; **18**: 117–124.
- [105] WEN D, PELES E, CUPPLES R, SUGGS SV, BACUS SS, LUO Y, TRIAL G, HU S, SILBIGER SM, LEVY RB, KASKI RA, LU HS, YARDEN U. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992; **69**: 559–572.
- [106] WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91**: 439–442.
- [107] YAMADA KM, GEIGER B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 76–85.
- [108] YATES RA, NANNEY LB, GATES RE, KING LE Jr. Epidermal growth factor and related growth factors. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 687–694.
- [109] ZOZULA S, LIOUBIN M, HILL RJ, ABRAM C, GISHIZKY ML. Mapping signal transduction pathways by phage display. *Nature Biotechnol* 1999; **17**: 1193–1198.

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
E-mail: klein @ mol.uj.edu.pl

WYKORZYSTANIE ENDOCYTOZY KIEROWANEJ RECEPTORAMI DO SELEKTYWNEGO WPROWADZANIA GENÓW W TERAPII GENOWEJ

TARGETED GENE DELIVERY BY RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS FOR GENE THERAPY

Marta MICHALIK

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Wykorzystanie procesu endocytozy kierowanej receptorami (ER) umożliwiło opracowanie metod wektorowych ukierunkowanego wprowadzania makrocząsteczek do komórek docelowych. W artykule przedstawiono różne metody wprowadzania DNA do komórek oparte na wykorzystaniu procesu endocytozy. Szczegółowo omówiono wprowadzanie genów terapeutycznych do komórek docelowych za pośrednictwem niewirusowych wektorów zwanych koniugatami molekularnymi. Opisano konstrukcję tych wektorów, omówiono domeny, które wiążą DNA, ligandy odpowiedzialne za wiązanie z receptorami w błonie komórek docelowych, składniki, które ułatwiają uwalnianie wektora z endosomu oraz czynniki sygnałowe kierujące wprowadzane DNA do jądra komórki. Przedstawiono zalety i ograniczenia koniugatów molekularnych jako wektorów służących do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek i perspektywy ich wykorzystania dla celów terapii genowej *ex vivo* i *in vivo*. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 135–157)

Słowa kluczowe: terapia genowa, wprowadzanie genów, wektory niewirusowe, koniugaty molekularne, endocytoza kierowana receptorami

Summary: Receptor-mediated endocytosis (RME) is a type of delivery system by which therapeutic agents can be specifically transported to their targets. In this paper methods of delivery of macromolecules via RME are discussed. This review focuses on molecular conjugate vectors as a delivery system of therapeutic genes to targeted cells. Characteristic of DNA-binding agents, together with further factors such as cell-specific ligands, endosomal escape and nuclear localisation are discussed. Advantages and disadvantages of molecular conjugates and future perspectives of application of these vectors for gene therapy are considered.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *supl.* 16: 135–157)

Key words: gene therapy, gene delivery, non-viral vectors, molecular conjugates, receptor-mediated endocytosis

1. WSTĘP

Postęp w biologii molekularnej i biotechnologii dokonany w ostatnich 25 latach umożliwił wprowadzanie nowych metod do współczesnej medycyny. Do takich metod zalicza się m.in. terapię genową. Wiele chorób zostało rozpoznanych jako choroby genetyczne, które mają podłoże w nieprawidłowym funkcjonowaniu pojedynczego genu lub zespołu genów. Najskuteczniejszym sposobem leczenia chorób genetycznych wydaje się być stosowanie terapii genowej, która umożliwia leczenie przez naprawę, zamianę lub zablokowanie funkcji genu odpowiedzialnego za wystąpienie danej jednostki chorobowej. Podstawą tej metody jest wprowadzenie do zmienionych chorobowo komórek odpowiedniej informacji genetycznej, fragmentu DNA zastępującego własny, zmieniony gen i tym sposobem „naprawienie” niewłaściwie funkcjonujących komórek, tkanek, narządów lub całych organizmów [19], względnie selektywne blokowanie ekspresji i translacji odpowiednich genów [59].

Terapia genowa może dotyczyć komórek rozrodczych, zygoty przed pierwszym podziałem lub komórek somatycznych. Zabiegi na komórkach rozrodczych człowieka ze względu na nieprzewidywalność skutków w odniesieniu do potomstwa i ze względów etycznych są zabronione. Natomiast zabiegi prowadzone na komórkach somatycznych mogą umożliwić korygowanie defektów zarówno genetycznych, jak i niegenetycznych. Dlatego w wielu ośrodkach badawczych prowadzone są próby wprowadzania genów terapeutycznych do komórek somatycznych metodami *in vitro* oraz próby zastosowania terapii somatycznej do leczenia różnych schorzeń, metodą *ex vivo* lub *in vivo*. Chorobami, które próbuje się zwalczać tymi metodami, są zarówno choroby genetyczne: mukowiscydoza [19, 83, 100], hemofilia [48, 114], ADA (ostry złożony zespół niedoboru odporności) [27, 35], fenyloketonuria [43], adrenoleukodystrofia [92], choroba Gauchera [28], dystrofia mięśniowa Duchennea [42] i inne, jak również choroby nabyte, między innymi: nowotwory [13, 41, 55, 71, 73, 86], choroby układu krążenia [25, 29, 91], choroby neurodegeneracyjne [40, 58], AIDS [13, 43, 56, 61, 67].

Zasadniczą trudnością w rozwoju terapii genowej (dotychczas nie w pełni rozwiązana) jest opracowanie specyficznego, powtarzalnego i wydajnego sposobu wprowadzania genu terapeutycznego do organizmu chorego, a najlepiej do wybranego narządu lub tkanki. Drugą istotną trudnością napotykaną po transfekcji komórek jest zapewnienie właściwej regulacji ekspresji wprowadzonego genu.

2. WPROWADZANIE GENÓW DO KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH

Bardzo trudne jest wprowadzanie fragmentów DNA (lub plazmidów z wbudowanym genem terapeutycznym) do komórek docelowych z odpowiednią wydajnością i swoistością oraz z zachowaniem niezmienionej struktury i właściwości wprowadzanego genu, tak by mógł on ulec ekspresji w komórce, do której zastał wprowadzony. Opracowano wiele różnych metod wprowadzania makrocząsteczek do komórek. Można wśród nich wyróżnić:

I. metody fizyko-chemiczne, takie jak:

- bezpośrednie wprowadzenie za pomocą mikroiniekcji [11],
- elektroporacja [2],
- techniki biobalistyczne [5],
- odwracalna perforacja i permeabilizacja błon [53],
- precypitacja z CaPO_4 [103];

II. metody wykorzystujące takie przENOŚniki, jak:

- liposomy (liposomy kationowe, anionowe, obojętne, proteoliposomy) [64, 82],
- wektory wirusowe [54, 79],
- wektory niewirusowe [14, 17].

Do pierwszej grupy metod należą techniki, w których DNA wprowadza się do komórek stosując metody fizyczne lub chemiczne [86]. Metody te są zwykle uciążliwe w stosowaniu, charakteryzują się różną wydajnością, która zależy od rodzaju metody. Są dość powszechnie stosowane w badaniach podstawowych i mogą być przydatne w inżynierii komórkowej wykorzystywanej w biotechnologii, ale trudno sobie wyobrazić ich użycie w terapii *in vivo*. Jak dotychczas służą przede wszystkim do konstruowania linii komórek produkujących wektory wirusowe.

Do drugiej grupy metod należą techniki, w których konstruuje się „prENOŚniki” (wektory) zdolne do przekazywania informacji genetycznej do komórek. Dopiero opracowanie systemów „prENOŚnikowych” (liposomy i wektory) umożliwiło badania zmierzające do wydajnego i selektywnego wprowadzania genów do komórek docelowych. Wśród konstruowanych wektorów można wyróżnić:

I. wektory wirusowe, takie jak:

- retowirusowe [45],
- adenowirusowe [20, 105],
- tworzone z wirusów adenosatelitarnych (ang. *Adeno-Associated Virus*) [9, 89],
- oparte na herpeswirusach typu 1 (ang. *Herpes Simplex Virus*) [95],
- oparte na innych wirusach (*Polio*, *Vaccinia*, *Sindbis*) [51, 75];

II. wektory niewirusowe, takie jak np.:

- koniugaty molekularne [34].

Należy zaznaczyć, że dotychczas tylko wektory retrowirusowe, adenowirusowe i lipofekcja są stosowane w terapii w niektórych ośrodkach klinicznych [1, 27, 45], a w ostatnich latach wektory tworzone z wirusów adenosatelitarnych i wirusów *Herpes Simplex* zostały dopuszczone do prób klinicznych [30, 95]. Pozostałe metody to systemy eksperymentalne, testowane na zwierzętach i w hodowlach komórek *in vitro*.

Tworzenie różnych typów liposomów, sposoby pułapkowania w ich wnętrzu genów terapeutycznych, czynniki ułatwiające fuzję liposomów z błonami komórek docelowych i sposoby uwalniania DNA do cytoplazmy komórek zostały opisane w pracach przeglądowych [46, 64, 82, 112]. Również, wykorzystanie wirusów jako wektorów w terapii genowej, wydajność tych wektorów, efekty uboczne związane z ich wprowadzaniem do komórek i możliwości zastosowań klinicznych tych wektorów zostały omówione w wielu pracach przeglądowych zarówno w języku angielskim [40, 57, 74, 79, 92], jak i języku polskim [43, 44, 54], dlatego pominięte przedstawianie tych wektorów w niniejszym artykule ograniczając się do omówienia wektorów niewirusowych zwanych koniugatami molekularnymi (ang. *molecular conjugates*) albo polipeksami białko/DNA (ang. *protein/DNA polyplexes*).

3. ENDOCYTOZA RECEPTOROWA NARZĘDZIEM DO SPECYFICZNEGO WPROWADZANIA KONIUGATÓW MOLEKULARNYCH DO KOMÓREK DOCELOWYCH

Metoda wprowadzania DNA do komórek przy użyciu wektorów zwanych koniugatami molekularnymi oparta jest na wykorzystaniu endocytozy kierowanej receptorami (por. rys. 2), która jest wysoce specyficznym i selektywnym procesem transportu substancji zewnątrzkomórkowych do cytoplazmy, z udziałem błony komórkowej. Ligandy obecne w środowisku po związaniu z komplementarnymi receptorami na powierzchni komórki są internalizowane i transportowane do wnętrza komórki jako kompleksy makrocząsteczek z receptorami, zawarte w pęcherzykach zwanych endosomami [66]. Endosomy nie są przemieszczane w komórce w sposób przypadkowy, ale są kierowane do odpowiednich przedziałów cytoplazmy przez specyficzne białka odpowiedzialne za kierunkowość transportu wewnątrzkomórkowego i fuzję endosomów z pęcherzykami przedziału docelowego lub błoną komórkową (białka z rodziny Rab, białka ARF, t-SNARE i v-SNARE) [62, 63, 80].

Los zinternalizowanych kompleksów ligand-receptor zależy przede wszystkim od typu komórki, w której zachodzi endocytoza oraz rodzaju ligandu związanego przez specyficzny receptor [63, 93]. Zazwyczaj w kwaśnym pH endosomu ligandy, takie jak np. LDL (lipoproteiny o małej gęstości), EGF, PDGF, kalcitonina, kate-

cholamina, insulina, interferon oddysocjują od receptorów. Receptory w pęcherzykach ulegających recykulacji (ang. *recycling endosomes*) powracają do tej samej domeny błony komórkowej, a ligandy zawarte w endosomach wczesnych przechodząc przez kolejne przedziały w komórce (endosomy sortujące, późne endosomy) kierowane są do lizosomów, w których ulegają degradacji [66]. Gdy w kwaśnym pH endosomu ligand pozostaje związany z receptorem (np. transferyna), wówczas zachodzi recykulacja zarówno receptorów, jak i ligandów, przy czym ligandy są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a receptory zostają wbudowane do błony komórkowej. W komórkach spolaryzowanych, w których zachodzi proces transcytozy, często ligandy i receptory transportowane są przez komórkę i wbudowywane do błony komórkowej po przeciwległej stronie komórki (np. IgA). Gdy ligandami w endocytozie receptorowej są wirusy lub toksyny, wtedy ich receptory ulegają recykulacji do błony komórkowej, ale ligandy są uwalniane bezpośrednio do cytoplazmy [93].

Komórki ssaków mają właściwe sobie receptory powierzchniowe, które umożliwiają wiązanie i pobieranie na drodze endocytozy różnych ligandów (por. tab.1). Niektóre typy komórek wykazują na swojej powierzchni znacznie większą ekspresję specyficznych receptorów dla określonych związków (białek, peptydów, wielocukrów) niż inne komórki tego samego organizmu, narządu lub tkanki. Znajomość ligandów dla receptorów powierzchniowych specyficznych dla określonego typu komórek ssaków została wykorzystana w konstrukcji wektorów do selektywnego wprowadzania DNA do wybranych komórek docelowych [17, 47]. Wektory te, zwane koniugatami molekularnymi (ang. *molecular conjugates*), składają się z ligandu połączonego kowalencyjnie z białkiem lub peptydem, z którym dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym związane jest terapeutyczne DNA.

Pierwszy koniugat molekularny skonstruowali Wu G. i Wu C. w 1987 r. Wybrany przez nich ligandem kowalencyjnie związanym z kompleksem białko/DNA (polipleks) była glikoproteina asialoorosomukoid (ASOR), która jest specyficznie pobierana w drodze endocytozy receptorowej przez komórki wątrobowe. Autorzy ci plazmid pSV2CAT z wbudowanym genem dla bakteryjnego enzymu CAT (acetylotransferazy chloramfenikolu) wprowadzili w polipleksie ASOR/białko/DNA do komórek HepG2, które wykazują silną ekspresję receptorów asjaloglikoproteinowych (250 000 receptorów/komórkę). Komórki HepG2 wykazywały wysoką wydajność transfekcji i ekspresję genu CAT [108]. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* zostały potwierdzone przez badania na zwierzętach. Wprowadzenie myszom za pomocą dożylniej iniekcji doogonowej koniugatu molekularnego ASOR/białko/CAT, ze znakowanym radioaktywnie genem, wykazało znacznie wyższą radioaktywność w komórkach wątroby niż w innych komórkach organizmu (ok. 85%). Gdy samo znakowane DNA (nie wbudowane do koniugatu molekularnego) wprowadzono bezpośrednio do krwioobiegu zwierzęcia, tylko 17% znakowanego DNA znajdowano w komórkach wątroby [109]. Obiecujące wyniki pierwszych prób zastosowania

TABELA 1. Typy ligandów pobierane przez komórki ssaków w procesie endocytozy kierowanej receptorami (wg [93] zmodyfikowane)

Hormony i czynniki wzrostu	Toksyny i lektyny	Wirusy i bakterie	Białka przenośnikowe surowicy i przeciwciała	Witaminy i jony metali
Kalcitonina Katecholamina Glukagon Insulina Parathormon Progesteron Oksytocyna Wazopresyna Tyrotropina Prolaktyna Hormon lutenizujący Kortykotropina Somatotropina Somatostatyna Somatoliberyna Gonadoliberyna Tyreoliberyna Kortykoliberyna Interferon EGF NGF PDGF FGF	Toksyny i lektyny Toksyny bakteryjne: przecinkowca cholery dyfterotoksyna egzotoksyna <i>Pseudomonas</i> termolabilna toksyna <i>Escherichia coli</i> enterotoksyny A i B szczepów <i>Staphylococcus</i> Toksyny grzybicze: sarcyna amanityna Toksyny roślinne: rycyna saporyna modecyna abryna gelonina nigryna b Lektyny: konkanawalina A aglutyninga z zarodków pszenicy lektyna z orzeszków ziemnych	Adenowirus Wirus mięsaka Rousa Rotawirus Reowirus Wirus niedoboru odporności (HIV) <i>Semliki forest virus</i> <i>Vesicular stomatitis virus</i> <i>Varicella Zoster</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Szczepy <i>Klebsiella</i> Szczepy <i>Enterobacter</i> Szczepy <i>Serratia</i>	LDL IgE IgG wiążące receptor Fc IgG matczyne Polimeryczna IgA Transferyna Transkobalamina Białka żółtka	Żelazo/transferyna Kwas foliowy Ryboflawina Witamina B ₁₂

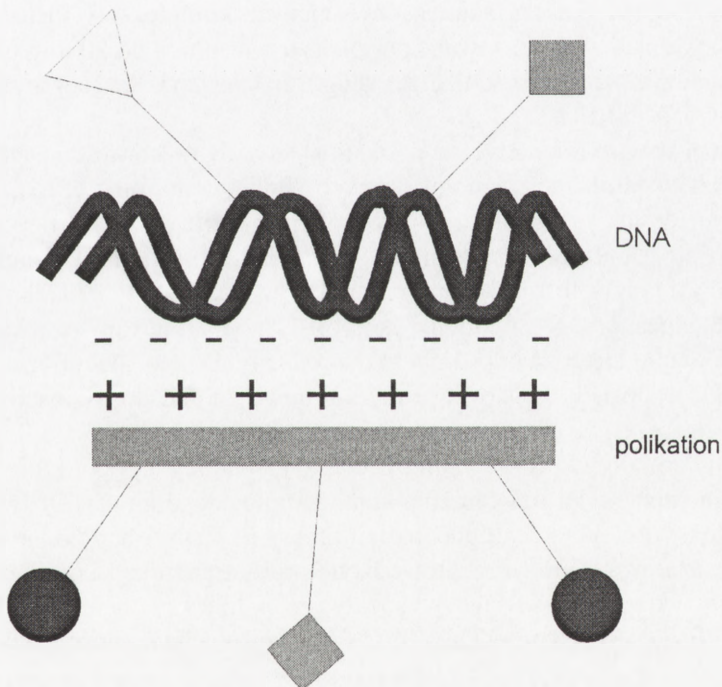
Sposowane skróty: EGF – epidermalny czynnik wzrostowy, NGF – czynnik wzrostu nerwu, PDGF – płytkowy czynnik wzrostowy, FGF – fibroblasty czynniki wzrostowy, LDL – lipoproteiny o małej gęstości, IgE – immunoglobulina E, IgG – immunoglobulina G, IgA – immunoglobulina A.

koniugatów molekularnych do selektywnego wprowadzania genów do określonych komórek zapoczątkowały w wielu pracowniach badania nad opracowaniem nowych niewirusowych wektorów dogodnych dla terapii genowej różnych schorzeń.

4. KONIUGATY MOLEKULARNE

Schemat budowy koniugatów molekularnych zwanych też polipleksami białko/DNA przedstawia rysunek 1. Wektory te złożone są zazwyczaj z 4 domen:

- 1 – domena, która wiąże wprowadzane DNA (ang. *DNA-binding agent*),
- 2 – ligand, który specyficznie wiąże się z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej (ang. *cell-specific targeting ligand*),
- 3 – czynnik lizujący, który umożliwia uwolnienie wektora z endosomu do cytoplazmy (ang. *endosomal lysis agent*),
- 4 – domena ułatwiająca wprowadzenie genu do jądra komórkowego (ang. *nuclear localization signals*).



RYSUNEK 1. Schemat budowy koniugatu molekularnego. Gen terapeutyczny lub oligonukleotydy (DNA) połączony jest wiązaniem jonowym z czynnikiem wiążącym (polikation), z którym związane są również: ligand (kwadrat), który specyficznie wiąże się z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej, czynnik lizujący (trójkąt), który umożliwia uwolnienie wektora z endosomu do cytoplazmy oraz domena (koło) ułatwiająca wprowadzenie genu do jądra komórkowego; (na podstawie danych [17, 39, 94, 101])

4.1. Domeny, które wiążą DNA (ang. *DNA-binding agents*)

W koniugatach molekularnych odpowiednio dobrany gen terapeutyczny, który ma być wprowadzony do komórki docelowej, musi zostać połączony z domeną wiążącą w taki sposób, aby nie uszkodzić struktury wprowadzanego genu i umożliwić skonstruowanie wektora o jak najkorzystniejszych parametrach dla pobrania go przez komórkę w drodze endocytozy.

Najpowszechniej stosowanym do wiązania DNA czynnikiem jest poli-L-lizyna (PLL), polikation złożony z powtarzających się reszt lizyny o długości cząsteczki od 15 do około 1000 reszt lizynowych [17, 34, 99, 101, 108]. Powstanie kompleksu PLL-DNA następuje przez utworzenie wiązania jonowego między obdarzonymi ładunkiem dodatnimi grupami aminowymi PLL, a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA. Podczas reakcji wiązania zachodzi zmiana konformacji cząsteczki DNA z kowalencyjnie ciągłej struktury kolistej lub superhelikalnej na strukturę pierścieniową (*toroid structure*). Powstające struktury mają średnice 80–100 nm, co umożliwia ich pobieranie w drodze endocytozy przez większość komórek ssaków [18, 98]. Jak wykazano doświadczalnie, wielkość cząsteczki PLL ma duży wpływ na kształt, wielkość i ładunek powstających kompleksów PLL-DNA [34]. Najbardziej stabilne i skondensowane polipleksy, o średnicy do 80 nm, uzyskiwano przy użyciu dużych cząsteczek PLL, o długości łańcucha liczącego ponad 1000 reszt lizynowych [110].

W pracowni Wagnera syntetyczne polikationy zostały wykorzystane jako domeny wiążące DNA w koniugatach molekularnych. Polietylenoimina (PEI), polimer o silnie rozgałęzionych łańcuchach, zsyntetyzowany z pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych amin, został wykorzystany do wprowadzenia kilku oligonukleotydów lub plazmidów do różnych typów komórek w hodowli *in vitro* [7]. PEI jako polikation ma zdolność wiązania DNA podobnie jak poli-L-lizyna, ale równocześnie pośredniczy w uwalnianiu DNA z endosomu do cytoplazmy. Dzięki specyficznej budowie cząsteczki, która posiada końcowe grupy aminowe zdolne do jonizacji w pH 6,9 i wewnątrzcząsteczkowe grupy aminowe zdolne do jonizacji w pH 3,9, polikation PEI wywołuje zmiany w pH wewnątrz pęcherzyka endocytarnego, które prowadzą do pęcznienia pęcherzyka i uwolnienia koniugatu z endosomu [7]. Doświadczalnie wykazano, że uwolnione do cytoplazmy polipleksy PEI/DNA bardzo łatwo wnikają do jądra komórkowego [36]. Przeprowadzone próby transfekcji komórek zarówno w hodowli *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że polipleksy ligand/PEI/DNA (np. transferyna/PEI/DNA lub anty-CD3/PEI/DNA) z wysoką wydajnością wprowadzają geny do ludzkich komórek nowotworowych mózgu i nerek oraz komórek nabłonka jelitowego [6, 7, 102].

Ostatnio doniesiono, że różne, rozpuszczalne w wodzie, polimery pochodnych metakrylanu i metakrylamidu są zdolne do tworzenia z DNA skondensowanych kompleksów i mogą być stosowane jako domeny wiążące DNA w koniugatach

molekularnych [97]. Van de Wetering i wsp. wykazali, że wydajność transfekcji komórek takimi polipleksami w znacznym stopniu zależy od rodzaju i wielkości cząsteczki polimeru, która jest domeną wiążącą DNA. Najwyższą wydajność transfekcji uzyskano przy zastosowaniu polimeru p(DMAEMA) (ang. *poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]*), który w fizjologicznym pH ulega protonowaniu i może działać destabilizująco na błonę endosomu, co w rezultacie prowadzi do rozerwania pęcherzyka i uwolnienia polipleksu do cytoplazmy komórki [97].

Naturalnymi białkami stosowanymi do wiązania DNA w koniugatach molekularnych są spermina i spermidyna [17, 65] oraz histony, białka, które wykazują zarówno zdolność upakowywania DNA, co ułatwia tworzenie małych polipleksów, jak i ułatwiają wnikiwanie wektorów do jądra komórkowego [3, 12].

4.2. Ligandy koniugatów molekularnych (ang. *cell-specific targeting ligands*)

Skonstruowanie pierwszego polipleksu, w którym gen *CAT* związany w koniugacie molekularnym z PLL i ze specyficznym ligandem (ASOR) został z dużą wydajnością wprowadzony do żądanych komórek (hepatocytów), było początkiem poszukiwań nowych wektorów, które przez wbudowanie właściwie dobranego ligandu zapewniłyby wysoką specyficzność wprowadzania DNA do wielu typów komórek docelowych. ASOR oraz inne asialoglikoproteiny zostały wykorzystane do konstrukcji polipleksów, przy zastosowaniu których można wprowadzać do hepatocytów geny terapeutyczne dla nowotworów wątroby, fenyloketonurii, analbuminemii [88]. W niektórych stanach patologicznych wątroby (cukrzyca, nowotworach, marskości wątroby) ekspresja receptorów asialoglikoproteinowych na powierzchni hepatocytów jest niska, co wyklucza stosowanie polipleksów ASOR/polikation/DNA do specyficznego wprowadzania genów terapeutycznych. Komórki takie można transfekować z dobrą wydajnością wykorzystując koniugaty molekularne, w których ligandem jest białko MCS (ang. *malaria circumsporozite*) [90].

Plank i wsp. wykazali, że asialoorosomukoid, białko, które wiąże się z receptorem asialoglikoproteinowym przez końcową grupę galaktozową, może być w polipleksach ASOR/PLL/DNA zastąpione przez syntetyczny koniugat galaktozowy nie powodując obniżenia wydajności i specyficzności wprowadzania DNA do komórek wątroby [76]. Doniesienie to zapoczątkowało poszukiwania syntetycznych ligandów wiążących się z receptorami komórek, do których mają być wprowadzone terapeutyczne geny.

Często stosowanym naturalnym ligandem, który jest wbudowywany do koniugatów molekularnych jest transferyna. Wykazano w badaniach *in vitro* na komórkach HL-60, SW403, Hep 2, Lovo, że polipleksy transferyna/polikation/DNA mogą być skuteczne w leczeniu m.in. nowotworów płuc i wątroby oraz w terapii genowej leukemii hematopoetycznej [87, 99]. Efektywność wprowadzania genów za po-

średnictwem transferyna/DNA polipleksów można znacznie zwiększyć w obecności takich związków, jak chelator Fe desferrioksamina (ang. *desferrioxamine*), które stymulują ekspresję receptorów transferyny na błonie komórek docelowych [14].

Zwiększona ekspresja receptorów dla EGF na komórkach nowotworowych została z powodzeniem wykorzystana do transfekcji różnych komórek rakowych (m. in. raka płuc) za pośrednictwem EGF/polikation/DNA polipleksów [23]. Również inne czynniki wzrostowe są wykorzystywane jako ligandy w koniugatach molekularnych, wówczas gdy komórkami docelowymi dla wprowadzanych genów są komórki wykazujące wysoką ekspresję receptorów dla tego czynnika. Wykorzystując FGF/PLL/DNA polipleksy skutecznie transfekowano ludzkie fibroblasty w hodowli pierwotnej [113].

Wiele typów komórek nowotworowych wykazuje na błonie komórkowej silną ekspresję receptorów folianowych, dlatego polipleksy kwas foliowy/polikation/DNA dają możliwość ukierunkowanego wprowadzania genów do komórek rakowych i zastosowania tych wektorów w terapii genowej nowotworów nerek, jelita, pęcherza, jajnika, mózgu, płuc [23, 37, 104].

W koniugatach molekularnych, które są konstruowane w celu ukierunkowanego wprowadzania genów terapeutycznych do zmienionych chorobowo komórek i tkanek, jako ligandy używane są różne makrocząsteczki, które mogą być specyficznie wiązane przez dany rodzaj komórek np. przeciwciała anti-CD3 i anti-CD5 do transfekcji ludzkich limfocytów T [10, 101], lektyny roślinne i lektyny bakteryjne do transfekcji komórek nabłonka jelitowego i nabłonka oddechowego [111], mannoza jako ligand wiążący polipleksy Man/PEI/DNA z komórkami dendrytycznymi (ang. *dendritic cells*) [24] i wiele innych.

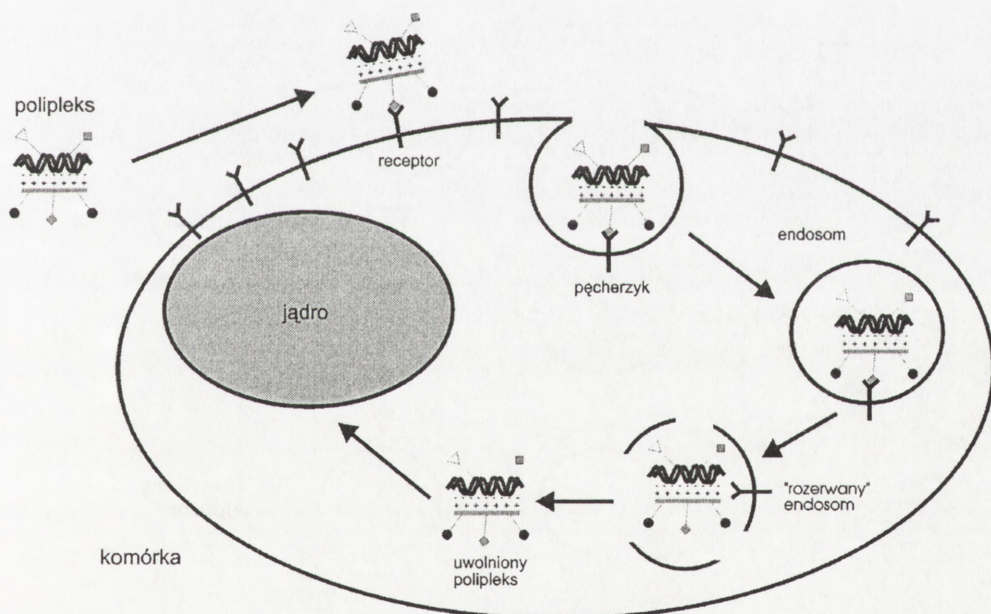
Właściwy dobór liganda i dołączenie go do domeny wiążącej DNA w koniugacie molekularnym zapewnia wysoką specyficzność wiązania wektora z komórką docelową zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, nie gwarantuje jednak zadowalającej wydajności wprowadzania wektora do komórki. Metodę zwiększenia wydajności transfekcji komórek przy zastosowaniu koniugatów molekularnych zaproponowali Muller i wsp. [68]. Autorzy ci jako ligand polipleksu wykorzystali kapsyd ludzkiego wirusa papiloma (HPV). Również replikowane, defektywne adenowirusy zastosowano jako ligandy polipleksów, dzięki którym z dobrą wydajnością wprowadzano geny terapeutyczne zarówno do komórek nowotworowych w hodowli, jak i w organizmie (np. gen supresorowy p53 do komórek raka płuc) [69, 70].

Ostatnio w celu zwiększenia wybiórczości wiązania i wydajności wprowadzania polipleksów do różnych komórek *in vivo* opracowano nowy typ wektorów ligand/polikation/DNA [4, 72]. W wektorach tych PLL lub PEI zostały kowalencyjnie związane z glikolem polietylenowym (PEG). Sprzężenie z PEG (ang. *PEGylation*) dodatkowo naładowanych cząsteczek koniugatów nadaje ich powierzchni ładunek ujemny, co zwiększa ich stabilność i znacząco redukuje wiązanie białek surowicy i agregację polipleksów wprowadzonych do krwioobiegu organizmu docelowego. Podane *in*

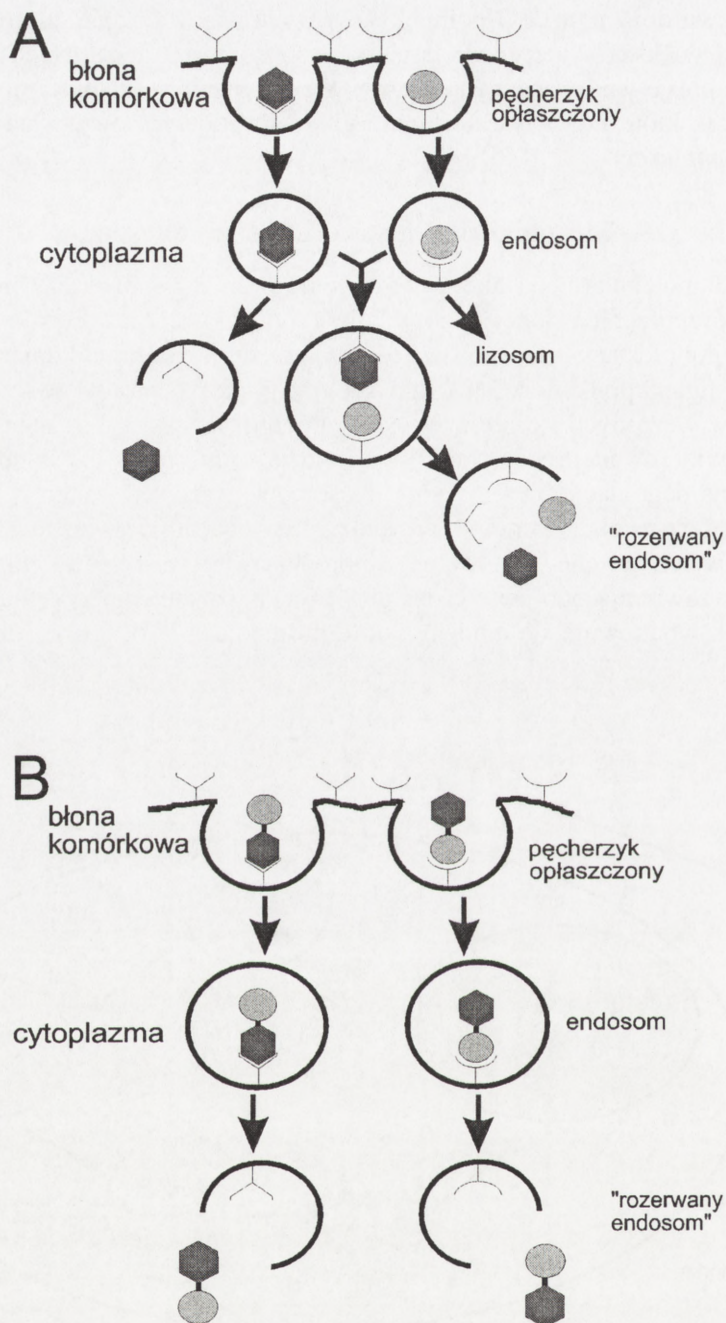
in vivo we wlewie dożylnym PEG-polipleksy są również „niewidoczne” dla makrofagów i wykazują większą skuteczność targetingu do komórek docelowych i znacznie wyższą ekspresję wprowadzanych genów, w porównaniu z analogicznie podanymi polipleksami, które nie były związane z glikolem polietylenowym (ang. *non-PEGylated complexes*) [72, 102].

4.3. Składniki uwalnijące DNA z endosomów

Koniugat molekularny dostaje się do komórki w drodze endocytozy receptorowej (rys. 2), której przebieg zależy od typu komórki docelowej oraz rodzaju i wielkości cząsteczki polipleksu wiążącego się z receptorem na powierzchni komórki. Zwykle polipleksy ligand/polikation/DNA oddysocjują od receptorów w kwaśnym pH endosomów wczesnych i przechodzą kolejne etapy charakterystyczne dla procesu endocytozy kierowanej receptorami wraz z fuzją endosomu z lizosomem. W celu ograniczenia degradacji przez enzymy lizosomowe wprowadzonego w koniugacie DNA, często transfekcję komórek prowadzi się w obecności związków, które podnoszą pH wewnątrz endosomów (np. chlorochina) [39, 106]. Aby zapobiec fuzji endosomu (zawierającego wprowadzany wektor) z lizosomem, do koniugatów molekularnych wbudowuje się domeny, które pośredniczą w destrukcji endosomów.



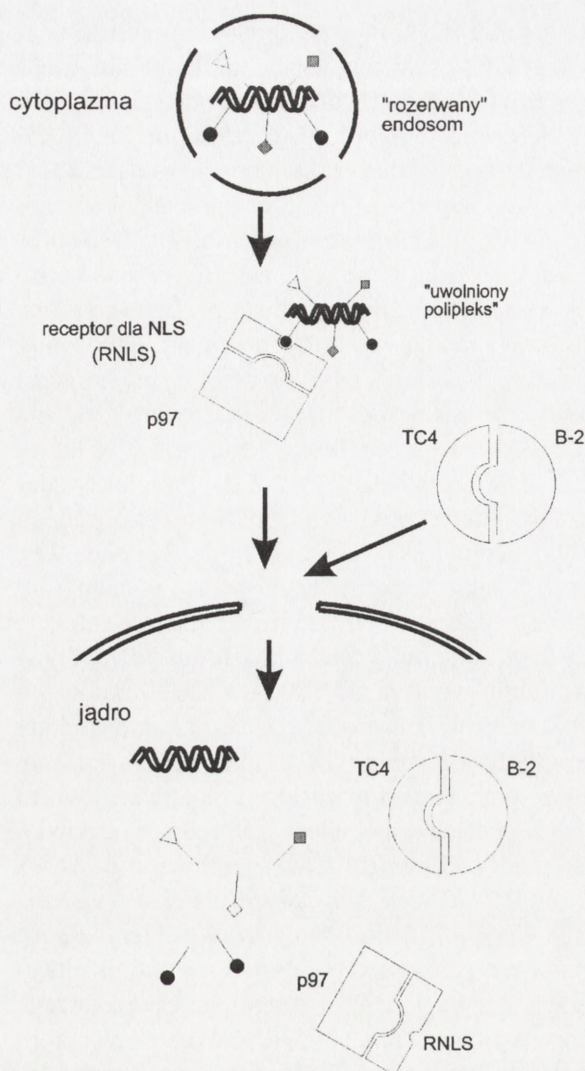
RYSUNEK 2. Wprowadzanie koniugatów molekularnych (polipleksów) do komórki docelowej w drodze endocytozy kierowanej receptorami; (schemat na podstawie rysunku 1 i danych [17, 39, 94, 101])



RYSUNEK 3. Wprowadzanie DNA do komórek wątroby za pośrednictwem polipeksów ASOR/PLL/DNA: A – transfekcja komórek równocześnie defektywnym adenowirusem (sześciąt) i polipeksem ASOR/PLL/DNA (koło). B – transfekcja komórek polipeksem adenowirus-/ASOR/PLL/DNA, opis w tekście w rozdziale 4.3 (wg [18] zmodyfikowane)

Curiel i wsp. opracowali metodę, w której wykorzystali defektywny ludzki adenowirus (dl312 otrzymany z genu E1a) jako czynnik uwalniający koniugaty z endosomów [21]. Adenowirusy są internalizowane do komórek w drodze endocytozy kierowanej receptorami i wydostają się bezpośrednio do cytoplazmy podstawowej komórki gospodarza dzięki fuzji wirusowego kapsydu z błoną endosomu, co prowadzi do utworzenia porów w błonie pęcherzyka i lizy endosomu [38]. Inkubacja komórek ze zreplikowanym defektywnym adenowirusem i poliplexsem ligand/PLL/DNA prowadzi do internalizacji obu typów cząstek, które są związane niezależnie przez swoiste receptory na błonie komórki (rys. 3 A). Dzięki fuzji powstałych pęcherzyków oba rodzaje pobranych makrocząsteczek mogą dostać się do tego samego endosomu, co w końcu prowadzi do lizy pęcherzyka i uwolnienia DNA do cytoplazmy komórki [21]. Zastosowanie tej metody zwiększyło w istotny sposób wydajność wprowadzania genów do komórek docelowych. Opracowano modyfikację tej metody, w której adenowirusy są bezpośrednio dołączane do polipleksów (rys. 3 B). Poliplexy adenowirus/ligand/PLL/DNA po związaniu z receptorem (albo dla ligandu obecnego w koniugacie molekularnym, albo dla adenowirusa) na błonie komórki docelowej, dostają się do endosomów, w których dzięki obecności adenowirusa dochodzi do lizy pęcherzyka i uwolnienia polipleksu do cytoplazmy komórki [22]. W efekcie stosowania kompleksów molekularnych w połączeniu z adenowirusem poziom ekspresji genów wprowadzanych do komórek wzrastał od 1000 do 2000 razy w porównaniu do stosowania samych polipleksów zawierających takie same ligandy (ASOR, transferyna, EGF, FGF, kwas foliowy i inne) [18, 21, 20, 50]. Wykazano, że wykorzystanie polipleksów połączonych z adenowirusami umożliwia również skuteczną transfekcję komórek, które nie posiadają specyficznych receptorów powierzchniowych. Za pomocą polipleksów adeno/EGF/PLL/DNA wprowadzono DNA do komórek raka płuc linii SCLC (ang. *small cell lung cancer*), które wykazują niską ekspresję receptorów EGF [32]. Chociaż adeno-koniugaty charakteryzują się znaczną efektywnością wprowadzania terapeutycznego DNA do komórek docelowych, to ich zastosowanie w terapii genowej *in vivo* jest ograniczone, przede wszystkim z powodu niespecyficznego wprowadzania polipleksów (przez receptory wiążące adenowirusy) do różnych typów komórek, jak również przez wzrost toksyczności spowodowany białkami ludzkich wirusów [18]. Aby obniżyć toksyczność stosowanych adeno-polipleksów, podjęto próby wprowadzania kurzych wirusów jako składnika koniugatu, który doprowadza do lizy endosomów i powoduje uwolnienie DNA do cytoplazmy komórek docelowych, np. kurzy adenowirus (*CELO Virus*) daje bardzo dobre rezultaty w transfekcji komórek ludzkich, porównywalne do otrzymywanych przy stosowaniu ludzkich defektywnych adenowirusów [16].

W celu uniknięcia toksyczności koniugatów molekularnych połączonych z defektywnymi adenowirusami w wielu pracowniach skoncentrowano badania na znalezieniu niewirusowych czynników lizujących. Rafalski i wsp. wyizolowali 20-aminokwasowy, N-końcowy peptyd z hemaglutyniny HA-2 wirusa grypy i wbu-



RYSUNEK 4. Aktywny transport koniugatów molekularnych do jądra komórki, opis w tekście w rozdziale 4.4; (schemat na podstawie rysunku 2 i danych [17, 39, 94, 101])

dowali go do polipeksu transferyna/PLL/DNA. Peptyd ten, przez insercję do błony endosomu i tworzenie w niej porów, które prowadzą do lizy pęcherzyka, ułatwia wprowadzanie DNA do cytoplazmy i jądra komórki docelowej [78, 102].

W ostatnich latach wykazano, że uwolnienie koniugatów molekularnych z endosomu komórki można znacznie ułatwić przez dodanie syntetycznych, amfipatycznych peptydów anionowych, które w kwaśnym pH destabilizują dwuwarstwą lipidową błonę i działają podobnie jak peptydy wirusowe. Peptydy takie (np. peptyd GLFEALLELLESLWELLLEA) zwiększają od 100 do 1000 razy wydajność transfekcji różnych linii komórek w hodowli *in vitro*, w zależności od rodzaju peptydu, wielkości cząsteczki wprowadzanego DNA, rodzaju i wielkości polikationu wiążącego DNA i typu komórki docelowej [26, 49].

Innymi czynnikami pośredniczącymi w uwalnianiu DNA z polipeksów wprowadzonych do komórek docelowych są białka strukturalnie zbliżone

do toksyn bakteryjnych, np. białko GD5 odpowiadające podjednostce toksyny krztuśca lub białko ETA strukturalnie przypominające egzotoksynę A bakterii szczepu *Pseudomonas*. Białka te naśladując toksyny bakteryjne omijają w szlaku endocytozy fuzję endosomu z lizosomem i ułatwiają wprowadzanie DNA do jądra komórkowego [31, 96]. Wciąż prowadzone są poszukiwania niewirusowego czynnika, który wbu-

dowując się z polipleksem do endosomu może prowadzić do efektywnego uwalniania wektora do cytoplazmy komórki docelowej.

4.4. Domeny ułatwiające wprowadzenie wektora do jądra komórki (ang. *nuclear localization signals*)

Główną przeszkodą w wykorzystaniu koniugatów molekularnych do terapii genowej jest fakt, że kierunkowo wprowadzony do komórki docelowej gen nie ulega w niej ekspresji, gdyż uwolniony do cytoplazmy koniugat nie dostaje się do jądra komórki [84, 94]. Aby zapewnić aktywny transport koniugatu do jądra, do polikationu wiążącego DNA dołączana jest domena sygnałowa NLS (ang. *nuclear localization signals*) [12], białko lub peptyd zawierający charakterystyczną sekwencję aminokwasową obecną w wielu polipeptydach jądrowych (np. histonie H1). Po uwolnieniu polipeksu z endosomu do cytoplazmy komórki koniugat zostaje rozpoznany przez specyficzny receptor cytoplazmatyczny RNLS (rys. 4). Aktywność receptora RNLS jest stymulowana przez inne cytoplazmatyczne białko zwane p97 [77]. Kompleks RNLS-koniugat molekularny wiązany jest w obrębie poru otoczki jądrowej. Równocześnie kompleks białek B-2 i TC4 stymuluje translokację koniugatu do jądra, uczestniczy w dysocjacji polipeksu i uwolnieniu terapeutycznego DNA, które w jądrze komórki ulega integracji z genomem komórki docelowej i podlega transkrypcji [94].

Ostatnio wykazano doświadczalnie i na podstawie komputerowego modelowania molekularnego, że istotnym czynnikiem limitującym ekspresję wprowadzanego genu jest dysocjacja koniugatu molekularnego w jądrze i uwolnienie DNA, które w znacznej mierze zależy od wielkości i rodzaju cząsteczki polikationu wiążącego DNA [84]. Jak doniesiono z pracowni Wagnera, ekspresja genów wprowadzanych za pomocą polipeksów do komórek w hodowli *in vitro* w istotny sposób zależy również od fazy cyklu komórkowego, w której znajdują się transfekowane komórki. Gdy komórki znajdowały się w fazie S lub G2, aktywność luciferazy, której gen wprowadzano za pośrednictwem różnych typów polipeksów (np. transeryna/PLL lub transferyna/PEI lub adeno/PEI), była od 30 do 500 razy wyższa niż w transfekowanych komórkach, które znajdowały się w fazie G1 cyklu [8]. Wyniki tych doświadczeń wskazują na potencjalnie znacznie większą przydatność stosowania polipeksów do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek szybko dzielących się niż do komórek nie proliferujących.

5. ZALETY I OGRANICZENIA KONIUGATÓW MOLEKULARNYCH

Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują, że koniugaty molekularne mogą stać się znacznie bardziej wszechstronnymi wektorami niż inne

dotychczas stosowane. Wektory te wykazują największą specyficzną targetingu genów terapeutycznych lub oligonukleotydów do wielu typów komórek, umożliwiając ich wprowadzanie zarówno do komórek *in vitro*, jak i *in vivo*, mogą być wykorzystane przy przenoszeniu genów do komórek proliferujących i komórek nie dzielących się. Wektory te pozbawione są szeregu ograniczeń, które mają wektory wirusowe, takich jak: niebezpieczeństwo integracji genomu wirusa z genomem komórki gospodarza, możliwość przypadkowej eliminacji komórek docelowych oraz neutralizacji lub zniszczenia produktu wprowadzonego genu terapeutycznego przez białka wirusa, który został zastosowany jako wektor [17, 34, 81].

Obecnie stosowanie polipleksów do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek ma dwa główne ograniczenia: stosunkowo niską wydajność transferu genów i często przejściową ekspresję wprowadzanych genów. Najbardziej obiecującymi zaletami tych wektorów jest potencjalne bezpieczeństwo ich stosowania oraz znacznie większa niż innych wektorów kierunkowość wprowadzania genów [17, 94]. Wyniki badań przeprowadzonych w różnych pracowniach na wielu typach komórek w hodowli oraz na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że koniugaty molekularne będą mogły być stosowane do leczenia chorób zarówno metodami *ex vivo*, *in situ* (miejscowo), jak też *in vivo*. Odpowiedni wybór polipleksu zapewniający wysoką skuteczność targetingu daje potencjalną możliwość stosowania tych wektorów nawet w przypadkach, gdy sukces terapeutyczny zależy od eliminacji komórek docelowych. Wysoka wybiórczość transferu genów do komórek docelowych za pośrednictwem polipleksów wskazuje na możliwość zastosowania tych wektorów w terapii chorób dziedzicznych, która nie wymaga znacznej wydajności wprowadzania genu terapeutycznego.

W leczeniu wielu chorób dziedzicznych zazwyczaj wystarcza, aby tylko część zmienionych chorobowo komórek została „naprawiona” i zaczęła prawidłowo funkcjonować. W terapii genowej wielu chorób nabytych, a szczególnie nowotworów (do leczenia których wciąż poszukuje się nowych, skutecznych metod), konieczna jest zarówno doskonała selektywność, jak i duża wydajność transferu genów. Jak wskazują wyniki doświadczeń przeprowadzanych na różnych typach komórek nowotworowych, koniugaty molekularne, które wykorzystują drogę endocytozy kierowanej receptorami do wnikania do komórek, spełniają wymóg wybiórczego wprowadzania DNA do komórek docelowych najlepiej ze wszystkich dotychczas stosowanych wektorów [17, 23, 39, 104]. Aby osiągnąć zadowalającą wydajność targetingu do komórek nowotworowych, istotne wydaje się dobranie odpowiedniej strategii terapii antynowotworowej. Omówienie tego zagadnienia mogłoby być tematem niezależnego artykułu i zostało w mniej lub bardziej szczegółowy sposób opisane w kilku artykułach przeglądowych [43, 55, 86], dlatego zasygnalizuję tylko najważniejsze ze stosowanych strategii. Są to:

- wprowadzanie do komórek nowotworowych genów „samobójczych”,
- immunostymulacja,
- „naprawa nowotworów” za pomocą terapii antysensowej przez wprowadzanie do komórek oligonukleotydów, które hybrydując z DNA gospodarza lub mRNA genu docelowego, powodują „wyciszenie” onkogenów lub stymulację anty-onkogenów i mogą hamować niekontrolowane podziały komórek [59].

Wyniki badań przeprowadzonych na różnych komórkach nowotworowych w hodowli *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że koniugaty molekularne będą mogły być wprowadzone do prób klinicznych do leczenia różnych typów nowotworów ludzkich po opracowaniu optymalnej strategii terapii [33, 60, 88, 104].

Porównanie polipleksów z innymi dotychczas stosowanymi wektorami wskazuje, że prawdopodobnie wkrótce koniugaty molekularne zostaną dopuszczone do prób klinicznych i w najbliższej przyszłości staną się bardzo dobrym narzędziem w terapii genowej. Wydaje się też możliwe, że w krótkim czasie zostaną skonstruowane tzw. „syntetyczne wirusy”, które zachowując wszystkie zalety koniugatów będą miały zdolność kierunkowego uwalniania wprowadzanych genów, którą można osiągnąć przez dołączenie do wektora, obok wprowadzanego genu, również promotora tkankowo-specyficznego odpowiadającego za wybiórczą transkrypcję genu terapeutycznego [17, 34, 33, 81]. Należy pamiętać, że wektory przyszłości powinny cechować się wysoką pojemnością, wydajnością i selektywnością, zapewniać właściwą integrację genu terapeutycznego z genomem komórki gospodarza oraz działać bez wywoływania skutków ubocznych. Znalezienie za pomocą inżynierii komórkowej takich wektorów rozwiązałoby problem targetingu genów i oligonukleotydów skierowany selektywnie do wybranych komórek i pozwoliłoby wielokrotnie obniżyć bardzo wysokie dotychczasowe koszty terapii genowej wielu chorób [52].

LITERATURA

- [1] ANDERSON WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; **392**(6679Suppl): 25–30.
- [2] ANDREASON GL, EVANS GA. Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechnology* 1988; **6**: 650–659.
- [3] BALICKID, BEUTLER E. Histone H2A significantly enhances *in vitro* DNA transfection. *Mol Med* 1997; **3**: 782–787.
- [4] BENNS JM, KIM SW. Tailoring new gene delivery designs for specific targets. *J Drug Target* 2000; **8**: 1–12.
- [5] BIEWENGA JE, DESTREE OH, SCRAMA LH. Plasmid-mediated gene transfer in neurones using the biolistics technique. *J Neurosci Methods* 1997; **71**: 67–75.
- [6] BOLETTA A, BENIGNI A, LUTZ J, REMUZZI G, SORIA MR, MONACO L. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 1243–1251.
- [7] BOUSSIF O, LEZOUALCH F, ZANTA MA, MERGNY M, SCHERMAN D, DEMENEIX B, BEHR JR. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7297–7301.

- [8] BRUNNER S, SAUER T, CAROTTA S, COTTEN M, SALTIK M, WAGNER E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 401–407.
- [9] BUELER H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *J Biol Chem* 1999; **380**: 618–622.
- [10] BUSCHLE M, COTTEN M, KIRLAPPOS H, MECHTLER K, SCHAFFNER G, ZAUNER W, BIRSTIEL ML, WAGNER E. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 753–761.
- [11] CELIS JE. Microinjection of somatic cells with micropipettes: Comparison with other techniques. *Biochem J* 1984; **223**: 281–291.
- [12] CHEN J, STICKLES R, DAICHENDT K. Galactosylated histone-mediated gene transfer and expression. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 429–436.
- [13] COSTELLO E, MUNOZ M, BUETTIE, MEYLAN PR, DIGGELMANN H, THALI M. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 2000; **7**: 596–604.
- [14] COTTEN M, LANGLE-ROUAULT F, KIRLAPPOS H, WAGNER E, MECHTLER K, ZENKE M, BEUG H, BIRSTIEL ML. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukaemic cells: stimulation by agent that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4033–4037.
- [15] COTTEN M, WAGNER E. Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol* 1993; **4**: 705–710.
- [16] COTTEN M, WAGNER E, ZATLOUKAL K, BIRSTIEL ML. Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants. *J Virol* 1993; **67**: 3777–3785.
- [17] CRISTIANO RJ. Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy. *Front Biosci* 1998; **3**: d1161–1170.
- [18] CRISTIANO RJ, SMITH LC, KAY MA, BRINKLEY BR, WOO SLC. Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilising a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11548–11552.
- [19] CRYSTAL RG. The gene as the drug. *Nature Medicine* 1995; **1**: 15–17.
- [20] CURIEL DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **886**: 158–171.
- [21] CURIEL DT, AGARWAL S, WAGNER E, COTTEN M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8850–8854.
- [22] CURIEL DT, WAGNER E, COTTEN M, BIRNSTIEL ML, AGARWAL S, LI C, LOECHEL S, HU P. High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 147–154.
- [23] DACHS GU, DOUGHERTY GJ, STRATFORD IJ, CHAPLIN DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997; **9**: 313–325.
- [24] DIEBOLD SS, KURSA M, WAGNER E, COTTEN M, ZENKE M. Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19087–19094.
- [25] DUCKERS HJ, NABEL EG. Prospects for genetic therapy of cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2000; **84**: 199–213.
- [26] DUGUID JG, LI C, SHI M, LOGAN MJ, ALILA H, ROLLAND A, TOMLINSON E, SPARROW JT, SMITH LC. A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys J* 1998; **74**: 2802–2814.
- [27] DUNBAR C, CHANG L, MULLEN C, RAMSEY WJ, CARTER C, KOHN D, PARKMAN R, LENARSKY C, WEINBERG K, WARA D, CULVER KW, ANDERSON WF, LEITMAN

- S, FLEISHER T, KLEIN H, SHEARER G, CLERICI M, McGARRITY G, BASTIAN J, HERSHFIELD MS. Amendment to Clinical Research Project 90-C-195. April 1, 1993. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with autologous lymphocytes transduced with a human ADA gene. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 477–488.
- [28] DUNBAR C, KOHN D, SCHIFFMANN R, BARTON NW, NOLTA JA, ESPLIN JA, PENSIERO M, LONG Z, LOCKEY C, EMMONS RV, CSIK S, LEITMAN S, KREBS CB, CARTER C, BRADY, KARLSSON S. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: *in vivo* detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 2629–2640.
- [29] FELDMAN LJ, STEG G. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 391–404.
- [30] FLOTTE T, CARTER B, CONRAD C, GUGGINO W, REYNOLDS T, ROSENSTEIN B, TAYLOR G, WALDEN S, WETZEL R. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1145–1159.
- [31] FOMINAYA J, WELS W. Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multi-domain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10560–10568.
- [32] FREDERIKSEN KS, ABRAHAMSEN N, CRISTIANO RJ, DAMMSTRUP L, POULSEN HS. Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 262–268.
- [33] FREDERIKSEN KS, PETRI A, ABRAHAMSEN N, POULSEN HS. Gene therapy for lung cancer. *Lung Cancer* 1999; **23**: 191–207.
- [34] GARNETT MC. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999; **16**: 147–207.
- [35] GAVAGHAN H. NIH wins patent on basic technique covering all *ex vivo* gene therapy. *Nature* 1995; **374**: 393.
- [36] GODBEY WT, WU KK, MIKOS AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5177–5181.
- [37] GOTTSCHALK S, CRISTIANO RJ, SMITH L, WOO SLC. Folate-mediated gene delivery and expression *in vitro*. *Gene Ther* 1994; **1**: 185–191.
- [38] GREBER U, WILLETTS M, WEBSTER P, HELENIUS A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; **75**: 477–486.
- [39] GUY J, DRABEK D, ANTONIOU M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol Biotechnol* 1995; **3**: 237–248.
- [40] HERMENS WT, VERHAAGEN J. Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; **55**: 399–432.
- [41] HSIEH JT, DINNEY CP, CHUNG LW. The potential role of gene therapy in the treatment of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; **27**: 103–113.
- [42] HUARD J, KRISKY D, OLIGINO T, MARCONI P, DAY CS, WATKINS SC, GLORIOSO JC. Gene transfer to muscle using herpes simplex virus-based vectors. *Neuromuscul Disord* 1997; **7**: 299–313.
- [43] HUMINIECKI Ł. Terapia genowa – wektory i strategie. *Post Biochem* 1995; **41**: 230–236.
- [44] HUMINIECKI Ł. Somatyczna terapia genowa – czy jest bezpieczna? *Post Biochem* 1996; **42**: 14–21.
- [45] KALPANA GV. Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Semin Liver Dis* 1999; **19**: 27–37.
- [46] KANEDA Y, SAEKI Y, MORISHITA R. Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? *Mol Med Today* 1999; **5**: 298–303.
- [47] KATO Y, SUGIYAMA Y. Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor mediated endocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; **14**: 287–331.

- [48] KAY MA, MANNO CS, RAGNI MV, LARSON PJ, COUTO LB, McCLELLAND A, GLADER B, CHEW AJ, TAI SJ, HERZOG RW, ARRUDA V, JOHNSON F, SCALLAN C, SKARSGARD E, FLAKE AW, HIGH KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat ure Genet* 2000; **24**: 257–261.
- [49] KICHLER A, FREULON I, BOUTIN V, MAYER R, MONSIGNY M, MIDOUX P. Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J Gene Med* 1999; **1**: 134–143.
- [50] KIRCHEIS R, SCHULLER S, BRUNNER S, OGRIS M, HEIDER KH, ZAUNER W, WAGNER E. Polycation-based DNA complexes for tumour-targeted gene delivery *in vivo*. *J Gene Med* 1999; **1**: 111–120.
- [51] KLIMATCHEVA E, ROSENBLATT JD, PLANELLES V. Lentiviral vectors for liver-directed gene therapy. *Front Biosci* 1999; **4**: D481–D496.
- [52] KOROHO DA W. Czy inżynieria komórkowa stanowi zagrożenie. *Prace Komisji Zagrożeń Cywilizacyjnych PAU* 2000; **3**: 7–18.
- [53] KOROHO DA W, MADEJA Z. Wprowadzanie cząsteczek do komórek w drodze odwracalnej perforacji błon. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 89–95.
- [54] KOSZ-VNENCHAK M, FORYST A. Wykorzystanie wirusów jako wektorów w terapii genowej. *Mikrobiologia Medycyna* 1997; **3**: 22–28.
- [55] KOURAKLIS G. Progress in cancer gene therapy. *Acta Oncol* 1999; **38**: 675–683.
- [56] LAMOTHE B, JOSHI S. Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front Biosci* 2000; **5**: D527–D555.
- [57] LANGER JC, KLOTMAN ME, HANSS B, TULCHIN N, BRUGGEMAN LA, KLOTMAN PE, LIPKOWITZ MS. Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for *in vivo* gene delivery. *Exp Nephrol* 1998; **6**: 189–194.
- [58] LATCHMAN DS, COFFIN RS. Viral vectors in the treatment of Parkinsons disease. *Mov Disord* 2000; **15**: 9–17.
- [59] LIANG E, AJMANI PS, HUGHES JA. Oligonucleotide delivery: a cellular prospective. *Pharmazie* 1999; **54**: 559–566.
- [60] MAHATO RI, SMITH LC, ROLLAND A. Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. *Adv Genet* 1999; **41**: 95–156.
- [61] MARASCO WA, LaVECCHIO J, WINKLER A. Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods* 1999; **231**: 223–238.
- [62] MAYER A. Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Current Opinion Cell Biol* 1999; **11**: 447–452.
- [63] MELLMAN I, WARREN G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 2000; **100**: 99–112.
- [64] MICHALIK M. Wprowadzanie makrocząsteczek do komórek przez fuzję z liposomami i cieniami erytrocytów. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 97–118.
- [65] MOHR L, SCHAUER JI, BOUTIN RH, MORADPOUR D, WANDS JR. Targeted gene transfer to hepatocellular carcinoma cells *in vitro* using a novel monoclonal antibody-base gene delivery system. *Hepatology* 1999; **29**: 82–89.
- [66] MUKHERJEE S, GHOSH RN, MAXFIELD FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 1997; **77**: 759–803.
- [67] MUKHTAR M, DUKE H, BOUHAMDAN M, POMERANTZ RJ. Anti-human immunodeficiency virus type I gene therapy in human central nervous system-based cells: an initial approach against a potential viral reservoir. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 347–359.
- [68] MULLER M, GISSMANN L, CRISTIANO RJ, SUN XY, FRAZER IH, JENSON AB, ALONSO A, ZENTGRAF H, ZHOU J. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* 1995; **69**: 948–954.
- [69] NGUYEN DM, WIEHLE SA, KOCH PE, BRANCH C, YEN N, ROTH JA, CRISTIANO RJ. Delivery of the p53 tumour suppressor gene into lung cancer cells by an adenovirus/DNA/complex. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 191–198.

- [70] NGUYEN DM, WIEHLE SA, ROTH JA, CRISTIANO RJ. Gene delivery in malignant cells *in vivo* by a conjugated adenovirus/DNA/complex. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 183–190.
- [71] NOWROOZI MR, PISTERS LL. The current status of gene therapy for prostate cancer. *Cancer Control* 1998; **5**: 522–531.
- [72] OGRISM, BRUNNER S, SCHULLER S, KIRCHEIS R, WAGNER E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; **6**: 595–605.
- [73] PEARSON AS, BOUVET M, EVANS DB, ROTH JA. Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Biosci* 1998; **3**: e230–237.
- [74] PENG KW, RUSSELL SJ. Viral vector targeting. *Curr Opin Biotechnol* 1999; **10**: 454–457.
- [75] PEPLINSKI GR, TSUNG K, NORTON JA. Vaccinia virus for human gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; **7**: 575–588.
- [76] PLANK C, ZATLOUKAL K, COTTEN M, MECHTLER K, WAGNER E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem* 1992; **3**: 533–539.
- [77] POWERS MA, FORBES DJ. Cytosolic factors in nuclear transport: whats importing? *Cell* 1994; **79**: 931–934.
- [78] RAFALSKI M, ORTIZ A, ROCKWELL A, VanGINKEL LC, LEAR JD, DeGRADO WF, WILSCHUT J. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles. *J Biochem* 1991; **30**: 10211–10220.
- [79] ROBBINS PD, GHIVIZZANI SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998; **80**: 35–47.
- [80] RODMAN SJ, WANDINGER-NESS A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 2000; **113**Pt2: 183–192.
- [81] ROLLAND AP. From gene to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998; **15**: 143–198.
- [82] ROBERT C. Liposomes as a gene delivery system. *Braz J Med Biol Res* 1999; **32**: 163–169.
- [83] ROSENECKER J, SCHMALIX WA, SCHINDELHAUER D, PLANK C, REINHARDT D. Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 1998; **3**: 149–156.
- [84] SCHAFFER DV, FIDELMAN NA, DAN N, LAUFFENBURGER DA. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000; **67**: 598–606.
- [85] SCHAFFER DV, LAUFFENBURGER DA. Optimisation of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28004–28009.
- [86] SCHMIDT-WOLF GD, SCHMIDT-WOLF IGH. Cancer and gene therapy. *Ann Hematol* 1996; **73**: 207–218.
- [87] SINGH M. Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 1999; **5**: 443–451.
- [88] SMITH RM, WU GY. Hepatocyte-directed gene delivery by receptor-mediated endocytosis. *Semin Liver Dis* 1999; **19**: 83–92.
- [89] SNYDER RO. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med* 1999; **1**: 166–175.
- [90] SOSNOWSKI BA, GONZALEZ AM, CHANDLER LA, BUECHLER YE, PIERCE GF, BAIRD A. Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2). *J Biol Chem* 1996; **271**: 33647–33653.
- [91] STEPHAN D, WELTIN D, ZARIC V. Gene therapy for coronary disease. *Ann Endocrinol* 2000; **61**: 85–90.
- [92] STONE D, DAVID A, BOLOGNANI F, LOWENSTEIN PR, CASTRO MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol*. 2000; **164**: 103–118.

- [93] SWAAN PW. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm Res* 1998; **15**: 826–834.
- [94] SZALA S. Synthetic virus-like gene transfer system. *Post Bioch* 1995; **41**: 318–321.
- [95] TIBERGHEN P, CAHN JY, BRION A, DECONINCK E, RACADOT E, HERVE P, MILPIED N, LIOURE B, GLUCKMAN E, BORDOGONI P, JACOB W, CHIANG Y, MARCUS S, REYNOLDS C, LONGO D. Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogenic bone marrow transplantation: a phase I-II study. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 615–624.
- [96] UHEREK C, FOMINAYA J, WELS W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8835–8841.
- [97] VanDeWETERING P, MORET EE, SCHUURMANS-NIEUWENBROEK NM, VAN STEENBERGEN MJ, HENNINK WE. Structure-activity relationships of water soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjug Chem* 1999; **10**: 589–597.
- [98] WAGNER E, COTTEN M, FOISNER R, BIRNSTIEL ML. Transferrin-polycation- DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4255–4259.
- [99] WAGNER E, ZENKE M, COTTEN M, BEUG H, BIRNSTIEL ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3410–3414.
- [100] WAGNER JA, MORAN ML, MESSNER AH, DAIFUKU R, CONRAD CK, REYNOLDS T, GUGGINO WB, MOSS RB, CARTER BJ, WINE JJ, FLOTTE TR, GARDNER P. A phase III study of tg AAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 889–909.
- [101] WAGNER JA, OGRIS M, ZAUNER W. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **30**: 97–113.
- [102] WAGNER E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; **38**: 279–289.
- [103] WALTERS RW, DUAN D, ENGELHARD JF, WELSH MJ. Incorporation of adeno-associated virus in calcium phosphate coprecipitate improves gene transfer to airway epithelia *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2000; **74**: 535–540.
- [104] WANG S, LOW PS. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Controlled Release* 1998; **53**: 39–48.
- [105] WICKHAM TJ. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 110–114.
- [106] WU Y, BOYSUN MJ, CSENCISITS KL, PASCUAL DW. Gene transfer facilitated by a cellular targeting molecule, reovirus protein sigma 1. *Gene Ther* 2000; **7**: 61–69.
- [107] WU GY, WILSON JM, SHALABY F, GROSSMAN M, SHAFRITZ DA, WU CH. Receptor-mediated gene delivery *in vivo*. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14338–14342.
- [108] WU GY, WU CH. Receptor-mediated *in vitro* transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4429–4432.
- [109] WU GY, WU CH. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14621–14624.
- [110] XU B, WIEHLE S, ROTH JA, CRISTIANO RJ. The contribution of poly-L-lysine, epidermal growth factor, and streptavidin to EGF/PLL/DNA polyplex formation. *Gene Ther* 1998; **5**: 1235–1243.
- [111] YIN W, CHENG PW. Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 826–833.
- [112] YONEMITSU Y, ALTON EW, KOMORI K, YUSHIZUMI T, SUGIMACHI K, KANNEDA Y. HVJ (Sendai virus) liposome-mediated gene transfer: current status and future perspectives (review). *Int J Oncol* 1998; **16**: 1277–1285.

- [113] ZAUNER W, BRUNNER S, BUSCHLE M, OGRIS M, WAGNER E. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1428**: 57–67.
- [114] ZHANG WW, JOSEPHS SF, ZHOU J, FANG X, ALEMANY R, BALAGUE C, DAI Y, AYARES D, PROKOPENKO E, LOU YC, SETHI E, HUBERT-LESLIE D, KENNEDY M, RUIZ L, ROCKOW-MAGNONE S. Development and application of minimal-adenoviral vector system for gene therapy of haemophilia A. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 562–571.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3, tel.: 634-13-55 w. 262
e-mail: Marta@mol.uj.edu.pl

ZNACZENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL*

THE SIGNIFICANCE OF ANTI-GAL ANTIBODIES

Marcin KLEJMAN, Joanna BERETA

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Surowice człowieka, naczelnych i małp wąskonosych zawierają unikalne przeciwciała anti-Gal skierowane przeciwko epitopowi Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (α -gal). Przeciwciała o takiej specyficzności stanowią najpowszechniejszą grupę przeciwciał w surowicach tych gatunków. Przeciwciała anti-Gal zaangażowane są w szereg procesów związanych z obroną organizmu, mogą jednak również uczestniczyć w patogenezie niektórych chorób. Anti-Gal mogą potencjalnie stanowić pierwszą linię obrony przeciwko niektórym pasożytom, wirusom i bakteriom; aktywować kaskadę dopełniacza na powierzchni niektórych komórek nowotworowych; regulować usuwanie starych i nieprawidłowych erytrocytów. Podniesiony poziom anti-Gal wykazano w szeregu chorób autoimmunologicznych, między innymi w chorobie Gravesa-Basedowa, gdzie przeciwciała te aktywują komórki pęcherzykowe tarczycy. Przeciwciała anti-Gal są również pierwszą przeszkodą w przeprowadzeniu udanej transplantacji człowiekowi organów takich ssaków, jak świnia, gdyż większość przeciwciał odpowiedzialnych za nadostre odrzucenie takich przeszczepów to anti-Gal.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 159–170)

Słowa kluczowe: epitop α -gal, przeciwciała naturalne, dopełniacz, transplantacja

Summary: Human, ape and Old World monkey sera contain unique anti-Gal antibodies directed against Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc epitope (α -gal). It is the most common antibody specificity within the sera of these animals. Anti-Gal antibodies are involved in many processes of immune defence but they might be also involved in pathogenesis of some disorders. Anti-Gal might be the first line of defence against some parasites, viruses and bacteria. They activate complement cascade on the surface of some cancer cells and regulate senescent or pathological erythrocytes clearance. Elevated levels of anti-Gal antibody were shown in many autoimmunological disorders. For example in Graves' disease anti-Gal antibodies activate thyrocytes. Anti-Gal antibodies are also the most important barrier to successful transplantation of organs obtained from mammals such as pig to human. Most common xenoreactive antibodies responsible for hyperacute organ rejection are in fact anti-Gal antibodies.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *suppl.* 16: 159–170)

Keywords: epitope (α -gal), natural antibodies, complement, transplantation

*Praca dofinansowana z projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych 4P05A 027 11

Przeciwciała anty-Gal¹ skierowane przeciwko końcowej reszcie galaktozy występującej w łańcuchach oligosacharydów opisano i wyizolowano na początku lat osiemdziesiątych [1, 2]. Specyficzność względem epitopu Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (α -gal) (rys. 1) została określona dzięki wiązaniu się przeciwciał anty-Gal do glikolipidów o zdefiniowanej strukturze pochodzących z erytrocytów królika [3]. Wykazano również, że przeciwciała anty-Gal mają ściśle określoną swoistość względem epitopu α -gal, nie wiążą się zaś lub wiążą słabo do naturalnych lub syntetycznych oligosacharydów o podobnej strukturze [4, 5].

Zidentyfikowano również szereg glikoprotein zwierzęcych, które wykazują znaczną zawartość łańcuchów oligosacharydowych o strukturze α -gal. Dla przykładu tyreoglobulina bydłęca ma 11 cząstek tego epitopu na jedną cząsteczkę białka, tyreoglobulina świńska ok. 6 [6], zaś mysia laminina 50–70 [7]. Analogiczne białka ludzkie nie mają α -gal.

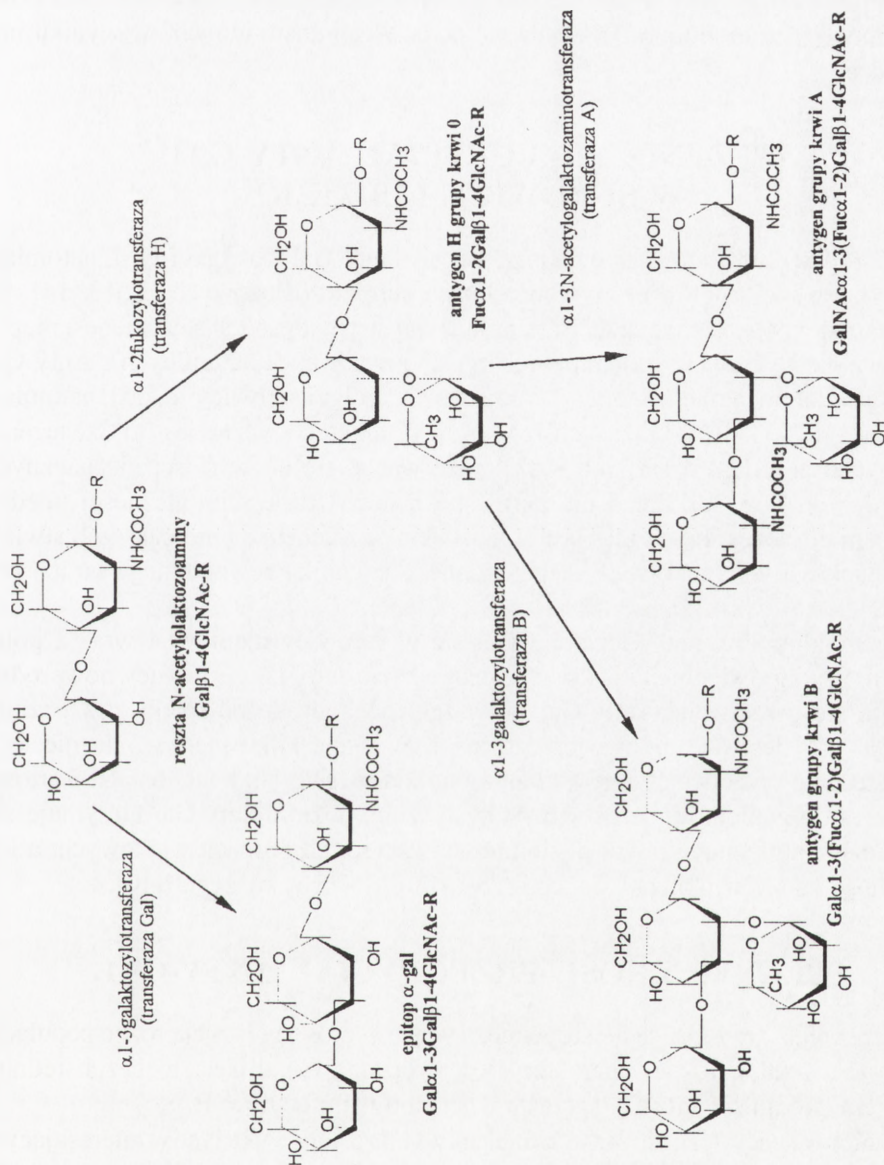
Analiza występowania przeciwciał anty-Gal oraz występowania epitopu α -gal w glikolipidach i glikoproteinach wielu ssaków, w tym człowieka, wykazała ich unikalną dystrybucję gatunkową. Wszystkie badane małpy wąskonosy, naczelnie i człowiek nie syntetyzują epitopu α -gal, natomiast ich surowica zawiera wysokie stężenie przeciwciał anty-Gal. Małpiatki, małpy szerokonosy i pozostałe ssaki syntetyzują epitop α -gal, a w ich surowicy nie występuje przeciwciało anty-Gal [8].

PRZECIWCIAŁA ANTY-GAL JAKO PRZECIWCIAŁA „NATURALNE”

Przeciwciała anty-Gal zaliczane są do grupy przeciwciał „naturalnych”. Grupę tę tworzą obok przeciwciał skierowanych przeciwko α -gal, izohemaglutyniny układu grupowego ABO krwi oraz część autoprzeciwciał, czyli immunoglobulin skierowanych przeciwko antygenom własnym organizmu (fosfatydyloserynie, cholesterolowi, aktynie, DNA, przeciwciałom i wielu innym) [9, 10].

Przez długi czas uważano, iż wszystkie przeciwciała „naturalne” występują w surowicy bez poprzedzającej stymulacji antygenem. W przypadku przeciwciał anty-Gal wykazano jednak, że wysokie stężenie tych przeciwciał w surowicy jest wynikiem stałej immunizacji. Opisano obecność α -gal w lipopolisacharydach wielu rodzajów bakterii – między innymi *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia* [cyt. za 11]. Dodatkowo wykazano, że przeciwciała anty-Gal i izohemaglutyniny grup krwi wiążą się do antygenów bakterii jelitowych lub bakterii izolowanych z krwi ludzi w stanie szoku septycznego. Co więcej, niektóre bakterie naturalnej flory jelit można wyznakować przeciwciałami anty-Gal nie po lizie, ale wprost w rosnących koloniach

¹Stosowane skróty: α 1-3GT – UDP-Gal:Gal β 1-4GlcNAc α 1-3galaktozylotransferaza; α -ga 1– epitop Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc; antyGal – przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi α -gal.



RYСУNEK 1. Struktura epitopu α-gal i antygenów grup krwi oraz schemat ich biosyntezy

[11]. Te właśnie bakterie mogą być odpowiedzialne za ciągłą immunizację epitopem α -gal *in vivo*. Również przeciwciała układu grupowego ABO występują w surowicy ludzkiej w wysokim stężeniu. W klasycznym doświadczeniu wykazano, że podawanie ludziom bakterii *E. coli* powoduje podniesienie poziomu przeciwciał układu ABO [12]. Potwierdza to teorię pojawiania się przeciwciał „naturalnych” w wyniku immunizacji.

STĘŻENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL W SUROWICY LUDZKIEJ

W surowicy ludzkiej występują przeciwciała anty-Gal klas IgG i IgM, natomiast IgA znajdowane są głównie w wydzielinach surowiczośluzowych [2, 13, 14]. Są to najbardziej powszechne przeciwciała ludzkiej surowicy, a ich stężenie jest nieporównywalnie wyższe niż jakichkolwiek innych przeciwciał „naturalnych”. Anty-Gal klasy IgG stanowią około 1% (0–2,5%) wszystkich IgG surowicy [2, 15], natomiast anty-Gal IgM – 1–10% krążących IgM [14]. Charakterystyczne jest to, iż stężenie przeciwciał anty-Gal u różnych ludzi może wahać się od wartości nieznacznych do bardzo dużych. Jak dotąd nie określono u ludzi zdrowych zależności między stężeniem poszczególnych klas tych przeciwciał względem siebie, jak i nie stwierdzono wpływu jakiegokolwiek niepatogennego czynnika zewnętrznego na ich poziom.

Immunoglobuliny anty-Gal pojawiają się w surowicy niemowląt wraz z pojawianiem się odpowiednich klas przeciwciał. Oznacza to, iż w surowicy noworodka znajdują się przeciwciała anty-Gal klasy IgG pochodzące od matki, zaś poziom anty-Gal IgM jest początkowo bardzo niski. W ciągu kilku pierwszych miesięcy życia stężenie przeciwciał anty-Gal zarówno klasy IgM, jak i IgG osiąga wartości typowe dla organizmów dorosłych. Statystycznie, poziom anty-Gal utrzymuje się w zasadzie na niezmiennym poziomie we wszystkich grupach wiekowych, a ich aktywność zaczyna obniżać się dopiero około 70–75 roku życia [16].

SPECYFICZNOŚĆ PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL

Przeciwciała anty-Gal są heterogenne, a więc w surowicy istnieją różne populacje tych przeciwciał o różnej charakterystyce wiązania α -gal. Jest to bezpośrednim wynikiem produkcji anty-Gal przez różne klonety limfocytów B.

Różnice w specyficzności przeciwciał anty-Gal zostały wykazane w interesującym doświadczeniu. Epitop α -gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc) jest bardzo podobny do determinanty grupy krwi B człowieka (Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc); różni się od niej jedynie brakiem pojedynczej reszty fukozy (rys. 1). Mimo tak niewielkiej różnicy między tymi epitopami, u ludzi z grupą krwi B lub AB nie ma oczywiście

w obrębie całej puli przeciwciał anty-Gal takich, które rozpoznawałyby jednocześnie antygen B. Natomiast u ludzi z grupą krwi A lub 0 występują przeciwciała anty-Gal, które rozpoznają również antygen grupy krwi B. Co ciekawe, stwierdzono, że większość przeciwciał reagujących z antygenem B wiąże się także do epitopu α -gal, nie są to więc przeciwciała ze specyficznością ograniczoną do antygeny B [17]. Przeciwciała anty-Gal u ludzi z grupą krwi B lub AB są więc bardziej swoiste w stosunku do epitopu α -gal niż przeciwciała anty-Gal u ludzi z grupą krwi A lub 0.

Innym epitopem rozpoznawanym przez anty-Gal jest rzadko występujący glikolipid x_2 (GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer). Anty-Gal wiążą ten epitop 50 razy słabiej niż α -gal [5], tym niemniej wiązanie anty-Gal do glikolipidu x_2 może mieć znaczenie fizjologiczne (opisane niżej). Ponadto anty-Gal wiążą się do peptydów występujących w ludzkich mucynach. Wyjaśnia to fakt wiązania się anty-Gal do komórek ludzkiego raka sutka [18] wykazujących ekspresję mucyn.

Oprócz istotnych różnic w poziomie przeciwciał anty-Gal w surowicach ludzi zdrowych, istnieją również znaczące różnice w ich powinowactwie do α -gal. Obserwuje się duże różnice w wiązaniu się przeciwciał anty-Gal pochodzących z surowic różnych osób, zarówno do antygenów immobilizowanych jak i antygenów w roztworze, nawet wówczas, gdy poziom przeciwciał anty-Gal w badanych surowicach jest podobny. Stałe powinowactwa K_a określające oddziaływanie, wyizolowanych z surowic dwóch różnych osób, przeciwciał anty-Gal z epitopem α -gal wynosiły $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ oraz $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, a więc różniły się 30-krotnie [19]. Warto zauważyć, że powinowactwo anty-Gal do α -gal jest stosunkowo niskie w porównaniu z powinowactwem typowych przeciwciał wiążących peptydy.

Wielkością, która lepiej charakteryzuje oddziaływanie przeciwciał z antygenami obecnymi na powierzchni komórek, jest funkcjonalna zachłanność (ang. *functional avidity*) mierzona z użyciem immobilizowanego ligandu. Funkcjonalna zachłanność wyrażona jako stała dysocjacji dla oddziaływania ludzkich anty-Gal IgM z antygenami obecnymi na komórkach śródbrzońki świni oznaczana w temp. 37°C wynosiła $1 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ [14]. Wartość ta była co najmniej o rząd wielkości niższa niż określona dla przeciwciał klasy IgG, co związane jest z większą zachłannością poliwalentnych IgM. Rozbicie anty-Gal IgM na monomery i dimery znacząco osłabia ich wiązanie do α -gal [14].

ZNACZENIE PRZECIWCIAŁ ANTY-GAL

Znaczenie przeciwciał anty-Gal w transplantologii

Od dawna postuluje się, iż jednym z najbardziej oczywistych źródeł organów do przeszczepów są zwierzęta. Poza naczelnymi i małpami wąskonosymi, których hodowla jest powolna i droga, naturalnym dawcą może być świnia, gdyż ma ona

organy o zbliżonej wielkości i anatomii do ludzkich. Niestety, próby przeszczepów unaczynionych narządów świńskich kończą się zawsze ich nadostrym odrzuceniem, czyli występującym w czasie minut od przeszczepu. Spowodowane jest to nagłą aktywacją kaskady dopełniacza na powierzchni śródbłonka naczyń przeszczepianego organu prowadzącą do jego zniszczenia. Dowiedziono, że ponad 80% ludzkich „naturalnych” przeciwciał ksenoreaktywnych wiążących się do komórek świńskiego śródbłonka to przeciwciała anty-Gal [14].

Jednocześnie wykazano, iż to anty-Gal klasy IgM są u zdrowego człowieka odpowiedzialne za aktywację klasycznej drogi dopełniacza na komórkach zwierzęcych mających ekspresję epitopu α -gal. Anty-Gal klasy IgG nie tylko nie aktywują dopełniacza, ale w niektórych doświadczeniach mogą wręcz hamować jego odkładanie. Wyjaśnieniem zjawiska braku aktywacji dopełniacza przez anty-Gal IgG może być to, iż są one u zdrowych ludzi w większości podklasy IgG2 [15]. Przeciwciała tej podklasy nie aktywują wydajnie klasycznej drogi dopełniacza, a ponadto charakteryzują się niższą zachłannością.

Po stymulacji antygenem, tak jak to ma miejsce na przykład po zewnętrznym włączeniu nerki świni w obieg krwi naczelnych, następuje odpowiedź organizmu związana z przełączeniem klas przeciwciał i silnym wzrostem poziomu anty-Gal IgM, a następnie IgG o zwiększonym powinowactwie do α -gal. Podnosi się znacznie ilość przeciwciał podklasy IgG1, które, odmiennie od IgG2, efektywnie aktywują dopełniacz [20].

Do tej pory przeprowadzono wiele badań mających doprowadzić do rozwiązania problemu nadostrego odrzucania przeszczepów. Jak się wydaje, jedynie organy świni transgenicznej, która posiadałaby ekspresję genów „uczłowieczających” jej komórki, stanowiłyby pożądany materiał do przeszczepów ksenogenicznych. Ze względu na brak odpowiedniej linii komórek embrionalnych świni, prace prowadzące do uzyskania zwierząt tego gatunku z wyłączonym (*knock-out*) genem np. kodującym α 1-3galaktozylotransferazę odpowiedzialną za syntezę epitopu α -gal, nie były możliwe. Podjęto więc prace zmierzające do modyfikacji szlaku syntezy łańcuchów oligosacharydowych przez wprowadzenie do komórek genów kodujących dodatkowe enzymy. Wykazano, że koekspresja w komórkach świńskich α -galaktozydazy usuwającej końcową resztę galaktozy oraz α 1-2fukozylotransferazy (transferazy H), syntetyzującej na tak powstałym rdzeniu antygen grupy krwi 0 (rys. 1), zapobiega odkładaniu się na powierzchni komórek anty-Gal i chroni je przed lizą [21]. Przy dodatkowym wprowadzeniu ludzkich genów kodujących białka inaktywujące dopełniacz, jak np. DAF (CD55), czy HRF20 (CD59), można byłoby prawdopodobnie efektywnie zapobiegać nadostrej fazie odrzucania przeszczepu [22].

Ostatnie doniesienia o sklonowaniu świni z użyciem jąder zróżnicowanych komórek jako donorów DNA mogą świadczyć o zbliżającej się fazie intensywnych testów nad przeszczepianiem zmodyfikowanych świńskich organów. Nie należy jednak zapominać o trudnościach w eliminacji m.in. ostrej (opóźnionej) fazy od-

rzucania związanej z późniejszą odpowiedzią komórkową i humoralną organizmu biorcy oraz z ewentualnymi niebezpieczeństwami transmisji groźnych odzwierzęcych wirusów.

ZNACZENIE ANTY-GAL I α -GAL W PROCESACH OBRONNYCH ORGANIZMU

Przeciwciała anty-Gal są potencjalnie jedną z pierwszych linii obrony przeciwko różnym patogenom. Antygeny wielu bakterii izolowanych z ludzkich jelit i krwi są rozpoznawane przez anty-Gal [11]. Wiadomo, że budowa ściany poszczególnych szczepów bakterii wpływa na zdolność anty-Gal do indukcji zabijania. Nie wykazano jednakże prostej zależności między odkładaniem się anty-Gal na powierzchni komórek bakteryjnych i aktywacją dopełniacza, a podatnością bakterii na zabicie [11]. Potrzebne są szersze badania ze szczególnym zwróceniem uwagi na różne klasy przeciwciał, aby ustalić znaczenie anty-Gal w obronie przed infekcjami bakteryjnymi.

Kolejnym ważnym procesem, w którym mogą brać udział przeciwciała anty-Gal, jest ochrona przed wirusami odzwierzęcymi. Wykazano, iż większość wirusów, które namnożyły się w komórkach ssaków produkujących α -gal jest efektywniej niszczone przez dopełniacz surowicy ludzkiej [23] niż wirusy namnażane w komórkach niesyntetyzujących tego epitopu. Ma to również implikacje terapeutyczne: konstruując wektory wirusowe służące do terapii genowej *in vivo* należy brać pod uwagę ekspresję α -gal w komórkach służących do namnażania wirusa.

Przeciwciała anty-Gal wiążą się również do powierzchni pasożytów zakażających człowieka. Wykazano, iż świdrowiec *Trypanosoma cruzi*, który powoduje chorobę Chagasa objawiającą się często zapaleniem mięśnia sercowego, ma na swej powierzchni wysokie stężenie epitopu α -gal [24]. W związku z tym u większości chorych obserwuje się znacznie podniesiony poziom anty-Gal. Stwierdzono, że przeciwciała te uczestniczą w zabijaniu komórek świdrowca i ograniczaniu choroby [25]. Wiciowce *Leishmania* również mają epitop α -gal [24], a chorzy często wykazują duże stężenie anty-Gal, choć brak dowodów na zdolność anty-Gal do lizy tych pasożytów. Lista pasożytów, z którymi przeciwciała anty-Gal mogą oddziaływać, ciągle rośnie. Anty-Gal stanowią potencjalnie ważny element obrony przed rozwojem zakażeń powodowanych przez niektóre z nich.

WIĄZANIE ANTY-GAL DO KOMÓREK LUDZKICH

Epitop α -gal nie występuje w strukturze żadnych ludzkich glikolipidów lub glikoprotein. Może być więc zaskakujące, iż przeciwciała anty-Gal wiążą się do niektórych typów komórek człowieka, głównie w stanach patologicznych. Jak na ironię, pierwsze doniesienia o przeciwciałach anty-Gal były wynikiem wiązania się ich

do patologicznych erytrocytów ludzi cierpiących na β -talasemię [1]. Następne doniesienia mówiły o wiązaniu się tych przeciwciał do starych (ang. *senescent*) erytrocytów zdrowych ludzi [26] oraz do erytrocytów ludzi z anemią sierpowatą [27]. Obecnie panuje pogląd, że za wiązanie przeciwciał anty-Gal do patologicznych lub starych erytrocytów jest odpowiedzialny, opisywany wcześniej i występujący u ludzi, glikolipid x_2 . W stanach patologicznych lub podczas starzenia się erytrocytu może być on prawdopodobnie ekspozycyjnie na tyle, aby anty-Gal mogły się z nim wiązać. Postuluje się, iż odkładanie anty-Gal na powierzchni starych erytrocytów jest jednym z mechanizmów ich fizjologicznego usuwania z ustroju [26].

Nieznany jest również epitop wiążący anty-Gal do powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy ludzi cierpiących na autoimmunologiczną chorobę Gravesa-Basedova. U chorych występują autoprzeciwciała specyficzne w stosunku do sekwencji aminokwasowej fragmentu receptora dla tyreotropiny, powodujące niekontrolowaną aktywację komórek pęcherzykowych. W surowicy chorych stwierdza się również znacznie podniesiony poziom przeciwciał anty-Gal, które także reagują z powierzchnią komórek tarczycy, aktywując je podobnie do znanych wcześniej autoprzeciwciał. Usunięcie anty-Gal z surowic pochodzących od pacjentów obniża aktywację komórek pęcherzykowych o ponad 50%. Jednocześnie surowice chorych nie wywierają żadnego efektu na komórki pęcherzykowe tarczycy zdrowych ludzi, co świadczy o ekspresji specyficznego epitopu rozpoznawanego przez anty-Gal na powierzchni komórek ludzi chorych [28]. Natura tego epitopu nie została poznana; można więc jedynie spekulować, czy jest to znany glikolipid x_2 , peptyd podobny do tych występujących w mucynach, czy też może jakaś inna struktura.

GEN DLA α 1-3GALAKTOZYLOTRANSFERAZY (α 1-3GT) I JEGO EWOLUCJA

Enzym UDP-Gal:Gal β 1-4GlcNAc α 1-3galaktozylotransferaza (α 1-3GT), (EC 2.4.1.87), katalizuje reakcję przeniesienia reszty galaktozy na resztę N-acetylotkotozamin w przedziale *trans* aparatu Golgiego:



Niższe kręgowce nie mają prawdopodobnie aktywnego genu kodującego α 1-3GT, a więc nie zachodzi w ich komórkach synteza α -gal. Ekspresja genu kodującego α 1-3GT, a co za tym idzie, ekspresja epitopu α -gal obserwowana jest dopiero u ssaków. Rozkład ekspresji genu α 1-3GT u ssaków jest bardzo charakterystyczny – enzym ten występuje u wszystkich małpiałek, małp szerokonosych (Nowego Świata) i gatunków mniej niż małpy zaawansowanych ewolucyjnie. Zwierzęta te mają więc na powierzchni swych komórek epitop α -gal, natomiast w ich surowicy brak przeciwciał anty-Gal. U małp wąskonosych (Starego Świata), naczelnych i człowieka

nie ma ekspresji genu kodującego α 1-3GT. Dzięki temu możliwe jest występowanie w ich surowicy wysokiego stężenia anty-Gal [8]. Oligosacharydy wchodzące w skład glikolipidów i glikoprotein tych ssaków są najczęściej zakończone resztą kwasu sjałowego.

Inaktywacja genu α 1-3GT u wszystkich badanych małp wąskonosych, w odróżnieniu od małp Nowego Świata, dowodzi, iż proces ten nastąpił już po geograficznym rozdzieleniu się tych dwóch populacji. Po sklonowaniu genu kodującego α 1-3GT stało się możliwe zbadanie jego ewolucji. U gatunków z nieaktywną α 1-3GT wykryto pseudogen; brak ekspresji genu jest spowodowany prawdopodobnie mutacjami w obrębie promotora. U naczelnych i człowieka występują także mutacje typu przesunięcia ramki odczytu w eksonie kodującym domenę katalityczną enzymu.

Istnieją dwie hipotezy tłumaczące powszechny brak ekspresji α 1-3GT u wyższych małp. Pierwsza mówi, że małpy wąskonosy mogły zostać poddane presji ewolucyjnej, na skutek której gen α 1-3GT uległ inaktywacji [artykuł przeglądowy 29]. Jednym z powodów mogło być pojawienie się na obszarze Afryki groźnych patogenów, które miały na swej powierzchni epitop α -gal. Następstwem tego była pozytywna selekcja takich osobników, u których doszło do wyłączenia ekspresji genu dla α 1-3GT, dzięki czemu mogły pojawić się, bez wywoływania procesów autoimmunologicznych, przeciwciała anty-Gal chroniące przed zakażeniem. Istnienie patogenów mających na powierzchni α -gal jest udokumentowane [24], natomiast udowodnienie takiej hipotezy jest niezwykle trudne.

Innym potencjalnym stymulatorem takiej presji ewolucyjnej mógłby być wirus lub bakteria, dla których α -gal na powierzchni komórek zwierzęcych byłby receptorem wymaganym do zakażenia lub receptorem dla toksyn bakteryjnych. Taki przypadek wykorzystania epitopu α -gal przez współczesne bakterie jest znany [30]. Ocena okresu, w jakim doszło do inaktywacji α 1-3GT, na podstawie ilości i tempa mutacji oraz porównania sekwencji genu u różnych małp wskazywać może, iż to wydarzenie zaszło już po oddzieleniu się małp Starego Świata od naczelnych (około 28 milionów lat temu) niezależnie w tych dwóch grupach. Co ciekawsze, badania paleontologiczne wykazują, iż naczelne były bardzo rozpowszechnione w Afryce około 20 milionów lat temu. Ilość znajdowanych szczątków naczelnych pochodzących z późniejszych okresów jest jednak niewielka, zaś obecna liczba gatunków jest bardzo mała. Powszechny brak ekspresji α 1-3GT u wszystkich małp Starego Świata może świadczyć o masowym wyginięciu małp kilkanaście milionów lat temu i odrodzeniu się populacji z małej ilości osobników.

Hipoteza alternatywna [31] postuluje, że pojedyncza mutacja powodująca pojawienie się kodonu stop w genie dla α 1-3GT jeszcze przed oddzieleniem się naczelnych od małp wąskonosych jest przyczyną braku epitopu α -gal u wszystkich wąskonosych. Kolejne mutacje w regionie promotorowym spowodowały zaś zaniknięcie nieaktywnego transkryptu dla α 1-3GT. Podstawą tego rozumowania jest analiza sekwencji zduplikowanych pseudogenów α 1-3GT u człowieka [32]. Po-

parciem dla tej hipotezy jest obserwacja podobnej punktowej mutacji (typu przesunięcia ramki odczytu) w genie kodującym glikozylotransferazę systemu grup krwi AB0, która spowodowała pojawienie się grupy 0. Podobne są też korzyści, jakie pojawiły się w wyniku mutacji obydwu glikotransferaz – nastąpiło zwiększenie we krwi różnorodności przeciwciał skierowanych przeciwko oligosacharydom potencjalnych patogenów.

Mimo kilkunastoletnich badań nad funkcją przeciwciał anti-Gal, nadal wiele pozostaje do wyjaśnienia. Tym niemniej, rola przeciwciał anti-Gal w takich ważnych procesach, jak: autoimmunizacja, obrona przeciwbakteryjna, czy odrzucanie przeszczepów ksenogenicznych, już teraz zaczyna być doceniana.

LITERATURA

- [1] GALILI U, KORKESH A, KAHANE I, RACHMILEWITZ EA. Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells. *Blood* 1983; **61**: 1258–1264.
- [2] GALILI U, RACHMILEWITZ EA, PELEG A, FLECHNER I. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; **160**: 1519–1531.
- [3] GALILI U, MACHER BA, BUEHLER J, SHOHET SB. Human natural anti- α -galactosyl IgG. II. The specific recognition of $\alpha(1-3)$ -linked galactose residues. *J Exp Med* 1985; **162**: 573–582.
- [4] GALILI U, BASBAUM CB, SHOHET SB, BUEHLER J, MACHER BA. Identification of erythrocyte Gal α 1-3Gal glycosphingolipids with a mouse monoclonal antibody, Gal-13. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4683–4688.
- [5] TENEBERG S, LONNROTH I, TORRES LOPEZ JF, GALILI U, HALVARSSON MO, ANGSTROM J, KARLSSON KA. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal α 3Gal β 4 GlcNAc β -binding *Clostridium* difficile toxin A, human natural anti- α -galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 1996; **6**: 599–609.
- [6] SPIRO RG, BHOYROO VD. Occurrence of α -D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *J Biol Chem* 1984; **259**: 9858–9866.
- [7] ARUMUGHAM RG, HSIEH TC, TANZER ML, LAINE RA. Structures of the asparagine-linked sugar chains of laminin. *Biochim Biophys Acta* 1986; **883**: 112–126.
- [8] GALILI U, SHOHET SB, KOBRIN E, STULTS CL, MACHER BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17755–17762.
- [9] CASALI P, NOTKINS AL. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1989; **10**: 364–368.
- [10] COUTINHO A, KAZATCHKINE MD, AVRAMEAS S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 812–818.
- [11] GALILI U, MANDRELL RE, HAMADEH RM, SHOHET SB, GRIFFISS JM. Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988; **56**: 1730–1737.
- [12] SPRINGER GF AND HORTON RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest* 1969; **48**: 1280–1291.
- [13] HAMADEH RM, GALILI U, ZHOU P, GRIFFISS JM. Anti- α -galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; **2**: 125–131.

- [14] PARKER W, BRUNO D, HOLZKNECHT ZE, PLATT JL. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 1994; **153**: 3791–3803.
- [15] YU PB, HOLZKNECHT ZE, BRUNO D, PARKER W, PLATT JL. Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies. *J Immunol* 1996; **157**: 5163–5168.
- [16] XU H, EDWARDS N, CHEN JM, DONG X, MICHLER RE. Age-related development of human anti-pig xenoantibody. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; **110**: 1023–1029.
- [17] GALILI U, BUEHLER J, SHOHET SB, MACHER BA. The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 1987; **16**: 693–704.
- [18] CASTRONOVO V, COLIN C, PARENT B, FOIDART JM, LAMBOTTE R, MAHIEU P. Possible role of human natural anti-Gal antibodies in the natural antitumor defense system. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 212–216.
- [19] GALILI U, MATTA KL. Inhibition of anti-Gal IgG binding to porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides. *Transplantation* 1996; **62**: 256–262.
- [20] YU PB, PARKER W, EVERETT ML, FOX IJ, PLATT JL. Immunochemical properties of anti-Gal α 1-3Gal antibodies after sensitization with xenogeneic tissues. *J Clin Immunol* 1999; **19**: 116–126.
- [21] OSMAN N, MCKENZIE IF, OSTENRIED K, IOANNOU YA, DESNICK RJ, SANDRIN MS. Combined transgenic expression of α -galactosidase and α 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal α (1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14677–14682.
- [22] FODOR WL, WILLIAMS BL, MATIS LA, MADRI JA, ROLLINS SA, KNIGHT JW, VELANDER W, SQUINTO SP. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11153–11157.
- [23] WELSH RM, O'DONNELL CL, REED DJ, ROTHER RP. Evaluation of the Gal α 1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *J Virol* 1998; **72**: 4650–4656.
- [24] AVILA JL, ROJAS M, GALILI U. Immunogenic Gal α 1-3Gal carbohydrate epitopes are present pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 1989; **14**: 2828–2834.
- [25] GALILI U, FLECHNER I, KNYSZYNSKI A, DANOND D, RACHMILEWITZ EA. The natural anti- α -galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol* 1986; **62**: 317–324.
- [26] ALMEIDA IC, MILANI SR, GORIN PA, TRAVASSOS, LR. Complement mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *J Immunol* 1991; **146**: 2394–2400.
- [27] GALILI U, CLARK MR, SHOHET SB. Excessive binding of natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *J Clin Invest* 1986; **77**: 27–33.
- [28] WINAND RJ, DEVIGNE JW, MEURISSE M, GALILI U. Specific stimulation of Graves' disease thyrocytes by the natural anti-Gal antibody from normal and autologous serum. *J Immunol* 1994; **153**: 1386–1395.
- [29] GALILI U. Evolution of α 1,3galactosyltransferase and of the α -Gal epitope. *Subcell Biochem* 1999; **32**: 1–23.
- [30] KRIVAN HC, CLARK GF, SMITH DF, WILKINS TD. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal(1-3Gal(1-4GlcNAc). *Infect Immun* 1986; **53**: 573–581.
- [31] JOZIASSE DH, SHAPER JH, SHAPER NL. The 1,3-galactosyltransferase gene. *Subcell Biochem* 1999; **32**: 25–48.

- [32] JOZIASSE DH, SHAPER JH, JABS EW, SHAPER NL. Characterization of an 1-3-galactosyl-transferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6991–6998.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: joannab@mol.uj.edu.pl

KATECHOLAMINY W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM – IDENTYFIKACJA I FUNKCJA*

CATECHOLAMINES IN THE IMMUNE SYSTEM – IDENTIFICATION AND FUNCTION

Agnieszka ŚCIUBISZ¹, Marta SZOSTEK², Aleksander SKOTNICKI²,
Jerzy SILBERRING¹

¹ Zespół Neurobiochemii, Wydział Chemii, Środowiskowe Laboratorium Analiz Fizykochemicznych i Strukturalnych, Uniwersytet Jagielloński;

² Klinika Hematologii Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Od wczesnych lat dziewięćdziesiątych prowadzone są badania wzajemnych zależności pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym. Do substancji mogących wpływać na te procesy należą glukokortykosteroidy, peptydy opioidowe, polipeptydy, hormony przysadki i katecholaminy. Katecholaminy powodują inhibicję aktywności limfocytów typu T i B oraz wytwarzają immunologiczną odpowiedź antynowotworową. Udowodnienie w 1994 roku obecności i biosyntezy katecholamin w komórkach układu immunologicznego stało się ważnym krokiem w badaniach związków pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym. Odkrycie to zapoczątkowało badania poziomu tych amin biogennych u osób zdrowych i chorych na różne typy białaczek. Niniejsza praca dokonuje przeglądu funkcji katecholamin w układzie immunologicznym oraz metod wykorzystywanych w celu ich identyfikacji, wśród których należy wymienić spektrometrię masową, elektroforezę kapilarną oraz wysoko-sprawną chromatografię cieczową.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 171–180)

Słowa kluczowe: elektroforeza kapilarna, katecholaminy, limfocyty, spektrometria masowa, wysoko-sprawną chromatografię cieczową.

Summary: The search for the possible connection between nervous-, and immune systems has been conducted since early 90-ties. A suggestion that the immune response might be controlled by the brain, initiated the search for the specific substances involved in this process. It has been found that glucocorticoids, opiates, polypeptides, pituitary hormones, and catecholamines influence activity of the immune system. Catecholamines and their metabolites are also synthesized in the peripheral blood lymphocytes

*Niniejsza praca finansowana była z grantów: DS/VI/WCH/41/00, BW/VI/WCH/41/00 oraz DS/VI/WCH/1008/00.

and in the T-, and B-cells clones. This finding has urged us to perform quantitative studies on the catecholamines level in lymphocytes from healthy and leukemic patients. This work reviews the actual knowledge on catecholamines in the immune system and describes techniques for their identification and quantitation.

(Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 171–180)

Keywords: capillary electrophoresis, catecholamines, lymphocytes, mass spectrometry, high performance liquid chromatography.

WSTĘP

Układ nerwowy kontroluje i reguluje wiele funkcji organizmu. Neurony komunikują się z innymi komórkami i organami w procesie zwanym neuroprzekaznictwem (neurotransmisją), za pomocą trzech głównych rodzajów związków: aminokwasów, amin oraz peptydów. Aminy biogenne – katecholaminy, znalezione zostały w układzie immunologicznym. Szczegółowy mechanizm opisujący zależności pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym nie jest dotychczas w pełni poznany, postawiono natomiast hipotezę, że katecholaminy zarówno egzo-, jak i endogenne mogą pełnić funkcje regulatorowe w układzie immunologicznym biorąc udział m.in. w procesach apoptozy, proliferacji i różnicowania komórek.

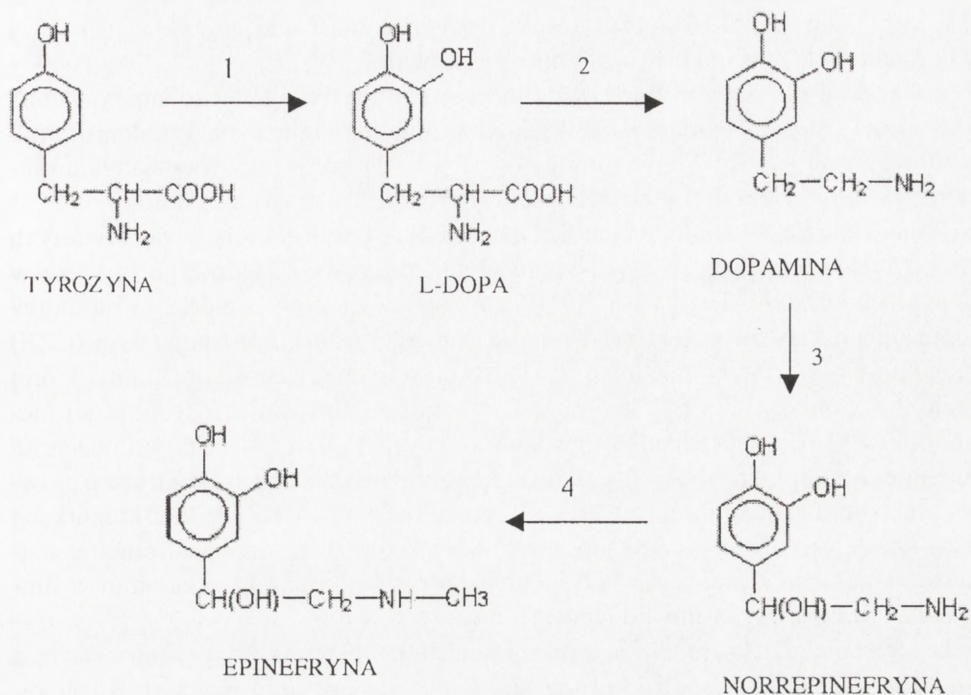
Udowodnienie w ostatnich latach obecności i biosyntezy katecholamin w komórkach układu immunologicznego stało się ważnym krokiem w badaniach związków między układem nerwowym a immunologicznym [8,26]. Badania te sugerują, że mózg może być regulatorem odpowiedzi immunologicznej i mogą być pomocne w zrozumieniu roli stresu i jego wpływu na homeostazę.

CHARAKTERYSTYKA KATECHOLAMIN

Do katecholamin zaliczamy dopaminę, norepinefrynę i epinefrynę. Są one syntetyzowane w zakończeniach nerwów współczulnych, neuronach ośrodkowego układu nerwowego i rdzeniu nadnerczy [17]. Prekursorem katecholamin jest tyrozyna, a cykl syntezy poszczególnych związków został przedstawiony na rysunku 1.

Miejscami magazynowania a zarazem metabolizmu są pęcherzyki synaptyczne neuronów i ziarnistości chromochłonne nadnerczy [17,24]. Działanie amin biogennych jest determinowane przez wychwyty zwrotny oraz degradację enzymatyczną. Metylotransferaza katecholowa (COMT) oraz monoaminooksydaza (MAO) degradują katecholaminy do dwóch głównych metabolitów: kwasu wanilinomigdałowego (3-metoksy, 4-hydroksymigdałowego, VMA) oraz glikolu 3-metoksy,4-hydroksyfenyloetylowego (MHPG) [15].

Katecholaminy działają przez receptory dopaminergiczne i adrenergiczne, uczestnicząc w regulacji procesów adaptacji na stres czy wyższych czynności psychicznych, jak: czynności ruchowe, procesy emocjonalne, sen i czuwanie [11, 15,



RYSUNEK 1. Biosynteza katecholamin. Enzymy biorące udział w kolejnych etapach syntezy oznaczono cyframi: 1 – hydroksylaza tyrozynowa, 2 – L-DOPA dekarboksylaza, 3 – hydroksylaza dopaminy, 4 – N-metylotransferaza

17]. W szczególności dopamina wprzęgnięta jest w tzw. układ nagrody i mechanizm uzależnień [12, 23, 27]. Depresje endogenne i zespół abstynencji morfinowej są m.in. związane ze szlakiem neuronów noradrenergicznych [17,22].

Zaburzenia w przewodnictwie dopaminergicznym pomiędzy istotą czarną a prążkowiec są przyczyną choroby Parkinsona [12, 20]. Istnieje hipoteza łącząca nadmierną stymulację receptorów dopaminergicznych z schizofrenią. Wśród zaburzeń wynikających z upośledzenia neurotransmisji katecholaminergicznej należy wymienić także chorobę Alzheimer'a, dystonię czy nowotwory, takie jak pheochromocytoma czy być może białaczki [15].

KATECHOLOAMINY W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM

Interakcje pomiędzy układami nerwowym a immunologicznym wymagają zaangażowania wielu rodzajów substancji pełniących rozmaite funkcje, czego przykładem może być regulacyjna rola cytokin w obu tych systemach [2]. Również neuro-

przebieżniki kontrolując wiele istotnych funkcji układu nerwowego mogą spełniać rolę immunoprzebieżników, czy nawet stanowić pomost wiążący układ nerwowy z immunologicznym jako neuroimmunoprzebieżniki.

Związkami należącymi do tej kategorii są niewątpliwie katecholaminy. Pełnią one ważne funkcje regulatorowe w układzie immunologicznym. Działają immunosupresywnie na aktywność limfocytów T i B, są także odpowiedzialne za komórkową odpowiedź immunologiczną w warunkach ostrego stresu [6].

Endogenne katecholaminy i ich metabolity odkryto w 1994 roku w pojedynczych limfocytach pochodzących z ludzkiego płynu mózgowo-rdzeniowego, a także w hodowlach komórek T i B CD4⁺ [5]. Analizę pojedynczych komórek i ekstraktów populacji limfocytów przeprowadzono za pomocą elektroforezy kapilarnej (CZE) z detektorem elektrochemicznym. Stwierdzono w nich obecność dopaminy, której poziom w limfocytach CSF wynosi 2×10^{-18} mola, jak również obecność jej metabolitu DOPAC. W przypadku linii komórkowych T i B CD4⁺ odkryto obecność dopaminy i norepinefryny, co dodatkowo może potwierdzić obecność głównego metabolitu dopaminy – DOPAC, jak i norepinefryny – MHPG w tych komórkach [14]. Ostateczny dowód uzyskano stosując wysokorozdzielczą spektrometrię masową, za pomocą której wykazano identyczność strukturalną katecholamin w limfocytach ludzkiej krwi obwodowej [4].

Dalsze badania dowiodły, że synteza katecholamin zachodzi w limfocytach, a ich obecność nie jest spowodowana pasywnym wychwytem przez struktury receptorowe. Doświadczenia przeprowadzono na ludzkich i mysich komórkach typu T, które inkubowano z dopaminą oraz L-DOPA, co powodowało wzrost ilości katecholamin w liniach komórkowych. Wynikiem inkubacji limfocytów z inhibitorem syntezy dopaminy α -metylo-p-tyrozyną było zmniejszenie poziomu katecholamin. Wychwyt dopaminy przez komórki jest hamowany przez inkubację z nomifensyną – antagonistą transportera dopaminy. Podobnie, zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu katecholamin obserwowano w czasie inkubacji z dopaminą w obecności tetrabenazyny – blokera magazynowania katecholamin. Żadna z tych substancji nie wpływała na pierwotny poziom tych amin wewnątrz komórki [6]. Endogenne katecholaminy są syntetyzowane w limfocytach krwi obwodowej, co również potwierdzono metodą znakowania izotopowego; inkubacja [³H]L-DOPY z ekstraktem limfocytów powoduje powstanie [³H]dopaminy i [³H]norepinefryny [21].

CZE z detekcją elektrochemiczną wykorzystano również w oznaczeniu amin katecholowych w jądrze komórkowym [6]. Odkryto obecność dopaminy i norepinefryny, natomiast nie wykryto ich metabolitów. Główne enzymy odpowiedzialne za metabolizm katecholamin znajdują się w błonie mitochondriów i cytozolu. Regulacyjna rola katecholamin w limfocytach może zachodzić przez interakcje ze składnikami jądra, wewnątrz którego są one chronione przed degradacją. Katecholaminy w jądrze komórki mogą np. współdziałać z różnymi wewnątrzjądrowymi strukturami receptorowymi, lecz ich pełne funkcje nie zostały jeszcze poznane.

Jedną z ważnych funkcji, jaką endogenne katecholaminy pełnią w limfocytach, jest regulacja różnicowania i proliferacji komórek [6, 14]. Efekt ten badano *in vitro* stosując mitogenową aktywację komórek T i B. Jako mitogeny stosowano odpowiednio konkanawalinę A i lipopolisacharyd. Proliferacja w przypadku obydwu mitogenów jest hamowana przez katecholaminy i L-DOPA. Również różnicowanie się limfocytów jest zmniejszane przez inkubację z katecholaminami i ich prekursorami.

Katecholaminy i L-DOPA hamują różnicowanie się i proliferację komórek przez indukowanie mechanizmu apoptozy limfocytów. W celu udowodnienia tej hipotezy badano fragmentację DNA i markery apoptozy Bcl2/Bax oraz Fas/Fas [6, 14].

Możliwe są m.in. dwa przypadki oddziaływania katecholamin na limfocyty: w miejscach, w których zachodzi normalna proliferacja i różnicowanie oraz tam gdzie limfocyty narażone na duże stężenie egzogennych katecholamin, np. w pobliżu zakończeń synaptycznych. W pierwszym przypadku obserwuje się mały wychwyty egzogennych katecholamin, natomiast zwiększenie ich poziomu prowadzi do zwiększenia wychwyty przez komórkę. Wewnątrz komórki katecholaminy są degradowane przez enzymy mitochondrialne, natomiast w drugim przypadku mogą one wywierać efekt toksyczny na mitochondria. Wewnątrzkomórkowe katecholaminy mogą być magazynowane w specjalnych strukturach, czy też transportowane do jądra komórki [6].

Badanie katecholamin w układzie immunologicznym jest znaczące dla problemu interakcji pomiędzy układami immunologicznym a nerwowym. Katecholaminy są pierwszymi neuroprzekaznikami tak ściśle związanymi z układem immunologicznym. Badania tych zależności mogą być kluczowymi w wyjaśnieniu zaburzeń o podłożu immunologicznym. Do takich schorzeń należy białaczka – nowotwór złośliwy atakujący szpik kostny i krew, który charakteryzuje się niekontrolowanym i zazwyczaj nieodwracalnym rozrostem liczby białych krwinek.

W ramach badań w tutejszym Zespole prowadzono badania porównawcze u pacjentów zdrowych i chorych na różne typy białaczek: limfatycznych (na ostrą białaczkę limfoblastyczną – ALL, przewlekłą białaczkę limfoblastyczną – CLL), szpikowych (ostrą białaczkę szpikową – AML, przewlekłą białaczkę szpikową – CML) oraz w zespole mielodysplastycznym (MDS). Badano poziom noradrenaliny i dopaminy w ekstraktach leukocytów. Do wyznaczenia poziomu katecholamin zastosowano technikę spektrometrii masowej, a jako metodę jonizacji zastosowano elektrospray, ze względu na wysoką czułość i swoistość strukturalną.

Wyznaczono drogi fragmentacji standardów katecholamin w celu porównania ich z widmami ekstraktów leukocytów krwi obwodowej. Badania potwierdziły występowanie pików o wartościach m/z 170, 152, 139 odpowiadających norepinefrynie i jej fragmentom oraz 154 i 137 odpowiadających dopaminie i jej jonom fragmentacyjnym. Pomiar te dowiodły, że poziom katecholamin u osób chorych jest większy niż u osób zdrowych.

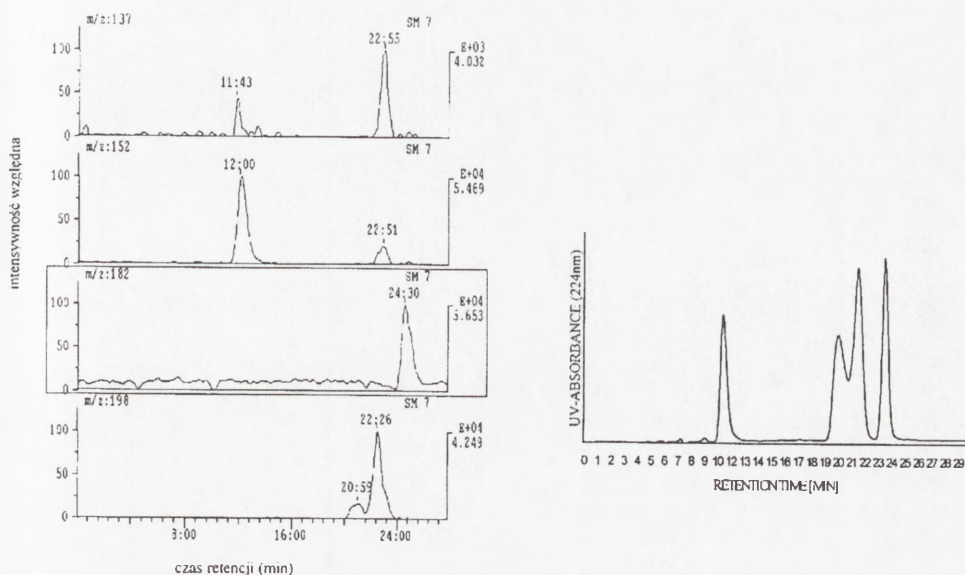
Wobec regulacyjnej funkcji katecholamin w układzie immunologicznym zwiększona ilość katecholamin w limfocytach może być związana z endogennym hamowaniem namnażania i różnicowania komórek limfoidalnych. Fakt ten może być wykorzystany w diagnostyce i terapii białaczek jako czynnik hamujący czynność limfocytów, a tym samym obniżający poziom niedojrzałych komórek. Ponadto aminy katecholowe mogą być wykorzystane jako markery w stanach chorobowych.

ANALIZA KATECHOLAMIN W PRÓBKACH BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Popularną techniką stosowaną do badań katecholamin jest spektrometria masowa w połączeniu z chromatografią gazową (GC MS). Najczęściej wykorzystywanymi tutaj metodami jonizacji są jonizacja elektronami (EI) i chemiczna (CI) [1, 18, 10, 19, 25, 29]. EI jest metodą używaną również w badaniach ilościowych, jednak główną jej wadą jest konieczność derywatywacji próbki w celu obniżenia temperatury parowania, co znacznie wydłuża czas analizy [13, 29, 31]. Nowoczesna i czuła spektrometria masowa obejmująca inne metody jonizacji, jak desorpcja laserowa w matrycy (MALDI) czy electrospray (ESI), jest obecnie coraz częściej stosowana do badań katecholamin, ich prekursorów i metabolitów [4, 7, 9, 16]. Stosowanie tych metod jonizacji stwarza wiele korzyści. Między innymi metody te są czulsze w porównaniu z techniką GC MS, co jest szczególnie ważne w badaniach obejmujących materiał biologiczny. Ponadto te łagodne metody jonizacji nie powodują rozpadu próbki w trakcie analizy, umożliwiając uzyskanie jonu molekularnego na widmie masowym. Należy podkreślić, że metody te nie wymagają uprzedniej derywatywacji próbek.

Elektroforeza kapilarna z detekcją elektrochemiczną (ED) lub w połączeniu ze spektrometrią masową są używane do identyfikacji i analizy tych amin biogennych [3, 6, 28, 30]. Metoda ta jest wykorzystywana w tych badaniach szczególnie często ze względu na wysoką rozdzielczość i selektywność. Detektor elektrochemiczny umożliwia stosowanie kapilar o średnicy poniżej 2 μm , co znacznie zmniejsza objętość próbki potrzebnej do wykonania analizy i poprawia czułość analiz. CZE ED umożliwia analizę substancji biogennych na poziomie pojedynczej komórki.

Technikę połączonej spektrometrii masowej (ESI MS) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconej fazie (RP-HPLC) zastosowano w badaniach katecholamin po raz pierwszy w tutejszym Zespole. Typowy eluent stosowany w RP-HPLC amin katecholowych zawiera w swoim składzie bufor fosforanowy, co jest znaczącym ograniczeniem tej metody. Bufor ten nie może być stosowany w przypadku, kiedy system HPLC jest bezpośrednio podłączony do spektrometru masowego, ze względu na łatwo tworzące się nierozpuszczalne polifosforany. Nowa metoda umożliwia połączenie tych dwóch technik przez zastosowanie gradientu



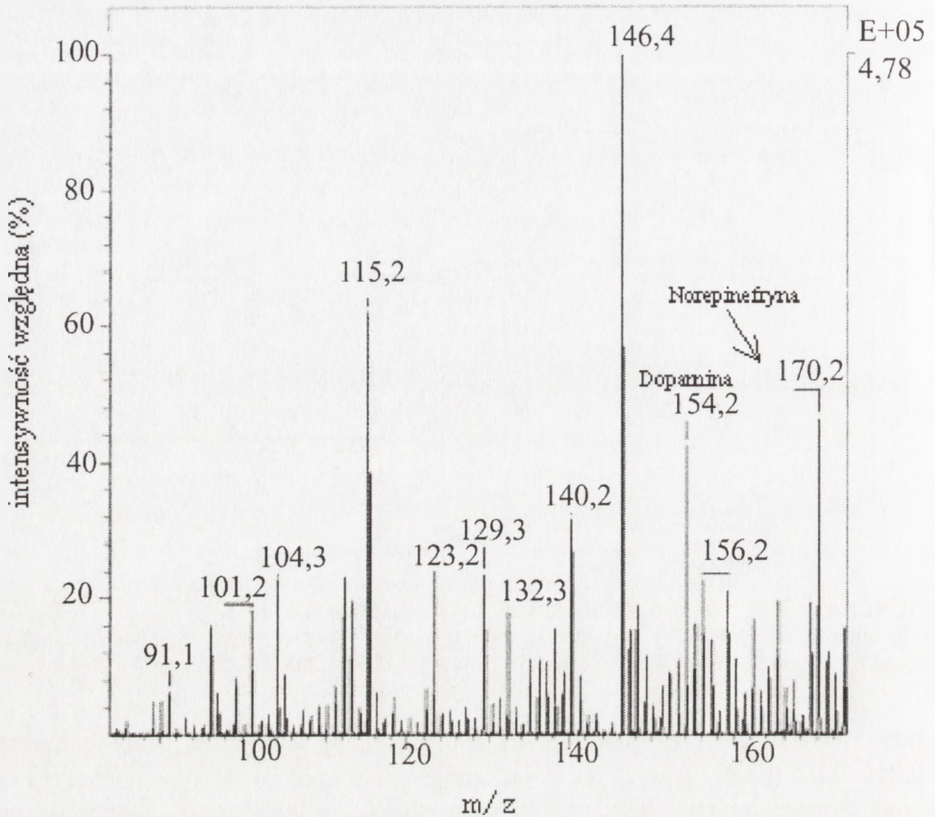
RYSUNEK 2. Analiza *on-line* LC/ESI MS standardów katecholamin. Po prawej stronie chromatogram UV dla długości fali 224 nm. Po lewej chromatogram masowy poszczególnych komponentów: $m/z=137$ – dopamina; $m/z=152$ – norepinefryna; $m/z=182$ – tyrozyna i $m/z=198$ – L-DOPA

wody z 0,01% TFA i dodatkiem oktanosulfonianu (eluent A) oraz acetonitrylu z 0,01% TFA (eluent B) (rys. 2). Połączenie *on-line* LC-ESI MS daje wiele korzyści, wśród których należy wymienić większą czułość, selektywność, jednoznaczność w identyfikacji składników czy wstępny rozdział mieszaniny, co ma szczególną wagę dla analiz próbek biologicznych.

Kolejnym krokiem w badaniach katecholamin jest zastosowanie techniki nanospray. Nanospray jest modyfikacją ESI wykorzystującą znacznie mniejszy przepływ cieczy (poniżej 300 nL/min), co prowadzi do uzyskania większej czułości oznaczeń (femto/attomole). Metoda ta jest szczególnie użyteczna w badaniach próbek biologicznych, kiedy dysponujemy niewielką ilością materiału potrzebnego do przeprowadzenia standardowej analizy. Przykładowe widmo masowe ekstraktu limfocytów, uzyskane techniką nanospray przedstawione zostało na rysunku 3.

PODSUMOWANIE

Katecholaminy to neuroprzekązniki pełniące szereg funkcji regulatorowych. Biorą udział w adaptacji na stresu, procesach uczenia się czy pamięci. Wiele chorób neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona) czy np. depresji endogennych jest powiązanych ściśle z poziomem katecholamin [12, 17, 22]. Katecholaminy pełnią



RYSUNEK 3. Widmo masowe endogennych katecholamin w ekstrakcie limfocytów ludzkich (5×10^6 komórek) wykonane techniką nanospray. Przepływ fazy ruchomej: 300 nL/min. Faza ruchoma: 30% MeOH + 0,1% HCOOH

również funkcje regulatorowe w układzie immunologicznym, gdzie regulują namnażanie i różnicowanie limfocytów. Identyfikacja dopaminy i norepinefryny w ekstraktach leukocytów krwi obwodowej i zwiększony poziom tych substancji w przypadku białaczek jest przykładem istniejących powiązań pomiędzy układem nerwowym a immunologicznym.

Dalsze badania prowadzone w kierunku badania interakcji między tymi układami mają szansę stworzenia modelu wiążącego katecholaminy, białaczki i czynniki wpływające na rozwój nowotworów, wśród których znaczące miejsce zajmuje stres. Wymaga to integracji szeregu badań klinicznych i wykorzystania nowoczesnych, ultraczułych metod biochemicznych, służących identyfikacji substancji endogennych, takich jak: LC/ESI MS, CZE/ESI MS czy nanospray.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDREW R, BEST SA, WATSON DG, MIDGLEY JM, REID JL, SQUIRE IB. Analysis of biogenic amines in plasma of hypertensive patients and a control group. *Neurochem Res* 1993; **18(11)**: 1179–1182.
- [2] BERCZI I, CHOW DA, SABBADINI ER. Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Dome Anim Endocrinol* 1998; **15(5)**: 273–281.
- [3] BERGQUIST J, JOSEFSSON E, TARKOWSKI A, EKMAN R, EWING A. Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; **18(10)**: 1760–1766.
- [4] BERGQUIST J, SILBERRING J. Identification of catecholamines in the immune system by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998; **12**: 683–688.
- [5] BERGQUIST J, TARKOWSKI A, EKMAN R, EWING A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91(26)**: 12912–12916, Dec 20.
- [6] BERGQUIST J, TARKOWSKI A, EWING A, EKMAN R. Catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. *Immunology Today* 1998; **19(12)**: 562–567.
- [7] BERTAZZO A, COSTA CV, ALLEGRI G, FAVRETTO D, TRALDI P. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to the detection of melanins formed from Dopa and dopamine. *J Mass Spectr* 1999; **34(9)**: 922–929.
- [8] CHAMBERS DA, COHEN RL, PERLMAN RL. Neuroimmune modulation: signal transduction and catecholamines. *Neurochem Int* 1993; **22(2)**: 95–110.
- [9] CHEN S, LI Q, CARVEY PM, LI K. Analysis of 9-fluorenylmethylloxycarbonyl derivatives of catecholamines by high performance liquid chromatography, liquid chromatography/mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999; **13(18)**: 1869–1877.
- [10] FAULER G, LEIS HJ, HUBER E, SCHELLAUFC, KERBL R, URBAN C, GLEISPACH H. Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in neuroblastoma screening by stable isotope dilution GC-MS. *J Mass Spectrom* 1997; **32(5)**: 507–514.
- [11] GOODMAN, GILMAN (red.) "The pharmacological basis of therapeutics". McGraw-Hill Companies, 1996 rozdz. II 10, III 12
- [12] GÓRSKA T, GRABOWSKA A, ZAGRODZKA J. (red.) Mózg a zachowanie, Jegliński W. Mózg a układ odpornościowy, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997, 91–104.
- [13] de JONG AP, CRAMERS CA. Derivatization of catecholamines in aqueous solution for quantitative analysis in biological fluids. *J Chromatogr* 1983; **276(2)**: 267–278.
- [14] JOSEFSSON E, BERGQUIST J, EKMAN R, TARKOWSKI A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology* 1996; **88(1)**: 140–146.
- [15] KAGEDAL B, GOLDSTEIN DS. Catecholamines and their metabolites. *J Chromatogr* 1998; **429**: 177–233.
- [16] KERWIN JL. Negative ion electrospray mass spectrometry of polyphenols, catecholamines and their oxidation products. *J Mass Spectrom* 1996; **31(12)**: 1429–39
- [17] KOSTOWSKI W, KUBIKOWSKI P. Farmakologia. 1996, Wydawnictwa Lekarskie PWL, Warszawa, 91–95, 104–106.
- [18] KUHLENBECK DL, O'NEILL TP, MACK CE, HOKESH ND, WEHMEYER KR. Determination of norepinephrine in small volume plasma samples by stable-isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry with negative ion chemical ionization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; **11;738(2)**: 319–330.

- [19] MATTAMMAL MB, CHUNG HD, STRONG R, HSU FF. Confirmation of a dopamine metabolite in parkinsonian brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1993; **614**: 205–212.
- [20] MURRAY AM, WEIHMUELER FB, MARSHALL JF, HURTIG HI, GOTTLIEB GL, JOYCE JN. Damage to dopamine systems differs between parkinson's disease and Alzheimer's disease with parkinsonism. *Ann Neurol* 1995; **37**: 300–312.
- [21] MUSSO NR, BRENCI S, SETTI M, INDIVERI F, LOTTI G. Catecholamine content and *in vitro* catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 3553–3557.
- [22] NEMEROFF ChB. Neurobiologia depresji. *Świat Nauki*. Sierpień 1998.
- [23] NYLANDER I, SILBERRING J. Opioid peptides in drug dependence and neurological diseases. *Progress in HPLC-HPCE*, 1998; **7**: 171–192.
- [24] O'CONNOR DT. Chromaffin cell mechanisms: understanding catecholamine storage and release. *TiPS* 1999; **20**: 431–432.
- [25] ORIGITANO TC, COLLINS MA. Gas chromatographic analysis of endogenous catecholamines, phenolic amines and derived isoquinolines using short glass capillary columns and electron-capture detection. *J Chromatogr* 1984; **311**: 17–29.
- [26] QIU Y, PENG Y, WANG J. Immunoregulatory role of neurotransmitters. *Adv Neuroimmun* 1996; **6**: 223–231.
- [27] SPANAGEL R, WEISS F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 1999; **22**: 521–527.
- [28] SIREN H, KARJALAINEN U. Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1999; **853**: 527–533.
- [29] TAS AC, ODINK J, TEN NOEVER DE BRAUW MC, SCHRIJVER J, JONK RJ. Derivatization and mass spectrometric behaviour of catecholamines and their 3-O-methylated metabolites. *J Chromatogr* 1984; **310**: 243–250.
- [30] WALLENBORG SR, NYHOLM L, LUNTE CE. End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol. *Anal Chem* 1999; **71**: 544–549.
- [31] WATSON DG, MIDGLEY JM, CHEN RN, HUANG W, BAIN GM, MCDONALD NM, REID JL, MCGHEE CN. Analysis of biogenic amines and their metabolites in biological tissues and fluids by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC-NICIMS). *J Pharm Biomed Anal* 1990; **8**: 899–904.

Adres autora: ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków
e-mail: sciubisz@chemia.uj.edu.pl

Część trzecia

**INTERAKCJA LIGAND-BIAŁKO
W UKŁADACH TRANSPORTU WITAMIN**

BIĄŁKO WIĄŻĄCE RYBOFLAWINĘ Z JAJ KURZYCH – STRUKTURA BIAŁKA I MECHANIZM WIĄZANIA LIGANDU

CHICKEN EGG RIBOFLAVIN-BINDING PROTEIN – PROTEIN STRUCTURE AND LIGAND-BINDING MECHANISM

Andrzej KOZIK

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Białko, wiążące ryboflawinę z jaj kurzych, rozpuszczalne białko o funkcji transportowej, a zarazem stosunkowo prosta flavoproteina, jest intensywnie badane pod względem struktury cząsteczki białka oraz fizykochemicznego mechanizmu oddziaływania białko-ligand. W niniejszym artykule przedstawiono postęp tych badań w ciągu ostatnich kilkunastu lat, począwszy od określenia struktury pierwszorzędowej tego białka. Wykazuje ono wysoki stopień homologii z białkami wiążącymi kwas foliowy, a jego makrocząsteczka ma unikalną strukturę trzeciorzędową, z dwiema domenami: silnie spiętą mostkami dwusiarczkowymi domeną wiążącą ligand oraz odrębnym motywem ufosforylowanym, odpowiedzialnym za transport białka do oocytu. Cząsteczka ryboflawiny wiąże się w hydrofobowej kieszeni makrocząsteczki; układ izoalloksazyny obłożony jest z obu stron przez reszty tryptofanu-156 oraz tyrozyny-75, a rybitolowy łańcuch boczny zakotwiczony jest licznymi wiązaniami wodorowymi. W najnowszych badaniach ostatecznie ustalono strukturę składnika cukrowego oraz przedstawiono ogólne cechy procesu fałdowania struktury natywnej tego białka.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 183–198)

Słowa kluczowe: transport ryboflawiny, fałdowanie białek, białka wiążące kwas foliowy

Summary: The structure and ligand-protein interaction of chicken egg riboflavin-binding protein, a representative transport protein and simple flavoprotein, is extensively studied. This work reviews the current progress of this field over last fifteen years, starting from the study establishing the protein primary structure. This protein is highly homologous to the folate-binding proteins and forms a unique fold, consisting of two domains: a ligand-binding domain cross-linked with multiple disulphide bridges and a separate phosphorylated motif which is responsible for protein transport to the oocyte. Riboflavin is bound into a hydrophobic pocket, the izoalloxazine rings stacked in between tryptophan-156 and tyrosine-75 and the rybityl chain anchored with multiple hydrogen bonds. Recent studies specified the

structure of the oligosaccharide moiety and presented general pathways of the protein folding. (*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 183–198*)

Key words: riboflavin transport, protein folding, folate-binding proteins

WSTĘP

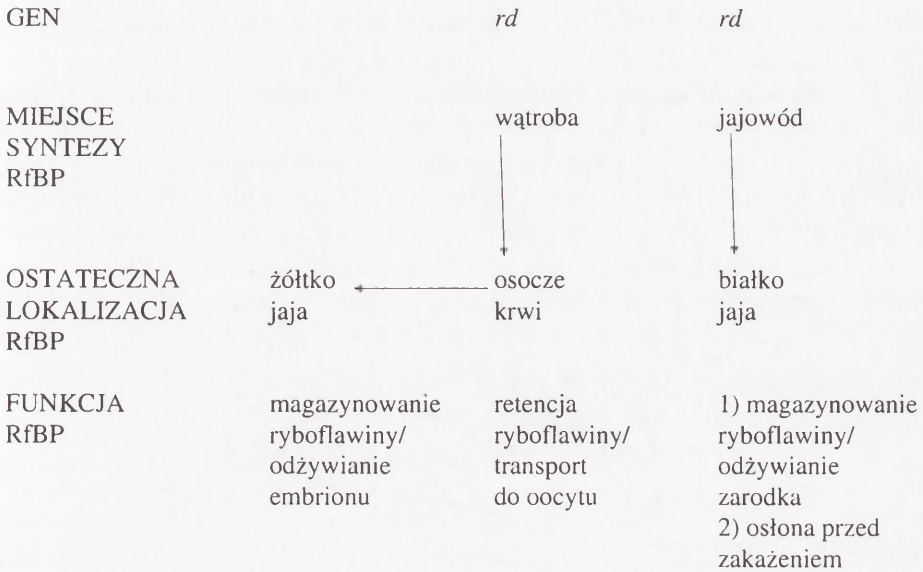
Aktywacja biologiczna ryboflawiny (witaminy B₂) polega na jej przekształceniu w koenzymy flawinowe, FMN i FAD. Wchodzą one w skład licznych oksydoreduktaz, z których wiele ma kluczowe znaczenie w metabolizmie komórki. Natomiast białka, które wiążą nieufosforylowaną ryboflawinę, nie są enzymami. Zadaniem większości z nich jest kontrola podaży ryboflawiny dla enzymów aktywacyjnych (flawokinazy i syntetazy FAD) poprzez udział w procesach transportu, retencji lub magazynowania tej witaminy.

Najważniejsze grupy takich białek wiążących ryboflawinę (RfBP):

- wchodzą w skład układów transportu ryboflawiny przez błony plazmatyczne wielu typów komórek prokariotycznych i eukariotycznych,
- przytrzymują ryboflawinę w płynach ustrojowych, opóźniając jej wydalanie przez nerki; w osoczu funkcję tę pełnią albumina oraz globuliny wiążące ryboflawinę [16, 48],
- biorą udział w procesach transportu, retencji i magazynowania ryboflawiny istotnych dla fizjologii rozrodu zwierząt:
- ulegają akumulacji w kompleksie z ryboflawiną w hemolimfie larw owadów tuż przed fazą przepoczwarczenia (pewne białka z grupy heksameryn [6, 23, 28, 29, 35, 40, 41]),
- występują w jajach ptaków i pojawiają się w osoczu krwi samic w okresie lęgowym [17] (schemat ten dotyczy zapewne wszystkich kręgowców jajorodnych [1, 2, 12, 24, 44]),
- pojawiają się w osoczu krwi samic ssaków w stanie ciąży [3, 31, 32, 33, 38, 47].

Zdecydowanie najszerzej badane były do tej pory ptasie RfBP. Na rysunku 1 schematycznie zilustrowano ich występowanie i konkretne funkcje.

Niniejszy artykuł poświęcony jest wyraźnie wyodrębnionemu nurtowi badań struktury RfBP z jaj kurzych oraz mechanizmu oddziaływania tego białka z ryboflawiną. Intensywność tego kierunku, rozpoczętego na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych, nadała RfBP status modelowej, jednej z najlepiej w tych aspektach scharakteryzowanej flawoproteiny. W tabeli 1 przedstawiono główne fazy fizykochemicznych badań nad RfBP. Do początku lat osiemdziesiątych struktura samej cząsteczki białka była słabo poznana, natomiast badania stanu związanej z białkiem ryboflawiny przy zastosowaniu całej gamy rozmaitych metod spektroskopowych, zmian konformacji białka towarzyszących wiązaniu ligandu, wpływu chemicznej



RYSUNEK 1. Schemat ilustrujący pochodzenie, występowanie i funkcje ptasich białek wiążących ryboflawinę (RfBP)

TABELA 1. Fazy fizykochemicznych badań nad białkiem wiążącym ryboflawinę z jaj kurzych (RfBP)

Rok/lata	Kierunek badań/osiągnięcie	Reprezentatywne publikacje oryginalne lub (*) artykuł przeglądowy
1959	Izolacja RfBP z białka jaj kurzych	[17]*
od 1970	Badanie RfBP i jego kompleksu z ryboflawiną metodami spektroskopowymi	[17]*
1978–1982	Kulminacja badań z zastosowaniem metod chemicznej modyfikacji obu oddziałujących partnerów: szczegółowy model chemiczny miejsca wiążącego ryboflawinę	[17]*
1984–1988	Analiza sekwencji RfBP	[13, 14, 34, 50]
1984	Krystalizacja RfBP	[49]
1992–1993	Analiza sekwencji składnika oligosacharydowego	[39, 45]
1996	Otrzymanie rekombinantowego RfBP	[42]
1997	Struktura trójwymiarowa (z rozdzielczością 2,5 Å) krystalicznego RfBP	[30]
1992–1998	Badania procesu fałdowania cząsteczki RfBP	[26, 46]

modyfikacji cząsteczki białka na jego aktywność wiążącą oraz powinowactwa białka do imponującej liczby syntetycznych analogów strukturalnych ryboflawiny doprowadziły do wyrafinowanej koncepcji struktury chemicznej centrum wiążącego ligand. Ówczesny stan badań nad RfBP podsumowano w innym artykule przeglądowym [17]. Chociaż wymienione podejścia metodyczne są kontynuowane [7, 10, 15, 19] i nadal dostarczają szczegółowych informacji o mechanizmie oddziaływania białko-ligand w tym układzie, w niniejszej pracy nakreślono obraz, uzyskany współczesnymi metodami strukturalno-chemicznymi, który zaczął się wyłaniać z chwilą oznaczenia pełnej sekwencji aminokwasowej łańcucha polipeptydowego RfBP [13], a przypięczony został wraz z określeniem struktury przestrzennej tego białka [30].

I. PODSTAWOWE INFORMACJE O STRUKTURZE CZĄSTECZKI RfBP

Prekursor RfBP, kodowany przez pojedynczy gen *rd* [11, 22, 50], syntetyzowany jest w wątrobie i jajowodzie. Białko to podlega następnie kilku rodzajom potranslacyjnej modyfikacji:

- w wyniku ograniczonej proteolizy następuje odcięcie 17-aminokwasowego peptydu sygnałowego od N-końca oraz, co już nie jest typowe, dwóch reszt argininy od C-końca; dojrzałe RfBP osocza oraz białka jaja składa się z 219 aminokwasów, a masa cząsteczkowa części peptydowej wynosi 29,2 kDa [13, 34],
- następuje intensywne usieciowanie cząsteczki poprzez utworzenie 9 mostków dwusiarczkowych [14, 17],
- cząsteczka jest glikozylowana w dwóch punktach, Asn-36 i Asn-147; składnik oligosacharydowy RfBP z białka znacznie różni się od zasadniczo identycznych składników cukrowych RfBP z osocza i żółtka [5],
- na odcinku C-końcowym, między Ser-186 a Ser-197, 8 reszt seryny ulega fosforylacji [8, 27],
- w trakcie transportu lub dojrzewania RfBP żółtkowego następuje proteolityczne odcięcie od C-końca 11–13 aminokwasów [34].

II. STRUKTURA ŁAŃCUCHA POLIPEPTYDOWEGO RfBP

1. Struktura pierwszorzędowa

Zgodnie z wcześniejszymi badaniami genetycznymi, dowodzącymi, że wszystkie trzy RfBP w obrębie jednego gatunku ptaka są kodowane przez ten sam gen, sekwencja aminokwasów łańcucha polipeptydowego RfBP z białka jaj kurzych jest

```

Q Y L L L Q C C L E G D K H H T H K A E P P S P E P N N M H E - C S F Y S R K N A C C Y A N N F T S I O
L L N V V C K A E P G P E D D S L L H E E Q C R P W R K X A C C C S V N N - T T S I O
L L N V V C K A E P G P E D D S L L H E E Q C R P W R K X A C C C S V N N - T T S I O

L A H S B I I K V S N S Y M N R C Q L S K S C E R R H F F I I X Y Q D D I E E C F Y R C S P H
E A K R D I S Y L Y R R F N M D H H C G K X S P A C C K K R R H F F I I X Y Q D D I E E C F Y R C S P H
A A H K D V S Y L Y R R F N M D H H C G K X S P A C C K K R R H F F I I X Y Q D D I E E C F Y R C S P H

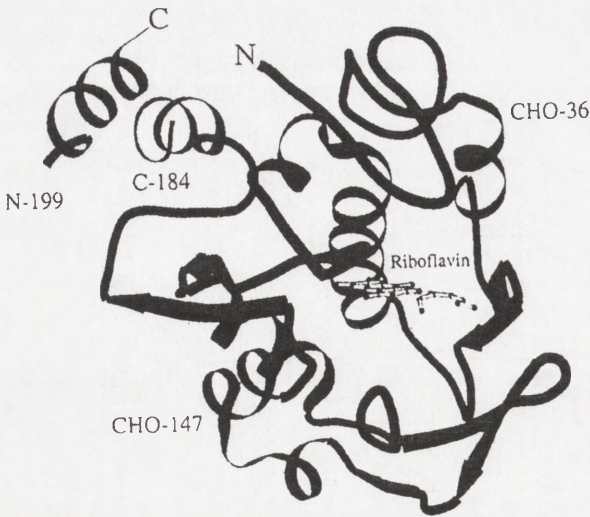
A A R W I - - - - D P R Y T A A I Q S V P L C Q K S F C D D S W M E Y E E D C C K R T S Y I C C A H S N M W
L G P W J R E V V D Q S E N R X E R V L G V P L C Q K S F C D D S W M E Y E E D C C K R T S Y I C C A H S N M W
L L G P W J R E V V D Q S E N R X E R V L G V P L C Q K S F C D D S W M E Y E E D C C K R T S Y I C C A H S N M W

J T D W E R R D E S G G Y Y F H C K S K - - - Y P R F F H S E M Y A N G T D D H C Q S M W G E S S Y Y
H K X G W N N W - T S G P V V K A A A C C V H R C Q H K K D M V A I K H L L S S S S M S S S E N P
K V S E - S C L Q H N K K D M V A I K H L L S S S S M S S S E N P
K V S N Y S R G S G R C I Q H M W - - - - F D P F Q G N P M E E V A R R F - Y A A A M
K V S N Y S R G S G R C I Q H M W - - - - F D P F Q G N P M E E V A R R F - Y A A A M

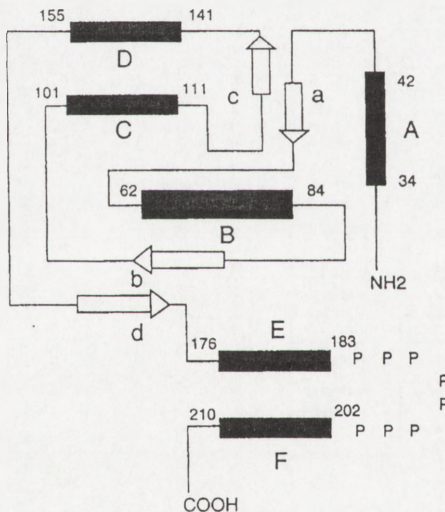
A C Q K L L K F E A L Q Q E G E R R A C C R R F H H H L L S S S S M S S S E N P
S G A G P W A A W P F L L S L A L M L L W L L S C C K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K K

```

RYSUNEK 2. Homologia struktury pierwszorzędowej (kolejno od góry): białka wiążącego ryboflawinę z jaj kurzyc (RFBP) oraz białek wiążących kwas foliowy: z mleka krowiego oraz komórek ludzkiego łożyska. Ramkami otoczono reszty, które są identyczne w RFBP i przynajmniej jednym z białek wiążących kwas foliowy (z [30], z modyfikacjami)



RYSUNEK 3. Wstęgowy diagram struktury trzeciorzędowej białka wiążącego ryboflawinę z jaj kurzych (RfBP). Zaznaczono położenie cząsteczki ryboflawiny oraz punkty glikozylacji (reprodukowane z [30] za zezwoleniem Oxford University Press i autora)



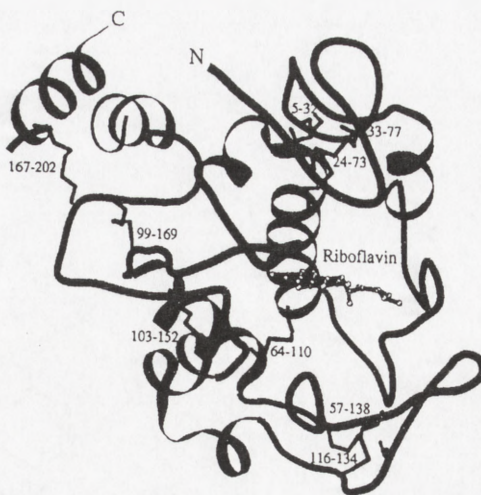
RYSUNEK 4. Topologia struktury drugorzędowej w cząsteczce RfBP. Cylindry symbolizują α -helisy, a strzałki – odcinki tworzące β -kartkę (reprodukowane z [30] za zezwoleniem Oxford University Press i autora)

taka sama jak RfBP z osocza, natomiast po odliczeniu 13 aminokwasów C-końcowych również RfBP żółtkowego [34]. O stopniu podobieństwa struktury pierwszorzędowej białek wiążących ryboflawinę między różnymi gromadami kręgowców uczy porównanie z sekwencją RfBP z jaj żółtwa *Trionyx sinensis japonicus* [12]: 71% identyczności z kurzym RfBP lub z wątroby ropuchy *Scaphiopus couchii* [44]: 50% identyczności. Co najbardziej jednak interesujące, RfBP tworzą jedną rodzinną strukturalną nie z jakąkolwiek grupą innych flawoprotein, lecz z białkami wiążącymi kwas foliowy (FBP) [30, 50]. Na rysunku 2 zilustrowano homologię struktury pierwszorzędowej RfBP z jaj kurzych i FBP z mleka krowiego i komórek ludzkiego łożyska [30]. Na ściśle homologicznych odcinkach (reszty 5–172) sekwencji porównywanych białek, ponad 30% aminokwasów jest identycznych. Warto jednak zwrócić od razu uwagę, że brak jest znaczącej homologii między RfBP i FBP na prawie 50-aminokwasowym odcinku C-końcowym.

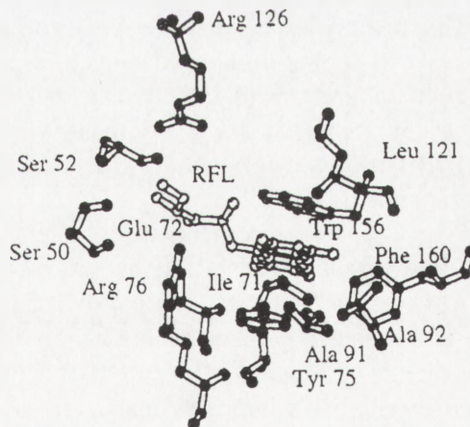
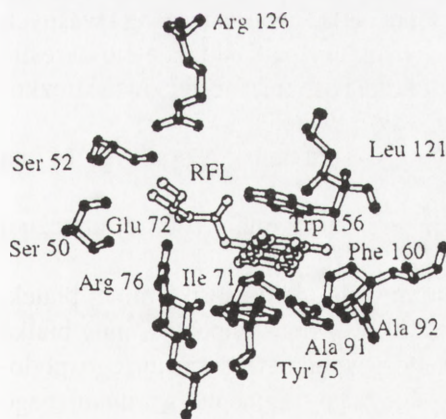
2. Struktura przestrzenna części RfBP

Plan struktury trzeciorzędowej łańcucha polipeptydowego RfBP z jaj kurzych [30] przedstawiono na rysunku 3. Najważniejsze cechy tej makrocząsteczki są następujące:

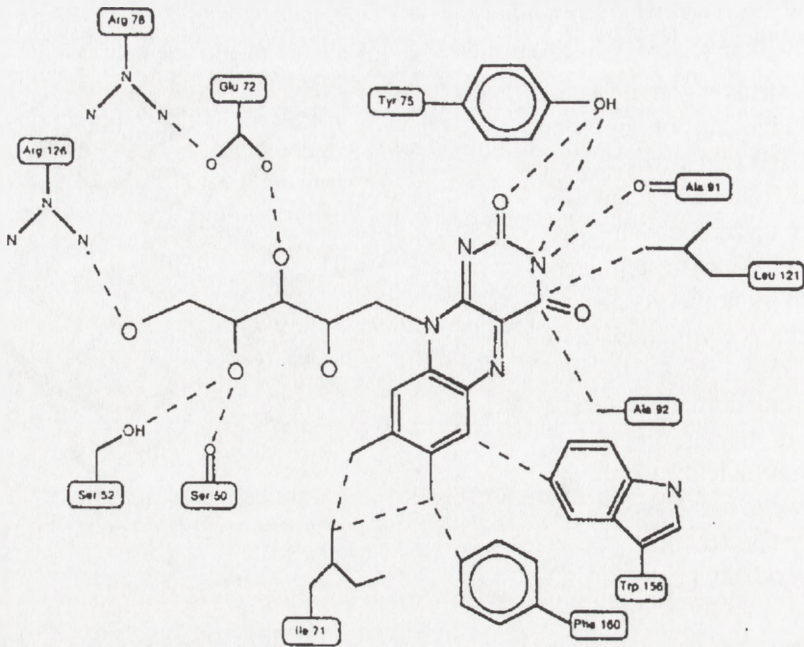
1. Jest to monomeryczna cząsteczka o wymiarach 50 x 40 x 35 Å.
2. Zawiera domenę wiążącą ligand, utworzoną przez odcinek łańcucha polipeptydowego od N-końca do reszty Cys169 oraz począwszy od tej reszty do C-końca, motyw silnie ufosforforylowany.
3. Ma następującą topologię struktur drugorzędowych (rys. 4): 6 helis α , A do F (obejmujących 30% reszt aminokwasowych) oraz 4 nieciągłe serie struktur β , a do d (15% reszt aminokwasowych). Helisy B i D są załamane. Struktura β jest bardzo skomplikowana, poprzerzywana, z najdłuższym ciągłym fragmentem zawierającym zaledwie 5 reszt aminokwasowych.



RYSUNEK 5. Położenie mostków dwusiarczkowych w cząsteczce RfBP (reprodukowane z [30] za zezwoleniem Oxford University Press i autora)



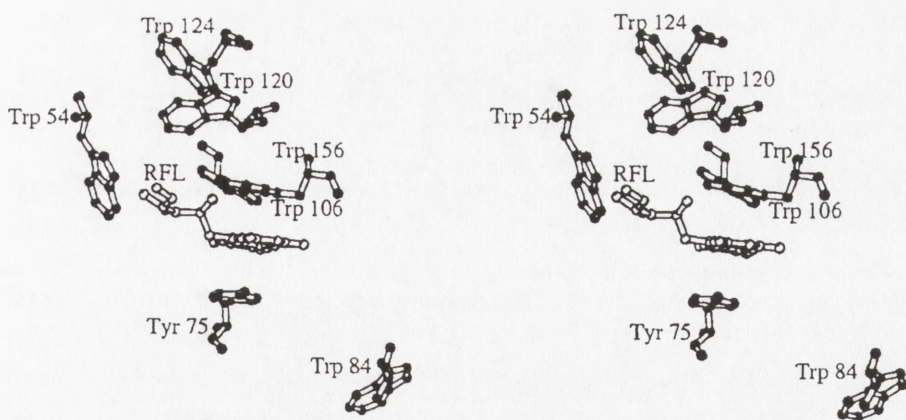
RYSUNEK 6. Diagram przestrzenny, ilustrujący najbliższe otoczenie ryboflawiny przyłączonej do RfBP (reprodukowane z [30] za zezwoleniem Oxford University Press i autora)



RYSUNEK 7. Schemat oddziaływań ryboflawiny z resztami aminokwasowymi w centrum wiążącym w RfBP (reprodukowane z [30] za pozwoleniem Oxford University Press i autora)

4. Domenę wiążącą ligand tworzą helisy A do D oraz cała struktura β . Domena ta jest silnie usieciowana ośmioma mostkami dwusiarczkowymi (rys. 5).
5. Motyw ufosforylowany odpowiedzialny jest za transport RfBP do oocyta [21, 43]. Zbudowany jest z helis E i F, połączonych giętką pętlą zawierającą ciąg kwaśnych reszt: Glu oraz ufosforylowanych reszt Ser (struktury pętli nie daje się określić rentgenograficznie). Pojedynczy (dziewiąty z kolei i ostatni) mostek dwusiarczkowy zakotwicza helisę F w domenę wiążącą ryboflawinę.
6. RfBP ma dwa punkty glikozylacji: Asn-36 na początku helisy A oraz Asn-147 na zakręcie helisy D.
7. Między obiema domenami jest miejsce wiążące bursztynian; rola tej ubocznej aktywności wiążącej RfBP nie jest znana.

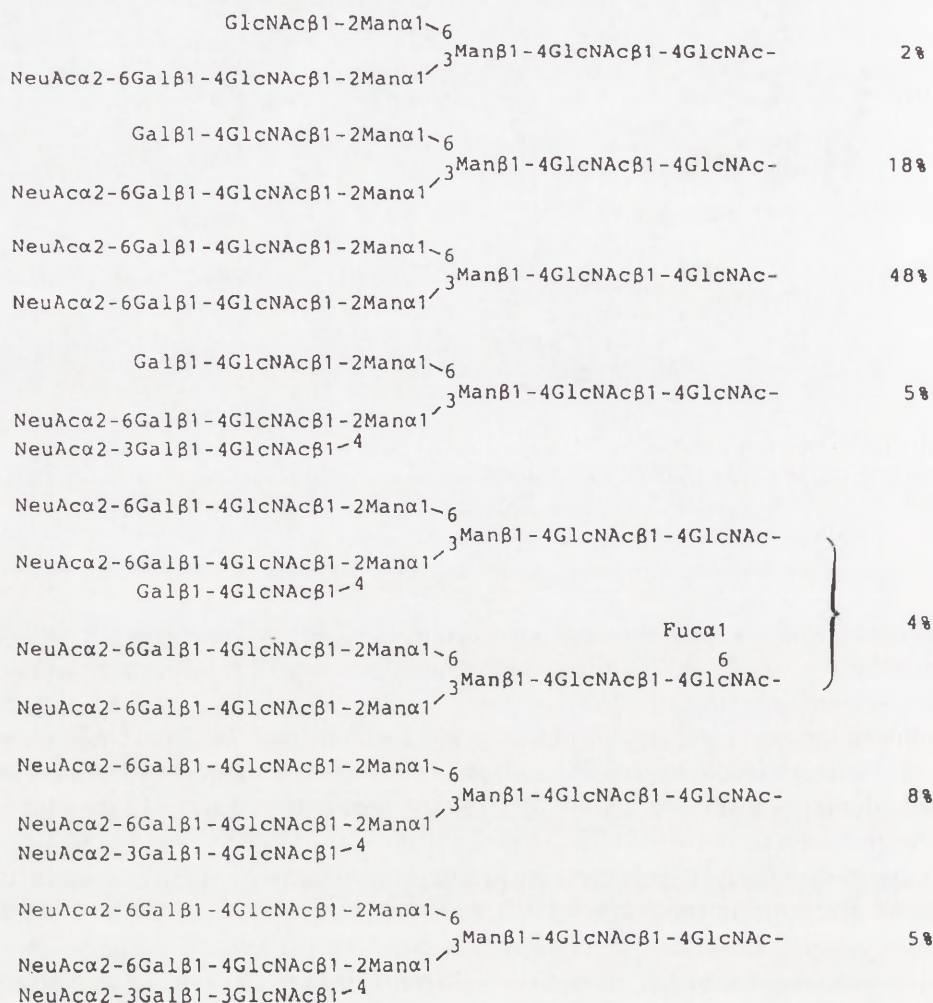
Cząsteczka RfBP stanowi prototyp zupełnie nowej rodziny strukturalnej białek, do której należą ponadto białka wiążące kwas foliowy oraz, zapewne, inne białka wiążące ryboflawinę. Między RfBP a FBP należy spodziewać się dużego podobieństwa domen wiążących ligand, ale nie C-końcowego fragmentu, warunkującego odmienne funkcje biologiczne białek tej rodziny.



RYSUNEK 8. Diagram przestrzenny, obrazujący rozmieszczenie reszt tryptofanu wokół cząsteczki ryboflawiny przyłączonej do RfBP (reprodukowane z [30] za zezwoleniem Oxford University Press i autora)

3. Wiązanie ryboflawiny

Kieszon wiążąca ryboflawinę w cząsteczce RfBP[30] ma szerokość ok. 20 Å, a głębokość – ok. 15 Å. Najbliższe otoczenie związanego ligandu przedstawiono przestrzennie na rysunku 6. Zwrócić należy uwagę przede wszystkim na oddziaływanie stakingowe pierścienia izoalloksazyny z resztami tryptofanu-156 oraz tyrozyny-75. Pierścień indolowy Trp-156 okłada część o-ksylenową trójpierścieniowego układu dimetyloizoalloksazyny od jednej strony jego płaszczyzny; od strony przeciwnej pierścień fenolowy Tyr-75 okłada część pirymidynową. Występowanie kompleksów π - π między tryptofanem a ryboflawiną w miejscu wiążącym w RfBP, a nawet przesunięcie centrum tego oddziaływania ku fragmentowi ksylenowemu, przewidywano z licznych wcześniejszych badań z zastosowaniem metod spektroskopowych oraz chemicznej modyfikacji [17]. Również w zgodności z wcześniejszymi wyobrażeniami o hydrofobowym charakterze miejsca wiążącego wokół układu izoalloksazyny [17] pozostaje wyraźna koncentracja w tym rejonie kilku silnie hydrofobowych reszt aminokwasowych (Tyr-75, Ala-91, Leu-121, Ala-92, Trp-156, Phe-160, Ile-71). Jak jaśniej ilustruje schemat przypuszczalnych oddziaływań ryboflawiny zakotwiczonej w centrum wiążącym (rys. 7), grupy hydroksylowe boczno-łańcucha rybitolu tworzą prawdopodobnie wiązania wodorowe z resztami Ser-50, Ser-52, Glu-72, Arg-76 i Arg-126. O występowaniu grupy karboksylowej [17] oraz 1–2 reszt argininy i jej prawdopodobnym oddziaływaniu z grupą karboksylową [18] w centrum wiążącym ryboflawinę wnioskowano z wcześniejszych badań z zastosowaniem metod chemicznej modyfikacji RfBP. Sam obraz struktury przestrzennej łańcucha RfBP nie daje jednak pełnej informacji o względnej ważności



RYSUNEK 9. Struktura łańcuchów oligosacharydowych RfBP z żółtka. Podano względną zawartość każdego składnika (z [45], z modyfikacjami)

poszczególnych rodzajów oddziaływań, tj. ich wkładzie w całkowitą energię wiązania. Przykładowo, mimo dużej liczby potencjalnych wiązań z zaangażowaniem pierścienia pirymidynowego ryboflawiny (rys. 7), wiadomo od dawna, że ten fragment jest stosunkowo mało istotny i wyeksponowany na zewnątrz, w odróżnieniu od głęboko wchodzącego w kieszeń wiążącą i wnoszącego o wiele znacznie większy wkład energetyczny fragmentu o-ksylenowego układu dimetyloizoallosazyny [17]. Ilustracją sposobu, w jaki tego rodzaju szczegółowe niespójności mogą być wyjaśnione,

są m.in. niedawne badania z zastosowaniem spektroskopii ramanowskiej [19], z których wynika, że wiązanie wodorowe z udziałem atomu azotu (3) pierścienia pirymidynowego jest słabsze w przypadku oddziaływania związanej ryboflawiny z białkiem niż wolnej ryboflawiny z cząsteczką wody. Wiązanie to oznacza zatem raczej destabilizację niż stabilizację kompleksu ligand-białko.

Jak zilustrowano na rysunku 8, nie tylko Trp-156, ale jeszcze cztery z wszystkich sześciu reszt tryptofanu są zlokalizowane w pobliżu związanej ryboflawiny [30]. Stanowi to przekonujące wyjaśnienie bardzo wcześnie rozpoznanego zjawiska wygaszania fluorescencji obu składników z chwilą utworzenia kompleksu ryboflawina-białko: pełnego wygaszenia fluorescencji ryboflawiny i prawie pełnego (w około 85%) wygaszenia wewnętrznej (tj. uwarunkowanej właściwościami reszt tryptofanu) fluorescencji białka [17]. Za resztkową fluorescencję holoproteiny mogłby być zatem odpowiedzialny najbardziej odległy od związanego ligandu Trp-84.

II. STRUKTURA SKŁADNIKA OLIGOSACHARYDOWEGO RfBP

RfBP z jaj kurzych jest glikoproteina, zawierającą 14% węglowodanów. Szczegółowa struktura składnika cukrowego poznana została dopiero w ostatnich latach [5, 20, 37, 39, 45]. Wzór glikozylacji RfBP jest bardzo złożony: różne, wieloantenowe łańcuchy oligosacharydowe występują z różną średnią częstością, rozmaicie zlokalizowane w poszczególnych cząsteczkach białka i o wyraźnie różnej dystrybucji pomiędzy dwoma miejscami glikozylacji: Asp-36 i Asp-147. Pociąga to za sobą heterogeniczność RfBP: występowanie tego białka w licznych, możliwych do wyodrębnienia metodami elektroforetycznymi, izoformach. Stosunkowo najbardziej przejrzysta jest sytuacja w RfBP z żółtka [45]; jeden mol tego białka zawiera 5,8 moli mannozy, 5,1 moli galaktozy, 7,5 moli N-acetylglukozyminy, 2,7 moli kwasu N-acetylneuraminowego i minimalną zaledwie ilość fukozy. Strukturę zidentyfikowanych łańcuchów oligosacharydowych przedstawiono na rysunku 9, z zaznaczeniem częstości ich występowania. Są to układy dwu- i trójantenowe; tylko nieliczne z anten nie są zakończone kwasem sialowym. Składnik najczęściej występujący (48%) to undekasacharyd z dwiema sialowanymi, czterocukrowymi antenami. W łańcuchach, związanych z Asn-147 jest więcej układów trójantenowych i mniej składnika najczęstszego w porównaniu z drugim miejscem glikozylacji. Struktura części cukrowej RfBP z osocza [39] jest bardzo podobna, jeśli nie identyczna jak w RfBP z żółtka, natomiast w RfBP z białka [5, 20, 37] – zasadniczo odmienna i o wiele bardziej złożona. Łańcuchy są bardziej rozgałęzione, nawet pięcioantenowe, rzadziej zakończone resztą kwasu sialowego i znacznie częściej posiadające resztkę fukozy. Porównanie dystrybucji łańcuchów pomiędzy oba miejsca glikozylacji wskazuje na większą ilość łańcuchów silnie rozgałęzionych związanych z Asn-147.

III. BADANIA PROCESU FAŁDOWANIA ŁAŃCUCHA POLIPEPTYDOWEGO RfBP

Charakterystyka procesów przyjmowania przez łańcuchy polipeptydowe struktury natywnej (fałdowanie, ang. *folding*) należy do najintensywniejszych aktualnie nurtów w badaniach strukturalnych białek. Z uwagi na wyjątkowo silne usieciowanie dziewięcioma mostkami dwusiarczkowymi, cząsteczka RfBP zyskuje status interesującego modelu dla tego typu badań. Białko, w którym wiązania dwusiarczkowe nie zostały naruszone, poddane działaniu czynników denaturujących, takich jak chlorowodorek guanidyny (Gu-HCl), całkowicie traci cechy struktury trzeciorzędowej i drugorzędowej, ale odzyskuje je w pełni, tak jak i aktywność wiązania, po usunięciu denaturanta [4, 9]. Z badań procesów denaturacji-renaturacji w funkcji stężenia Gu-HCl wysnuto przypuszczenie o istnieniu stanu pośredniego ze zniszczoną strukturą trzeciorzędową, lecz zachowanymi elementami struktury drugorzędowej [4]. Kinetyka renaturacji, badana szybkimi metodami spektroskopowymi *stopped-flow*, wskazuje, że odtworzenie stanu natywnego ze stanu zdenaturowanego odbywa się w co najmniej czterech etapach, tj. przez trzy stany pośrednie [26]. W pierwszym z nich cząsteczka ma elementy struktury drugorzędowej i wiąże sondę hydrofobowych powierzchni tak jak w stanie natywnym, ale jeszcze nie wiąże ryboflawiny. W kolejnych stanach aktywność wiązania ryboflawiny jest pełna, ale jeszcze zmienia się ekspozycja reszt tryptofanu, co sugeruje, że białko wciąż dopasowuje swoją strukturę trzeciorzędową. Czasy połowicznych przejść na tych hipotetycznych etapach wynoszą odpowiednio <1,7 ms, 25 ms, 50 s i 60 min. Defosforylacja RfBP nie zmieniała termodynamiki ani kinetyki renaturacji.

Po redukcji mostków dwusiarczkowych, zawartość struktur drugorzędowych w cząsteczce RfBP obniża się dwukrotnie, sądząc ze zmian widma dichroizmu kołowego w dalekim nadfiolecie, oraz zwiększa się, rejestrowana spektrofluorymetrycznie, ekspozycja reszt tryptofanu [4, 25]. Resztki struktury drugorzędowej oczywiście zanikają po dodatkowej denaturacji. Próby renaturacji-reoksydacji naturalnym układem glutation zredukowany-glutation utleniony prowadziły do znaczącego odzysku aktywności wiązania ryboflawiny jedynie w obecności wysokich stężeń znanego enzymu naprawczego: izomerazy dwusiarczków w białkach [25]. Jednak pełne odtworzenia zarówno aktywności wiązania, jak i struktury przestrzennej następuje w trakcie renaturacji-reoksydacji rozpuszczonym tlenem z powietrza [36, 46]. W tych ostatnich eksperymentach zaobserwowano co najmniej dwa stany pośrednie:

- stan nieaktywny, z utlenionymi, ale wciąż ulegającymi rearanżacji mostkami dwusiarczkowymi,
- stan w pełni aktywny, jednak ze strukturą znacząco rozluźnioną wskutek niepełnej reoksydacji mostków dwusiarczkowych.

W badaniach nad zdenaturowanym i zredukowanym RfBP, wcześniej zdefosforylowane białko zachowywało się tak jak natywne.

Ostatnio uzyskano rekombinantowe RfBP w układzie ekspresyjnym *E. coli* [36, 42]. Białko to, solubilizowane z ciał inkluzyjnych w obecności denaturantów oraz czynników redukujących, odzyskiwało około 25% spodziewanej aktywności wiązania ryboflawiny po renaturacji i reoksydacji tlenem z powietrza [36]. Wniosek autorów, że dowodzi to roli składnika cukrowego w wyborze produktywnych dróg w procesie fałdowania, wymagać będzie zapewne niejednej weryfikacji.

Niezależnie jednak od zastosowania w badaniach nad procesami renaturacji, otrzymanie rekombinantowego RfBP zapewne otworzy nowy rozdział dalszego poznawania struktury tego białka.

IV. PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat nastąpił znaczny postęp w badaniach nad strukturą RfBP z jaj kurzych. Znana jest aktualnie struktura przestrzenna łańcucha polipeptydowego oraz struktura składnika cukrowego tej fosfoglikoproteiny. Intensywnie badane są procesy odzyskiwania struktury natywnej RfBP po rozfałdowaniu (denaturacji). W połączeniu z wcześniejszymi, licznymi badaniami nad mechanizmem oddziaływania białko-ligand, nagromadzona wiedza powinna wkrótce postawić RfBP w rzędzie najlepiej strukturalnie poznanych rozpuszczalnych białek transportujących.

LITERATURA

- [1] ABRAMS VAM, BUSH L, KENNEDY T, SCHREIBER RW, SHERWOOD TA, WHITE HB. Vitamin-transport proteins in alligator eggs. *Comp Biochem Physiol* 1989; **93B**: 291–297.
- [2] ABRAMS VAM, McGAHAN TJ, ROHRER JS, BERO AS, WHITE HB. Riboflavin-binding protein from reptiles: a comparison with avian riboflavin-binding proteins. *Comp Biochem Physiol* 1988; **90B**: 243–247.
- [3] ADIGA PR, SUBRAMANIAN S, RAO J, KUMAR M. Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals. *Hum Reprod Update* 1997; **3**: 325–334.
- [4] ALLEN S, STEVENS L, DUNCAN D, KELLY SM, PRICE NC. Unfolding and refolding of hen egg-white riboflavin binding protein. *Int J Biol Macromol* 1992; **14**: 333–337.
- [5] AMORESANO A, BRANCACCIO A, ANDOLFO A, PERDUCA M, MONACO HL, MARINO G. The carbohydrates of the isoforms of three avian riboflavin-binding proteins. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 849–858.
- [6] BURMESTER T, MASSEY HC, ZAKHARKIN SO, BENES H. The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. *J Mol Evol* 1998; **47**: 93–108.
- [7] BYSTRA-MIELOSZYK K, BALTER A, DRABENT R. Fluorescence quenching for flavins interacting with egg white riboflavin-binding protein. *Photochem Photobiol* 1985; **41**: 141–147.
- [8] FENSELAU C, HELLER DN, MILLER MS, WHITE HB. Phosphorylation sites in riboflavin-binding protein characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Biochem* 1985; **150**: 309–314.
- [9] GALAT A. Interaction of riboflavin binding protein with riboflavin, quinacrine, chlorpromazine and daunomycin. *Int J Biochem* 1988; **20**: 1021–1029.

- [10] GUEVARA I, ŽAK Z. Fluorescence quenching in riboflavin-binding protein and its complex with riboflavin. *J Prot Chem* 1993; **12**: 179–185.
- [11] HAMAJIMA S, HIRANO H, HORIUCHI S, ONO S. 5'-Upstream structure of the gene coding for chicken riboflavin-binding protein and its relation to estrogen induction. *IUBMB Life* 1999; **48**: 293–298.
- [12] HAMAJIMA S, ONO S. Sequence of a cDNA encoding turtle riboflavin-binding protein: a comparison with avian riboflavin-binding protein. *Gene* 1995; **164**: 279–282.
- [13] HAMAZUME Y, MEGA T, IKENAKA T. Characterization of hen egg white- and yolk-riboflavin binding proteins and amino acid sequence of egg white-riboflavin binding protein. *J Biochem* 1984; **95**: 1633–1644.
- [14] HAMAZUME Y, MEGA T, IKENAKA T. Positions of disulphide bonds in riboflavin-binding protein of hen egg white. *J Biochem* 1987; **101**: 217–223.
- [15] HAZEKAWA I, NISHINA Y, SATO K, SHICHIRI M, MIURA R, SHIGA K. A Raman study on the C(4)=O stretching mode of flavins in flavoenzymes: hydrogen bonding at the C(4)=O moiety. *J Biochem* 1997; **121**: 1147–1154.
- [16] INNIS WSA, McCORMICK DB, MERRILL AH. Variations in riboflavin binding by human plasma: identification of immunoglobulins as the major proteins responsible. *Biochem Med* 1985; **34**: 151–165.
- [17] KOZIK A. Białka wiążące ryboflawinę. *Post Biochem* 1985; **31**: 263–281.
- [18] KOZIK A. 1,2-Cyclohexanedione modification of arginine residues in egg-white riboflavin-binding protein. *Int J Biochem* 1988; **20**: 707–711.
- [19] KIM M, CAREY PR. Observation of a carbonyl feature for riboflavin bound to riboflavin-binding protein in the red-excited Raman spectrum. *J Am Chem Soc* 1993; **115**: 7015–7016.
- [20] LIKHOSHERSTOV LM, PISKAREV VE, GALENKO EL, DEREVITSKAYA VA, KOCHETKOV NK. Isolation and characterization of the carbohydrate chains of hen white riboflavin binding glycoproteins. *Bioorg Chim* 1987; **13**, 528–532.
- [21] MACLACHLAN I, NIMPF J, SCHNEIDER WJ. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 24127–24132.
- [22] MACLACHLAN I, NIMPF J, WHITE HB, SCHNEIDER WJ. Riboflavinuria in the *rd* chicken. 5'-Splice site mutation in the gene for riboflavin-binding protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23222–23226.
- [23] MAGEE J, KRAYNACK N, MASSEY HC, TELFER WH. Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994; **25**: 137–157.
- [24] MALHOTRA P, KARANDE AA, PRASADAN TK, ADIGA PR. Riboflavin carrier protein from carp (*C. carpio*) eggs: comparison with avian riboflavin carrier proteins. *Biochem Int* 1991; **23**: 127–136.
- [25] McCLELLAND DA, McLAUGHLIN SH, FREEDMAN RB, PRICE NC. The refolding of hen egg white riboflavin-binding protein: effect of protein disulphide isomerase on the reoxidation of the reduced protein. *Biochem J* 1995; **311**: 133–137.
- [26] McCLELLAND DA, PRICE NC. Stopped-flow analysis of the refolding of hen egg white riboflavin binding protein in its native and dephosphorylated forms. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1382**: 157–166.
- [27] MEGA T, HAMAZUME Y, NONG Y-M, IKENAKA T. Studies on the methods for the determination of phosphorylation sites in highly phosphorylated peptides and proteins: phosphorylation sites of hen egg white riboflavin binding protein. *J Biochem* 1986; **100**: 1109–1116.
- [28] MILLER SG, SILHACEK DL. Properties of two hemolymph riboflavin-binding proteins from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem Molec Biol* 1993; **23**: 413–420.
- [29] MILLER SG, SILHACEK DL. Riboflavin-binding proteins and flavin assimilation in insects. *Comp Biochem Physiol* 1995; **110B**: 467–475.

- [30] MONACO HL. Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J* 1997; **16**: 1475–1483.
- [31] NATRAJ U, SABNIS TN, MAHALE SD, IYER KSN. Termination of pregnancy in mice following administration of antibodies to the pentadecapeptide 10–24 of chicken riboflavin carrier protein: identification of a bionutralizing epitope of chicken riboflavin carrier protein. *Vaccine* 1994; **12**: 431–434.
- [32] NATRAJ U, KUMAR AR, KADAM P. Termination of pregnancy in mice with antiserum to chicken riboflavin-carrier protein. *Biol Reprod* 1987; **36**: 677–685.
- [33] NATRAJ U, PEREIRA J. Immunoreactive riboflavin carrier protein concentration during ovulatory cycle in the common marmoset (*Callithrix jachhus*): role of estrogen. *Indian J Exp Biol* 1998; **36**: 353–357.
- [34] NORIOKA N, OKADA T, HAMAZUME Y, MEGA T, IKENAKA T. Comparison of the amino acid sequences of hen plasma, yolk and white riboflavin-binding proteins. *J Biochem* 1985; **97**: 19–28.
- [35] PAN ML, TELFER WH. Equivalence of riboflavin-binding hexamerin and arylphorin as reserves for adult development in two saturniid moths. *Arch Insect Biochem Physiol* 1999; **42**: 138–146.
- [36] PATTANAIK P, SOORYANARAYANA, ADIGA PR, VISWESWARIAH SS. Refolding of native and recombinant chicken riboflavin carrier (or binding) protein: evidence for the formation of non-native intermediates during the generation of active protein. *Eur J Biochem* 1998; **258**: 411–418.
- [37] PISKAREV VE, SEPETOV NF, LIKHOSHERSTOV LM, GALENKO EL, DEREVITSKAYA VA, KOCHETKOV NK. Structure of the oligosaccharide chains of riboflavin-binding glycoproteins from hen egg white. II. ^1H NMR 500-MHz spectroscopy of the main neutral oligosaccharides. *Bioorg Chim* 1989; **15**: 1546–1554.
- [38] PRASAD PD, MALHOTRA P, KARANDE AA, ADIGA PR. Isolation and characterization of riboflavin carrier protein from human amniotic fluid. *Biochem Int* 1992; **27**: 385–395.
- [39] ROHRER JS, WHITE HB. Separation and characterization of the two Asn-linked glycosylation sites of chicken serum riboflavin-binding protein. Glycosylation differences despite similarity of primary structure. *Biochem J* 1992; **285**: 275–280.
- [40] SHAPIRO JP, SILHACEK DL, NIEDZ RP. Storage proteins of the larval root weevil *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae): riboflavin binding and subunit isolation. *Arch Insect Biochem Physiol* 1992; **20**: 315–331.
- [41] SILHACEK DL, MILLER SG, MURPHY CL. Purification and characterization of a flavin-binding storage protein from the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994; **25**: 55–72.
- [42] SOORYANARAYANA, ADIGA PR, VISWESWARIAH SS. Hyperexpression of chicken riboflavin carrier protein: antibodies to the recombinant protein curtail pregnancy in rodents. *Prot Expression Purif* 1996; **7**: 147–154.
- [43] SOORYANARAYANA, SARKAR S, ADIGA PR, VISWESWARIAH SS. Identification and characterization of receptors for riboflavin carrier protein in the chicken oocyte. Role of the phosphopeptide in mediating receptor interaction. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1382**: 230–242.
- [44] STOREY KB, DENT ME, STOREY JM. Gene expression during estivation in spadefoot toads, *Scaphiopus couchii*: upregulation of riboflavin binding protein in liver. *J Exp Zool* 1999; **284**: 325–333.
- [45] TARUTANI M, NORIOKA N, MEGA T, HASE S, IKENAKA T. Structures of sugar chains of hen egg yolk riboflavin-binding protein. *J Biochem* 1993; **113**: 677–682.
- [46] VELU NK, KARANDE AA, ADIGA PR. Refolding of riboflavin carrier protein as probed by biochemical and immunological parameters. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1293**: 231–237.

- [47] VISWESWARIAH SS, ADIGA PR. Purification of a circulatory riboflavin carrier protein from pregnant bonnet monkey (*M. radiata*): comparison with chicken egg vitamin carrier. *Biochim Biophys Acta* 1987; **915**: 141–148.
- [48] WATSON CD, FORD HC. High-affinity binding of riboflavin and FAD by immunoglobulins from normal human serum. *Biochem Int* 1988; **16**: 1067–1074.
- [49] ZANETTE D, MONACO HL, ZANOTTI G, SPADON P. Crystallization of hen egg white riboflavin-binding protein. *J Mol Biol* 1984; **180**: 1185–1187.
- [50] ZHENG DB, LIM HM, PENE JJ, WHITE HB. Chicken riboflavin-binding protein. cDNA sequence and homology with milk folate-binding protein. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11126–11129.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: akozik@mol.uj.edu.pl

BIOSYNTeza I BIOAKTYWACJA TIAMINY

THIAMINE BIOSYNTHESIS AND BIOACTIVATION

Inga KOTAS

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Biosynteza tiaminy (witaminy B₁) zachodzi w mikroorganizmach i roślinach. W początkowych fazach syntezy powstają dwa prekursory: 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazol i 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyna. Są one fosforylowane, po czym kluczowy enzym, pirofosforylaza fosforanu tiaminy, łączy je w cząsteczkę fosforanu tiaminy. Ulega on defosforylacji do wolnej tiaminy, a ta jest przekształcana przy udziale pirofosfokinazy tiaminy, do aktywnego metabolicznie koenzymu, difosforanu tiaminy.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl. 16: 199–212*)

Słowa kluczowe: witamina B₁, biosynteza tiaminy, pirofosforylaza fosforanu tiaminy, pirofosfokinaza tiaminy.

Summary: The biosynthesis of thiamine (vitamin B₁) is performed in microorganisms and plants. First step leads to the formation of two precursors: 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. They are phosphorylated and then combined by the key enzyme, thiamine phosphate pyrophosphorylase. Thiamine phosphate is dephosphorylated; free thiamine is then converted by thiamine pyrophosphokinase into a metabolically active coenzyme, thiamine pyrophosphate.

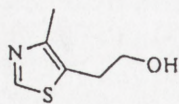
(*Advances in Cell Biology* 2001; *supl. 16: 199–212*)

Key words: vitamine B₁, thiamine biosynthesis, thiamine phosphate pyrophosphorylase, thiamine pyrophosphokinase.

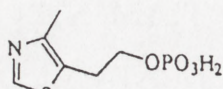
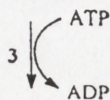
1. WSTĘP

Cząsteczka tiaminy (witaminy B₁, w literaturze określanej również jako aneuryna), zbudowana jest z dwóch pierścieni: 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazolu i 4-amino-2-metylopirymidyny połączonych mostkiem metylenowym [14]. Może ona wy-

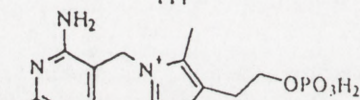
Prekursor wewnątrzkomórkowy



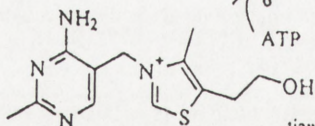
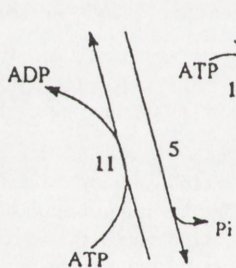
5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazol



4

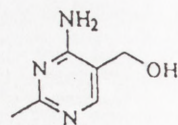
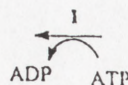
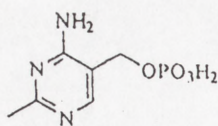


monofosforan tiaminy

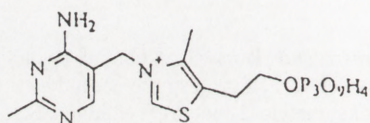
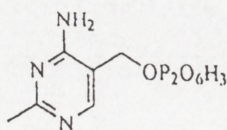
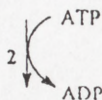


tiamina

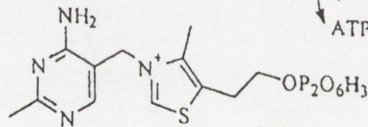
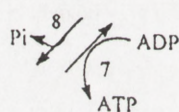
Prekursor wewnątrzkomórkowy



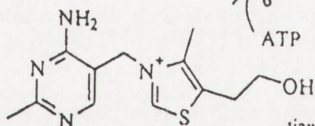
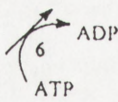
4-amino-5-hydroksyetylo-2-metylenopirymidyna



trifosforan tiaminy



pirofosforan tiaminy



tiamina

RYSUNEK 1. Powstawanie i wewnątrzkomórkowe przemiany tiaminy; enzymy zaangażowane w powyższe szlaki metaboliczne: 1 – kinaza 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny (EC2.7.1.49), 2 – kinaza 4-amino-5-fosfometylo-2-metylopirymidyny (EC 2.7.4.7), 3 – kinaza 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazolu (EC 2.7.1.50), 4 – pirofosforylaza fosforanu tiaminy (EC 2.5.1.3), 5 – fosfataza fosforanu tiaminy, 6 – pirofosfokinaza tiaminy (EC 2.7.6.2), 7 – kinaza difosforanu tiaminy (EC 2.7.4.15), 8 – fosfataza trifosforanu tiaminy (EC 3.6.1.28), 9 – fosfataza difosforanu tiaminy, 10 – kinaza fosforanu tiaminy (EC 2.7.4.16), 11 – kinaza tiaminy (EC 2.7.1.89)

TABELA 1. Enzymy, których kofaktorem jest pirofosforan tiaminy

Nazwa enzymu	Numer systematyczny
Karboligaza glioksalanowa	EC 4.1.1.47.
Dekarboksylaza pirogronianowa	EC 4.1.1.1.
Dekarboksylaza indolopirogronianowa	EC 4.1.1.74
Dekarboksylaza benzoilomrówczanowa	EC 4.1.1.7.
Syntaza acetomleczanowa	EC 4.1.3.18.
Dehydrogenaza pirogronianowa	EC 1.2.4.1.
Dehydrogenaza α -ketoglutaranianowa	EC 1.2.4.2.
Dehydrogenaza α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych	EC 1.2.4.4.
Oksydaza pirogronianowa	EC 1.2.3.3.
Transketolaza	EC 2.2.1.1.
Syntaza dihydroksyacetonu (transketolaza formaldehydu)	EC 2.2.1.3.

stępować w postaci niezestryfikowanej oraz jako mono-, piro- oraz trifosforan. Formą biologicznie aktywną jest pirofosforan tiaminy, koenzym zaangażowany w procesach oksydatywnej dekarboksylacji w cyklu Krebsa i katabolizmie aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych oraz w przenoszeniu grupy ketonowej w cyklu pentozowym. Zestawienie enzymów, wymagających jako kofaktora pirofosforanu tiaminy, przedstawiono w tabeli 1.

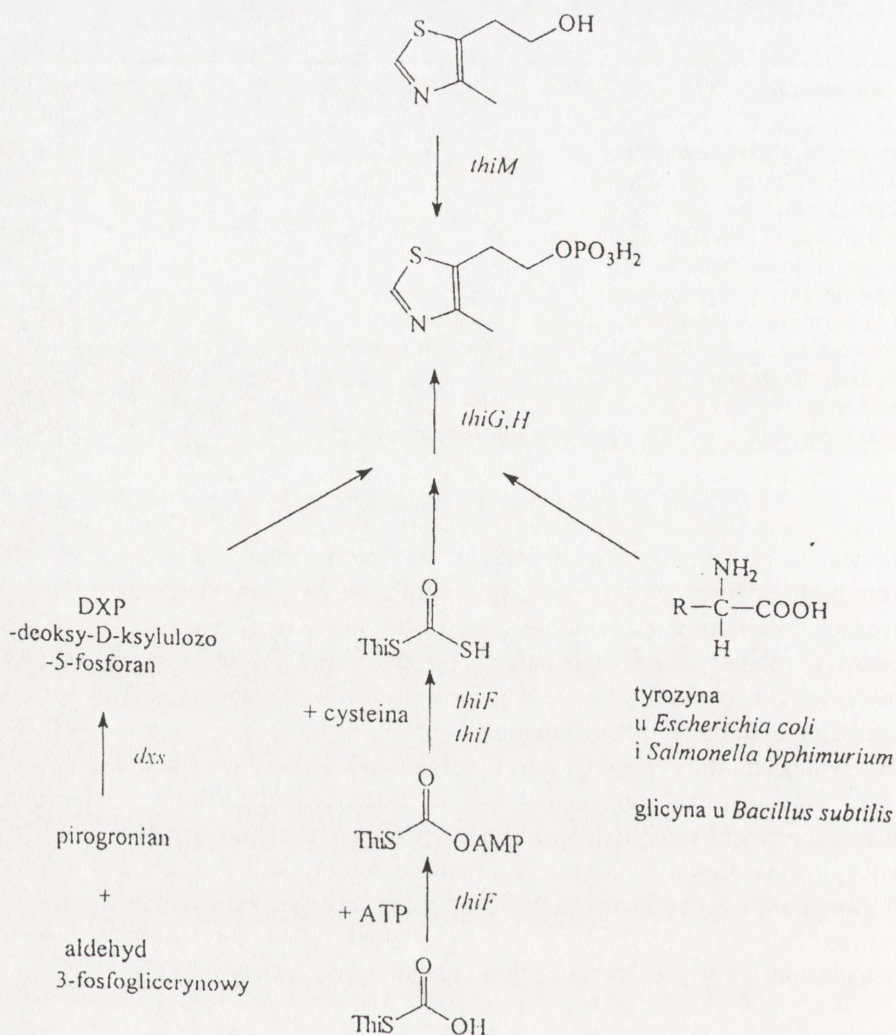
Biosynteza tiaminy zachodzi w mikroorganizmach i roślinach, natomiast zwierzęta wyższe zależne są od egzogennej tiaminy dostarczanej głównie z pożywieniem. Synteza pierścieni tiazolu i pirymidyny przebiega osobno, a dopiero ich formy ufosforylowane są kondensowane do monofosforanu tiaminy przez pirofosforylaze fosforanu tiaminy. Organizmy żywe dysponują szeregiem specyficznych enzymów, odpowiedzialnych za fosforylację tiaminy i defosforylację jej estrów. Najważniejsze wewnątrzkomórkowe przemiany tiaminy pokazano na rysunku 1.

2. BIOSYNTENZA TIAMINY U PROKARYOTA

Najlepiej poznane są szlaki syntezy prekursorów tiaminy u *Prokaryota*, wśród których najintensywniej badane były: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* oraz *Bacillus subtilis*.

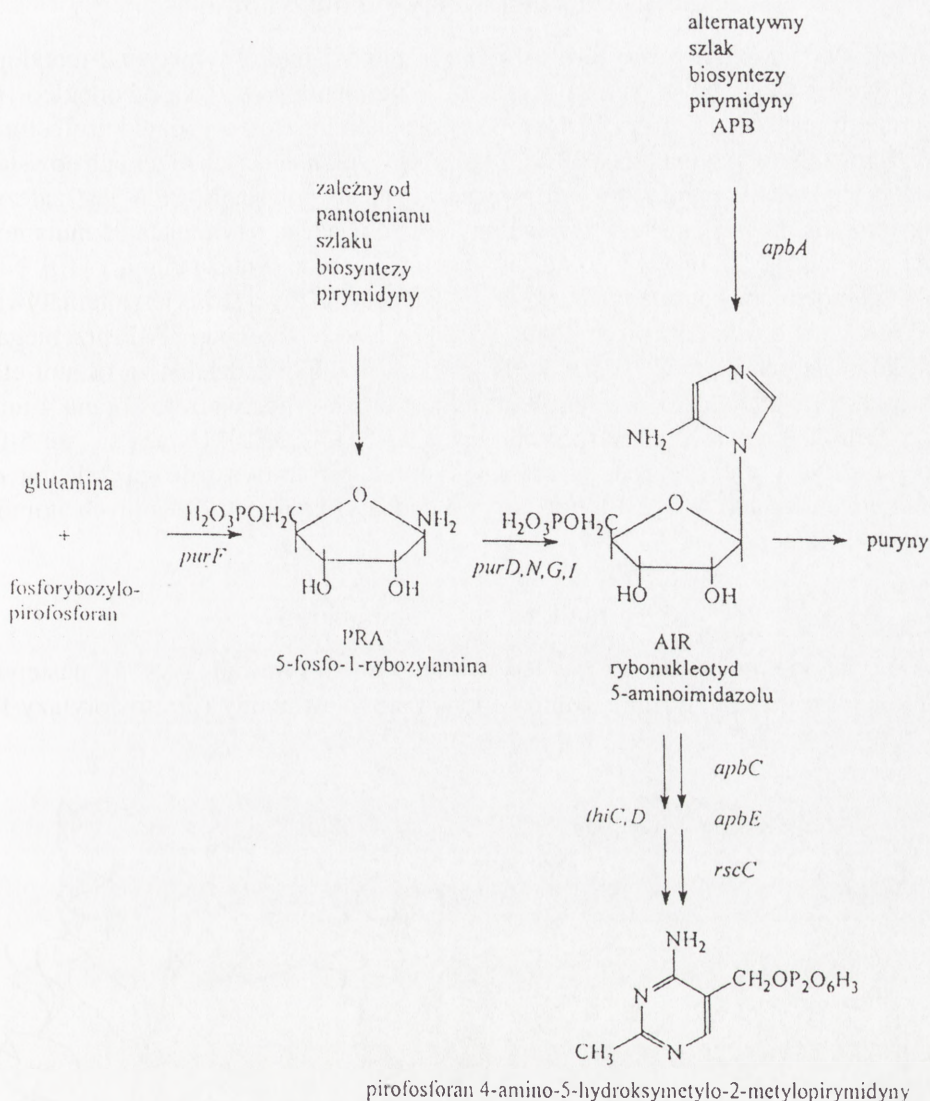
2.1. Synteza komponenty tiazolowej

Biosyntezę pierścienia tiazolowego u bakterii poznano w wielu szczegółach (rys. 2). Badania z wykorzystaniem znakowanych izotopowo substratów wykazały, że w syntezę komponenty tiazolowej u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*



RYSUNEK 2. Schemat biosyntezy pierścienia tiazolowego (kursywą podano geny odpowiadające za poszczególne etapy syntezy u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*)

wnoszą wkład tyrozyna, cysteina oraz 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan (DXP). U *Bacillus subtilis* tyrozynę zastępuje w tej funkcji glicyna [5]. DXP powstaje w wyniku kondensacji pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Warto podkreślić, że katalizujący tę reakcję enzym, syntaza 1-deoksy-ksylulozo-5-fosforanu, wymaga pirofosforanu tiaminy jako kofaktora. Białko ThiS jest enzymem, odpowiedzialnym za wbudowanie atomu siarki z cysteiny w pierścień tiazolowy [37]. Produkt pośredni, tiokarboksylované na C-końcu ThiS (ThiS-COSH), tworzy się



RYSUNEK 3. Schemat biosyntezy pierścienia pirymidynowego (kursywą podano geny odpowiadające za poszczególne etapy syntezy u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*)

przy współdziałaniu czynników ThiF i ThiI [42]. Jeżeli w środowisku bakterii znajduje się 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazol, komórki mogą go pobierać i przeprowadzać jego fosforylację za pomocą kinazy ThiM [5].

2.2. Synteza komponenty pirymidynowej

Podstawowy szlak syntezy pirofosforanu 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny jest wspólny z syntezą puryn, aż do momentu powstania rybonukleotydu 5-aminoimidazolu (AIR) (rys. 3). Na drodze tej glutamina i fosforybozylpirofosforan dają 5-fosfo-1-rybozylaminę (PRA), z której w wyniku dalszych przemian powstaje AIR [11]. Dodatkowym szlakiem prowadzącym do powstania PRA jest zależny od pantotenianu szlak syntezy pirymidyny [17]. Świadczą o tym badania mutantów *purF* wymagających wysokiego stężenia pantotenianu do syntezy tiaminy [10]. Niedobór pantotenianu hamuje syntezę tą drogą. Trzecią możliwą drogą jest alternatywny do PRA szlak biosyntezy pirymidyny, APB [7]. Dalsze przemiany AIR przebiegają pod kontrolą genów *thiC* i *thiD*; ThiD jest kinazą odpowiedzialną za ostatni etap fosforylacji [5]. Dodatkowo zduplikowana jest droga syntezy pirofosforanu 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny z AIR [1,4,30,32]. Uważa się, że 5-fosforyboza jest prekursorem w szlaku syntezy pirymidyny drogą zależną od pantotenianu [9] lub APB [30]. Podjęto próby identyfikacji poszczególnych atomów metodami izotopowymi [13].

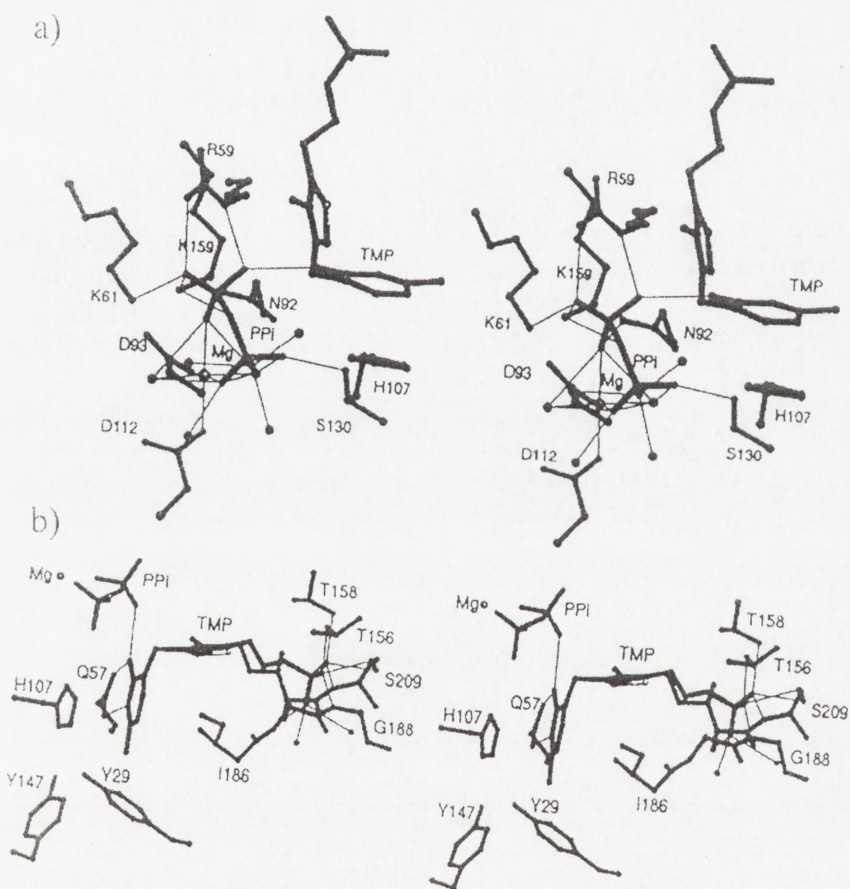
2.3. Synteza fosforanu tiaminy

Gdy oba prekursorzy są już zsyntetyzowane i ufosforylowane (rys. 1), następuje ich kondensacja przy udziale syntazy monofosforanu tiaminy (pirofosforylasy fo-



RYSUNEK 4. Struktura krystalograficzna syntazy fosforanu tiaminy z *Bacillus subtilis* (z bazy danych National Center of Biotechnology Information)

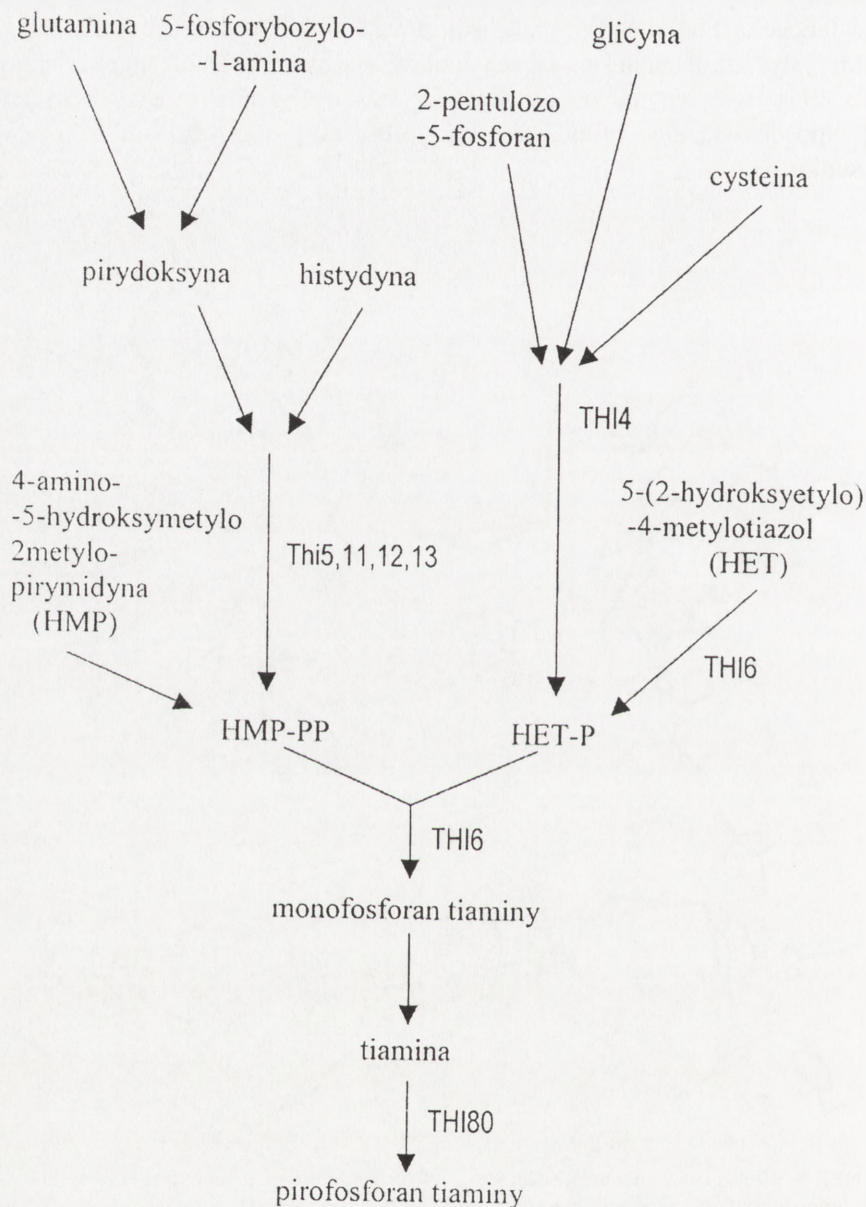
sforanu tiaminy). Znana jest struktura przestrzenna tego enzymu [6]. Syntaza wyizolowana z *Bacillus subtilis* jest dimerem, w którym każda podjednostka ma strukturę baryłki α/β (rys. 4). Składa się z 10 α -helis, 8 β -łańcuchów i 3 elastycznych pętli, z czego helisy $\alpha 2$ – $\alpha 8$ i $\alpha 10$ oraz struktury β tworzą baryłkę. Za wiązanie substratów i produktów odpowiedzialne są głównie aminokwasy znajdujące się w rejonach zagięć łańcucha białkowego oraz elastycznych pętli. Struktura baryłki α/β jest charakterystyczna dla białek mających miejsce wiązania fosforanu, które jest rejonem mocno konserwatywnym, znajdującym się blisko C końca między helisami 7 i 8 [3]. Sposób wiązania produktów w centrum aktywnym enzymu zilustrowano na rysunku 5.



RYSUNEK 5. Miejsce wiązania pirofosforanu (a) i fosforanu tiaminy (b) w syntazie fosforanu tiaminy, cienkie linie symbolizują wiązania wodorowe lub koordynacyjne, oddzielone kulki – cząsteczki wody (reprodukowane z [6] za pozwoleniem *American Chemical Society*)

3. BIOSYNTETA TIAMINY U DROŹDŹY

Badania nad biosyntezą tiaminy w drożdżach są nieco mniej zaawansowane. Określenie pochodzenia prekursorów nie jest łatwe ponieważ tiamina oraz produkty



RYSUNEK 6. Schemat biosyntezy tiaminy u *Saccharomyces cerevisiae* (drukowanymi literami podano geny odpowiadające za poszczególne etapy)

pośrednie są magazynowane w komórkach w wysokich stężeniach. Wiadomo że różni się ono od prokariotycznego. Szlaki biosyntezy tiaminy w drożdżach przedstawiono schematycznie na rysunku 6.

Komponenta pirymidynowa powstaje z części pierścienia imidazolowego histydyny [16] oraz z pirydoksyny [38]. U *Saccharomyces cerevisiae* gen zaangażowany w jej syntezę to THI5. Występuje on w 4 kopiach (THI 5,11,12,13), różniących się od siebie 27 nukleotydami. Homolog tego genu u *Schizosaccharomyces pombe* to *thi3 (nmt1)* [35]. Udało się zidentyfikować gen kinazy fosforanu 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny [21].

Początkowym substratem w syntezie komponenty tiazolowej jest 2-pentulozo-5-fosforan. Najprawdopodobniej jest to D-rybulozo-5-fosforan lub D-ksylulozo-5-fosforan. Pozostałymi substratami są glicyna oraz cysteina, która jest źródłem atomu siarki [16]. Dokładne przemiany metaboliczne prowadzące do powstania pierścienia tiazolowego nie są opisane. Znany jest jeden gen zaangażowany w syntezę tiazolu – THI4. Homologiczny gen występuje u *Schizosaccharomyces pombe*, *thi2(nmt2)* [46] oraz u roślin [22].

Wyjątkowym enzymem u *Saccharomyces cerevisiae* jest produkt genu THI6. Koduje on dwufunkcyjne białko: pirofosforylaze monofosforanu tiaminy, odpowiedzialną za kondensację fragmentów tiazolowego i pirymidynowego, oraz kinazę hydroksyetylotiazolu [19,27]. U innych organizmów są to oddzielne enzymy.

4. BIOSYNTETA TIAMINY U ROŚLIN

Szlaki biosyntezy tiaminy w roślinach są słabo scharakteryzowane. Zakłada się, że przebiegają podobnie jak w drożdżach. Sklonowano i opisano cDNA genu z kukurydzy [2] oraz z *Arabidopsis thaliana* [22] z rodziny *thi1*, o sekwencji homologicznej do drożdżowych genów, THI4 z *Saccharomyces cerevisiae* oraz *nmt2* z *Schizosaccharomyces pombe*, zaangażowanych w syntezę prekursora tiazolowego. Sklonowano podobny gen z roślin cytrusowych [18]. Poziom mRNA tego genu wzrasta stopniowo w czasie dojrzewania owoców.

5. SYNTETA PIROFOSFORANU TIAMINY

W komórkach *Escherichia coli* monofosforan tiaminy może być fosforylowany bezpośrednio do pirofosforanu przez kinazę kodowaną przez gen *thiL* [43]. Bakteria ta posiada również kinazę tiaminy (gen *thiK*). Istnienie odrębnej pirofosfokinazy tiaminy u *E. coli* jest kontrowersyjne; być może występuje ona jako białko integralne błony komórkowej [5].

THI80	M S E E C I E N P E R I K I G T D L I N I R M K M N L K E L I H P N E D - - E N	38
Tnr3	D S F E D T S K K A E T C V P A K P Q K A T H Q L A P C K A W L R D Y D T D Q K	352
pTPK1	- - - I G G A P V G R - - A D I E Q A L A L A P V V A A A D S G A Q T A L S H	16
mTPK1	M S Q Q G T K L A S A R P V T L - - - M E H A F T P L E P L L P T G N - - L K	18
THI80	S T L L I L N Q K I D I P R P L F Y K I W K L I I D L K V C A D G A A N R L Y D Y	78
Tnr3	F A V L I L N Q P I D I P D D R F R T L W K R A S I R V C A D G G A Q L R N Y	392
pTPK1	- - - I G G A P V G R - - A D I E Q A L A L A P V V A A A D S G A Q T A L S H	50
mTPK1	Y C L V M L N Q P L D A - - - R F R H L W K A A L L R A C A D G G A N H L Y D L	55
THI80	L D D D E T L R I K Y L P N Y I I G D L D S L S E K V Y K V Y R K N K V T I T K	118
Tnr3	D S - - - - - S L K P D Y V V G D F D S L T D E T K A Y Y K E M G V N I V F	425
pTPK1	G L - - - - - M P A A V W G D F D S I S A R A R A E I P L A N Q H P I A	81
mTPK1	T E G E - - - R E S F L P E F V S G D F D S I R P E V K E Y Y T K K G C D L I S	92
THI80	Q T T Q Y S T D F T K C V N I I S L H F N S P E F R S L I S N K D N L Q S N H G	158
Tnr3	D P C Q N T T D F M K C H K I I K -	442
pTPK1	E - - Q N S T D F E K C L S N L D -	96
mTPK1	T P D Q D H T D F T K C L Q V L Q R K I E -	113
THI80	I E L E K G I H T L Y N T M T E S L V F S K V T P I S L L A L G G I G G R F D Q	198
Tnr3	- - - E H G I D T I F V -	461
pTPK1	- - - A P F V V A L G F -	112
mTPK1	- E K E L Q V D V I V T -	134
THI80	T V H S I T Q L Y T L S E N A S Y F K L C Y M T P T D L I F L I K K N G T I I E	238
Tnr3	A I G N I N H L F W A A S I S E K N E V F L L T E L N M S T L L Q P G I N - - H	499
pTPK1	F L S V L N - - V L A R R I G P - - P C I L I A G E D V I T L A P P R L A - - -	145
mTPK1	I M A S V N T L F Q A T H I T P - V P I I I I Q K P S L I Y L L Q P G K H R L H	173
THI80	Y D P Q F R N T C I G N C G L L P I G E A T L L K E T R G L K W D V K N W P T S	278
Tnr3	V D C H D - - N I G L H C G L L P V G Q S V Y V K K T S G L E W N I E D R - I C	536
pTPK1	L D L A P - - - G T R V S L F P N G P A T G R - - S Q G L K W P I D G L - A F	178
mTPK1	V D T G - - - M E G S W C G L I P V G Q P C N Q V T T T G L K W N L T N D - V L	209
THI80	V V T G R V S S S N R F V G D N C C F I D T K D D I I L N V E T F V D K L I D F L	319
Tnr3	Q E G G L V S S C N V V T K A T V T I E V N N F I V W T M E T R L	569
pTPK1	A P G G R S G T S N Q A T G P V T L E C D G P M L L I L P R S E L A T L A R A L	218
mTPK1	G F G T L U S T S N T Y D G S G L V T V E T D H P L L W T M A I K S	243

RYSUNEK 7. Porównanie sekwencji aminokwasowej pirofosfokinazy tiaminy u *Saccharomyces cerevisiae* (THI80), *Schizosaccharomyces pombe* (tnr3), *Paracoccus denitrificans* (pTPK1) oraz myszy (mTPK1). Zaznaczono homologię do enzymu mysiego (z bazy danych *National Center of Biotechnology Information*)

W większości organizmów monofosforan tiaminy ulega defosforylacji, a wolna tiamina w jednoetapowej reakcji katalizowanej przez pirofosfokinazę tiaminy przechodzi w pirofosforan tiaminy.

Ze względu na kluczową rolę tego enzymu w bioaktywacji tiaminy, jest on dość szeroko badany. Został przynajmniej częściowo oczyszczony z następujących źródeł: *Paracoccus denitrificans* [34], drożdży piwnych [40], liści pietruszki [23], zarodków soi [17], serca i mózgu świni [26,33], wątroby szczura [40] oraz ludzkich erytrocytów [7]. Znana jest sekwencja aminokwasowa pirofosfokinazy tiaminy z *Schizosaccharomyces pombe* (produkt genu *tnr3*) [14], *Saccharomyces cerevisiae* (THI80) [28], *Paracoccus denitrificans* (pTPK1) [29] oraz myszy (mTPK1) [29]. Na rysunku 7 porównano sekwencje tych enzymów. Konserwatyzm struktury pierwszorzędowej pirofosfokinazy tiaminy jest bardzo wysoki. Homologia enzymu my-

siego z THI80 i pTPK1 wynosi 31%, a z C-końcowym odcinkiem enzymu tnr3 aż 39% [29].

6. SYNTeza TRIFOSFORANU TIAMINY

Syntaza trifosforanu tiaminy została wyizolowana z kory mózgowej wołu [24]. Białko wykazuje dwie aktywności: białka wiążącego pirofosforan tiaminy oraz ATP-fosforylo- transferazy. Niekowalencyjne związanie pirofosforanu tiaminy jest konieczne do przebiegu reakcji enzymatycznej. Również produkt reakcji pozostaje związany z białkiem, co może mieć znaczenie w ochronie trifosforanu przed defosforylacją przez fosfatazy, jak i w jego transporcie w układzie nerwowym. Enzym syntetyzujący trifosforan tiaminy oczyszczono również z *Saccharomyces carlsbergensis*; jego właściwości biologiczne i fizykochemiczne różnią się od enzymu wołowego, przede wszystkim brakiem aktywności białka wiążącego pirofosforan tiaminy [41].

7. ORGANIZACJA GENÓW BIOSYNTETY TIAMINY I ICH REGULACJA

Geny biosyntezy tiaminy są odpowiednio regulowane w zależności od jej dostępności w środowisku. U *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* pogrupowane są one jako 3 operony i 4 pojedyncze geny [5, 31]. U *B. subtilis* są 2 operony i jeden pojedynczy gen [5, 45]. Operony regulowane są przez poziom pirofosforanu tiaminy, natomiast geny pojedyncze nie [44].

U drożdży *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* regulacja biosyntezy odbywa się następująco: wysoki poziom tiaminy i pirofosforanu w komórce hamuje ekspresję znanych genów syntezy tiaminy [16,36], natomiast produkty genów THI2(PHO6), THI3 oraz PDC2 działają stymulująco [16,20]. Również mutacja genu THI81 powoduje brak negatywnej regulacji syntezy tiaminy [25].

8. PODSUMOWANIE

W badaniach biosyntezy i bioaktywacji tiaminy pozostało jeszcze wiele niewiadomych. W szczególności, wyjaśnienia wymaga chemia niektórych etapów syntezy prekursorów, jak również rola biologiczna trifosforanu tiaminy. Ponieważ witamina B₁ jest niezbędnym składnikiem ludzkiej diety, badania biosyntezy tiaminy w kierunku, umożliwiającym manipulowanie tymi procesami w organizmach mogłyby doprowadzić do otrzymania żywności wzbogaconej w tą substancję. Konstrukcja odpowiednich wektorów ekspresyjnych może udoskonalić komercyjną produkcję witaminy B₁ lub jej komponent składowych.

LITERATURA

- [1] BECK B, CONNOLLY L, DE LAS PENAS A, DOWNS D. Evidence that *rseC*, a gene in the *rpoE* cluster, has a role in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 6504–6508.
- [2] BELANGER FC, LEUSTEK T, CHU B, KRIZ AL. Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Mol Biol* 1995; **29**: 809–821.
- [3] BORK P, GELLERICH J, GROTH H, HOOFT R, MARTIN F. Divergent evolution of a β/α -barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci* 1995; **4**: 268–274.
- [4] BECK B, DOWNS D. The *apbE* gene encodes a lipoprotein involved in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 885–891.
- [5] BEGLEY TP, DOWNS DM, EALICK SE, McLAFFERTY FW, VAN LOON A, TAYLOR S, CAMPOBASSO N, CHIU H, KINSLAND C, REDDICK J, XI J. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 1999; **171**: 293–300.
- [6] CHIU H, REDDICK JJ, BEGLEY TP, EALICK SE. Crystal structure of thiamin phosphate synthase from *Bacillus subtilis* at 1,25 Å resolution. *Biochemistry* 1999; **38**: 6460–6470.
- [7] DOWNS DM, PETERSEN L. Apb A, a new genetic locus involved in thiamine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 4858–4864.
- [8] EGI Y, KOYAMA S, SHIODA T, YAMADA K, KAWASAKI T. Identification, purification and reconstitution of thiamin metabolizing enzymes in human red blood cells. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1160**: 171–178.
- [9] ENOS-BERLAGE JL, DOWNS DM. Involvement of oxidative pentose phosphate pathway in thiamine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 1476–1479.
- [10] ENOS-BERLAGE JL, DOWNS DM. Mutations in *sdh* (succinate dehydrogenase genes) alter the thiamine requirement of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 3989–3996.
- [11] ENOS-BERLAGE JL, DOWNS DM. Biosynthesis of the pyrimidine moiety of thiamine independent of the PurF enzyme (phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase) in *Salmonella typhimurium*: incorporation of stable isotope-labeled glycine and formate. *J Bacteriol* 1999; **181**: 841–848.
- [12] ENOS-BERLAGE JL, LANGENDORF MJ, DOWNS DM. Complex metabolic phenotypes caused by a mutation in *yjgF*, encoding a member of the highly conserved YER057c/YjgF family of proteins. *J Bacteriol* 1998; **180**: 6519–6528.
- [13] ESTRAMAREIX B, DAVID S. Conversion of 5-aminoimidazole ribotide to the pyrimidine of thiamin in enterobacteria: study of the pathway with specifically labeled samples of ribotide. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1035**: 154–160.
- [14] ESTRAMAREIX B, DAVID S. Biosynthesis of thiamine. *New J Chem* 1996; **20**: 607–629.
- [15] FRANKHAUSER H, ZURLINDEN A, SCHWEINGRUBER AM, EDENHARTER E, SCHWEINGRUBER ME. *Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphokinase is encoded by gene *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating, and growth. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28457–28462.
- [16] HOHMANN S, MEACOCK PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochem Biophys Acta* 1998; **1358**: 201–219.
- [17] HOWLE P, FITES R. GTP-specific pyrophosphorylation of thiamin in dark-grown soybean (*Glycine max*) seedling axes. *Physiol Plant* 1991; **81**: 24–30.
- [18] JACOB-WILK D, GOLDSCHMIDT EE, RIOV J, SADKA A, HOLLAND D. Introduction of a citrus gene highly homologous to plant and yeast *thi* genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol Biol* 1997; **35**: 661–666.

- [19] KAWASAKI Y. Copurification of hydroxyethylthiazole kinase and thiamine-phosphate pyrophosphorylase of *Saccharomyces cerevisiae*: characterisation of hydroxyethylthiazole kinase as bifunctional enzyme in the thiamine biosynthetic pathway. *J Bacteriol* 1993; **175**: 5153–5158.
- [20] KAWASAKI Y, NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1990; **172**: 6145–6147.
- [21] LLORENTE B, FAIRHEAD C, DUJON B. Genetic redundancy and fusion in the genome of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterisation of a three-member gene family involved in the thiamine biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* 1999; **32**: 1140–1152.
- [22] MACHADO CR, deOLIVEIRA RL, BOITEUX S, PRAEKELT UM, MEACOCK PA, MENCK CF. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 585–593.
- [23] MITSUDA H, TAKII Y, IWAMI K, YASUMOTO K. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from parsley leaf. *J Nutr Sci Vitaminol* 1975; **21**: 103–115.
- [24] NISCHINO K, ITOKAWA Y, NISCHINO N, PIRAS K, COOPER J. Enzyme system involved in the synthesis of thiamin triphosphate. *J Biol Chem* 1983; **258**: 11871–11878.
- [25] NISHIMURA H, KAWASAKI Y, NOSAKA K, KANEKO Y. Mutation thi81 causing a deficiency in the signal transduction of thiamine pyrophosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; **156**: 245–249.
- [26] NISHIMURA H, KAWASAKI Y, NOSAKA K, KANEKO Y, IWASHIMA A. A constitutive thiamine metabolism mutation, *thi80*, causing reduced thiamine pyrophosphokinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1991; **173**: 2716–2719.
- [27] NOSAKA K, NISHIMURA H, KAWASAKI Y, TSUJIHARA T, IWASHIMA A. Isolation and characterisation of the THI6 gene encoding a bifunctional thiamin-phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30510–30516.
- [28] NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Isolation and characterisation of thiamine pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 17440–17447.
- [29] NOSAKA K, ONOZUKA M, NISHINO H, NISHIMURA H, KAWASAKI Y, UEYAMA H. Molecular cloning and expression of mouse thiamin pyrophosphokinase cDNA. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34129–34133.
- [30] PETERSEN L, DOWNS D. Mutations in *apbC* (*mnp*) prevent function of the alternative pyrimidine biosynthetic pathway in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 5676–5682.
- [31] PETERSEN L, DOWNS D. Identification and characterisation of an operon in *Salmonella typhimurium* involved in thiamine biosynthesis. *J Bacteriol* 1997; **179**: 4894–4900.
- [32] PETERSEN L, ENOS-BERLAGE J, DOWNS D. Genetic analysis of metabolic crosstalk and impact on thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* 1996; **143**: 37–44.
- [33] PETERSON J, GUBLER C, KUBY S. Partial purification and properties of thiamine pyrophosphokinase from pig brain. *Biochem Biophys Acta* 1975; **397**: 377–394.
- [34] SANEMORI H, KAWASAKI T. Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase in *Paracoccus denitrificans*. *J Biochem* 1980; **88**: 223–230.
- [35] SCHWEINGRUBER AM, DŁUGOŃSKI J, EDENHARTER E, SCHWEINGRUBER ME. Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport. *Curr Genet* 1991; **19**: 249–254.
- [36] SCHWEINGRUBER AM, FRANKHAUSER H, DŁUGOŃSKI J, STEIMANN-LOSS C, SCHWEINGRUBER ME. Isolation and characterization of regulatory mutants from *Schizosaccharomyces pombe* involved in thiamine-regulated gene expression. *Genetics* 1992; **130**: 445–449.

- [37] TAYLOR SV, KELLEHER NL, KINSLAND C, CHIU H, COSTELLO CA, BACKSTROM AD, McLAFFERTY FW, BEGLEY TP. Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of ThiS thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16555–16560.
- [38] TAZUYA K, AZUMI C, YAMADA K, KUMOKA H. Origin of the N-1, C-2 and C-2' of the pyrimidine moiety of thiamin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int* 1994; **33**: 769–774.
- [39] VANDER HORN P, BACKSTROM AD, STEWART V, BEGLEY TP. Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1993; **175**: 982–992.
- [40] VOSKOBOYEV A, OSTROVSKY Y. Thiamin pyrophosphokinase: structure, properties, and role in thiamin metabolism. [w] Slabe Z, Gubler C [red.] Thiamin: twenty years of progress. *Annals New York Academy of Sciences* 1978: 161–176.
- [41] VOSKOBOYEV A, CHERNIKEVICH P, LUCHKO VS. Studies of thiamine diphosphate kinase (EC 2.7.4.15) from brewer's yeast: purification and some properties. *Biochem Biomed Acta* 1987; **46**: 3–13.
- [42] WEEB E, CLAAS K, DOWNS D. Characterisation of *thiI*, a new gene involved in thiazole biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1997; **179**: 4399–4402.
- [43] WEEB E, DOWNS D. Characterisation of *thiL* encoding thiamin-monophosphate kinase in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 15702–15707.
- [44] WEEB E, FEBRES F, DOWNS D. Thiamine pyrophosphate (TPP) negatively regulates transcription of some *thi* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 2533–2538.
- [45] ZHANG Y, TAYLOR SV, CHIU H, BEGLEY TP. Characterization of the *Bacillus subtilis* *thiC* operon involved in thiamine biosynthesis. *J Bacteriol* 1997; **179**: 3030–3035.
- [46] ZURLINDEN A, SCHWEINGRUBER ME. Cloning and regulation of *Schizosaccharomyces pombe* *thi2*, a gene involved in thiamine biosynthesis. *Gene* 1992; **117**: 141–143.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: kotas@mol.mol.uj.edu.pl

HIPOTETYCZNA FUNKCJA TIAMINY W UKŁADZIE NERWOWYM

HYPOTHETICAL FUNCTION OF THIAMINE IN NERVOUS SYSTEM

Małgorzata BOŚ

Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Niedobór tiaminy w organizmie objawia się przede wszystkim zaburzeniami i degradacją centralnego i obwodowego układu nerwowego. Za efekt ten w znacznej mierze odpowiada uniwersalna metaboliczna funkcja pirofosforanu tiaminy, kofaktora enzymów uczestniczących w przemianach węglowodanów i metabolizmie energetycznym komórek. Zgromadzone w ostatnich latach liczne obserwacje wskazują jednak na dodatkową, nie kofaktorową rolę pochodnych tiaminy, zwłaszcza trifosforanu tiaminy, selektywną wobec układu nerwowego. Zgłoszono trzy hipotezy, podejmujące próbę wyjaśnienia neurochemicznej roli trifosforanu tiaminy na poziomie molekularnym. Dwie pierwsze postulują jego działanie na kanały jonowe: sodowe bramkowane ligandem oraz chlorkowe bramkowane napięciem. Najnowsza hipoteza postuluje funkcjonowanie trifosforanu tiaminy w mechanizmie neurotransmisji jako specyficznego donora grup fosforanowych w procesach fosforylacji pewnych białek regulacyjnych. (*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 213–220*)

Słowa kluczowe: niedobór tiaminy, trifosforan tiaminy, pyritiamina, oksytiamina, regulacyjna fosforylacja białek.

Summary: Thiamine deficiency in animals predominantly results in malfunctions or degradation of both central and peripheral nervous systems. These effects are partly due to the universal metabolic function of thiamine diphosphate, the cofactor of key enzymes involved in the carbohydrate metabolism and energy supply to the cell. However, many recent observations seem to indicate that thiamine derivatives, mainly thiamine triphosphate may play an additional non-cofactor role, specific to the nervous tissue. Three hypotheses attempt to interpret the neurochemical role of thiamine triphosphate on the molecular level. First two assume the action of this thiamine compound upon the ligand-gated Na^+ channels or the voltage-gated Cl^- channels. The recent hypothesis suggests that thiamine triphosphate is involved in the neurotransmission mechanism serving as a specific phosphate donor in the phosphorylation of some regulatory proteins.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 213–220*)

Keywords: thiamine deficiency, thiamine triphosphate, pyritiamine, oxythiamine, regulatory protein phosphorylation.

WSTĘP

Objawy niedoboru tiaminy (witaminy B₁), prowadzące w skrajnych przypadkach do choroby beri-beri (polineuritis, zapalenie wielonerwowe), znane są od wieków: zaburzenia czynności serca, przewodzenia pokarmowego oraz gospodarki wodnej organizmu, atrofia mięśni kończyn dolnych, a przede wszystkim objawy neurologiczne – zaburzenia zarówno w centralnym, jak i obwodowym układzie nerwowym [1,2,28,42,44]. Niedobór tiaminy występuje u chronicznych alkoholików, wywołując alkoholowe zapalenie wielonerwowe, tzw. syndrom Wernicke-Korsakoffa (WKS) [1,21,22,33]. Awitaminozę witaminy B₁ obserwuje się również u pacjentów cierpiących na AIDS [38], chorobę Alzheimer'a [12,27,34,36,37,39], nie alkoholowy zespół Wernicke-Korsakoffa oraz chorobę Leigha – podostrą martwiczą encefalomielopatię objawiającą się zapaleniem mózgu i rdzenia [1].

Zaburzenia w funkcjonowaniu lub degradację centralnego układu nerwowego oraz nerwów cholinergicznym obserwuje się również w doświadczeniach prowadzonych *in vivo* na zwierzętach, w których sztucznie wywoływano niedobór tiaminy poprzez podawanie dużych dawek pyritiaminy [6,16,23,26,32,33,34,35] lub amprolium [24].

Część hipotez, tłumaczących rolę witaminy B₁ w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, ogranicza jej znaczenie wyłącznie do metabolicznych funkcji pirofosforanu tiaminy, którego niedobór musi powodować upośledzenie w funkcjonowaniu szczególnie wrażliwych komórek nerwowych. Jednak obserwacje objawów chorobowych niedoboru tiaminy u ludzi oraz badania neurofizjologiczne na zwierzętach skłaniają ku przypuszczeniom, że tiamina spełnia jeszcze inną, specyficzną funkcję w układzie nerwowym. W 1944 r. A. Von Muralt jako pierwszy wysunął hipotezę, że tiamina odgrywa istotną rolę w przewodzeniu impulsów nerwowych. Wykazano, że w tych zjawiskach aktywną komponentą jest trifosforan tiaminy [2,5,15,28]. Do chwili obecnej zgłoszono szereg hipotez próbujących wyjaśnić rolę tiaminy w układzie nerwowym, szczególnie w kontekście licznych chorób, których objawów wcześniej nie łączono z niedoborem tiaminy [13,27,34,37,38]. Dopiero jednak w ostatnich latach hipotezy te objęły molekularne interpretacje udziału pochodnych witaminy B₁ w mechanizmach przenoszenia sygnałów nerwowych.

ILOŚCIOWA DYSTRYBUCJA POCHODNYCH TIAMINY W MÓZGU I NERWACH OBWODOWYCH

W mózgu zidentyfikowano, poza difosforanem tiaminy (TDP), monofosforan tiaminy (TMP), tiaminę i trifosforan tiaminy (TTP) [18]. Metodą HPLC oszacowano [14], iż tiamina i TMP w centralnym układzie nerwowym stanowią ok. 10%, a TTP 5–10% całkowitej ilości witaminy B₁. Główną pulę tej witaminy stanowi

TDP: 80–85% całkowitej ilości witaminy w tkance nerwowej gryzoni [2]. Całkowite stężenie tiaminy w mózgu szczurów wynosi 6–13 nmol/g świeżej masy, podczas gdy w ludzkim mózgu wynosi ono tylko 3–4 nmol/g [18]. Stosunkowo niska zawartość tiaminy w mózgu ludzkim może być powodem szczególnej podatności ludzi na niedobór tiaminy.

Badania histochemiczne [43] demonstrują lokalizację tiaminy w błonach nerwów i mitochondriach, lecz nie w aksoplazmie. TTP występuje w większym stężeniu w komórkach nerwowych w porównaniu z komórkami glejowymi [2,31]. Tiamina związana jest z membranami synaptosomalnymi mózgu [28,30,31]. Miejsca wiążące TTP zlokalizowano w błonach neuronalnych [3], lecz mogą to być białka zasocjowane z TTP i tworzące kanały jonowe Na^+ [2,17] i kanały anionowe Cl^- [6,9,15]. Uważa się, że błony nerwów przypuszczalnie posiadają zewnątrzkomórkowe miejsca wiążące tiaminę i niektóre jej strukturalne analogi, takie jak np. oksytiamina [8,21,25]. Wysoko specyficzne miejsca wiążące TTP ($K_d=0,5 \mu\text{M}$) zidentyfikowano ponadto w membranach organu elektrycznego – *Electrophorus electricus* [2,11,19] oraz w mięśniach szkieletowych szczura [15,18].

II. METABOLICZNA ROLA PIROFOSFORANU TIAMINY W UKŁADZIE NERWOWYM

Rola pirofosforanu tiaminy (TDP) w układzie nerwowym związana jest z dobrze udowodnioną funkcją kofaktora dla kluczowych enzymów, uczestniczących w przemianach węglowodanów i metabolizmie energetycznym komórek: dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy α -ketoglutaranowej w mitochondriach oraz transketolazy w cytozolu [1,2,18,28,31,33]. TDP jest ponadto bezpośrednio zaangażowany w procesach syntezy i metabolizmie neurotransmiterów: acetylocholin, glutaminianu, kwasu γ -aminomasłowego (GABA) [24], somatostatyny [39] i 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) [35].

III. NIEKOFAKTOROWA FUNKCJA TIAMINY W UKŁADZIE NERWOWYM

Zgłoszono szereg hipotez, mówiących o specyficznej, neurochemicznej i nie kofaktorowej funkcji tiaminy, a zwłaszcza trifosforanu tiaminy w układzie nerwowym. Hipotezy te opierają się na obserwacjach zjawiska hydrolizy TTP i TDP oraz uwalniania tiaminy i monofosforanu tiaminy podczas pobudzania nerwów obwodowych przez elektrostymulację, a także podawanie leków aktywujących układ nerwowy [2]. W eksperymentach *in vivo* zaobserwowano, że pyritiamina (antagonista tiaminy), wykazuje wyraźne działanie na układ nerwowy. Wywołuje typowe objawy awitaminozy u zwierząt doświadczalnych łącznie z zapaleniem wielonerwowym

(*polineuritis*). Sugeruje się, że pyritiamina wpływa bezpośrednio na przewodzenie i sekrecję neuronów. Potwierdzeniem są doświadczenia, w których pyritiamina o stężeniu 0,1–1 mM zmieniała potencjał czynnościowy w izolowanych włóknach nerwowych. Zaobserwowano również, iż ekstrakt z paproci, zawierający tiaminazę I, enzym rozkładający tiaminę, dodany do izolowanych włókien nerwowych, modyfikuje potencjał błonowy i zwiększa amplitudę potencjału czynnościowego [28]. Skutkiem niedoboru trifosforanu tiaminy są zaburzenia neurologiczne, a obecność inhibitorów blokujących syntezę trifosforanu tiaminy z pirofosforanu tiaminy powoduje pojawienie się tych symptomów [2,8,9,10,20,24,28].

Liczne doświadczenia na zwierzętach, u których wywoływano stan niedoboru tiaminy poprzez podanie pyritiaminy, potwierdzają wpływ tiaminy na prawidłowe funkcjonowanie ATP-azy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (pompy sodowo-potasowej). Aktywny transport Na^+ i K^+ ma duże znaczenie fizjologiczne. Gradient $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ w komórkach zwierzęcych kontroluje objętość komórki, jest siłą napędową aktywnego transportu cukrów i aminokwasów oraz warunkuje pobudzenie nerwów i mięśni. Podawana pyritiamina powodowała zależną od czasu nieodwracalną inhibicję ATP-azy $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, co prawdopodobnie było rezultatem interakcji z grupami sulfhydrylowymi [2].

Liczne obserwacje sugerują potencjalny wpływ tiaminy na uwalnianie acetylocholino w płytkach nerwowo-mięśniowych [2,41]. Wiadomo np. że podawanie pacjentom z syndromem Wernicke-Korsakoffa lub chorobą Alzheimera wysokich dawek tiaminy (100 mg/dzień) powoduje aktywację centralnego systemu cholinergicznego [36].

Wpływ TTP na funkcjonowanie kanałów jonowych Na^+

Itokawa i Cooper w 1969 r. przedstawili hipotezę, że TTP bezpośrednio oddziałuje na kanały jonowe Na^+ [29,2]. W swoich doświadczeniach zastosowali tetrodotoksynę (TTX), która specyficznie wiąże się z kanałami sodowymi, blokując przepływ jonów Na^+ oraz przewodnictwo impulsów nerwowych wzdłuż aksonów. Jest przy tym znacznikiem wysoce specyficznym i nie działa na inne kanały. TTX posiada dodatkowo naładowaną grupę guanidynową, która oddziałuje ujemnie naładowaną grupą karboksylową przy wejściu kanału od zewnątrzkomórkowej strony błony. TTX blokuje przepływ Na^+ zamykając wejście do poru. Toksyna ta, wiążąc się z kanałem sodowym, indukowała uwalnianie tiaminy w izolowanych nerwach. Efekt ten, tłumaczony zastąpieniem TTP z kanału Na^+ przez TTX wskazuje, że TTP bezpośrednio bramkuje te kanały. TTP jest zasocjowany z białkiem tworzącym kanał jonowy. Twórcy hipotezy sugerują, że rola TTP w funkcjonowaniu kanałów Na^+ polega na ich kontrolowaniu pod względem kierunku działania [29]. Jednak szczegółowy mechanizm działania TTP nie został zaproponowany. Co więcej, późniejsze badania w innych laboratoriach poddają tę hipotezę w wątpliwość.

Rola TTP w funkcjonowaniu kanałów jonowych Cl^-

L. Bettendorff, stosując technikę *patch-clamp*, po raz pierwszy wykazał wpływ TTP w stężeniu fizjologicznym na kanały jonowe Cl^- [2,8,7,9,10,19]. Pracując na synaptoneurosomach izolowanych z mózgu szczura badał receptory GABA_A znakowane radioaktywnie $^{36}\text{Cl}^-$. Zaobserwował, iż TTP aktywuje transport jonów Cl^- w preparatach błonowych uzyskanych z mózgu szczura, przy czym TTP wydaje się działać po cytoplazmatycznej stronie błony. W doświadczeniach z oksytiaminą na komórkach neuroblastomy [2,4,5,9], na homogenatach mózgu szczura [19] i hodowlach neuronów [7,24] stwierdził, że ten analog modyfikuje napięciową zależność pojedynczych kanałów Cl^- od zewnątrz, podczas gdy ten sam kanał był uaktywniany przez TTP od strony cytoplazmy. Efektywność tiaminy i pyritiaminy w blokowaniu kanałów Cl^- była znacznie niższa [19]. Ponadto podawanie oksytiaminy powodowało u zwierząt doświadczalnych utratę masy ciała i bradykardię, lecz nie wywoływało zapalenia wielonerwowego, gdyż ten antymetabolit nie przekracza bariery krew-mózg [8].

Obserwacje te potwierdzają hipotezę, że TTP powoduje aktywację kanałów anionowych o niskiej specyficzności, których działanie związane jest ze zmianą potencjału błonowego tzn. są to kanały bramkowane napięciem [7,8]. TTP nie wydaje się zmieniać kinetyki bramkowania napięciem, lecz raczej kontroluje liczbę funkcjonalnych kanałów, np. przez fosforylację [2,7,8]. Niestety rola tych kanałów nie jest w pełni zrozumiała. Kanały o podobnej charakterystyce są szeroko rozpowszechnione w błonach plazmatycznych różnych komórek, w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i błonie jądrowej. Tak więc rodzi się pytanie, czy przedstawiona przez Bettendorffa hipoteza rzeczywiście mówi o szczególnej roli TTP w układzie nerwowym skoro kanały jonowe, o których była mowa, występują powszechnie w błonach różnych typów.

Funkcja TTP w mechanizmie neurotransmisji

Najnowsze badania nad potencjalnym wpływem tiaminy na uwalnianie acetylocholin w płytkach nerwowo-mięśniowych wskazują na zupełnie inną rolę, jaką może pełnić tiamina w układzie nerwowym. Badania te, prowadzone w grupie Bettendorffa, dotyczyły białka rapsyny 43K zasocjowanego z błoną postsynaptyczną, które w sposób specyficzny łączy się z receptorami acetylocholinowymi typu N, znajdującymi się w postsynaptycznej błonie płytki nerwowo-mięśniowej gryzoni lub elektrocytach *Torpedo murata*. Stymulacja tych receptorów, stanowiących w istocie bramkowane przez acetylocholiny kanały jonowe, prowadzi do aktywacji komórki postsynaptycznej. Asocjacja rapsyny 43K z błoną umożliwia tworzenie się funkcjonalnych części motorycznych, scalających docierające informacje. Zmutowanie genu białka 43 K rapsyny u myszy, prowadzi do ich postnatalnej śmierci.

W pracy Nghiem i Bettendorffa [40] przedstawiona jest nowa specyficzna droga

fosforylacji rapsyny 43K przez endogenną kinazę(y) białkową na membranach receptora acetylocholinowego, dla której donorem grup fosforanowych był trifosforan tiaminy (TTP). Endogenna kinaza(y) obecna w membranach mózgu gryzoni wykorzystywała γ^{32} P-TTP jako donora grup fosforanowych. Użycie jako donora grup fosforanowych TTP, nie należącego do klasycznych trifosforanów purynowych, takich jak ATP czy GTP, reprezentuje nową drogę fosforylacji, prawdopodobnie szczególnie ważną dla białek synaptycznych. Ta świeża, a zatem wymagająca dalszych potwierdzeń hipoteza, pozwalająca traktować TTP jako potencjalną wysokoenergetyczną komponentę, której energia hydrolizy może być powiązana z procesem transportu przez błony w układzie nerwowym, stawia TTP w nowej bardziej ogólnej roli donora grup fosforanowych w procesach fosforylacji białek.

IV. PODSUMOWANIE

W licznych pracach traktujących o roli tiaminy i jej fosforanów w układzie nerwowym wyróżnić można trzy grupy hipotez. Pierwsza mówi o roli tiaminy, a ściślej trifosforanu tiaminy, poprzez wpływ na funkcjonowanie kanałów jonowych Na^+ bramkowanych ligandem. Druga, podważając argumenty pierwszej, wskazuje raczej na rolę fosforanów tiaminy w funkcjonowaniu kanałów anionowych Cl^- o niskiej specyficzności bramkowanych napięciem. Wobec powszechnego występowania tych kanałów w różnych typach błon, hipoteza ta nie tłumaczy specyficzności obserwowanych efektów wobec układu nerwowego. Najnowsza hipoteza postuluje funkcjonowanie TTP jako donora grup fosforanowych w procesach fosforylacji białek, przebiegających w układzie nerwowym podczas przekazu sygnału poprzez synapsy.

LITERATURA

- [1] BASU TK, DICKERSON JW. Vitamins in human health and disease. Thiamin (Vitamin B₁). *Cab International, Guildford, UK* 1996; **rozdz.2**: 11–27.
- [2] BETTENDORFF L. A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells? *Arch Physiol Biochem* 1996; **104**: 745–751.
- [3] BETTENDORFF L. Thiamine in excitable tissues; reflections on a non-cofactor role. *Metab Brain Dis* 1994; **9**: 183–203.
- [4] BETTENDORFF L. Thiamine homeostasis in neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 1995; **26**: 295–302.
- [5] BETTENDORFF L. The compartmentation of phosphorylated thiamine derivatives in cultured neuroblastoma cell. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1222**: 7–14.
- [6] BETTENDORFF L, GOESSENS G, SLUSE FE. Reversibility of thiamine deficiency-induced partial necrosis and mitochondria uncoupling by addition of thiamine to neuroblastoma cell suspensions. *Mol Cell Biochem* 1997; **174**: 121–124.
- [7] BETTENDORFF L, HENNUAY B, DE CLERCK A, WINS P. Chloride permeability of rat

- brain membrane vesicles correlates with thiamine triphosphate content. *Brain Res* 1994; **652**: 157–160.
- [8] BETTENDORF L, HENNUAY B, WINS P, SCHOFFENIELS E. Thiamine and derivatives as modulators of rat brain chloride channels. *Neuroscience* 1993; **52**: 1009–1017.
- [9] BETTENDORFF L, KISH SJ, GRISAR T, MASTROGIACOMO F. Thiamine, thiamine phosphates, and their metabolising enzymes in human brain. *J Neurochem* 1996; **66**: 250–258.
- [10] BETTENDORFF L, KOLB HA, SHOFFENIELS E. Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells. *J Membr Biol* 1993; **136**: 281–288.
- [11] BETTENDORFF L, MASTROGIACOMO F, GRANDFILS C, WINS P, SCHOFFENIELS E. Thiamine triphosphatase in the membranes of the main electric organ of *Electrophorus electricus*: substrate-enzyme interactions. *J Neurochem* 1989; **53**: 738–746.
- [12] BETTENDORFF L, MASTROGIACOMO F, WINS P, KISH SJ, GRISAR T, BALL MJ. Low thiamine diphosphate levels in brains of patients with frontal lobe degeneration of the non-Alzheimers type. *J Neurochem* 1997; **69**: 2005–2010.
- [13] BETTENDORFF L, PEETERS M, JOUAN C, WINS P, SHOFFENIELS E. Determination of thiamin and its phosphates esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed phase high-performance liquid chromatographic method. *Anal Biochem* 1991; **198**: 52–59.
- [14] BETTENDORFF L, PEETERS M, WINS P, SHOFFENIELS E. Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *J Neurochem* 1993; **60**: 423–433.
- [15] BETTENDORFF L, SLUSE F, GOESSENS G, WINS P, GRISAR T. Thiamine-deficiency-induced partial necrosis and mitochondrial uncoupling in neuroblastoma cells are rapidly reversed by addition of thiamine. *J Neurochem* 1995; **65**: 2178–2184.
- [16] BETTENDORFF L, WEEKERS L, WINS P, SHOFFENIELS E. Injection of sulbutiamine induced an increase in thiamine triphosphate in rat tissues. *Biochem Pharmacol* 1990; **40**: 2557–2569.
- [17] BETTENDORFF L, WINS P. Mechanism of thiamine transport in neuroblastoma cells. Inhibition of high affinity carrier by sodium channel activators and dependence of thiamine uptake on membrane potential and intracellular ATP. *J Biol Chem* 1994; **269**: 14379–14385.
- [18] BETTENDORFF L, WINS P, LESOURD M. Subcellular localisation and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1222**: 1–6.
- [19] BETTENDORFF L, WINS P, SHOFFENIELS E. Regulation of ion uptake in membrane vesicles from rat brain by thiamine compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **171**: 1137–1144.
- [20] BROWN RD. The proton channel blocking agent omeprazole is an inhibitor of the thiamin shuttle. *J Theor Biol* 1990; **143**: 565–573.
- [21] BUTTERWORTH R F. Pathophysiology of alcoholic brain damage: synergistic effects of external, thiamine deficiency and alcoholic liver disease. *Metab Brain Dis* 1995; **10**: 1–8.
- [22] BUTTERWORTH R F, KRIL JJ, HARPER CG. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; **17**: 1084–1088.
- [23] CALINGASAN NY, CHUN WJ, PARK LCH, UCHIDA K, GIBSON GE. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 946–958.
- [24] DODD PR, THOMAS GJ, Mc CLOSKEY A, CRANE DI, SMITH ID. The neurochemical pathology of thiamine deficiency: GABA_A and glutamate_{NMDA} receptor binding sites in a goat model. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 39–54.
- [25] GENG MY, SAITO, KATSUKI H. The effects of thiamine and oxythiamine on the survival of cultured brain neurons. *J Pharmacol* 1995; **68**: 349–352.
- [26] HARATA N, IWASAKI Y. The blood-brain barrier and selective vulnerability in experimental thiamine-deficiency encephalopathy in the mouse. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 55–69.

- [27] HEROUX M, RAGHAVENDRA RAO VL, LAVOIE J, RICHARDSON JS, BUTTERWORTH RF. Alternations of thiamine phosphorylation and thiamine-dependent enzymes in Alzheimers disease. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 81–88.
- [28] ITOKAWA Y. Thiamine and nervous system function: a historical sketch. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 1–8.
- [29] ITOKAWA Y, COOPER JR. Thiamine release from nerve membranes by tetrodoxin. *Science* 1969; **166**: 76–761.
- [30] LAFORENZA U, PATRINI C, MAZZARELLO P, POLONIM, RINDIG. Thiamine, thiamine phosphates and thiamine metabolising enzymes in synaptosomes of rat brain. *Bas Appl Histochem* 1990; **34**: 249–258.
- [31] LAFORENZA U, PATRINI C, TARTARA F, RINDI G. Thiamin pyrophosphate-dependent enzymes in neuronal, glial and synaptosomal enriched fractions from rat brain. *Med Sci Res* 1995; **23**: 109–110.
- [32] LANGLAIS PJ, ZHANG S X, SAVAGE L M. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 19–37.
- [33] LEONG DK, BUTTERWORTH RF. Neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy: pathophysiologic mechanisms and implications for PET imaging. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 71–79.
- [34] MASTROGIACOMO F, BETTENDORFF L, GRISAR T, KISH SJ. Brain thiamine, its phosphate esters, and its metabolising enzymes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996; **39**: 585–591.
- [35] MATSUSHITA H, TAKEUCHI Y, KOSAKA K, FUSHIKI S, KAWATA M, SAWADA T. Changes in serotonergic neurons in the brain of pyriethamine-induced acute thiamine-deficient mice. *Acta Neuropathologica* 1999; **98**: 614–621.
- [36] MEADOR KJ, NICHOLS ME, FRANKE P, DURKIN MW, OBERZAN RL, MOORE EE, LORING DW. Evidence for a central cholinergic effect of high-dose thiamine. *Ann Neurol* 1993; **34**: 724–726.
- [37] MIMORI Y, KATSUOKA H, NAKAMURA S. Thiamine therapy in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 89–94.
- [38] MURI RM, VON OVERBECK J, FURRER J, BALLMER PE. Thiamin deficiency in HIV-positive patients: evaluation by erythrocyte transketolase activity and thiamin pyrophosphate effect. *Clin Nutr* 1999; **18**: 375–378.
- [39] NAKAGAWASAI O, TADANOT, NIJIMA F, TAN-NOK, KISARA K. Immunohistochemical estimation of rat brain somatostatin on avoidance learning impairment induced by thiamine deficiency. *Brain Res Bull* 2000; **51**: 47–51.
- [40] NGHIEM HO, BETTENDORFF L, CHANGEUX JP. Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB J* 2000; **14**: 543–554.
- [41] ROMANENKO AV. A new way of muscle activity regulation: thiamine participation in neuromuscular transmission. *Muscle and Motility* 1990; **2**: 151–153.
- [42] SUZUKI M, ITOKAWA Y. Effects of thiamine supplementation on exercise-induced fatigue. *Metab Brain Dis* 1996; **11**: 95–106.
- [43] TANDRA C, COOPER JR. The fluorescent microscopic localization of thiamine in nervous tissue. *J Histochem Cytochem* 1968; **16**: 362–365.
- [44] TODD K, BUTTERWORTH RF. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1999; **893**: 404–411.

TRANSPORT ORAZ METABOLIZM TIAMINY W KOMÓRKACH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

THIAMINE TRANSPORT AND METABOLISM IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS

Robert DULIŃSKI

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Praca przedstawia wybrane aspekty transportu oraz metabolizmu tiaminy w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, podkreślając działanie w tych procesach białek, unikalnych dla tego mikroorganizmu. Jedno z nich (produkt genu *THI6*), łączy w jednej cząsteczce dwie aktywności niezbędne na kolejnych etapach syntezy tiaminy. Inny enzym, kwaśna fosfataza występująca w przestrzeni peryplazmatycznej (produkt genu *PHO3*), wykazuje dodatkowo odrębną aktywność wiązania tiaminy. Pełni ona najprawdopodobniej funkcję defosforylacji fosforanów tiaminy pobranych z zewnątrz. Uwolniona w tym procesie tiamina przechodzi przez błonę komórkową przy udziale błonowego transportera, kodowanego przez gen *THI10*.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl. 16*: 221–228)

Słowa kluczowe: transport przez błony, przestrzeń peryplazmatyczna, fosforany tiaminy.

Summary: This review presents selected problems of thiamine transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cells with focus on the proteins that are unique in this microorganism. The protein, encoded by *THI6* gene, combines in one molecule two enzymatic activities, necessary at two steps of thiamine biosynthesis. Another enzyme, the periplasmic acid phosphatase (*PHO3* gene product), exhibits the additional thiamine binding property. It probably dephosphorylates thiamine phosphate taken up from the medium. Free thiamine crosses the cell membrane via the membrane-bound transporter encoded by *THI10* gene.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *suppl. 16*: 221–228)

Key words: membrane transport, periplasmic space, thiamin phosphates.

I. WSTĘP

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* przez wiele lat stanowiły niezwykle efektywne źródło dla izolacji tiaminy oraz wielu enzymów wykorzystujących jako kofaktor difosforan tiaminy (ThDP) [1,3]. *S. cerevisiae* zyskały status swojego modelu eukariotycznego organizmu. Kulminacją ogromnego zaawansowania badań z zakresu inżynierii genetycznej, biochemii oraz biologii komórki stało się zidentyfikowanie sekwencji nukleotydowej kompletnego genomu tych drożdży, kodującej ponad 6000 genów zlokalizowanych na 16 niezależnych chromosomach [2,26,29].

Podobnie jak rośliny oraz wiele mikroorganizmów *S. cerevisiae* są zdolne do syntezy tiaminy *de novo* [12]. Mogą jednak również pobierać zewnątrzkomórkową tiaminę i wykorzystywać ją do syntezy ThDP. Zjawiska aktywnego transportu witaminy B1 cechuje imponująca wydajność, manifestująca się 200-krotnym wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowej tiaminy w ciągu kilku minut [3]. W niniejszym artykule przedstawiono te cechy transportu i metabolizmu w *S. cerevisiae*, które, przynajmniej w chwili obecnej, przypisać można wyłącznie temu mikroorganizmowi.

II. BIOSYNTeza DIFOSFORANU TIAMINY

Pomimo faktu, iż ThDP stanowi jeden z kluczowych kofaktorów, znajomość wielu genetycznych aspektów biosyntezy tego związku wciąż pozostaje na niezadowolającym poziomie [25]. Zidentyfikowane do tej pory geny kodujące białka zaangażowane w tym procesie wyliczono w tabeli 1.

Tak jak w innych organizmach syntezujących tiaminę, w pierwszych fazach biosyntezy tej substancji powstają dwa prekursorzy: 5-(2-hydroksyetylo)-4-metylotiazol (HET) oraz 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyna (HMP) [3,25]. Prekursorzy te, ulegają następnie fosforylacji: HMP dwustopniowej, a HET jednostopniowej, po czym następuje ich kondensacja z utworzeniem monofosforanu tiaminy. Unikalną własnością *S. cerevisiae* jest to, że aktywność enzymatyczną odpowiedzialną za kondensację (pirofosforylaza fosforanu tiaminy, EC 2.5.1.3.) niesie łańcuch polipeptydowy, który ma jednocześnie aktywność kinazy HET (EC 2.7.1.50). To dwufunkcyjne białko kodowane jest przez gen *THI6* [23]. Natywny enzym jest oktamerem zbudowanym z podjednostek o masie cząsteczkowej 60 kDa. Stwierdzono, iż 70-aminokwasowy region na końcu karboksylowym proteiny jest niezbędny dla funkcjonowania obu aktywności i prawdopodobnie utrzymania przez białko odpowiedniej konformacji. Ostatnie etapy syntezy ThDP, już typowe dla większości organizmów, obejmują najpierw defosforylację fosforanu tiaminy, a następnie wolna tiamina ulega pirofosforylacji przy udziale pirofosfokinazy tiaminy [3,19]. Warto jednak zaznaczyć, że ten ostatni kluczowy enzym został najlepiej scharakteryzowany pod względem właściwości enzymatycznych właśnie w *S. cerevisiae*. Jest on kodowany przez gen *THI80*.

TABELA 1. Geny oraz białka odpowiedzialne za syntezę difosforanu tiaminy u *S. cerevisiae*

Gen	Chromosom	Masa cząsteczkowa białka (KDA)/Liczba aminokwasów	Funkcja białka
THI6	14	58/540	pirofosforylaza fosforanu tiaminy i kinaza hydroksyetylotiazolu,
THI80	15	36,6/314	pirofosfokinaza tiaminy, unikalna kopia
THI4	7	35/322	biosynteza prekursora tiazolowego,
THI5	6	38,6/340	biosynteza prekursora pirymidynowego
THI11	10	38,6/340	biosynteza prekursora pirymidynowego
THI12	14	38,6/340	biosynteza prekursora pirymidynowego
THI13	4	38,6/340	biosynteza prekursora pirymidynowego
PHO3	2	51/450	reprimowalna przez tiamine kwaśna fosfataza, hydroliza fosforanów tiaminy w przestrzeni periplazmatycznej
THI10/ THI7	12	66,9/598	transporter tiaminy w błonie komórkowej
THI2/ PHO6	2	51,8/450	aktywator transkrypcji, wiązanie z DNA!
THI3	4	68,4/576	regulacja ekspresji genów
PDC2	4	103,9/925	regulacja ekspresji genów,
RPI1	9	46,6/407	aktywator transkrypcji, bogaty w Asn + Ser

III. TRANSPORT TIAMINY PRZEZ BŁONĘ KOMÓRKOWĄ *S. CEREVISIAE*

Wymienione procesy biosyntezy wymagają znacznego zaangażowania energetycznego, bowiem wyprodukowanie przez komórkę jednej cząsteczki ThDP stanowi równoważnik pięciu fosforylacji [3,9]. W kontekście tych danych nie zaskakuje fakt, iż drożdże wykształciły niezwykle efektywny mechanizm pozyskiwania oraz sekwestracji dostępnej pozakomórkowo tiaminy. Dzięki systemowi aktywnego transportu komórki *Saccharomyces cerevisiae* są zdolne do akumulacji tiaminy w stężeniach przekraczających 10 000 razy zewnątrzkomórkowy poziom witaminy B1. W ciągu 30 minut dochodzi do całkowitej sekwestracji 1 mM tiaminy ze środowiska zewnętrznego [5,8]. Procesy transportu są stymulowane przez glukozę, natomiast inhibitorami są jony fluorkowe oraz azotanowe. Transporter operuje w optimum pH wynoszącym 4,5, a wartość stałej K_m wynosi 0,18 μM [1]. Z obserwacji wpływu rozlicznych analogów tiaminy wynika, iż system transportu wykazuje większą swoistość względem fragmentu pirymidynowego niż pierścienia tiazolu [7,15,22]. Wśród badanych związków najlepszym inhibitorem okazał się dwusiarczek o-benzoilo-

tiaminy, hamujący transport w sposób kompetycyjny, z wartością stałej inhibicji K_i wynoszącą 1,8 nM [15]. Jego skuteczność może wynikać z wysokiej rozpuszczalności w lipidowej komponentce błony komórkowej drożdży.

Pod koniec lat siedemdziesiątych w komórkach drożdży zidentyfikowano aktywność wiązania tiaminy zlokalizowaną w błonie komórkowej [4]. Zgodność parametrów wiązania; optimum pH i stałej dysocjacji, z odpowiednią charakterystyką całego układu transportu sugerowała, że białko wiążące bierze bezpośredni udział w przemieszczaniu cząsteczki tiaminy przez błonę komórkową. Hipoteza ta, została również potwierdzona przez badania m.in. przy zastosowaniu chemicznie (o-bromoetylotiamina) oraz fotochemicznie (4-azydo-2-nitrobenzoiotiamina) reaktywnych pochodnych tiaminy [14,15,28]. Okazało się, iż zastosowanie powyższych pochodnych prowadzi do inaktywacji jednocześnie aktywności wiążącej tiaminę, zlokalizowanej w błonie komórkowej oraz aktywności systemu transportu tiaminy w komórkach drożdży. Druga z wymienionych, fotoreaktywna pochodna posłużyła ponadto do wyznakowania miejsc wiążących w błonie.

Przełomem w badaniach nad transportem witaminy B1 w drożdżach było zidentyfikowanie w 1997 roku genu transportera tiaminy *THI10* [2,26,29]. Należy podkreślić, iż były to pierwsze prace, charakteryzujące gen kodujący białko transportujące tiaminę. Produkt genu *THI10* stanowi polipeptyd o masie cząsteczkowej 66,903 Da składający się z 598 aminokwasów, który wykazuje zaskakująco wysokie podobieństwo do permeazy uracylu (30,1% homologii) oraz permeazy alantoiny (27,9% homologii) [2]. Sekwencja aminokwasów jednoznacznie sugeruje cechy strukturalne integralnego białka błony komórkowej. Białko Thi10p składa się z licznych regionów transmembranowych, jakkolwiek N- oraz C-terminalne fragmenty mają charakter hydrofilowy. Jednocześnie gen nie zawiera cech strukturalnych wyróżniających peptyd sygnałowy. Potencjalne miejsca N-glikozylacji, Asn-X-(Ser/Thr) zidentyfikowano w pozycjach aminokwasowych 39, 323 oraz 390 [2].

Okazuje się również, iż repertuar genów kodujących potencjalne transportery tiaminy nie ogranicza się tylko do sekwencji *THI10*. Geny *YOR071c* oraz *YOR192c* wykazują uderzające podobieństwo do *THI10*, aczkolwiek trudno przesądzić, czy podlegają ekspresji i są zaangażowane w transport tiaminy w komórkach drożdży. Rezultaty wstępnych badań sugerują, iż produkty tych genów mogą stanowić zaplecze analogów transportera, wykazujących stosunkowo niskie powinowactwo dla naturalnego ligandu.

IV. BIAŁKO WIĄŻĄCE TIAMINĘ W PERYPLAZMIE *S. CEREVISIAE*

W przestrzeni peryplazmatycznej *S. cerevisiae*, tj. między błoną komórkową a ścianą komórkową, występuje inne białko wiążące tiaminę, rozpuszczalna gli-

koproteina wyizolowana po raz pierwszy w 1978 roku [4]. Białko ma masę cząsteczkową 140 kDa i charakteryzuje się stałą dysocjacji kompleksu białko-ligand wynoszącą 29 nM [16,27]. Optymalne pH dla procesu interakcji z tiaminą oscyluje wokół wartości 5,5, oddziaływanie to jest odwracalnie hamowane w obecności 8 M mocznika.

Sondowanie analogami tiaminy oraz szereg innych badań wykluczyło możliwość, że to białko jest składnikiem transportu tiaminy do wnętrza komórki [7,14,22]. Przykładowo, pirytiamina hamuje wiązanie tiaminy tak jak i transport, ale dwusiarczek o-benzoiłotiaminy nie wykazuje podobieństwa w efektach wywieranych na zdolność wiążącą oraz układ transportu. Co więcej, mutant transportu tiaminy w komórkach *S. cerevisiae* (PT-R2) izolowany jako szczep oporny na pirytiaminę wciąż zawiera rozpuszczalne peryplazmatyczne białko w ilościach porównywalnych do szczepu dzikiego.

W 1986 roku przedstawiono rezultaty badań, z których wynikało, iż peryplazmatyczne białko wiążące tiaminę jest jednocześnie kwaśną fosfatazą, której synteza hamowana jest przez tiaminę w pożywce, kodowaną przez gen *PHO3* [21,24]. Przemawiały za tym następujące argumenty:

- zewnątrzkomórkowa tiamina prowadziła do równoległego zaniku obu aktywności,
- detekcja obu aktywności podczas niedenaturującej elektroforezy na żelu poliakrylamidowym natywnych oraz deglikozylowanych białek nastąpiła w identycznych pozycjach,
- obie aktywności wykazywały niemal identyczny przyrost w trakcie procedury oczyszczania,
- denaturacja cieplna prowadziła do podobnego stopnia inaktywacji w przypadku obu aktywności,
- mutanty defektywne pod względem aktywności „reprimowalnej” przez tiaminę kwaśnej fosfatazy nie wykazywały zdolności wiążącej tiaminę [21].

Jakkolwiek spektrum pH dla aktywności wiążącej tiaminę oraz fosfatazowej wykazuje pewne różnice [17,18], można przyjąć z dużym prawdopodobieństwem, iż szczelina wiążąca witaminę B1 oraz miejsce aktywne enzymu, zlokalizowane są na jednym łańcuchu polipeptydowym – kodowanym przez wspólny gen. Enzym wykazywał wielokrotnie wyższe powinowactwo do fosforanów tiaminy niż do standardowego substratu fosfataz 7 – fosforanu p-nitrofenolu [17]. Dysproporcja pomiędzy wartościami stałej K_m wynosiła 2–3 rzędy wielkości na korzyść monofosforanu tiaminy (TMP) oraz pirofosforanu tiaminy (TPP). Należy podkreślić, iż dwa wspomniane związki stanowią główne postaci tiaminy w środowisku naturalnym.

Postawiono zatem hipotezę dotyczącą funkcji tego białka w mechanizmach transportu związków spokrewnionych z witaminą B1. Tak więc, pomimo stosunkowo

niskiej specyficzności substratowej, T-rAPaza pełni prawdopodobnie funkcję w procesie hydrolizy zewnątrzkomórkowych fosforanów tiaminy, obecnych w stosunkowo niskich stężeniach oraz utylizacji komponenty tiaminowej fosforanów, które stanowią główne źródło tej witaminy w naturze [18]. Hipoteza ta została poparta za pomocą eksperymentów genetycznych. Okazuje się bowiem, iż komórki *S. cerevisiae* z wyciętym regionem kodującym produkt genu *PHO3*, wykazują zredukowaną aktywność wiązania znakowanych radioaktywnym węglem fosforanów tiaminy [17]. Niewątpliwie jednak, fizjologiczna rola reprimowalnej przez tiaminę kwaśnej fosfatazy wciąż pozostaje kwestią otwartą, wymagającą ostatecznej weryfikacji.

V. REGULACJA BIOSYNTETY ORAZ TRANSPORTU TIAMINY

Podobnie jak inne kluczowe szlaki metabolizmu, biosynteza tiaminy jest procesem ściśle regulowanym w celu zapobieżenia ewentualnym stratom energii [3,10,11,12]. Już wczesne badania sygnalizowały spadek aktywności wszystkich biosyntetycznych enzymów w komórkach, rosnących w warunkach dostępności zewnątrzkomórkowej witaminy B1 [20]. Naturalną konsekwencją wysokiego poziomu tiaminy jest również zahamowanie wiązania oraz transportu tej substancji, co potwierdzają obserwacje kultur komórkowych, w których nieobecne są T-rAP-aza oraz związane z błoną białko transportujące. Fakt ten sugeruje, iż przynajmniej częściowo regulacja następuje na poziomie ekspresji genów. Jednak nie można wykluczyć innych mechanizmów, bowiem *S. cerevisiae* są w stanie błyskawicznie akumulować tiaminę do poziomu wewnątrzkomórkowego sięgającego 1600 pmoli/10⁷ komórek, a następnie wstrzymać proces transportu [5].

Ekspresja genu transportera *THI10* w komórkach *S. cerevisiae* jest regulowana na poziomie mRNA przez pirofosforan tiaminy (TPP), podobnie jak innych genów zaangażowanych w metabolizm tiaminy [29]. Natomiast ekspresja genu *PHO3*, kodującego wspomnianą wcześniej reprimowalną przez tiaminę kwaśną fosfatazę (T-rAP), jest kontrolowana na poziomie transkrypcji. Zanalizowano region odpowiedzialny za transkrypcyjną aktywację genu *PHO3* w odpowiedzi na tiaminę w medium [24]. Aktywująca sekwencja AAA(A/C)TCAA została zidentyfikowana w regionie niekodującym genu *PHO3* oraz *THI6* w postaci dwóch kopii dla każdego z nich [2]. Okazało się jednocześnie, iż mechanizmy regulujące ekspresję *THI10* są różne od tych, które sterują produkcją białek kodowanych przez inne geny *PHO3, THI6, THI80*, zaangażowane w metabolizm witaminy B1 [3,13,19].

VI. PODSUMOWANIE

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, pomimo zdolności do syntezy tiaminy *de novo*, dysponują możliwością aktywnego transportu tego związku ze środowiska

zewnątrzkomórkowego. Alternatywna droga pozyskiwania oraz sekwestracji witaminy B1 jest w znacznej mierze podyktowana wysokim pułapem energetycznym procesu biosyntezy.

W przestrzeni peryplazmatycznej komórek drożdży występuje swoista kwaśna fosfataza, której funkcją jest prawdopodobnie defosforylacja fosforanów tiaminy, docierających tu ze środowiska. Natomiast wolna tiamina transportowana jest przez odrębne białko, wbudowane w błonę komórkową. Gen *THI10*, kodujący ten rzeczywisty transporter tiaminy, zidentyfikowano dopiero w ostatnich latach. Odkrycie to otworzyło nowe możliwości dla analizy regulacji genetycznej oraz wzajemnej korelacji pomiędzy procesami biosyntezy oraz transportu tiaminy w tym mikroorganizmie.

LITERATURA

- [1] BILINSKI CA, RUSSEL I, STEWART GG. Thiamine secretion in yeast. *Can J Microbiol* 1992; **38**: 1156–1160.
- [2] ENJO F, NOSAKA K, OGATA M, IWASHIMA A, NISHIMURA H. Isolation and characterization of a thiamin transport gene, *THI10*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19165–19170.
- [3] HOHMANN S, MEACKOCK PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Bioch Biophys Acta* 1998; **1385**: 201–219.
- [4] IWASHIMA A, NISHIMURA H. Isolation of a thiamine-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1979; **577**: 217–220.
- [5] IWASHIMA A, NOSAKA K, NISHIMURA H, ENJO F. Thiamin transporters in yeast. *Methods Enzymol* 1997; **279**: 109–117.
- [6] IWASHIMA A, KAWASAKI Y, NOSAKA K, NISHIMURA H. Effect of thiamin on cordycepin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* 1992; **311**: 60–62.
- [7] IWASHIMA A, KIMURA Y, KAWASAKI Y. Transport overshoot during 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1028**: 1620–1626.
- [8] IWASHIMA A, WAKABAYASHI Y, NOSE Y. Thiamine transport mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1975; **413**: 243–247.
- [9] KAWASAKI Y, NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1990; **172**: 6145–6157.
- [10] LLORENTE B, FAIRHEAD C, DUJON B. Genetic redundancy and gene fusion in the genome of Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterization of a three member family involved in the thiamine biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* 1999; **32**: 1140–1152.
- [11] MACHADO CR, PRAEKELT UM, DE OLIVEIRA RC, BARBOSA AC, BYRNE KL, MEACKOCK PA, MENCK CF. Dual role for the yeast *THI4* gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. *J Mol Biol* 1997; **273**: 114–121.
- [12] NISHIMURA H, KAWASAKI Y, KANEKO Y, NOSAKA K, IWASHIMA A. Cloning and characteristics of a positive regulatory gene, *THI2(Pho6)* of thiamin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* 1992; **297**: 155–158.
- [13] NISHIMURA H, KAWASAKI Y, KANEKO Y, NOSAKA K, IWASHIMA A. A constitutive metabolism mutation, *thi80*, causing reduced thiamine pyrophosphokinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1991; **173**: 2716–2719.

- [14] NISHIMURA H, SEMPUKU K, KAWASAKI Y, NOSAKA K, IWASHIMA A. Photoaffinity labeling of thiamin-binding component in yeast plasma membrane with 4-azido-2-nitrozobenzylthiamin. *FEBS* 1989; **255**: 154–158.
- [15] NISHIMURA H, SEMPUKU K, NOSAKA K, IWASHIMA A. Inactivation of the thiamine transport system in *Saccharomyces cerevisiae* with O-bromoacetylthiamine. *Arch Biochem Biophys* 1988; **266**: 249–253.
- [16] NISHIMURA H, SEMPUKU K, IWASHIMA A. Possible roles of carboxyl and histidine residues in a soluble thiamin-binding protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1981; **668**: 333–338.
- [17] NOSAKA K. High affinity of acid phosphatase encoded by *PHO3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1037**: 147–154.
- [18] NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. A possible role for acid phosphatase with thiamin binding activity encoded by *PHO3* in yeast. *FEMS Microbiol Lett* 1989; **60**: 55–60.
- [19] NOSAKA K, KANEKO Y, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 17440–17447.
- [20] TANAKA K, TAZUYA K, YAMADA K, KUMAOKA H. Biosynthesis of thiamin under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofactor* 2000; **11**: 121–122.
- [21] NOSAKA K, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Identity of soluble thiamin-binding protein with thiamin-repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1988; **967**: 49–55.
- [22] NOSAKA K, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Effect of tunicamycin on thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1986; **858**: 309–311.
- [23] NOSAKA K, NISHIMURA H, KAWASAKI Y, TSUJIHARA T, IWASHIMA A. Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a bifunctional thiamin phosphate pyrophosphorylase/hydroksyethylthiazole kinaze from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30510–30516.
- [24] NOSAKA K, YAMANISHI K, NISHIMURA H, IWASHIMA A. Upstream activation element of *PHO3* gene encoding for thiamine-repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* 1992; **305**: 244–248.
- [25] PRAEKELT VM, BYRNE KL, MEACKOCK PA. Regulation of *THI4(MOL1)*, a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1994; **10**: 481–490.
- [26] RUMML T, SILHANKOWA L. Mapping of gene controlling thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996; **30**: 1279–1283.
- [27] SCHWEINGRUBER ME, FLURI R, MAUNDRELL R, SCHWEINGRUBER AM, DUMERMUTH E. Identification and characterization of thiamin repressible acid phosphatase in yeast. *J Biol Chem* 1986; **261**: 15877–15882.
- [28] SEMPUKU K. Photoinactivation of the thiamin transport system in *Saccharomyces cerevisiae* with azidobenzoyl derivatives of thiamin. *Biochim Biophys Acta* 1988; **944**: 177–184.
- [29] SINGLETON CK. Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1997; **199**: 111–121.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: dennis@mol.uj.edu.pl

BIĄŁKA TRANSPORTOWE W PRZESTRZENI PERYPLAZMATYCZNEJ BAKTERII GRAMUJEMNYCH

TRANSPORT PROTEINS IN THE PERIPLASMIC SPACE OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Sylvia ADAMEK-ŚWIERCZYŃSKA

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W przestrzeni peryplazmatycznej bakterii gramujemnych funkcjonują białka swoiście wiążące różne substancje. Cechuje je jednolity plan budowy i model działania. Służą jako pierwotne receptory w procesie transportu przez błonę komórkową wiązanych przez siebie ligandów. Współpracują z transporterami ABC, układami transportowymi szeroko rozpowszechnionymi zarówno u *Prokaryota*, jak i u *Eukaryota*. Ponadto mają one dodatkowe funkcje: opiekuńczą – molekularnych piastunek dla białek przestrzeni peryplazmatycznej oraz pierwotnych receptorów w procesie chemotaksji. Peryplazmatyczne białka wiążące przejawiają cechy, wskazujące na pełnienie przez nie jeszcze innych, na razie mało zrozumiałych, funkcji.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 229–242)

Słowa kluczowe: peryplazmatyczne białka wiążące, transportery ABC, peryplazmatyczne białka transportowe

Summary: Proteins, that specifically bind diverse compounds operate in the periplasmic space of gram-negative bacteria. They share the uniform plan of structure and the model of action. These proteins serve as the primary receptors in the transport process across the inner cellular membrane. The periplasmic binding proteins cooperate with the ABC transporters, which ubiquitously occur in prokaryotic and eucaryotic organisms. They have also additional functions: of the chaperones for periplasmic proteins and of the primary receptors for chemotaxis processes. The periplasmic binding proteins have some properties suggesting their further functions, still to be recognized.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *supl.* 16: 229–242)

Key words: periplasmic binding proteins, ABC transporters, periplasmic transport proteins

I. WSTĘP

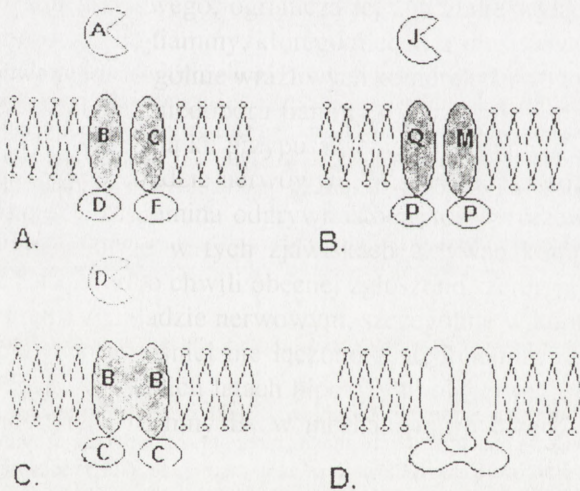
Bakterie gramujemne otoczone są podwójnym układem błon, pomiędzy którymi występuje przestrzeń grubości około 15 nm zwana przestrzenią peryplazmatyczną lub inaczej peryplazmą. U *Escherichia coli* peryplazma stanowi około 7% objętości komórki. Znajduje się w niej około 4% wszystkich białek, które pełnią najróżniejsze funkcje wspomagające metabolizm komórki lub wręcz unikalne w metabolizmie. Mogą to być zatem białka o funkcjach ochronnych (np. rozkładające penicylinę), odżywczych (enzymy hydrolizujące biopolimery), a także transportowych (np. białka transportujące w układzie permeaz). Układy permeaz, zwane także układami transportu wrażliwego na szok osmotyczny lub układami transportu peryplazmatycznego, należą do większej rodziny transporterów ABC (od ang. *ATP-binding cassette*).

II. UKŁADY TRANSPORTERÓW ABC

Cechą charakterystyczną wszystkich transporterów ABC jest posiadanie w swej strukturze domeny ABC. Jest to wysoce konserwatywna domena białkowa utworzona przez około 215 aminokwasów, która jest odpowiedzialna za przekaz energii związanej z przyłączeniem i hydrolizą ATP.

Domena ABC jest wykorzystywana w szerokiej gamie procesów fizjologicznych zarówno u *Prokaryota* [16], jak i *Eukaryota* [5, 9, 14, 30, 34, 35]. Wiele białek eukariotycznych należących do tej rodziny ma znaczenie w stanach chorobowych jak na przykład regulator przepuszczalności transbłonowej w mukowiscydozie (CFTR) [16], heterodimeryczny transporter Tap 1 i Tap 2 związany z procesem obróbki antygenów [5] oraz glikoproteina P, inaczej zwana białkiem MDRP (od ang. *multidrug resistance protein*), odpowiedzialna za odporność

Domena ABC jest wykorzystywana w szerokiej gamie procesów fizjologicznych zarówno u *Prokaryota* [16], jak i *Eukaryota* [5, 9, 14, 30, 34, 35]. Wiele białek eukariotycznych należących do tej rodziny ma znaczenie w stanach chorobowych jak na przykład regulator przepuszczalności transbłonowej w mukowiscydozie (CFTR) [16], heterodimeryczny transporter Tap 1 i Tap 2 związany z procesem obróbki antygenów [5] oraz glikoproteina P, inaczej zwana białkiem MDRP (od ang. *multidrug resistance protein*), odpowiedzialna za odporność



RYSUNEK 1. Modele organizacji struktury różnych typów transporterów ABC: A – cztery osobne podjednostki permeazy oligopeptydowej OppBCDF; B – cztery osobne podjednostki permeazy histydynowej HisQMP₂ z homodimerycznymi podjednostkami HisP; C – sfuzjowane podjednostki transbłonowe FhuB w prokariotycznym układzie transportowym związków żelaza – FhuB₂C₂; D. wszystkie cztery składniki w jednym łańcuchu polipeptydowym w transporterach eukariotycznych np. MDRP

nowotworów na chemioterapię [30, 35]. Białka bakteryjne natomiast wydają się pełnić rolę przystosowawczą do różnych zmiennych warunków środowiska. Większość procesów, w które zaangażowane są transportery ABC, związana jest z transportem różnorodnych substratów przez błony biologiczne. Wyjątek stanowi bakteryjny enzym UvrA, naprawiający uszkodzenia DNA spowodowane działaniem promieniowania UV [16].

Wszystkie transportery ABC mają wspólny model budowy. Zawierają cztery strukturalnie odrębne składniki: dwa transbłonowe oraz dwa wiążące nukleotyd adeninowy, umieszczone po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej [10]. U *Prokaryota* są to najczęściej cztery odrębne podjednostki – łańcuchy polipeptydowe, podczas gdy u *Eukaryota* często następuje połączenie ich w jeden łańcuch polipeptydowy o czterech strukturalnie wyodrębnionych domenach [10] (rys. 1). Organizacja struktury transportera ABC znajduje odbicie w strukturze genów go kodujących. U *Prokaryota* osobne geny kodujące poszczególne części transportera są zebrane w jednym miejscu genomu, zaś u *Eukaryota* często ulegają one fuzji w jeden gen [10, 16].

III. PROKARIOTYCZNE TRANSPORTERY ABC – CHARAKTERYSTYKA POSZCZEGÓLNYCH ELEMENTÓW

Genom *E. coli* został bardzo dobrze poznany, co ułatwiło identyfikację i lokalizację białek, wchodzących w skład układów transporterów ABC. Geny odpowiedzialne za kodowanie tych białek obejmują blisko 5% całego genomu. Analiza pozwoliła na sklasyfikowanie 79 białek jako części składowych tego typu układów. Białka te są najprawdopodobniej zorganizowane w 69 niezależnych, funkcjonalnych układów, z czego 57 jest układami transportu typu ABC (44 odpowiada za transport peryplazmatyczny, zaś 13 jest eksporterami różnych związków na zewnątrz komórki). Funkcja pozostałej reszty nie została jeszcze ustalona [16].

Charakterystyczną cechą układów transporterów ABC u *Prokaryota*, być może wręcz unikalną, jest działanie poprzez pierwotne receptory transportu – białka swoiście wiążące dany ligand, umieszczone w przestrzeni peryplazmatycznej.

1. Pierwotne receptory transportu – białka peryplazmatyczne swoiście wiążące ligandy

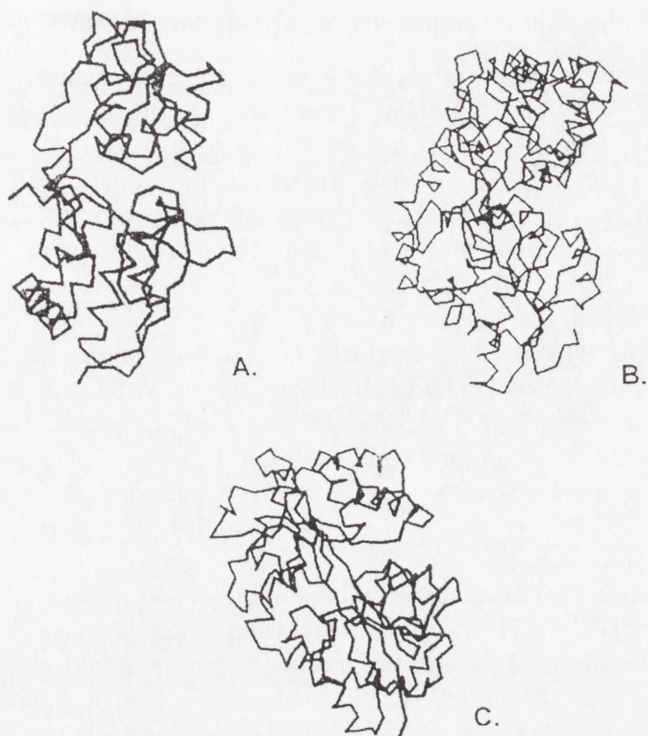
A. Struktura

Do chwili obecnej zidentyfikowano około 50 białek peryplazmatycznych, swoiście wiążących ligandy, funkcjonujących w przestrzeni peryplazmatycznej jako pierwotne receptory układów transportu [22]. Ligandy wiązane przez te białka należą do szerokiej gamy związków odżywczych. Są wśród nich cukry proste, oligosacharydy,

TABELA 1. Zestawienie własności wybranych, peryplazmatycznych białek wiążących

Wiązany ligand	Nazwa białka	Masa cząst. [kDa]	Stała dysocjacji kompleksu białko-ligand [μ M]	Struktura krystalograficzna	Chemo-taksja	Funkcja opiekuńcza
L-arabinoza	AraF	33,6	0,1	+ [28]		
D-galaktoza/D-glukoza	GBP	34	0,4	+ [28]	+	+ [29]
D-maltoza/maltodekstryna	MalE	40,5	3,5	+ [28]	+ [31]	+ [29]
Ryboza	Rbs B [27]				+	
Leucyna/izoleucyna/walina	LivK	36,8	1	+ [28]		
Leucyna	Leu	37,9	1	+ [28]		
Glutamina	Gln H	25	0,5	+ [11]		
Lizyna/arginina/ornityna	LAObp			+ [11]		
Histydyna	His J			+ [25]		
Arginina	Art J [36]					
Asparagina/glutamina	Ybe J			+ [11]		
Siarczany/chromiany	Cys P	34,7	0,2	+ [28]		
Fosforany/arseniany	Pbp			+ [28]		
Żelazo	Fep B	30,8 [32]				
Molibdeniany	Mod A [7]					
Nikiel	Nik A [16]					
Siderofory/hem/witamina B12	Fhu D [6]					
Witamina B12	Btu E [22]	20,5 [22]				
Poliaminy	Pot D Pot F	39		+ [13, 33]		
Dipeptydy	Dpp A	58		+	+ [22]	
Peptyd mureinowy	MppA [26]					
Oligopeptydy	Opp A					+ [21, 29]

aminokwasy, oligopeptydy, poliaminy oraz jony nieorganiczne (tab. 1). Poznano strukturę przestrzenną cząsteczek wielu z tych białek; ich porównanie wskazuje na jednolity, wspólny plan budowy. Pomimo znaczących różnic w masie cząsteczkowej – od 20 kDa do 60 kDa (tab. 1) oraz małej (10–20%) homologii w sekwencji aminokwasów, wszystkie pierwotne receptory peryplazmatyczne zbudowane są



RYSUNEK 2. Szkielet węglowy struktury trzeciorzędowej wybranych peryplazmatycznych białek wiążących: A – białko wiążące histydynę HisJ; B – białko wiążące maltozę MalE ze związanym ligandem; C – białko wiążące putrescynę PotD ze związanym ligandem (z internetowej bazy struktur białkowych *Entrez PubMed-National Center of Biotechnology Information*)

z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, pofałdowanego w dwie odrębne domeny globularne, które są połączone 2–3 krótkimi odcinkami peptydowymi, stanowiącymi zawias domykający obie domeny [20, 28] (rys. 2).

Obydwie domeny budujące peryplazmatyczne białko wiążące mają strukturę typu α/β oraz wykazują podobny sposób upakowania elementów struktury drugorzędowej. Ułożone są one w strukturę centralnego rdzenia ze splecionych β -harmonijek otoczonych przez α -helisy [1, 28] (rys. 3). Struktura ta bardzo przypomina pofałdowanie Rossmanna, spotykane w dehydrogenazach i kinazach [28]. Różnice w masie cząsteczkowej tych białek wynikają z różnic w długościach pętli i odcinków α -helis i β -harmonijek [20, 24, 28].

B. Wiązanie ligandu

Miejsce wiązania ligandu utworzone jest w szczelinie pomiędzy dwiema domenami globularnymi białka wiążącego [28]. Ligandy dla tych białek różnią się

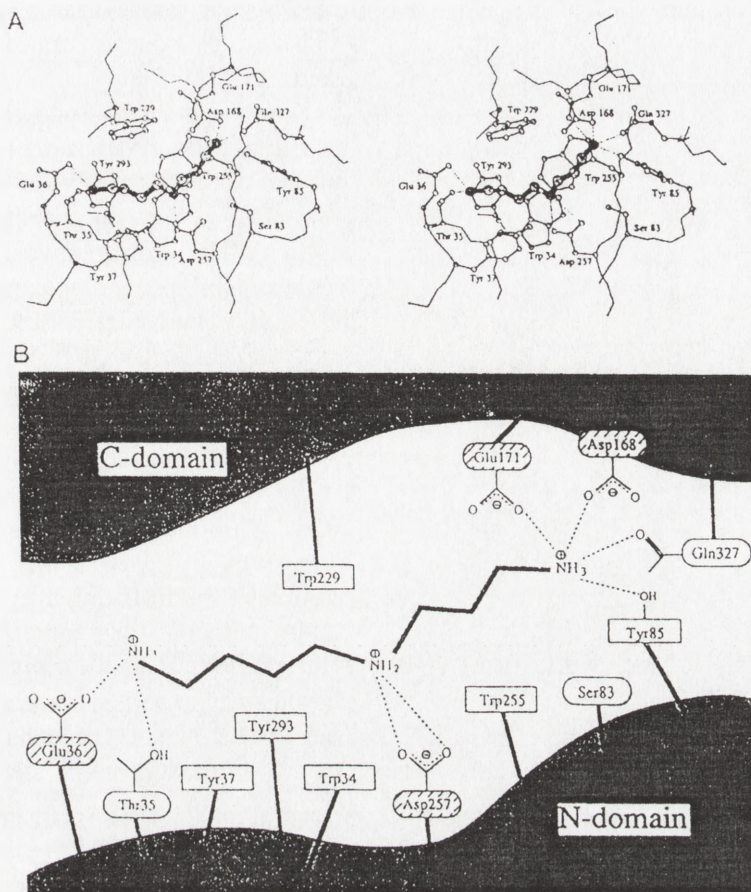


RYSUNEK 3. Struktura trzeciorzędowa peryplazmatycznego białka wiążącego dipeptydy DppA (z internetowej bazy struktur białkowych *Entrez PubMed National Center of Biotechnology Information*)

zarówno strukturalnie, jak i pod względem własności, na przykład ładunku. Pomimo tej różnorodności ligandów, ich powinowactwo do białek jest wysokie – stała dysocjacji tego oddziaływania jest we wszystkich przypadkach rzędu $1 \mu\text{M}$ (tab. 1). Proces wiązania ligandu przez receptory peryplazmatyczne jest szybki i związany z dehydratacją ligandu oraz usunięciem molekuł wody z miejsca wiążącego. Specyficzność względem substratu osiągnana jest głównie przez wiązania wodorowe, co wydaje się być uzasadnione funkcją tych białek [28]. Energia tych wiązań wystarcza dla przyłączenia ligandu, umożliwiając zarazem jednak szybkie i łatwe jego oddanie w celu dalszego transportu. O ile w ogóle można mówić o jakiejś zasadzie, to wydaje się, że różnice w charakterze ligandu wpływają na sposób tworzenia wiązań wodorowych. I tak, dla ligandów nie naładowanych wiązania wodorowe tworzą się przede wszystkim pomiędzy resztami bocznymi aminokwasów w miejscu wiązania a ligandem [28]. Natomiast dla ligandów obdarzonych ładunkiem wiązania wodorowe tworzą się przede wszystkim pomiędzy głównym łańcuchem peptydowym a ligandem, ale występuje dodatkowa stabilizacja ładunku ligandu poprzez oddziaływanie z resztami bocznymi [13, 15, 23, 28] (rys. 4).

C. Mechanizm działania

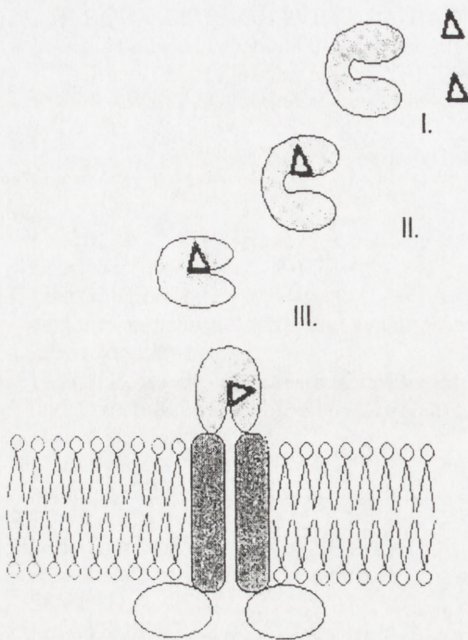
Na podstawie obserwacji różnic w strukturze pomiędzy peryplazmatycznymi białkami wiążącymi w stanie bez ligandu oraz ze związanym ligandem opracowano model mechanizmu działania tych białek. Wyróżniono trzy formy: (I) formę otwartą bez ligandu, (II) formę otwartą ze związanym ligandem oraz (III) formę zamkniętą ze związanym ligandem [28]. Dalsze badania różnych własności tych białek pozwoliły potwierdzić ten model, dodając nowe szczegóły [4, 31]. W wielu przypadkach stwierdzono zachodzenie zmiany konformacyjnej struktury pierwotnego receptora peryplazmatycznego pomiędzy formą II i III, wynikającej z zawiasowego zatrzaśnięcia obu domen i dodatkowo skręceniu względem siebie o pewien kąt [4, 31]. Najprawdopodobniej taka forma peryplazmatycznego białka wiążącego oddziałuje z komponentą błonową transportera ABC (rys. 5).



RYSUNEK 4. Oddziaływanie spermidyny z atomami peryplazmatycznego białka wiążącego PotD: A – obraz stereo ukazujący wiązania wodorowe, mostki solne i oddziaływania van der Waalsa; wiązania wodorowe i mostki solne zaznaczono linią kropkowaną; B – schematyczny diagram wiązań wodorowych i oddziaływań van der Waalsa (reprodukowano z *J Biol Chem* 1996; 27: 9519-9525 za zezwoleniem American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

2. Kompleks białek integralnych transportera ABC związany z wewnętrzną błoną cytoplazmatyczną

W komórkach bakterii gramujemnych pierwotny receptor peryplazmatyczny po swoistym związaniu ligandu oddziałuje z układem transportowym ABC. Dowiedziano, że obie domeny peryplazmatycznego białka wiążącego uczestniczą niezależnie w oddziaływaniu z komponentą transbłonową i przekazaniu sygnału do ATPazy [3, 17]. Kluczową wydaje się tu być sekwencja aminokwasowa: EAA-X₃-G-X₉-I-X-LP, którą mają wszystkie komponenty transbłonowe bakteryjnych transporterów ABC [1] oraz dodatkowo zmiana konformacji białka wiążącego po-



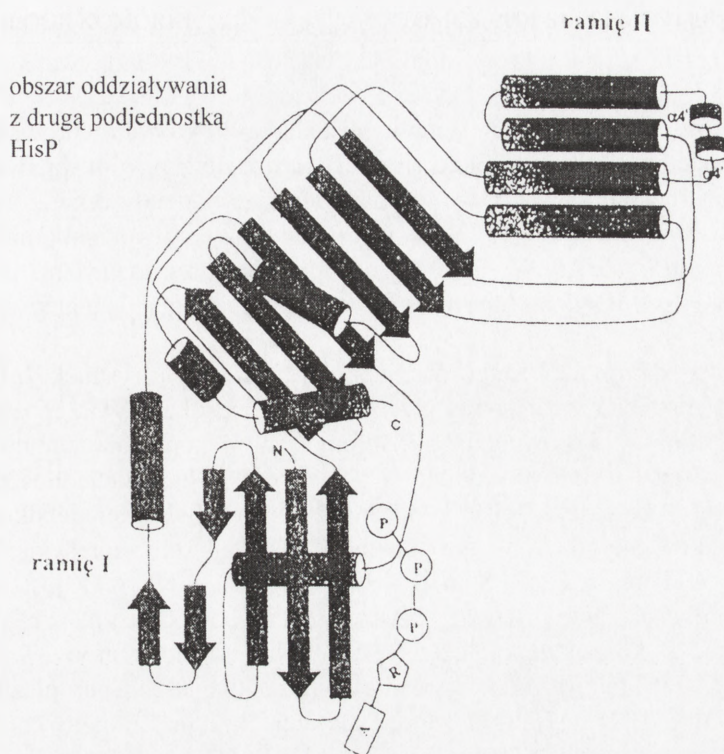
RYSUNEK 5. Model mechanizmu działania peryplazmatycznych białek swoiście wiążących ligandy, trzy formy: I – otwarta bez ligandu; II – otwarta ze związanym ligandem; III – zamknięta ze związanym ligandem, oddziaływująca z komponentą transbłonową transportera ABC

między stanem przekazania sygnału do ATPazy a dysocjacją i translokacją ligandu [17].

Komponenta transbłonowa bakteryjnego transportera ABC może być homolub heterodimerem. Wspólną cechą wszystkich komponent transbłonowych jest ich silna hydrofobowość oraz to, że przecinają błonę biologiczną parzystą liczbę razy, najczęściej sześć lub wielokrotność sześciu [1, 10]. Wyjątek stanowi transbłonowa podjednostka transportera odpowiedzialnego za translokację związków żelaza, hemu i witaminy B₁₂, przecinająca błonę 10 razy [6]. Odcinki hydrofobowe komponenty transbłonowej połączone są ze sobą odcinkami hydrofilowymi, odpowiedzialnymi za oddziaływanie z pozostałymi podjednostkami transportera – peryplazmatyczną i cytoplazmatyczną. Oba końce: N i C łańcucha polipeptydowego znajdują się po stronie cytoplazmatycznej błony [1, 6, 10].

3. Białka związane z wewnętrzną błoną cytoplazmatyczną odpowiedzialne za hydrolizę ATP

Podjednostka transporterów ABC odpowiedzialna za hydrolizę ATP znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej i oddziałuje z komponentą transbłonową. Do tej pory skryzalizowano jedno takie białko – HisP, które jest podjednostką wiążącą ATP w układzie permeazy histydynowej *Salomonella typhimurium* [12]. HisP ma własności białka zarówno integralnego błony, jak i peryferyjnego. Jest dostępne z obu stron błony, co w pewnym stopniu sugeruje charakter jego oddziaływania z komponentą transbłonową (białkami HisQ i HisM) [12]. Struktura krystaliczna HisP pokazuje, iż jest ono kształtem zbliżone do litery L, z dwoma grubymi ramionami (ramię I i ramię II) (rys. 6). Ramię I stanowi strukturę α/β , zaś ramię II zbudowane jest głównie z α -helis. Funkcjonalnie ramię II odpowiada za kontakt z komponentą transbłonową, a ramię I ma zdolność wiązania ATP [12, 17]. Wiązanie ATP odbywa się w kieszeni zawierającej „pętlę wiążącą fosforan”,



RYSUNEK 6. Model struktury drugorzędowej HisP – białka wiążącego ATP w układzie permeazy histydynowej. Cylindry i strzałki reprezentują odpowiednio α -helisy i β -harmonijki (reprodukowano za zezwoleniem z *Nature* 1998; 396: 703-707, copyright 1998 MacMillan Magazines Ltd)

inaczej zwaną „pętlą P”, strukturze charakterystycznej dla wielu białek wiążących nukleotydy (białka Ras lub kinazy adenylove) [12]. ATP wiązane jest głównie dzięki wiązaniom wodorowym oraz oddziaływaniom hydrofobowym [12]. Białko HisP tworzy homodimer poprzez oddziaływanie hydrofobowe pomiędzy strukturami β -harmonijek ramion I i tylko w tej formie jest w pełni funkcjonalną ATPazą [18].

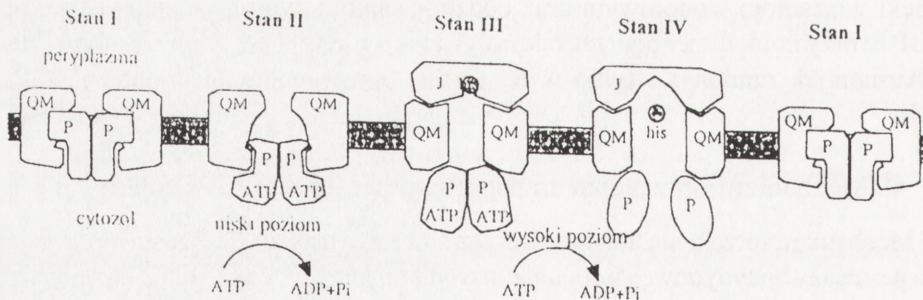
4. Mechanizm sprzężenia transportu przez błonę z hydrolizą ATP

Mechanizm sprzężenia transportu przez błonę z hydrolizą ATP został opracowany dla permeazy histydynowej *Salomonella typhimurium* [17, 18, 19]. Kompleks białek związanych z błoną, które wchodzi w skład bakteryjnego układu permeazy histydynowej, tj. układu transportera ABC zależnego od pierwotnego receptora peryplazmatycznego, złożony jest z dwóch hydrofobowych podjednostek transbłonowych HisQ i HisM oraz z dwóch jednakowych podjednostek wiążących ATP – HisP.

Rozpuszczalne białko peryplazmatyczne swoiście wiążące histydynę – HisJ dostarcza w tym układzie sygnału, który indukuje hydrolizę ATP dokonywaną przez białko HisP.

Doświadczenia z białkami składowymi układu, do których wprowadzono różne mutacje, wskazują na to, że białko HisP ma bardzo duże powinowactwo względem komponent transbłonowych (HisQ i HisM) oraz że oddziaływanie z nimi wpływa na jego aktywność ATPazową [3, 17, 19], ponieważ w roztworze, pomimo wiązania ATP, nie hydrolizuje go. Wydaje się, że stopień ścisłości powiązania podjednostek kompleksu HisQMP₂ działa supresyjnie bądź też stymulująco na aktywność dimeru HisP₂ [19].

Szczegóły zaproponowanego mechanizmu przedstawia rysunek 7. Cały proces sprzężenia translokacji substratu przez błonę z hydrolizą ATP, można podzielić na cztery etapy – odpowiadające czterem stanom konformacyjnym kompleksu HisQMP₂. Stan I – stan spoczynku: w nieobecności HisJ, podjednostki HisQMP₂ tworzą zwarty kompleks ściśle związany z błoną. HisP jest głęboko zanurzone w błonie i dostępne od strony cytoplazmy. HisQM ma rolę supresyjną – zapobiega hydrolizie ATP przez HisP. Stan II – stan wiązania ATP: ATP jest wiązane kooperatywnie. Związanie pierwszej cząsteczki ATP powoduje znaczną zmianę konformacyjną, w konsekwencji czego HisP wynurza się z błony, wiążąc drugą cząsteczkę ATP. Stan III – oddziaływanie z wiążącym białkiem peryplazmatycznym: oddziaływanie HisJ z HisQM zapoczątkowuje kolejną zmianę konformacyjną HisQM, która aktywuje ATPazową funkcję HisP. Następuje hydroliza ATP. Stan IV – stan translokacji substratu: zaktywowana podjednostka HisP ma mniejsze powinowactwo do ADP, co powoduje przyspieszenie szybkości hydrolizy ATP. HisQMP₂ podlega dalszym zmianom konformacyjnym prowadzącym do całkowitego otwarcia kanału transbłonowego i przejścia, uwolnionego przez peryplazmatyczne białko HisJ, ligandu. Stan I – stan spoczynku: po przejściu ligandu przez błonę



RYСУNEK 7. Proponowany model sprzężenia hydrolizy ATP z translokacją ligandu przez błonę komórkową w układzie permeazy histydynowej: Stan I – stan spoczynku; Stan II – kooperatywne wiązanie ATP; Stan III – oddziaływanie peryplazmatycznego HisJ z transbłonowym kompleksem HisQM; Stan IV – translokacja ligandu przez błonę (reprodukowano ze zmianami z *J Biol Chem* 1999; 274: 18310–18318 za zezwoleniem *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*)

i odłączeniu ADP, HisP automatycznie wsuwa się w głąb błony dzięki swojemu wysokiemu powinowactwu do podjednostek HisQM [19].

Wydaje się, że mechanizm ten, opracowany dla bakteryjnej permeazy histydynowej, może zostać rozszerzony także na pozostałe transportery ABC.

IV. DODATKOWE FUNKCJE RECEPTORÓW PERYPLAZMATYCZNYCH

1. Chemotaksja

Kaskada sygnału, związanego z chemotaksją u bakterii, zaczyna się wiązaniem cząsteczek atraktanta lub repelenta do czterech rodzajów chemoreceptorów w błonie komórkowej. U bakterii gramujemnych pewne repelenty i atraktanty wiążą się bezpośrednio z receptorami chemotaksji, a inne najpierw wiążą się z rozpuszczalnymi białkami peryplazmatycznymi, a dopiero za ich pośrednictwem oddziałują z receptorami. Znamiennym w tym procesie jest to, że owe białka peryplazmatyczne, wiążące chemoatraktanty, są tymi samymi białkami, które służą jako pierwotne receptory peryplazmatyczne, współdziałające z układami transporterów ABC [1, 22, 31]. Taką udowodnioną, podwójną funkcję pełnią białka wiążące D-galaktozę/D-glukozę, D-maltozę/maltodekstrynę, dipeptydy i rybozę (patrz tab. 1). Wydaje się, że mają one kolejne, strukturalnie odrębne miejsca oddziaływania z chemoreceptorem, inne niż miejsce oddziaływania z komponentą transbłonową transportera ABC [31].

2. Rola opiekuńcza

Ostatnie doniesienia wskazują na jeszcze jedną, dodatkową rolę białek peryplazmatycznych. Oddziałują one *in vitro* z rozwiniętymi i zdenaturowanymi białkami, tak jak molekularne piastunki (ang. *chaperones*), które są zaangażowane w procesy fałdowania i renaturacji białek w warunkach stresowych dla komórki [21, 29]. Białka peryplazmatyczne (GBP, MBP, OppA – tab. 1) promują funkcjonalne fałdowanie syntazy cytrynianowej i α -glukozydazy po denaturacji mocznikiem. Zapobiegają one również agregacji cząsteczek syntazy cytrynianowej podczas szoku cieplnego. Wydaje się, że peryplazmatyczne białka wiążące mogą spełniać te funkcje zarówno w formie związanej z ligandem, jak i w formie bez ligandu, co sugeruje istnienie osobnego miejsca wiązania z łańcuchem peptydowym, które przeznaczone jest dla ich realizacji [21, 29]. Realizacja funkcji opiekuńczych przez te białka tłumaczyłaby funkcjonalne fałdowanie się białek eksportowanych do przestrzeni peryplazmatycznej oraz ochronę komórki przed stresem.

3. Dodatkowe możliwe funkcje

Nie wyjaśniony pozostaje powód zjawiska fosforylacji niektórych białek peryplazmatycznych. Wydaje się, że nie jest ono powiązane z funkcją transportową [2], może więc być przyczynkiem do poszukiwania dalszych funkcji tych białek. Zaskakujące są też ostatnie badania wykazujące istnienie homologii w sekwencji i strukturze pomiędzy wiążącymi białkami peryplazmatycznymi, a neurotransmiterowym receptorem glutaminowym mózgu kurczęcia [25] oraz domeną zewnątrzkomórkową metabotropowego receptora glutaminowego (mGluRs), spełniającego rozliczne funkcje w centralnym układzie nerwowym ssaków [8].

Otwiera to potencjalną możliwość wykorzystania białek peryplazmatycznych jako uproszczonych modeli do badań nad funkcjonowaniem receptorów układu nerwowego.

V. PODSUMOWANIE

Białka wiążące różne ligandy, występujące w przestrzeni peryplazmatycznej bakterii gramujemnych, wydają się przede wszystkim pełnić rolę w transporcie przez błonę cytoplazmatyczną substancji niezbędnych do funkcjonowania komórki. Z drugiej strony, doniesienia eksperymentalne wskazują na dodatkowe funkcje tych białek, jako pierwotnych receptorów chemotaksji oraz białek opiekuńczych. Istnieją także przesłanki, wskazujące na nowe, jeszcze nie do końca zbadane i udowodnione, role peryplazmatycznych białek wiążących.

LITERATURA

- [1] BOOS W, SHUMAN H. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 204–229.
- [2] CELIS RTF, LEADLAY PF, IPSITA R, HANSEN A. Phosphorylation of the periplasmic binding protein in two transport systems for arginine incorporation in *Escherichia coli* K-12 is unrelated to the function of the transport system. *J Bacteriol* 1998; **180**: 4828–4833.
- [3] COVITZ KM, PANAGIOTIDIS CH, HOR LI, REYES M, TREPTOW NA, SHUMAN HA. Mutations that alter the transmembrane signalling pathway in an ATP binding cassette (ABC) transporter. *EMBO J* 1994; **13**: 1752–1759.
- [4] DOERING K, SURREY T, NOLLERT P, JAEHNIG F. Effects of ligand binding on the dynamics of maltose-binding protein. *Eur J Biochem* 1999; **266**: 477–483.
- [5] GILEADI U, HIGGINS CF. Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter associated with antigen presentation (Tap1) expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 11103–11108.
- [6] GROEGER W, KOESTER W. Transmembrane topology of two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B₁₂. *Microbiology* 1998; **144**: 2759–2769.
- [7] GRUNDEN AM, SHANMUGAM KT. Molybdate transport and regulation in bacteria. *Arch Microbiol* 1997; **168**: 345–354.

- [8] HAMPSON DR, HUANG XP, PEKHLETSKI R, PELTEKOVA V, HORNBY G, THOMSEN CH, THOGERSEN H. Probing the ligand-binding domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 33488–33495.
- [9] HIGGINS CF, CALLAGHAN R, LINTON KJ, ROSENBERG MF, FORD RC. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 135–142.
- [10] HIGGINS CF, GALLAGHER MP, HYDE S.C., MIMMACK ML, PEARCE SR. Periplasmic binding protein-dependent transport systems: the membrane associated components. *Phil Trans R Soc Lond* 1990; **326**: 353–365.
- [11] HSIAO CD, SUN YJ, ROSE J, WANG BC. The crystal structure of glutamine-binding protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1996; **262**: 225–242.
- [12] HUNG LW, WANG IX, NIKAIKO K, LIU PQ, AMES GF, KIM SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998; **396**: 703–707.
- [13] IGARASHI K., KASHIWAGI K. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J* 1999; **344**: 633–642.
- [14] KLEIN M, MARTINOIA E, HOFFMANN-THOMA G, WEISSENBOCK G. A membrane potential-dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronidase: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J* 2000; **21**: 289–304.
- [15] LEDVINA PS, TSAI AL., WANG Z, KOEHL E, QUIOCHO FA. Dominant role of local dipolar interactions in phosphate binding to a receptor cleft with an electronegative charge surface: equilibrium, kinetic, and crystallographic studies. *Protein Sci* 1998; **7**: 2550–2559.
- [16] LINTON KJ, HIGGINS CF. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 1998; **28**: 5–13.
- [17] LIU CE, LIU PQ, WOLF A, LIN E, AMES GF. Both lobes of the soluble receptor of the periplasmic histidine permease, an ABC transporter (traffic ATPase), interact with the membrane-bound complex. Effect of different ligands and consequences for the mechanism of action. *J Biol Chem* 1999; **274**: 739–747.
- [18] LIU PQ, AMES GF. *In vitro* disassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 3495–3500.
- [19] LIU PQ, LIU CE, AMES GF. Modulation of ATPase activity by physical disengagement of the ATP-binding domains of an ABC transporter, the histidine permease. *J Biol Chem* 1999; **274**: 18310–18318.
- [20] MATSUO Y, NISHIKAWA K. Prediction of the structural similarity between spermidine/putrescine-binding protein and maltose-binding protein. *FEBS Lett* 1994; **345**: 23–26.
- [21] MATSUZAKI M, KISO Y, YAMAMOTO I, SATOH T. Isolation of a periplasmic molecular chaperon-like protein of *Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans* that is homologous to the dipeptide transport protein DppA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 2718–2722.
- [22] NICKITENKO AV, TRAKHANOV S, QUIOCHO FA. 2.1 Å resolution structure of DppA, a periplasmic dipeptide transport/chemosensory receptor. *Biochemistry* 1995; **34**: 16585–16595.
- [23] OH BH, AMES GF, KIM SH. Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26323–26330.
- [24] OH BH, KANG CH, DE BOND T, KIM SH, NIKAIKO K, JOSHI AK, AMES GF. The bacterial periplasmic histidine-binding protein. Structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 4135–4143.
- [25] PAAS Y, EISENSTEIN M, MEDEVIELLE F, TEICHBERG VI, DEVILLERS-THIERY A. Identification of the amino acid subsets accounting for the ligand binding specificity of glutamate receptor. *Neuron* 1997; **17**: 979–990.
- [26] PARK JT, RAYCHAUDHURI D, LI H, NORMARK S, MENGIN-LECREULX D. Mppa, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide l-alanyl-d-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J Bacteriol* 1998; **180**: 1215–1223.

- [27] PARK Y, CHO YJ, AHN T, PARK C. Molecular interactions in ribose transport: the binding protein module symmetrically associates with the homodimeric membrane transporter. *EMBO J* 1999; **18**: 4149–4156.
- [28] QUIOCHO FA. Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high-affinity active transport systems in bacteria. *Phil Trans R Soc Lond* 1990; **326**: 341–351.
- [29] RICHARME G, CALDAS TD. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J Biol Chem* 1997; **272**: 15607–15612.
- [30] ROSENBERG MF, CALLAGHAN R, FORD RC, HIGGINS CF. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10685–10694.
- [31] SHARFF AJ, RODSETH LE, SPURLINO JC, QUIOCHO FA. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* 1992; **31**: 10657–10663.
- [32] STEPHENS DL, CHOEMD, EARHART CF. *Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin. *Microbiology* 1995; **141**: 1647–16
- [33] SUGIYAMA S, VASSYLYEV DG, MATSUSHIMA M, KASHIWAGI K, IGARASHI K, MORIKAWA K. Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9519–9525.
- [34] SZABO K, BAKOS E, WELKER E, MULLER M, GOODFELLOW HR, HIGGINS CF, VARADI A, SARKADI B. Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 23165–23171.
- [35] van VEEN HW, CALLAGHAN R, SOCENEANTU L, SARDINI A, KONINGS WN, HIGGINS CF. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* 1998; **391**: 291–295.
- [36] WISSENBACH U, SIX S, BONGAERTS J, TERNES D, STEINWACHS S, UNDEN G. A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterisation of the artPIQMJ genes, arginine binding and transport. *Mol Microbiol* 1995; **17**: 675–686.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: sylwiada@mol.uj.edu.pl

Część czwarta

PEPTYDY ANTYBAKTERYJNE

to jego funkcje. W tym celu komórki wykorzystują do swego przetrwania i rozwoju wewnątrz gospodarza, w tym też do przetrwania i rozwoju w środowisku zewnątrz komórki, czynniki obrony. Peptydy katalityczne, które są syntetyzowane przez komórki i posiadają zdolność do wywołania zmiany kształtu i rozmiaru komórki gospodarza, mogą być wykorzystane jako środki przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki badań nad tymi peptydami dowiodły, że mogą być one wykorzystane do leczenia chorób, w tym do leczenia chorób nowotworowych. Wyniki badań nad tymi peptydami dowiodły, że mogą być one wykorzystane do leczenia chorób nowotworowych. Wyniki badań nad tymi peptydami dowiodły, że mogą być one wykorzystane do leczenia chorób nowotworowych.

ELEKTYWNE DZIAŁANIE PEPTYDOW ANTYBAKTERYJNYCH

Aktywność bakteriobójcza skierowana przeciwko mikroorganizmom, m. in. zdatna w walce z patogenami, musi być selektywnie toksyczna, mogły działać destrukcyjnie na komórki gospodarza. Rowniny to czynniki molekularne, które są wszechobecne w komórkach prokariotycznych, nigdy nie występują w komórkach eukariotycznych. Są one składnikami aktywnej toksyczności i posiadają zdolność do wywołania zmiany kształtu i rozmiaru komórki gospodarza.

Wnętrza błony komórek bakterii (peptydów) zbudowana jest z złożonych obojętnych fosfolipidów, głównie fosfatydylocholu i sfingolipidów. Bakteryjna błona zawiera duże ilości niemiechanizowanych fosfolipidów, jak fosfatydylocholu i kardiolipin [42]. Wykazuje się, że aktywność chymiotaktyki jest wysoka w związku z tym, że błona jest bogata w fosfolipidy tego rodzaju, w tym także w składniki mineralne. Peptydy katalityczne, które są syntetyzowane przez komórki i posiadają zdolność do wywołania zmiany kształtu i rozmiaru komórki gospodarza, mogą być wykorzystane jako środki przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki badań nad tymi peptydami dowiodły, że mogą być one wykorzystane do leczenia chorób nowotworowych.

W składzie chemicznym błony komórek bakterii (peptydów) zbudowana jest z złożonych obojętnych fosfolipidów, głównie fosfatydylocholu i sfingolipidów. Bacteriofizjologia jest to ostatnie sąsiadnie w syntezie. Utrwaleniowa stabilizacja błony cholesterolu jest ważna dla ochrony ludzkich przed infekcją grzybną [2, 40].

PEPTYDY ANTYBAKTERYJNE – STRUKTURA I FUNKCJA*

ANTIMICROBIAL PEPTIDES – STRUCTURE AND FUNCTION

Barbara MICKOWSKA

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: W skład systemu obronnego roślin i zwierząt wchodzi między innymi peptydy o właściwościach antybakteryjnych lub antygrzybiczych. Pomimo dużego zróżnicowania pod względem występowania i sekwencji aminokwasów, większość z nich to kationowe cząsteczki o budowie amfipatycznej. Ze względu na strukturę przestrzenną można wśród nich wyróżnić kilka głównych grup: 1. Liniowe, formujące α -helisy; 2. Antyrównoległe arkusze β stabilizowane wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami disiarczkowymi; 3. Struktury α + β stabilizowane mostkami disiarczkowymi; 4. Struktury cykliczne; 5. Liniowe, o sekwencji wzbogaconej w określone aminokwasy. Aktywność peptydów skierowana selektywnie przeciwko mikroorganizmom obejmuje bakterie, grzyby, niektóre pierwotniaki, a nawet komórki nowotworowe. Wobec wzrastającej oporności mikroorganizmów na konwencjonalne antybiotyki, peptydy antybakteryjne mogą stać się w przyszłości bogatym źródłem antybiotyków o zastosowaniu klinicznym.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 245–259*)

Słowa kluczowe: peptydy antybakteryjne, peptydy antygrzybicze, antybiotyki

Summary: Antimicrobial peptides are part of defense system mainly in plants and animals. In spite of great diversity of origin and amino acid composition, almost all of them are cationic (due to presence excess Arg and Lys residues) and molecules form amphipathic structures. Antimicrobial peptides can be divided into several main groups based on their three-dimensional structure: 1. Linear, forming α -helices; 2. Antiparallel β -sheets stabilized by intramolecular disulfide bonds; 3. α -helical and β -sheet mixed structure with disulfide bonds; 4. Cyclic structures; 5. Linear, with unusually high content of certain amino acid, often forming extended helices. Antimicrobial activity of these peptides is very broad, including bacteria, fungi, some protozoa and even cancer cells. They are selectively toxic to microorganisms. Owing to the increasing resistance of bacteria to conventional antibiotics, antimicrobial peptides seem to be promising source of antibiotics in future.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 245–259*)

Key words: antimicrobial peptides, antibacterial, peptide antibiotics

*Dofinansowanie: praca częściowo finansowana przez KBN grant nr 6 P04B 00914

1. WSTĘP

Jednym z wielu elementów systemów obrony przed chorobotwórczymi mikroorganizmami są peptydy o aktywności antybakteryjnej bądź antygrzybiczej. Niektóre z nich produkowane są w komórkach konstytutywnie, synteza i lokalne uwalnianie innych wywoływane jest przez inwazję mikroorganizmów [1, 20, 24].

Peptydy o właściwościach antybiotyków są zwykle cząsteczkami kationowymi, zawierającymi od dwóch do dziewięciu ładunków dodatnich, pochodzących od reszt argininy i lizyny. Łańcuchy polipeptydowe długości kilkudziesięciu aminokwasów w około 50% składają się z reszt hydrofobowych, a cząsteczki mają budowę amfipatyczną, w której wyróżnić można część polarną i hydrofobową [23, 24].

Biosynteza peptydów antybakteryjnych przebiegać może w dwojaki sposób. W komórkach bakterii i grzybów zachodzi ona na kompleksach wieloenzymatycznych. Peptydy tak syntetyzowane często zawierają hydrokso- oraz D-aminokwasy, niejednokrotnie podlegają też dalszym modyfikacjom: metylacji, acylacji, glikozylacji, cyklizacji [23]. W organizmach wielokomórkowych roślin i zwierząt peptydy antybakteryjne syntetyzowane są na rybosomach, a następnie mogą podlegać modyfikacjom potranslacyjnym: glikozylacji łańcuchami oligosacharydowymi, tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań disiarczkowych, amidacji C-terminalnej grupy karboksylowej, halogenacji, fosforylacji, hydroksylacji, metylacji oraz epimeryzacji L-aminokwasów do D-aminokwasów [1]. Ponadto peptydami o właściwościach antybakteryjnych mogą być również produkty proteolitycznej degradacji białek [23].

W organizmach wielokomórkowych peptydy antybakteryjne występują głównie w tkankach najbardziej narażonych na pierwszy kontakt i wniknięcie mikroorganizmów chorobotwórczych lub w komórkach fagocytujących, odpowiedzialnych za zwalczanie intruzów (tab. 1). Peptydy antybakteryjne cechuje [1, 20, 24]:

- zdolność szybkiego zabijania komórek mikroorganizmów,
- szeroki zakres działania – bakteriobójcze, grzybobójcze, aktywne przeciw pierwotniakom,
- selektywność w stosunku do komórek mikroorganizmów i niska cytotoksyczność,
- aktywność przeciwko niektórym mikroorganizmom chorobotwórczym opornym na konwencjonalne antybiotyki,
- brak wytwarzania *in vitro* opornych mutantów,
- oporność na działanie enzymów proteolitycznych – dzięki zawartości D – oraz modyfikowanych aminokwasów, a także bardzo zwartej strukturze cząsteczek.

2. KLASYFIKACJA PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH

Peptydy antybakteryjne przejawiają duże zróżnicowanie strukturalne, można jednak wśród nich wyróżnić kilka głównych grup [15, 20, 24, 27, 35]:

TABELA 1. Lokalizacja peptydów antybakteryjnych w organizmach roślin i zwierząt

Rośliny	nasiona, liście, kwiaty, bulwy, strąki, ksylem, peryferyczne warstwy komórek [20, 21]
Bezkregowce	jady, płyny ustrojowe (np. hemolimfa), ziarnistości komórek fagocytyujących [20, 23]
Kregowce	komórki nabłonkowe i ich wydzieliny, skóra, ziarnistości komórek fagocytyujących (ziarnistości te formują fagolizosom lub ich zawartość uwalniana jest do środowiska w miejscu infekcji) [19, 20, 23]

- α -helikalne ,
- antyrównoległe arkusze β stabilizowane mostkami disiarczkowymi,
- struktury $\alpha+\beta$ stabilizowane mostkami disiarczkowymi,
- cykliczne,
- zawierające unikalną kompozycję aminokwasów.

2.1. Peptydy α -helikalne

Liniowe peptydy nie mające wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych w roztworach zwykle mają konformację przypadkową, natomiast w środowisku hydrofobowym (np. podczas interakcji z błoną lipidową) przyjmują amfipatyczną strukturę α -helikalną [13, 24, 37]. Reprezentantami tej grupy są m.in. magaininy, cekropiny, dermaseptyny i melityna, peptyd występujący w jadzie pszczoł [13, 32].

Magaininy, 23-aminokwasowe peptydy wyizolowano ze skóry afrykańskich żab *Xenopus laevis* [13, 15, 27, 37]. Magaininy wydzielane na powierzchnię skóry chronią żabę przed infekcjami, zagrażającymi jej w skażonej wodzie, działając skutecznie nawet w przypadku uszkodzenia skóry. Oprócz selektywnej aktywności przeciwko mikroorganizmom, magaininy oraz ich syntetyczne analogi wykazują aktywność skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym [32, 37] (rys. 1).

Cekropiny wyizolowano z hemolimfy ćmy *Hyalophora cecropia* [18, 22]. Łańcuch polipeptydowy cekropin składający się z 31–39 aminokwasów w środowisku hydrofobowym formuje strukturę złożoną z dwóch odcinków α -helikalnych (C- i N-końcowych), połączonych krótkim regionem zawiasowym. Helisa N-terminalna jest amfipatyczna i bardziej hydrofilowa (ładunki dodatnie), natomiast domena C-terminalna jest hydrofobowa [8, 11, 32]. Peptydy podobne do cekropin wyizolowano również z wielu innych gatunków owadów, a także z jelita cienkiego świni (cekropina P1) [11, 13, 27, 35, 37].

Dermaseptyny są liniowymi peptydami o łańcuchach długości 28–34 aminokwasów, wyizolowanymi ze skóry żab rodzaju *Phyllomedusa*, wykazującymi nie

tylko właściwości antybakteryjne, ale także aktywność przeciwko niektórym grzybom i pierwotniakom [2, 28, 36, 45].

Innymi peptydami zdolnymi do przyjmowania struktur helikalnych są bombininy izolowane z wydzieliny skóry żab *Bombina variegata* i *B. orientalis* oraz buforyna II z żołądka ropuchy *Bufo bufo gargarizans* [27, 28, 45].

2.2. Arkusze β stabilizowane mostkami disiarczkowymi

Peptydy o strukturze spinki do włosów, składającej się z dwóch antyrównoległych nici β „spiętych” dwoma mostkami disiarczkowymi wyizolowano z hemocytów kraba *Tachypleus tridentatus* oraz leukocytów świni. Grupy tych peptydów nazwano odpowiednio tachyplezynami i protegrynami. Są to niewielkie cząsteczki (16–18 aminokwasów) o 4–6 ładunkach dodatnich i amidowanej C-terminalnej grupie karboksylowej [14, 16, 35]. Wykazują one szeroki zakres działania przeciwko bakteriom i grzybom, ponadto mają zdolność wiązania się do lipopolisacharydu, co zapewne jest czynnikiem wzmacniającym ich aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym [14, 32, 35]. Podobne peptydy wyizolowano z hemocytów gatunku *Limulus polyphemus* spokrewnionego z krabem *Tachypleus tridentatus* [14, 32, 35].

Strukturalnie zbliżona do tachyplezyn i protegryn jest tanatyna – peptyd o właściwościach antybakteryjnych i antygrzybiczych wyizolowany z pluskwiaka *Podisus maculiventris*. Tanatyna ma również strukturę antyrównoległego arkusza β , którego dwie nici połączone są zwrotem β i spięte jednym mostkiem disiarczkowym. Siedem pierwszych aminokwasów z 21-aminokwasowego łańcucha tworzy długie, ruchome ramię o dużej zmienności konformacyjnej [14, 33] (rys. 2).

Defensyny kręgowców to cała rodzina peptydów zbudowanych z 29–42 aminokwasów, o cząsteczkach, które mają konformację trójniciowego antyrównoległego arkusza β stabilizowanego przez 3 wewnątrzcząsteczkowe mostki disiarczkowe [30, 44, 49]. Są to kationowe struktury amfipatyczne, o 2 do 10 ładunkach dodatnich. Ze względu na różnice w strukturze cząsteczek, przejawiające się w różnej lokalizacji mostków disiarczkowych, a także odmiennych miejscach ekspresji wprowadzono podział na α - oraz β -defensyny. α -Defensyny występują w ziarnistościach neutrofilii, gdzie stanowią znaczny procent białek, ponadto ich obecność wykryto w makrofagach oraz wydzielinach komórek nabłonka jelita cienkiego człowieka, szczurów, i myszy [30, 31, 35, 44]. Tę ostatnią grupę defensyn wydzielanych przez komórki Panetha nazwano kryptodynamami [30, 44]. β -Defensyny wykryto w nerkach, trzustce, keratynocytach i innych komórkach nabłonkowych (np. w nabłonku dróg oddechowych), leukocytach oraz w surowicy krwi i niektórych gruczołach np. ślinowych [3, 30, 34, 35, 36, 41, 42, 47, 48]. Zakres działania defensyn przeciwko mikroorganizmom jest bardzo szeroki – są toksyczne w stosunku do bakterii, grzybów, pierwotniaków, a nawet wirusów [31] (rys. 3).

2.3. Struktury $\alpha\beta$ stabilizowane mostkami disiarczkowymi

Liczną grupę peptydów antybakteryjnych rozpowszechnionych wśród owadów nazwano owadzimi defensynami. Obecność tych związków wykryto w organizmach muchówek, chrząszczy, błonkówek, pluskwiaków i ważek [7, 11, 14, 35]. Homologiczne peptydy znaleziono też w skorpionach, a nawet mięczakach [7, 14]. Owadzie defensyny są peptydami kationowymi, zbudowanymi z 34–46 aminokwasów [7, 14]. W ich strukturze trzeciorzędowej wyróżniono N-terminalną pętlę przechodzącą w amfipatyczną α -helisę oraz dwuniciowy antyrównoległy arkusz β . Domena α -helikalna jest połączona z C-terminalną nicią arkusza β dwoma mostkami disiarczkowymi, formując charakterystyczny motyw strukturalny $CS\alpha\beta$ (ang. *Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$*), gdzie dwie cysteiny w domenie α -helikalnej umiejscowione są w sąsiadujących skrętach helisy, a cysteiny nici β rozdzielone tylko jednym aminokwasem. Trzeci mostek disiarczkowy obecny w cząsteczce wiąże N-terminalną pętlę z centralną nicią arkusza β [12, 14]. Takie rozmieszczenie mostków disiarczkowych zapewnia dużą stabilność struktury przestrzennej cząsteczek, pozwalając jedynie na zmiany położenia pętli N-terminalnej [12]. Pojawianie się większości defensyn w hemolimfie owadów indukowane jest infekcją bakteryjną [7, 11, 12] (rys. 4).

Oprócz peptydów antybakteryjnych, jakimi są defensyny, owady wydzielają też peptydy o właściwościach antygrzybiczych. Pierwszym odkrytym peptydem tej grupy była drosomycyna, wyizolowana z muszki *Drosophila melanogaster*. Łańcuch polipeptydowy drosomycyny, składający się z 44 aminokwasów przyjmuje konformację motywu strukturalnego $CS\alpha\beta$ z dodatkową, trzecią nicią w arkuszu β , stworzoną przez fragment N-terminalny. Cała cząsteczka ma bardzo zwartą strukturę, głównie dzięki dodatkowemu, czwartemu mostkowi disiarczkowemu „spinającemu” początkowy i końcowy fragment łańcucha polipeptydowego [7, 14] (rys. 5).

Drosomycyna wykazuje strukturalne podobieństwo do defensyn roślinnych, które również przejawiają aktywność przeciwgrzybiczą [7, 14].

Roślinne defensyny, zbudowane z 45–54 aminokwasów, zawierają cztery mostki disiarczkowe, stabilizujące trójniciowy, antyrównoległy arkusz β oraz równoległą do niego domenę α -helikalną [5, 6, 21] (rys. 6).

Roślinnymi peptydami obronnymi, wyizolowanymi z wielu gatunków roślin, są tioniny. Amfipatyczne cząsteczki tionin zbudowane są z dwóch antyrównoległych α -helis, tworzących dłuższe „ramię” oraz mniejszej domeny – arkusza β , składającego się z dwóch krótkich, antyrównoległych nici β . Cała struktura stabilizowana jest przez trzy lub cztery mostki disiarczkowe. Zewnętrzna powierzchnia domeny α -helikalnej jest hydrofobowa, natomiast jej obszar wewnętrzny oraz region łączący obie domeny ma charakter hydrofilowy [5, 17].

2.4. Peptydy o budowie cyklicznej

W cząsteczkach niektórych niewielkich peptydów, dzięki obecności wewnątrzcząsteczkowego wiązania disiarczkowego, następuje cyklizacja krótkiego, kilkuaminokwasowego odcinka. Powstała w ten sposób C-terminalna struktura pierścieniowa zawiera aminokwasy o ładunkach dodatnich, natomiast domena hydrofobowa w postaci „ogonka” znajduje się na przeciwnym, N-terminalnym biegunie cząsteczki. Domena ta może przyjmować konformację α -helikalną, jak dzieje się to w przypadku peptydu ranaleksyny [10]. Innymi peptydami o strukturze zawierającej pierścień heptapeptydowy wyizolowanymi ze skóry żab z rodzaju *Rana* są brewininy i eskulentyny [28, 45]. Stwierdzono znaczne podobieństwo wyżej wymienionych peptydów do polimyksyn, antybiotyków otrzymywanych z bakterii *Bacillus polymyxa* [10].

Cykliczny dodekapeptyd – baktencynę – wyizolowano z neutrofilii wołowych. W odróżnieniu od peptydów ze skóry płazów, w cząsteczce baktencyny pierścień utworzony jest przez środkową część łańcucha polipeptydowego, obejmującą dziewięć aminokwasów [1, 39].

Cztery duże cykliczne peptydy odkryto w roślinach rodziny *Rubiaceae*. Cząsteczki o rozmiarach 29–31 aminokwasów są cyklicznymi strukturami amidowymi, o połączonych końcach łańcucha peptydowego. Peptydy te – kalata, cyrkulina A i B oraz CPT – zawierają trzy mostki disiarczkowe formujące tzw. motyw „węzła” cystynowego (ang. *Cystine-knot*), w którym jeden z mostków „przewleczony” jest pomiędzy dwoma pozostałymi. Powstały w ten sposób „węzeł cystynowy” wypełnia wnętrze cząsteczki, a na powierzchni znajdują się aminokwasy kationowe oraz hydrofobowe [46] (rys. 7).

2.5. Peptydy o unikalnej kompozycji aminokwasów

W sekwencji aminokwasowej niektórych peptydów antibakteryjnych charakterystyczna jest dominacja jednego lub kilku specyficznych aminokwasów. Udział dominującego aminokwasu w składzie łańcucha polipeptydowego wynosi od kilkunastu do kilkudziesięciu procent. Peptydy te mają strukturę liniową, z tendencją do tworzenia helis lub tzw. rozciągniętych helis w środowisku hydrofobowym. Niektóre z tych peptydów mogą być glikozylowane [1, 7, 11, 15, 24, 27, 35, 36, 47].

3. PODSUMOWANIE

Peptydy kationowe są grupą związków przejawiających bardzo szeroki zakres aktywności skierowanej przeciwko różnym grupom mikroorganizmów, poczynając od bakterii (zarówno gramdodatnich, jak i gramujemnych), przez grzyby, pierwotniaki, a kończąc na wirusach. W niektórych przypadkach udowodniono nawet wła-

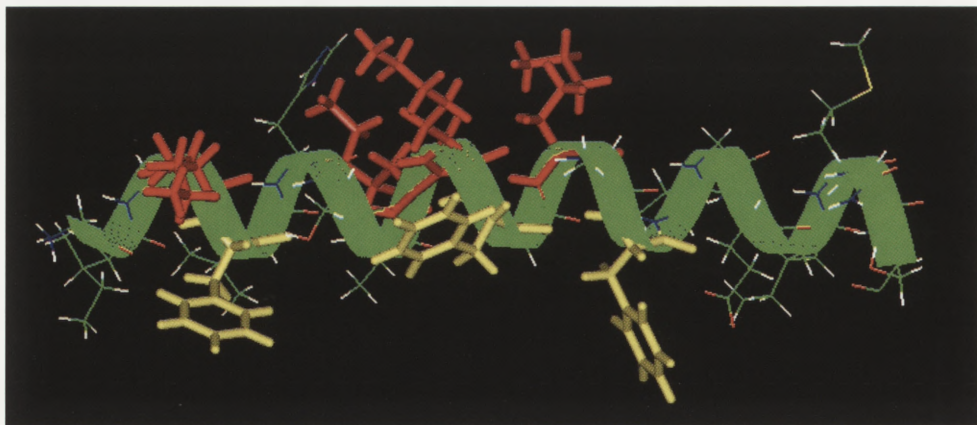
TABELA 2. Peptydy zawierające dominujące aminokwasy [4, 7, 9, 18, 22, 25, 26, 29, 38, 40, 43]

Wzbogacenie w aminokwas	Nazwa peptydu	Występowanie
Prolina + arginina	PR-39, Bac-5, Bac-7	jelito cienkie świni
Histydyna	Histatyny	ślina ludzka
Tryptofan	Tritrpticyna Indolicydyna	neutrofile wołowe
Prolina + fenyloalanina	Prophenin-1	leukocyty świni
Glicyna	Dipterycyny Attacyny Sarkotoksyny, Koleopterycyna Holotricyny, Hemipterycyna Tenecyna, Gloweryny	owady
Prolina	Drosocyna, Abecyna Apidecyny, Lebecyny Miecznikowina, Formecyna Metalnikowiny	owady

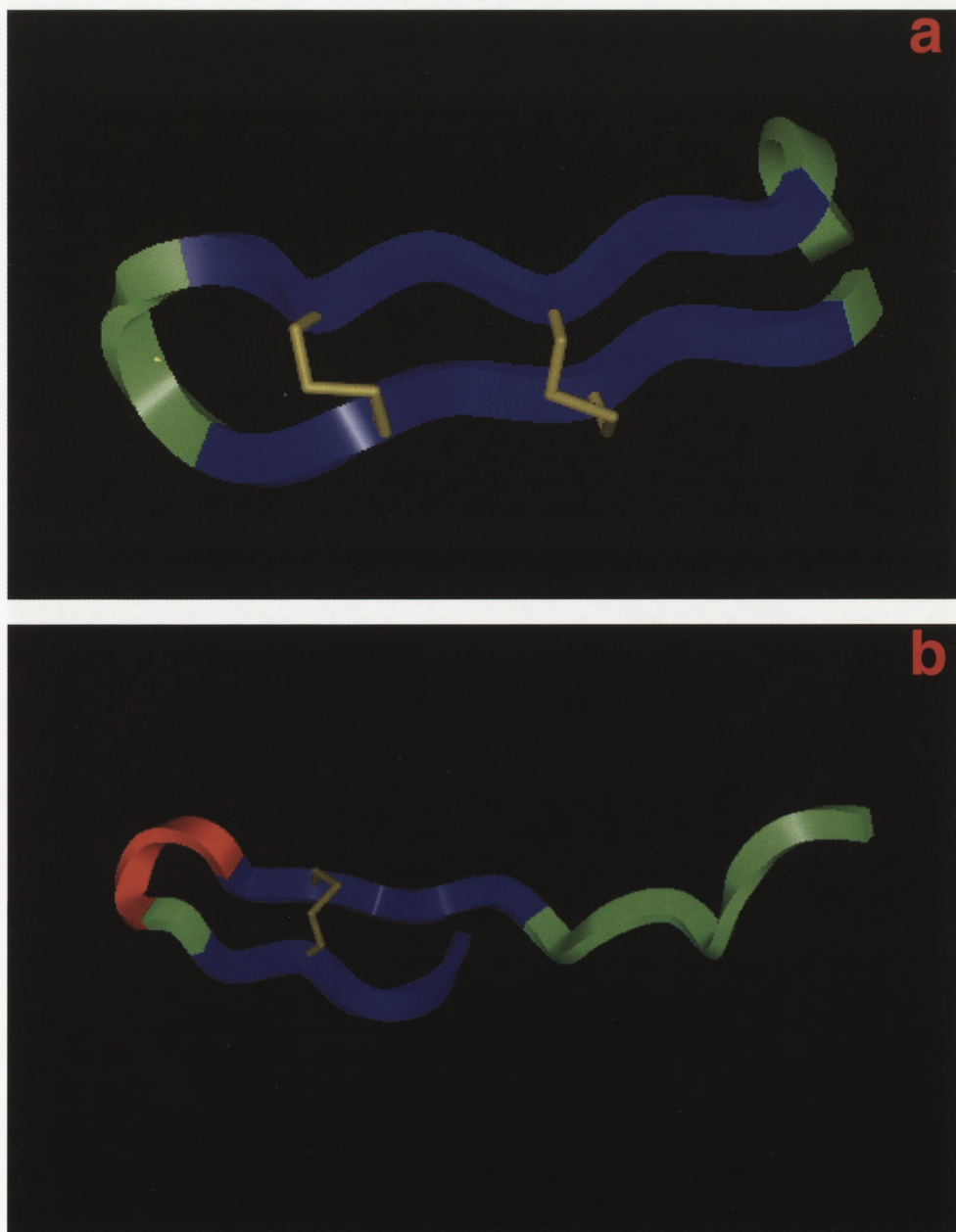
ściwości antynowotworowe. Przy jednoczesnym znikomym wytwarzaniu oporności u mikroorganizmów stanowią potencjalne źródło antybiotyków o możliwości zastosowania klinicznego. Niestety, obecnie zastosowanie peptydów jako antybiotyków jest raczej ograniczone. Antybiotyki uzyskiwane z bakterii (np. polimyksyny, gramicydyna, bacytracyna) są często toksyczne dla komórek eukariotycznych i wywołują niekorzystne efekty uboczne. Jednakże zmniejszająca się skuteczność konwencjonalnych antybiotyków wskutek wzrastającej oporności mikroorganizmów skłania do intensywnych poszukiwań alternatywnych źródeł antybiotyków. Peptydy kationowe wydają się być obiecującym narzędziem w rozwiązaniu tego problemu. Obiektem zainteresowania są peptydy o wysokiej selektywności działania w stosunku do komórek mikroorganizmów, a zarazem nietoksyczne dla komórek eukariotycznych. Izolacja nowych peptydów, modyfikacje prowadzące do uzyskania półsyntetycznych analogów oraz chemiczna synteza nowych antybiotyków na bazie dotychczas poznanych struktur stwarzają perspektywy na otrzymanie w przyszłości dużej różnorodności antybiotyków [13, 23, 31, 35, 47].

PODZIĘKOWANIE

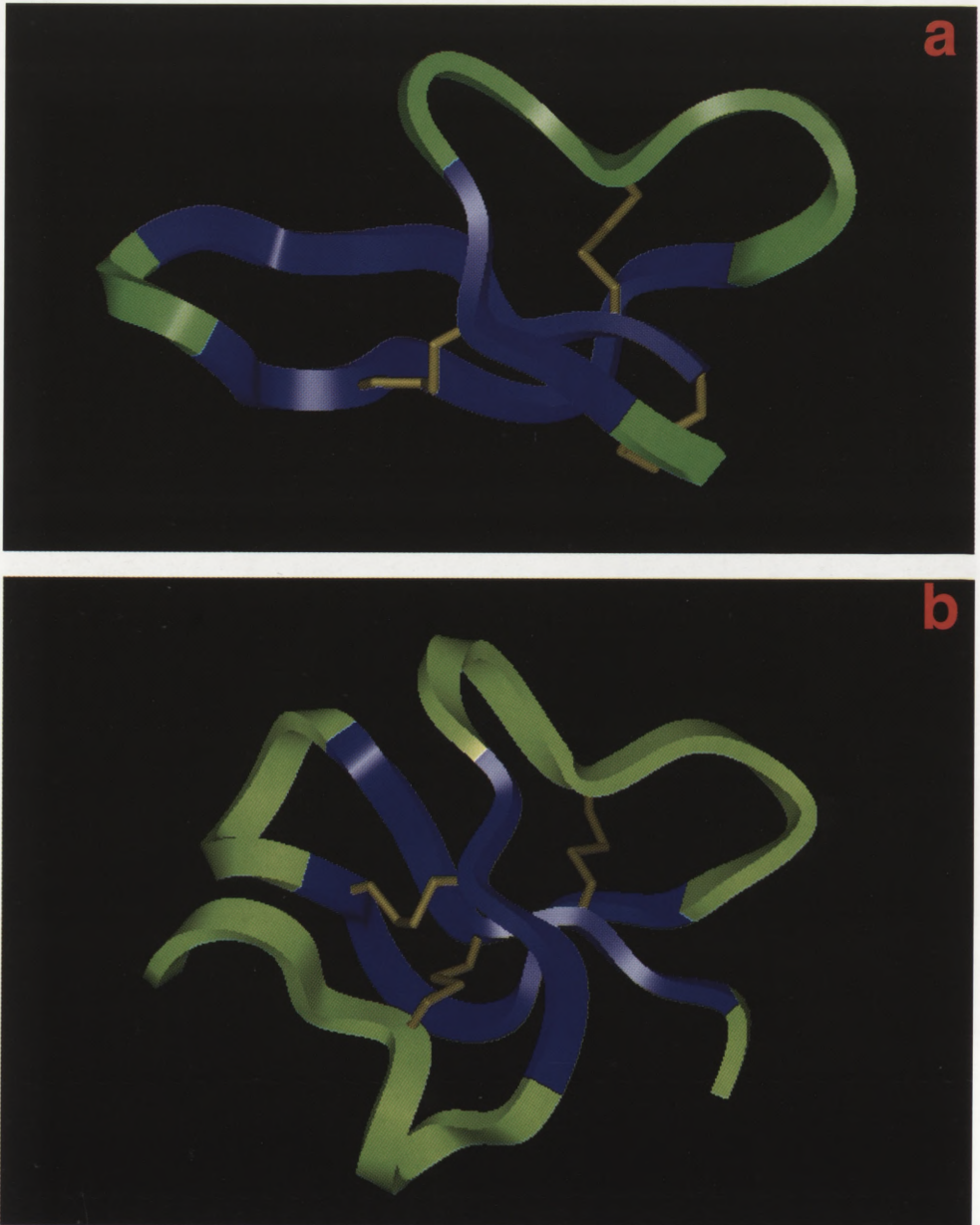
Serdeczne podziękowania składam Panu prof. dr hab. Adamowi Dubinowi za pomoc oraz cenne wskazówki udzielane przy opracowywaniu niniejszego artykułu.



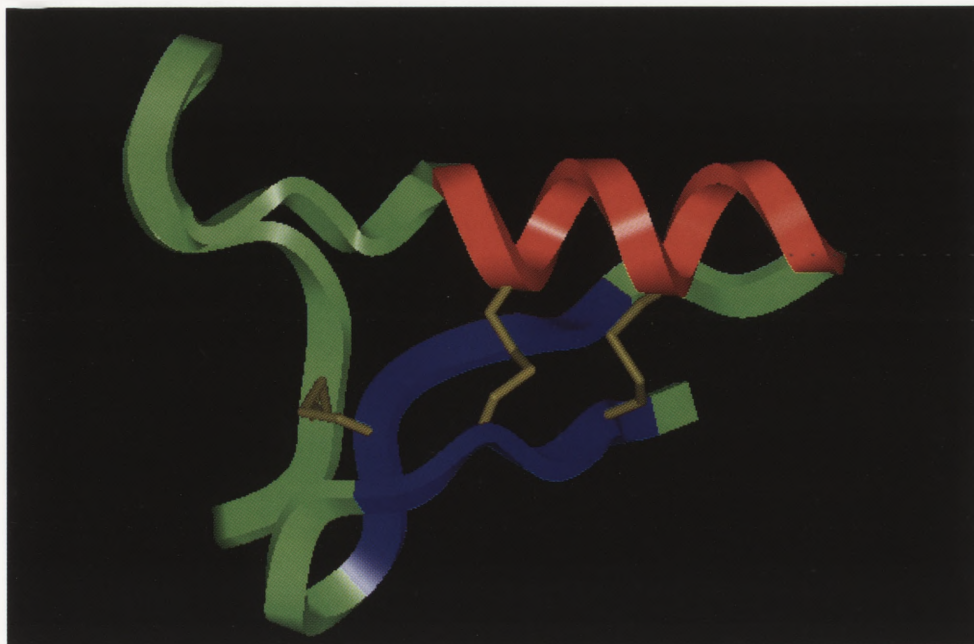
RYSUNEK 1. α -helikalna struktura magaininy, z uwidocznieniem amfipatycznego charakteru cząsteczki: reszty obdarzone ładunkiem dodatnim – kolor czerwony, reszty aromatyczne – kolor żółty. [Dane niepublikowane – K. Murzyn IBM UJ Kraków]



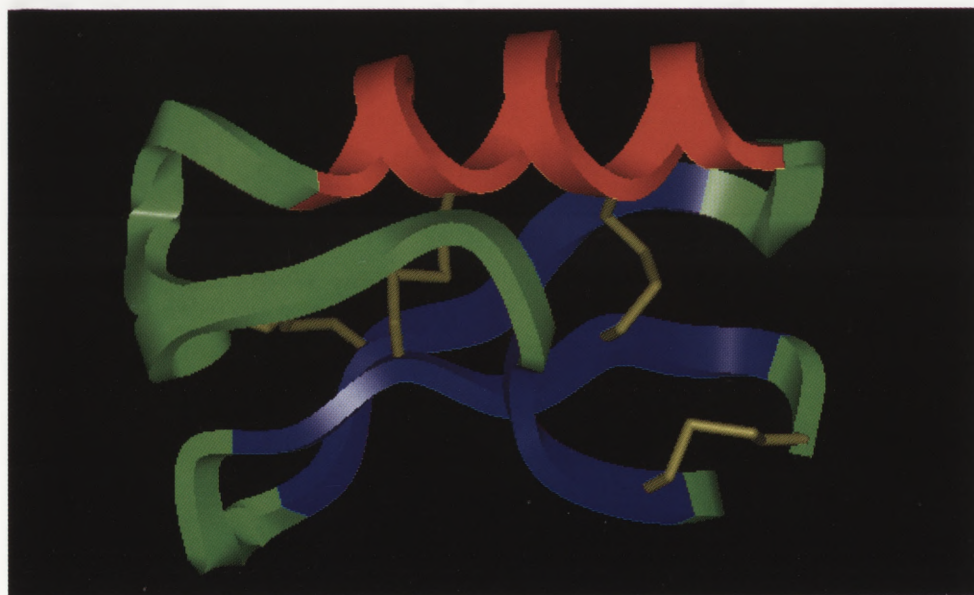
RYSUNEK 2. Struktura protegryny-1 (a) oraz tanatyny (b). Mostki disiarczkowe przedstawiono w kolorze żółtym. Rysunki wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (protegryna - kod 1PG, tanatyna - kod 8TVF)



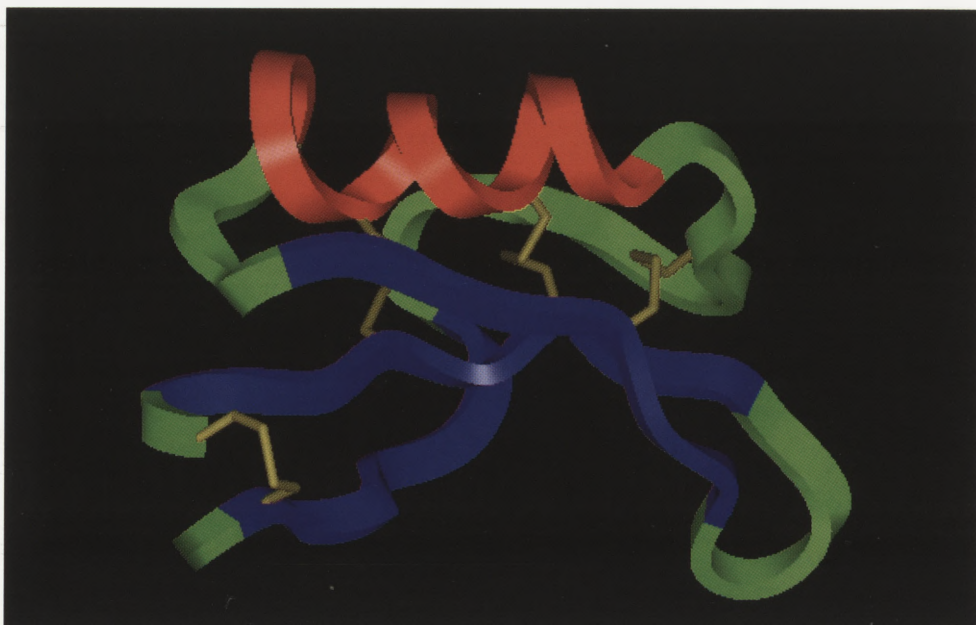
RYSUNEK 3. Struktury przestrzenne defensyn: (a) struktura krystalograficzna α -defensyny z ludzkich neutrofilii; (b) struktura β -defensyny 12 z wołowych neutrofilii. Rysunki wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (α -defensyna - kod 1DFN, β -defensyna 12 - kod 1BNB)



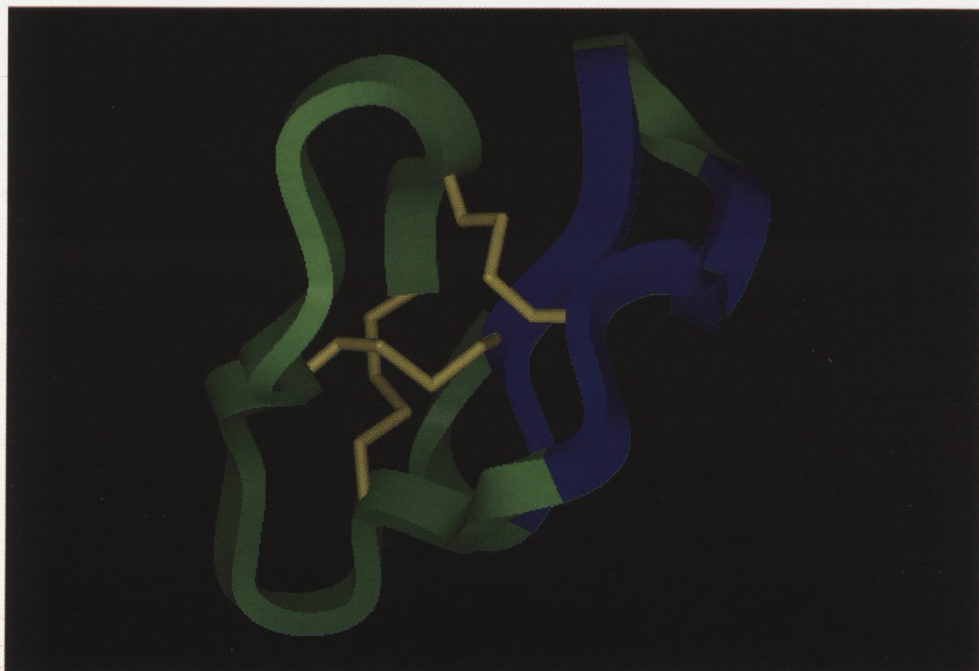
RYSUNEK 4. Struktura przestrzenna owadziej defensyny A, zbudowanej ze struktur drugorzędowych $\alpha\beta\beta$ stabilizowanych trzema mostkami disiarczkowymi. Rysunek wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (kod 1ICA)



RYSUNEK 5. Struktura drosomyecyny, składająca się ze struktur drugorzędowych $\beta\alpha\beta\beta$ połączonych czterema mostkami disiarczkowymi. Rysunek wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (kod 1MYN)



RYSUNEK 6. Struktura przestrzenna roślinnej defensyny, składająca się ze struktur drugorzędowych $\beta\alpha\beta\beta$ stabilizowanych przez cztery mostki disiarczkowe. Rysunek wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (kod 1BK8)



RYSUNEK 7. Kalata B1, roślinny peptyd zawierający motyw „węzła” cystynowego. Rysunek wykonano za pomocą programu BioSym (Insight II) na podstawie współrzędnych z Protein Data Bank (kod 1KAL)

LITERATURA

- [1] ANDREU D, RIVAS L. Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers* 1998; **47**: 415–433.
- [2] BATISTA CVF, ROSENDO DA SILVA L, SEBEN A, SCALONI A, FERRARA L, PAIVA GR, OLAMENDI-PORTUGAL T, POSSANI LD, BLOCH C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 1999; **20**: 679–686.
- [3] BENSCH KW, RAID A, MÄGERT HJ, SCHULZ-KNAPPE P, FORSSMAN WG. hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Letters* 1995; **368**: 331–335.
- [4] BREWER D, HUNTER H, LAJOIE G. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochem Cell Biol* 1998; **76**: 247–256.
- [5] BROEKAERT WF, CAMMUE BPA, DE BOLLE MFC, THIEVISSSEN K, DE SAMBLANX GW, OSBORN RW. Antimicrobial Peptides from Plants. *Crit Rev Plant Sci* 1997; **16**: 297–323.
- [6] BROEKAERT WF, TERRAS FRG, CAMMUE BPA, OSBORN RW. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1353–1358.
- [7] BULET P, HETRU C, DIMARCQ JL, HOFFMAN D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 1999; **23**: 329–344.
- [8] BULET P. Les peptides antimicrobiens de la drosophile. *medecine/sciences* 1999; **15**: 23–29.
- [9] CABIAUX V, AGERBERTH B, JOHANSSON J, HOMBLE F, GOORMAGHTIGH E, RUYSSCHAERT JM. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro + Arg-rich antibacterial peptide. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 1019–1027.
- [10] CLARK DP, DURELL S, MALOY WL, ZASLOFF M. Ranalexin a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem* 1994; **269**: 10849–10855.
- [11] COCIANCICH S, BULET P, HETRU C, HOFFMAN J.A. The inducible Antibacterial Peptides of Insects. *Parasitol Today* 1994; **10**: 132–139.
- [12] CORNET B, BONMANTIN JM, HETRU C, HOFFMAN JA, PTAK M, VOVELLE F. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 1995; **3**: 435–447.
- [13] DATHE M, WIEPRECHT T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochem Biophys Acta* 1999; **1462**: 71–87.
- [14] DIMARCQ JL, BULET P, HETRU C, HOFFMAN J. Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides in Invertebrates. *Biopolymers* 1998; **47**: 465–477.
- [15] EPAND RM, VOGEL HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochem Biophys Acta* 1999; **1462**: 11–28.
- [16] FAHRNER RL, DIECKMAN T, HARWIG SSL, LEHRER RI, EISENBERG D, FEIGON J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol* 1996; **3**: 543–550.
- [17] FLORACK DEA, STIEKEMA WJ. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 25–37.
- [18] GACEK GJ. Peptydy przeciwbakteryjne owadów. *Post Mikrobiol* 1997; **XXXVII**: 289–310.
- [19] GALLO RL, HUTTNER KM. Antimicrobial Peptides: An Emerging Concept in Cutaneous Biology. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 739–743.
- [20] GANZ T, LEHRER RI. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 1999; **5**: 292–297.
- [21] GARCIA-OLMEDO F, MOLINA A, ALAMILLO JM, RODRIGUEZ-PALENZUELA P. Plant Defense Peptides. *Biopolymers* 1998; **47**: 479–491.

- [22] GLIŃSKI Z, JAROSZ J. Polipeptydy odpornościowe owadów – chemioterapeutyki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. *Post Mikrobiol* 1998; XXXVII: 247–259.
- [23] HANCOCK REW, CHAPPLE DS. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1317–1323.
- [24] HANCOCK REW, LEHRER R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *TIBTECH* 1998; **16**: 82–87.
- [25] HARA S, YAMAKAWA M. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *Biochem J* 1995; **310**: 651–656.
- [26] HARWIG SSL, KOKRYAKOV VN, SWIDEREK KM, ALESHINAGM, ZHAOC, LEHRER RI. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Letters* 1995; **362**: 65–69.
- [27] HWANG PM, VOGEL HJ. Structure - function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem Cell Biol* 1998; **76**: 235–246.
- [28] KREIL G. Antimicrobial Peptides from amphibian skin: an overview. *Amphibian peptides. Ciba Found Symp* 1994; **186**: 77–90.
- [29] LADOKHIN AS, SELSTED ME, WHITE SH. CD spectra of Indolicidin Antibacterial Peptides Suggest Turns, Not Polyproline Helix. *Biochemistry* 1999; **38**: 12313–12319.
- [30] LEVY O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol* 1996; **56**: 263–277.
- [31] MAK P. Antybakteryjne białka i peptydy ludzkich neutrofilii. W poszukiwaniu nowych antybiotyków. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 157–173.
- [32] MALOY WL, KARI UP. Structure - Activity Studies on Magainins and Other Host Defense Peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 1995; **37**: 105–122.
- [33] MANDARD N, SODANO P, LABBE H, BOUMATIN JM, BULET P, HETRU C, PTAK M, VOVELLE F. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *Eur J Biochem* 1998; **256**: 404–410.
- [34] MATHEWS M, JIA HP, GUTHMILLER JM, LOSH G, GRAHAM S, JOHNSON GK, TACK BF, MCCRAY PB. Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infect Immun* 1999; **67**: 2740–2745.
- [35] MIYASAKI KT, LEHRER RI. β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrob Agents* 1998; **9**: 269–280.
- [36] NICOLAS P, MOR A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 1995; **49**: 277–304.
- [37] OREN Z, SHAI Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 451–463.
- [38] RAJ PA, MARCUS E, EDGERTON M. Delineation of an Active Fragment and Poly(L-proline)II Conformation for Candidacidal Activity of Bactenecin 5. *Biochemistry* 1996; **35**: 4314–4325.
- [39] ROMEO D, SKERLAVAJ B, BOLOGNESI M, GENNARO R. Structure and Bactericidal Activity of an Antibiotic Dodecapeptide Purified from Bovine Neutrophils. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9573–9575.
- [40] SCHIBLI DJ, HWANG PM, VOGEL HJ. Structure of the Antimicrobial Peptide Tritrpticin Bound to Micelles: A Distinct Membrane - Bound Peptide Fold. *Biochemistry* 1999; **38**: 16749–16755.
- [41] SCHNAPP D, REID CJ, HARRIS A. Localization of expression of human Beta defensin-1 in the pancreas and kidney. *J Pathol* 1998; **186**: 99–103.
- [42] SCHRÖDER JM, HARDER J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31**: 645–651.

- [43] SELSTED ME, NOVOTNY MJ, MORRIS WL, TANG YQ, SMITH W, CULLOR JS. Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils. *J Biol Chem* 1992; **267**: 4292-4295.
- [44] SELSTED ME, OUELLETTE AJ. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 114-119.
- [45] SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin: What Do They Tell Us? *Biopolymers* 1998; **47**: 435-450.
- [46] TAM JP, LU YA, YANG JL, CHIU KW. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8913-8918.
- [47] WEINBERG A, KRISANAPRAKORNKIT S, DALE BA. Epithelial Antimicrobial Peptides: Review and Significance for Oral Applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; **9**: 399-414.
- [48] ZHAO C, WANG I, LEHRER RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters* 1996; **396**: 319-322.
- [49] ZIMMERMAN GR, LEGAULT P, SELSTED ME, PARDI A. Solution Structure of Bovine Neutrophil β -Defensin-12: The Peptide Fold of the β -Defensin is Identical to that of the Classical Defensins. *Biochemistry* 1995; **34**: 13663-13671.

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: EUREKA@mol.uj.edu.pl

MECHANIZM DZIAŁANIA PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH*

MODE OF ACTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Dorota CHMIEL

Zakład Biochemii Analitycznej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Peptydy o aktywności bójczej skierowanej przeciwko mikroorganizm stanowią ważną część wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Produkowane są przez rośliny i zwierzęta konstytutywnie lub w odpowiedzi na zakażenie mikroorganizmami. Niniejsza praca przedstawia współczesną wiedzę i poglądy na temat interakcji peptydów antybakteryjnych ze strukturami komórkowymi mikroorganizmów oraz na temat prawdopodobnych mechanizmów działania tych związków. Peptydy antybakteryjne mogą wywierać swój bójczy efekt poprzez: tworzenie w błonie porów (hipoteza „tworzącej się beczki”) lub kanałów jonowych, dezintegrację błony – model „dywanopodobny” i wywołanie w niej przejściowych dziur – model „robakowatego zagięcia błony”, a także alternatywne mechanizmy działania, które obejmują m.in. oddziaływanie z DNA lub wpływ na syntezę białek, np. błonowych. Wyjaśniono, czym uwarunkowana jest selektywność działania peptydów oraz opisano ich rolę fizjologiczną i próby zastosowania klinicznego.
(*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 261–273*)

Słowa kluczowe: peptydy antybakteryjne, błona komórkowa, por, kanał jonowy

Summary: Plants and animals synthesise antimicrobial peptides constitutively or in response to microorganism infection and they are an important component of the organisms innate defence system. This paper focuses on the recent knowledge and views concerning interactions of antimicrobial peptides with structures of the microorganism's cells. There are described several suggested models of mechanisms of action: membrane pore formation („barrel stave” mechanism), „carpet like”, „wormhole”, and ion channels formation. Additionally, there are alternative mechanisms of action including interaction with DNA or influence on protein synthesis. Moreover, this paper explains the selectivity of these peptides and describes their physiological role and attempts of clinical applications.
(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 261–273*)

Key words: antimicrobial peptides, cell membrane, ion channel

WSTĘP

W toku ewolucji organizmy wykształciły cały system mechanizmów obronnych, chroniących je przed inwazją mikroorganizmów, poczynając od wykształcenia barier mechanicznych, aż po „czynną” obronę, angażującą zarówno komórki, jak i różnego rodzaju cząsteczki przez nie uwalniane. Znaczące miejsce w tak wykształconym systemie obronnym zajmują peptydy antybakteryjne [27, 28]. Te naturalnie występujące, endogenne antybiotyki peptydowe stanowią dużą grupę związków zróżnicowanych pod względem struktury przestrzennej, ale o zbliżonej masie cząsteczkowej od kilkuset do kilku tysięcy Da [16, 26].

Historia odkrycia peptydów antybakteryjnych sięga zaledwie lat osiemdziesiątych naszego stulecia, kiedy to Boman i współpracownicy wyizolowali cekropinę z hemolimfy owada *Hyalophora cecropia* zainfekowanego bakteriami [cytat za lit. 21]. Peptyd ten wykazuje silną aktywność antybakteryjną przeciwko bakteriom gramujemnym, takim jak: *E. coli*, *B. subtilis*, *S. marcescens* czy *P. aeruginosa* [21, 43]. Do dziś wykryto i scharakteryzowano setki peptydów antybakteryjnych i stało się jasne, że stanowią one część wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu [28]. Są syntetyzowane przez rośliny [7, 8, 23], owady [12], inne bezkręgowce [15, 48] oraz przez kręgowce [30, 33, 34, 59, 64].

Peptydy antybakteryjne mają zdolność zabijania nie tylko bakterii (np. α -defensyny, cekropiny) [14, 43], ale również grzybów (defensyny, cekropiny, derma-septyny, magaininy, protegryny, peptydy antybakteryjne bogate w cysteinę) [11, 13, 35,], a nawet wirusów (melityna, α -defensyny,) [1] i pierwotniaków (indolicydyna) [17]. Do tej pory nie udało się jednoznacznie udowodnić, jaki jest mechanizm działania tych związków. Zrozumienie i dokładne poznanie tego zagadnienia jest istotne z uwagi na potencjalne wykorzystanie peptydów antybakteryjnych w medycynie ze względu na narastającą lekooporność mikroorganizmów będącą konsekwencją powszechnego nadużywania stosowanych antybiotyków (nie tylko jako leków, ale i konserwantów żywności czy środków zwiększających przyrost masy ciała u zwierząt hodowlanych) [32]. Próby odpowiedzi na pytanie, jaki jest mechanizm działania peptydów antybakteryjnych opierają się na analizie ich struktury oraz na badaniu ich właściwości.

INTERAKCJE PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH ZE STRUKTURAMI KOMÓRKOWYMI

Peptydy, takie jak: defensyny wyizolowane z ziarnistości granulocytów, powierzchni nabłonka i skóry, protegryny obecne w leukocytach świni, tachyplesyny uzyskane z hemocytów kraba czy magaininy ze skóry gadów, mają amfipatyczny, kationowy charakter [5, 45, 55, 63]. Całkowity ładunek tych peptydów wynosi

+2 lub więcej, co czyni je zdolnymi do interakcji np. z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony [24]. Ze względu na swój kationowy charakter, peptydy te mogą wiązać się również do innych ujemnie naładowanych struktur, takich jak DNA [18], lub do kwaśnych białek, np. kalmoduliny [31]. Zwiększanie ilości dodatnio naładowanych aminokwasów w magaininie 2 i jej analogach oraz laktoferynie B i indolicydynie powodowało zwielokrotnienie ich antybakteryjnych właściwości [1, 40]. Z kolei amfipatyczność peptydów antybakteryjnych umożliwia im perforację błony bakteryjnej i/lub jej perturbację [42, 43]. Obserwacje te sugerowały, że peptydy o charakterze amfipatycznym tworzą w błonie pory, przez które mogą wyciekać jony lub większe cząsteczki [56]. Fakt, że błona cytoplazmatyczna może być celem działania peptydów antybakteryjnych, potwierdzono w badaniach defensyn owadzych, które efektywnie depolaryzują błonę cytoplazmatyczną *Micrococcus luteus* oraz powodują „wyciek” cytoplazmatycznego potasu i ATP [49]. Poddanie bakterii *E. coli* lub *S. aureus* działaniu magaininy 2 [40] lub tachyplesiny I [42] indukuje „wyciek” wewnątrzkomórkowych jonów K^+ i towarzyszącą temu redukcję przeżycia tych komórek.

Dowodów na to, że celem działania peptydów antybakteryjnych jest błona komórkowa, dostarczyły również badania prowadzone z D-analogami takich peptydów, jak cekropiny i magaininy [49, 57]. Udowodniono, że wykazują one identyczną aktywność jak ich naturalnie występujące L-analogi, co wyklucza stereospecyficzne rozpoznanie [26, 29]. Jednak nie jest to regułą. Niektóre z peptydów mają obniżoną aktywność jako D-enancjomery [6], co sugeruje, że łączą się one z jakimiś cząsteczkami stereospecyficznie.

Kationowe peptydy antybakteryjne, takie jak: magaininy, cekropiny i polimyksyna, mają zdolność wiązania się z LPS-em [16] i dlatego przyjęto, że w przypadku bakterii gramujemnych początkowym etapem działania peptydów antybakteryjnych jest ich wiązanie się do lipopolisacharydu [18, 57, 58]. Ponadto zaobserwowano korelację pomiędzy słabym wiązaniem się magaininy do mutanta *Salmonella typhimurium* z uszkodzonym LPS-em [16]. Oporność na polimyksynę B u bakterii koreluje z modyfikacją grup fosforowych LPS-u, która powoduje redukcję jego ujemnego ładunku [16]. Opisano również odporne na protegrynę mutanty *Salmonella*, u których miała miejsce acylacja lipidu A przez kwas palmitynowy [16]. Przypuszcza się, że ta modyfikacja zmienia strukturę zewnętrznej warstwy błony zewnętrznej, co zapobiega jej perforacji przez peptydy kationowe.

Dwuwartościowe kationy (Mg^{++} , Ca^{++}) stabilizują zewnętrzną warstwę błony zewnętrznej bakterii gramujemnych. Peptydy antybakteryjne wypierają te jony i przez to destabilizują zewnętrzną błonę. Dodanie do bakterii wraz z np. magaininą [40], gloweryną [2] czy innymi peptydami [58, 38b] jonów Mg^{++} lub Ca^{++} znosi bakteriobójcze działanie tych peptydów.

Hancock zaproponował mechanizm, w którym dochodzi do interakcji kationowych peptydów antybakteryjnych z osłonami bakterii gramujemnych, a następnie do przej-

ścia peptydów przez zewnętrzną błonę i określił ten proces jako samopromujące się przejście (ang. *self-promoted uptake*) [26, 58]. Zgodnie z tą hipotezą proponuje się, że rozwinięte, kationowe peptydy asocjują z ujemnie naładowaną powierzchnią błony zewnętrznej i/albo neutralizują ujemny ładunek błony, przyczyniając się do powstania szczeliny, przez którą peptydy mogą przekraczać zewnętrzną powierzchnię błony lub też wypierać dwuwartościowe kationy z nią związane i przez to zaburzać jej strukturę. Peptydy, które przekroczyły zewnętrzną błonę, mogą się wiązać do ujemnie naładowanej błony cytoplazmatycznej. Sądzi się, że tworzą w niej kompleksy podobne do miceli lub też wykonują ruch *flip-flop* przez błonę pod wpływem dużego, transmembranowego potencjału elektrycznego [26].

Bakterie gramodatnie jak *S. aureus* nie mają ani zewnętrznej błony, ani LPS, a zawierają natomiast peptydoglikan, który bogaty jest w kwas tejchojowy. Mutacje prowadzące do wzrostu ujemnego ładunku w tej strukturze powodują zwiększenie wrażliwości na kationowe peptydy antybakteryjne i ponownie podkreślają znaczenie oddziaływań elektrostatycznych w ich mechanizmie działania [16, 45].

SELEKTYWNE DZIAŁANIE PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH

Peptydy o aktywności bójczej skierowanej przeciwko mikroorganizmom, aby mogły być przydatne w walce z patogenami, muszą być selektywnie toksyczne, tak by nie mogły działać destrukcyjnie na komórki gospodarza. Powinny więc celować w te molekuly, które są wszechobecne w komórkach prokariotycznych, ale rzadko lub nigdy nie występują w komórkach eukariotycznych. Jak się okazało, podstawą selektywnej toksyczności jest specyficzność składu lipidów w błonie komórek prokariotycznych i eukariotycznych.

Warstwa zewnętrzna błony komórek ssaków (erytrocytów) złożona jest wyłącznie z elektrycznie obojętnych fosfolipidów, głównie fosfatydylocholiny i sfingomieliny, podczas gdy bakteryjna błona zawiera duże ilości ujemnie naładowanych fosfolipidów, takich jak fosfatydyloglicerol i kardiolipina [42]. Wykazano, że aktywność magainin i tachyplesin jest wysoce wrażliwa na skład lipidowy docelowej błony [42]. Siłą napędową tego wiązania są elektrostatyczne interakcje pomiędzy dodatnio naładowanymi peptydami a ujemnie naładowanymi lipidami. Hydrofobowość peptydów antybakteryjnych jest generalnie zbyt niska dla ich efektywnej asocjacji z elektrycznie obojętnymi fosfolipidami i dzięki temu komórki gospodarza są zabezpieczone przed ich toksycznym działaniem.

Inną ważną różnicą w chemicznym składzie błony pomiędzy komórką prokariotyczną a eukariotyczną jest to, że te ostatnie są obfite w sterole. Udowodniono, że obecność stabilizującego błonę cholesterolu jest ważna dla ochrony ludzkich erytrocytów przed atakiem magaininy 2 [40].

HIPOTETYCZNE MECHANIZMY DZIAŁANIA

Model tworzącej się becзки

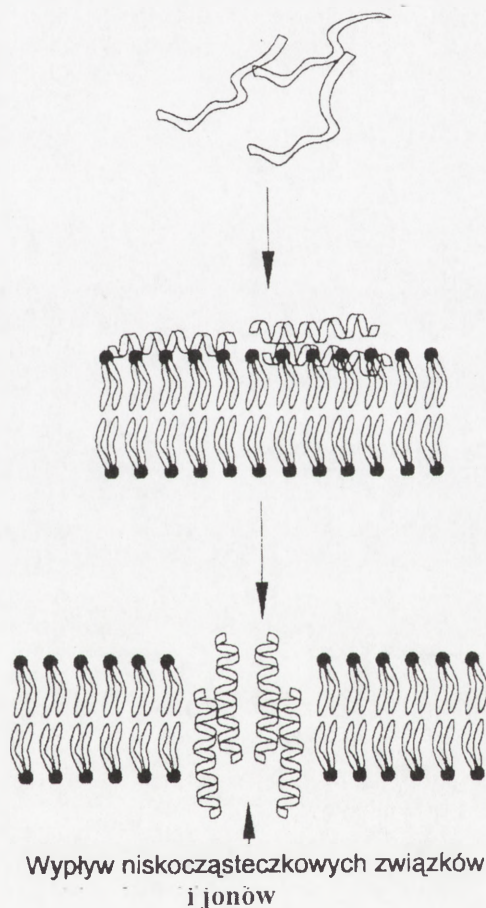
Dla klasycznego, transmembranowego poru zaproponowano hipotezę tworzącej się becзки z monomerycznych peptydów (rys. 1) [4, 44, 47, 63]. Hydrofobowe powierzchnie peptydów oddziałują z lipidowym rdzeniem błony, a hydrofilowa wewnętrzna powierzchnia tworzy por. W mechanizmie tym można wyróżnić cztery główne etapy [24]:

- rozwinięte peptydy po asocjacji z błoną komórki bakteryjnej przyjmują strukturę α -helikalną,
- molekularne oddziaływanie pomiędzy związanymi z błoną monomerami, które prowadzi do ich agregacji już przy niskiej ich gęstości na powierzchni błony;
- wbudowanie się dwóch zagregowanych monomerów – co rozpoczyna proces formowania się poru;
- dalsze wbudowanie się monomerów, które prowadzi do zwiększania się rozmiaru poru oraz w konsekwencji do wypłynięcia niskocząsteczkowych związków (ich wielkość zależy od rozmiaru poru) oraz jonów.

Przykładami peptydów dla których zaproponowano właśnie taki mechanizm są: melityna, alametycyna i paradaksyna.

Mechanizm „dywanopodobny”

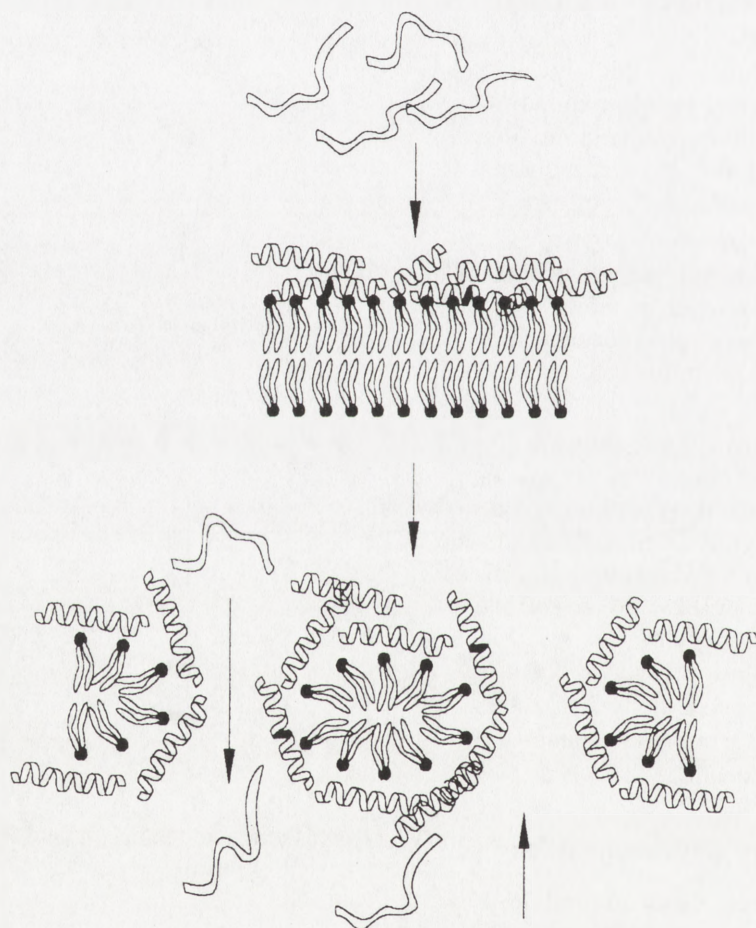
Mechanizm „dywanopodobny” (rys. 2) [4, 44, 24, 63], który zaproponowano dla opisu zachowania się dermaseptyn oraz cekropin opi-



RYSUNEK 1. Hipotetyczny mechanizm tworzenia porów w błonie komórki bakteryjnej przez peptydy antybakteryjne (wg Orenaa i Shaia [44], zmodyfikowane)

suje sytuację, w której amfipatyczne, α -helikalne peptydy początkowo wiążą się do powierzchni błony pokrywając ją częściowo lub całkowicie. Dziurawienie błony następuje jednak dopiero po przekroczeniu określonego progu stężenia peptydów. W odróżnieniu od mechanizmu tworzącej się beczki, tutaj peptydy nie wnikają do hydrofobowego wnętrza błony, ale raczej wiążą się do fosfolipidowych głównych grup. Początkowa reakcja z ujemnie naładowaną błoną jest napędzana elektrostatycznie, dlatego reagujące według tego schematu peptydy są naładowane dodatnio. Cztery główne etapy ilustrują ten proces [24]:

- preferencyjne wiązanie się dodatnio naładowanych peptydowych monomerów do ujemnie naładowanych fosfolipidów błony;



Wpływ zawartości cytoplazmy

RYSUNEK 2. Model dywanopodobny dezintegracji błony bakteryjnej pod wpływem peptydów antybakteryjnych (wg Orena i Shaia [44], zmodyfikowane)

- leżące, amfipatyczne, α -helikalne monomery na powierzchni membrany są ustawione w taki sposób, że dodatnie ładunki określonych aminokwasów oddziałują z ujemnie naładowanymi grupami fosfolipidowymi lub cząsteczkami wody;
- rotacja molekuł prowadzi do reorientacji hydrofobowych reszt w kierunku hydrofobowego wnętrza błony;
- dezintegracja membrany przez niszczące wyginanie się dwuwarstwy lipidowej, prowadzące do micelizacji i wypływu zawartości cytoplazmy.

Hipoteza robakowatego zagięcia błony

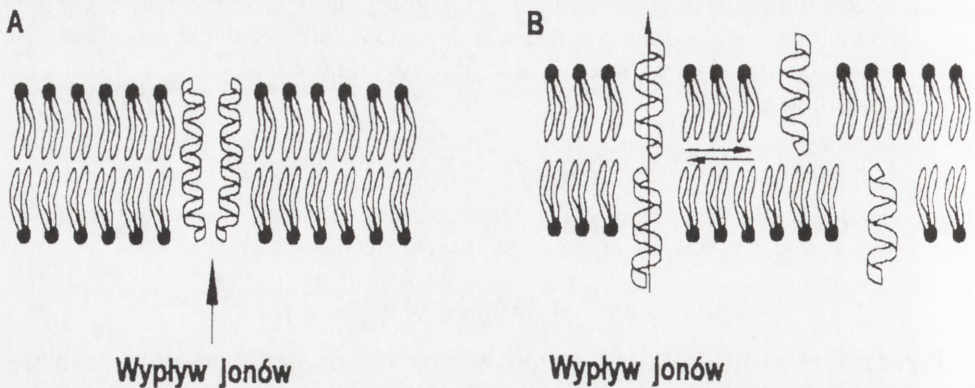
Przed rozerwaniem opakowanej peptydami błony mogą pojawiać się w niej przejściowe dziury, które są na tyle duże, aby umożliwić wypływ niskocząsteczkowych związków, zanim dojdzie do kompletnej lizy membrany. Taki rodzaj dziur został opisany w przypadku tzw. hipotezy robakowatego zagięcia błony [4, 38]. Powierzchnia błony zagina się tu charakterystycznie w tył za siebie, na kształt wnętrza wału formując tym samym por. To zagięcie wymaga bocznego rozszerzenia się w regionie głównych grup dwuwarstwy lipidowej. Monomery np. magainin odgrywają rolę wkładu (wypełnienia) rozszerzającego się regionu, a przez to stabilizują por. Tym niemniej należy pamiętać, że dla magaininy zaproponowano także model tworzącej się beczki oraz mechanizm w którym tworzy ona multimeryczne, transmembranowe pory, przejściowe struktury, które są zdolne do translokacji własnej oraz fosfolipidów przez błonę [31, 39, 41, 60].

Tworzenie kanałów jonowych przez peptydy antybakteryjne

Oprócz wymienionych dotychczas mechanizmów dziurawienia błon niektóre peptydy antybakteryjne mogą tworzyć selektywne, typowe kanały jonowe, co wykazano między innymi dla alametycyny i gramicydyny A (rys. 3) [20]. W przypadku alametycyny kilka cząsteczek peptydowych grupuje się razem w błonie, aby utworzyć charakterystyczny agregat, w którego centrum znajduje się por umożliwiający jonom ucieczkę na zewnątrz. Natomiast gramicydyna A jest peptydem zawierającym zarówno D-, jak i L- aminokwasy występujące naprzemiennie. Przyjmuje ona charakterystyczną strukturę zwaną β -helisą. Dwie cząsteczki tego peptydu asocjują w błonie, zbliżając się do siebie swymi N końcami. Średnica tej β -helisy jest wystarczająco duża, aby utworzyć por, przez który mogą migrować jony. Formowanie kanału jonowego zaproponowano również dla protegryny [51].

Alternatywne mechanizmy działania peptydów antybakteryjnych

Niektóre peptydy antybakteryjne, takie jak np. baktencyna [62], mimo że nie zaburzają ani nie dziurawią błony bakteryjnej, doprowadzają do śmierci bakterii. Najprawdopodobniej wnikają one do wnętrza komórki i na różnych drogach zaburzają



RYSUNEK 3. Mechanizmy tworzenia kanałów jonowych w błonie przez peptydy antybakteryjne: A – alametycyne, B – gramicydynę A (wg Futaki [20], zmodyfikowane)

normalne jej funkcjonowanie [49, 63]. Mogą hamować syntezę specyficznych białek błonowych, np. attanecyny [9] i gloyeryny [1], wiązać się do DNA i zatrzymywać jego replikację (PR-39) [1, 6] lub jak na przykład defensyny mają zdolność przerywania pojedynczej nici DNA [1]. Peptydy antybakteryjne mogą również działać przez wywołanie samo-destrukcyjnych mechanizmów. Autoliza bazująca na aktywacji amidazy, która degradowuje peptydoglikan, została zasobserwowana u bakterii poddanych działaniu pep5 i nizyny [1]. Niektóre peptydy antybakteryjne wykazują również działanie hamujące aktywność enzymów produkowanych przez patogenne mikroorganizmy. Mogą działać jako pseudosubstraty lub szczelnie wbudowywać się do centrum aktywnego enzymu, blokując dostęp substratu. Histatyny w submikromolarnych stężeniach są zdolne do hamowania proteinazy typu trypsyny wydzielanej przez bakterię atakującą jamę ustną – *Bacteroides gingivalis* [1].

ROLA PEPTYDÓW ANTYBAKTERYJNYCH I PRÓBY ICH ZASTOSOWANIA KLINICZNEGO

Mutacje wywołane w genach kontrolujących ekspresję peptydów antybakteryjnych owadów (np. drosomycyny) [36] dostarczyły dowodów o roli peptydów w zwalczaniu patogennych mikroorganizmów. Zakażenie grzybami przeżywało znacznie mniej osobników z taką mutacją. Z kolei transplantacja genu kodującego peptyd antybakteryjny (dającego oporność na patogeny roślinne) z jednej rośliny do drugiej pozbawionej tego genu nadawała jej oporność na infekcję [22].

Poziom peptydów o aktywności bójczej skierowanej przeciwko mikroorganizmom wzrasta podczas zakażeń i procesów zapalnych [1]. W bakteryjnym zapaleniu opon mózgowych i w szoku septycznym zwiększa się ilość α -defensyn [55], w infekcjach

wywołanych przez *Mycobacterium* czy *Pasteurella* β -defensyn [1, 47], a w ropniach i ranach zwiększa się ilość wielu peptydów [19]. Poziom IL-37, TAP (*tracheal antimicrobial peptide*) lub LAP (*lingual antimicrobial peptide*) wzrasta w stanach zapalnych [46]. Obniżony poziom peptydów antybakteryjnych związany jest z licznymi patologiami. Pacjenci cierpiący na zespół niedoboru ziarnistości mają upośledzoną produkcję α -defensyn, i w związku z tym dochodzi u nich do częstych i nawracających infekcji bakteryjnych [1]. Niski poziom histatyn w ślinie pacjentów chorych na HIV koreluje z ich wysoką zapadalnością na ustne grzybice [1]. W mukowiscydozie, chorobie wywołanej wadliwym działaniem kanałów chlorkowych, aktywność antybakteryjna β -defensyn niwelowana jest przez wysokie stężenie soli [22, 25, 50]. Następstwem są nawracające infekcje dróg oddechowych.

Obecnie wiele firm biotechnologicznych prowadzi intensywne prace nad wprowadzeniem peptydów antybakteryjnych na rynek i zastosowaniem ich w leczeniu różnych schorzeń. Do najbardziej zaawansowanych badań należą prace nad lekiem o nazwie Neuprex, który jest 21 aminokwasowym peptydem pochodzącym z białka BPI neutrofilii ludzkich [27, 37]. Lek ten znajdują się w III fazie badań klinicznych i stosowany jest przeciwko zakażeniu *Meningococcam* wywołującymi zapalenie opon mózgowych. Innym dobrze zbadanym peptydem jest wywodzący się z magaininy MSI-78 (Locilex, Magainin Pharmaceutical). Znajduje się on już też w III fazie badań klinicznych i zastosowano go u 926 pacjentów, cierpiących na trudne do leczenia owrzodzenie kończyn występujące u osób chorych na cukrzycę [27]. Z kolei nizyna i IB-367 (peptyd kationowy podobny do protegryny) [27], przechodzą I fazę badań klinicznych. Nizyna jest testowana w zwalczaniu owrzodzeń żołądka wywołanych przez *Helicobacter pylori* oraz używana jako środek konserwujący żywność, a IB-367 w zwalczaniu grzybic jamy ustnej. Peptydy antybakteryjne, mające zdolność wiązania LPS-u, mogą być stosowane w zwalczaniu szoku septycznego [37].

Histatyna, po zaadsorbowaniu jej na powierzchnię protez zębowych może znaleźć zastosowanie w redukcji adhezji *Candida* do protez. Poza tym peptyd ten wykazuje zdolność hamowania proteinaz *Bacteroides gingivalis* [1].

Magainina i jej analogii mogą służyć jako środek antykoncepcyjny, ponieważ powodują zmiany morfologiczne i funkcjonalne plemników [1]. Biorąc pod uwagę aktywność protegryn skierowaną przeciwko niektórym wirusom przenoszącym się drogą płciową postuluje się połączyć ten antybiotyk z czynnikiem antykoncepcyjnym [1].

Peptydy antybakteryjne, takie jak: cekropiny i melityny [10, 61], wykazują aktywność antynowotworową. Nie jest jasne, dlaczego komórki transfekowane nowotworowo są bardziej wrażliwe na ich działanie niż ich nietransfekowane odpowiedniki [1], ale daje to nadzieję na możliwość leczenia nowotworów.

Interesująca jest również aktywność antywirusowa niektórych peptydów. Analog melittyiny (ang. *hecate* - 23-aa syntetyczny peptyd) hamuje rozprzestrzenianie wirusa

HSV-1 (*herpes simplex virus-1*) [3], a z kolei T22 (analog polyphemusyny II, peptydu uzyskanego z hemocytów amerykańskiego gatunku kraba – *Limulus polyphemus*) ma silną aktywność skierowaną przeciwko wirusowi HIV [1, 52–54].

PODSUMOWANIE

Peptydy o aktywności bójczej skierowanej przeciwko mikroorganizmom stanowią nowe, obiecujące źródło antybiotyków. Cechują się szerokim spektrum działania, są aktywne w bardzo niskich stężeniach (rzędu μM) i działają w bardzo krótkim czasie. Interesujące jest, że D-enancjomery peptydów wykazują taką samą aktywność jak ich naturalnie występujące L-analogi, a są mniej wrażliwe na działanie proteinaz, a tym samym mają dłuższy okres półtrwania. Ponadto jako antybiotyki, peptydy cechują się obniżoną immunogennością, co związane jest z wprowadzaniem do organizmu znanych mu już epitopów. Nie ma dotychczas w literaturze informacji o powstaniu oporności na peptydy u mikroorganizmów, podczas gdy dla tradycyjnych antybiotyków lekooporność występuje dość często. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że peptydy działają głównie na błonę bakteryjną, są przy tym selektywnie toksyczne i nie wykazują aktywności przeciwko komórkom organizmu zakażonego patogenem.

Badania prowadzone obecnie mają na celu dokładniejsze poznanie cytotoksyczności i mechanizmów działania tych peptydów oraz opracowanie tanich metod ich pozyskiwania, tak by umożliwić ich wykorzystanie w medycynie jako leków wspomagających tradycyjne antybiotyki.

PODZIĘKOWANIE

Autorka niniejszej pracy składa serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. Adamowi Dubinowi za cenne uwagi i pomoc przy pisaniu tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ANDREU D, RIVAS L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 415–433.
- [2] AXEN A, CARLSSON A, ENGSTROM A, BENNIC H. Gloverin, an antibacterial protein from immune hemolymph of *Hyalophora* pupae. *Eur J Biochem* 1997; **247**: 614–619.
- [3] BAGHIAN A, JAYNES J, ENRIGHT F, KOUSOULAS KG. An amphipathic alpha-helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits herpes simplex virus-1 (HSV-1)-induced cell fusion and virus spread. *Peptides* 1997; **18**: 177–83.
- [4] BECHINGER B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**: 157–83.
- [5] BEVINS CL, MATRIN-PORTER E, GANZ T. Defensin and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Reprintet from GUT* 1999; **45**: 911–915.

- [6] BOMAN HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: An update review. *Scand J Immunol* 1998; **48**: 15–25.
- [7] BROEKAERT WF, CAMMUE BPA, De BOLLE MFC, THERISSEN K, De SAMBLANX GW, OSBORN RW. Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 1997; **16**: 297–323.
- [8] BROEKAERT WF, TERRAS FRG, CAMMUE BPA, OSBORN RW. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1353–1358.
- [9] CARLSSON A, NYSTROM Th, de COCK H, BENNICHT H. Attacin – an insect immune protein – binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer – membrane protein synthesis. *Microbiology* 1998; **144**: 2179–2188.
- [10] CHEN HM, WANG W, SMITH D, CHAN S Ch. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropin B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1336**: 171–179.
- [11] CHO Y, TURNER JS, DINH N, LEHRER RI. Activity of protegrins against Yeast – Phase *Candida Albicans*. *Infect Immun* 1998; **66** : 2486–2493.
- [12] COCIANCICH S, BULET P, HETRU C, HOFFMANN JA. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol Today* 1994; **10**: 132–139.
- [13] De LUCCA AJ, WALSH TJ. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1–11.
- [14] DIAMOND G, BEVINS Ch L. -Defensins: Endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; **88**: 221–225.
- [15] DIMARCQ J-L, BULET Ph, HETRU Ch, HOFFMANN J. Cysteine – rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 465–477.
- [16] EPAND RM, VOGEL HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**: 11–28.
- [17] FALLA TJ, KARUNARATNE DN, HANCOCK REW. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19298–19303.
- [18] FRIEDRICH C, SCOT MG, KARUNARATNE N, YAN H, HANCOCK REW. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1542–1548.
- [19] FROHM M, GUNNE H, BERGMAN AC, AGERBERTH B, BERGMAN T, BOMAN A, LIDEN S, JORNVALL H, BOMAN HG. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem* 1996; **237**: 86–92.
- [20] FUTAKI S. Peptide ion channels: design and creation of function. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 75–81.
- [21] GALLO RL, HUTTNER KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 739–743.
- [22] GANZ T, LEHRER RI. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 1999; **5**: 292–297.
- [23] GARCIA-OLMZOLE F, MOLINA A, ALAMILLO JM, RODRIQUEZ-PALANZUELA P. Plant defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 479–491.
- [24] GAZIT E, MILLER IR, BIGGIN PC, SANSOM MS, SHAI Y. Structure nad orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol* 1996; **258**: 860–870.
- [25] GOLDMAN MJ, ANDERSON GM, STOLZENBERG ED, KARI UP, ZASLOFF M, WILSON J. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; **88**: 553–560.
- [26] HANCOCK REW, CHAPPLE DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1317–1323.
- [27] HANCOCK REW, LEHRER R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 1998; **16** : 82–88.

- [28] HECHT G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 1999; **277** (*Cell Physiol* **46**): 351–358.
- [29] HELLER WT, WARING AJ, LEHRER RI, HUANG HW. Multiple states of β -sheet peptide protegrin in lipid bilayers. *Biochemistry* 1998; **37**: 17331–17338.
- [30] HUTTNER KM, BEVINS CH. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 1999; **45**: 785–794.
- [31] HWANG PM, VOGEL HJ. Structure – function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem Cell Biol* 1998; **76**: 235–246.
- [32] JONES RN, PFALLER MA. Bacterial resistance: A worldwide problem. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; **31**: 379–388.
- [33] KOKRYAKOV VN, HARWIG SS, PANYUTICH EA, SHEVCHENKO AA, ALESHINA GM, SHAMOVA OV, KORNEVA HA, LEHRER RI. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett* 1993; **372**: 231–236.
- [34] KREIL G. Antimicrobial peptides from amphibian skin: An overview. *Antimicrobial Peptides*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 186) 1994: 77–90.
- [35] LAMBERTY M, ADES S, UTTENWEILER-JOSEPH S, BROOKHART G, BUSHEY D, HOFFMANN JA, BULET P. Insect immunity. isolation from the Lepidopteran *Heliothis Virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9320–9326.
- [36] LEMAITRE B, NICILAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973–983.
- [37] LEVY O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol* 1996; **56**: 263–277.
- [38] LUDTKE SJ, HE K, HELLER WT, HARROUN TA, YANG L, HUANG HW. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 1996; **35**: 13723–13728.
- [38b] MAK P, WOJCIK K, SILBERRING J, DUBIN A. Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: Hemocidins. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; **77**: 197–207.
- [39] MATSUZAKI K, MURASE O, FUJII N, MIYAJIMA K. An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 1996; **35**: 11361–11368.
- [40] MATSUZAKI K, SIGISHITA K, HARADA M, FUJII N, MIYAJIMA K. Interactions of antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1327**: 119–130.
- [41] MATSUZAKI K, YONEYAMA S, MIYAJIMA K. Pore formation and translocation of melittin. *Biophys J* 1997; **73**: 831–838.
- [42] MATSUZAKI K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**: 1–10.
- [43] MOORE AJ, BEAZLEY WD, BIBBY MC, DEVINE DA. Antimicrobial activity of cecropins. *J Antimicrob Chemother* 1996; **37**: 1077–1089.
- [44] OREN Z, SHAI Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 451–463.
- [45] PESCHEL A, OTTO M, JACK RW, KALBACHER H, JUNG G, GÖTZ F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8405–8410.
- [46] RUSSELL JP, DIAMOND G, TARVER AP, SCANLIN TF, BEVINS CL. Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1996; **64**: 1565–1568.

- [47] SCHRODER JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *CML; Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 32–46.
- [48] SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; **47**: 435–450.
- [49] SITARAM N, NAGARAJ R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1462**: 29–54.
- [50] SMITH JJ, TRAVIS SM, GREENBERG EP, WELSH M. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; **85**: 229–236.
- [51] SOKOLOV Y, MIRZABEKOV T, MARTINDW, LEHRER RI, KAGAN BL. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1420**: 23–29.
- [52] TAMAMURA H, ISHIHARA T, OTAKA A, MURAKAMI T, IBUKA T, WAKI M, MATSUMOTO A, YAMAMOTO N, FUJII N. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), with gp 120 and CD4 by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1298**: 37–44.
- [53] TAMAMURA H, OTAKA A, MURAKAMI T, IBUKA T, SAKANOKAWA K, WAKI M, MATSUMOTO A, YAMAMOTO N, FUJII N. An Anti-HIV Peptide, T22, forms a highly active complex with Zn(II). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **229**: 648–652.
- [54] TAMAMURA H, OTAKA A, MURAKAMI T, ISHIHARA T, IBUKA T, WAKI H, MATSUMOTO A, YAMAMOTO N, FUJII N. Interaction of an anti-HIV peptide, T22, with GP120 and CD4. *Biochim Biophys Res Commun* 1996; **219**: 555–559.
- [55] van WETERING S, STERK PJ, RABE KF, HIEMSTRA PS. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **104**: 1131–1138.
- [56] VOGT TCB, BECHINGER B. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29115–29121.
- [57] VORLAND LH, ULVATNE H, REKDAL O, SVENDSEN JS. Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis* 1999; **31**: 467–473.
- [58] WEINBERG A, KRISANAPRAKORNKIT S, DALE BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; **9**: 399–414.
- [59] WEISS J. Leukocyte-derived antimicrobial proteins. *Curt Opin Hematol* 1994; **1**: 78–84.
- [60] WENK MR, SEELIG J. Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding and pore formation. *Biochemistry* 1998; **37**: 3909–3916.
- [61] WINDEWR D, GUNZBURG WH, ERFLE V, SALMONS B. Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 608–612.
- [62] WU M, HANCOCK REW. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29–35.
- [63] WU M, MAIER E, BENZ R, HANCOCK REW. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999; **38**: 7235–7242.
- [64] YEAMAN MR, BAYER AS. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resistance Updates* 1999; **2**: 116–126.

Część piąta

**WSPÓŁCZESNE METODY BADANIA
STRUKTURY I DYNAMIKI BIOCZAŚTECZEK**

STREK...
TECZEK

ODDZIAŁYWANIE CHOLESTEROLU Z FOSFOLIPIDAMI W BŁONIE – BADANIA METODĄ SYMULACJI DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

MOLECULAR SIMULATION STUDIES OF THE CHOLESTEROL-PHOSPHOLIPID INTERACTIONS

Tomasz RÓG, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Przeprowadzono 5-ns symulację dynamiki molekularnej uwodnionej błony w fazie ciekłokrystalicznej utworzonej z fosfatydylocholino dimyrystynowej (DMPC) i cholesterolu (Chol). Celem analiz uzyskanych trajektorii było wyjaśnienie mechanizmu efektu porządkującego i kondensacyjnego Chol na poziomie atomowym. Uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych w błonie DMPC-Chol jest większe niż w czystej błonie DMPC. Najbardziej uporządkowane są łańcuchy cząsteczek DMPC sąsiadujących z gładką powierzchnią α Chol. W tej grupie stwierdzono zarówno spadek liczby konformacji *gauche*/łańcuch, jak i kąta nachylenia łańcuchów względem normalnej do powierzchni błony. Łańcuchy cząsteczek sąsiadujących z chropowatą powierzchnią β Chol były mniej uporządkowane niż cząsteczek sąsiadujących z powierzchnią α . Za efekt kondensacyjny Chol odpowiedzialny jest wzrost oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi DMPC, a nie oddziaływania pomiędzy łańcuchami a pierścieniem sterydowym Chol.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 277–283)

Słowa kluczowe: fosfatydylocholino, cholesterol, uporządkowanie błony

Summary: A 5-ns molecular dynamics simulation of the fully hydrated, liquid-crystalline bilayer membrane built of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and cholesterol (Chol) was performed. The primary aim of the analyses of generated trajectories was to investigate the atomic-level mechanisms of the Chol ordering and condensing effect. A strong increase in the chain order in the DMPC-Chol membrane as compared to the pure DMPC membrane, was observed. Alkyl chains of PCs, which were the nearest neighbours of the smooth face of Chol (α face), were the most ordered. For these molecules, a decrease in the number of *gauche* conformation/myristoyl chain as well as in the tilt of the chain, were

*Niniejsza praca była finansowana z grantu Komitetu Badań Naukowych 6P04A05715

observed. PCs neighbouring the β face of Chol were less ordered than PCs neighbouring the α face. For the Chol condensing effect, an increase in the van der Waals interactions among PCs chains was responsible; interactions between hydrocarbon chains and cholesterol rings were weak. (*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 277–283*)

Key words: phosphatidylcholine, cholesterol, membrane order

WSTĘP

Cholesterol (Chol) jest istotnym składnikiem zwierzęcych błon komórkowych. Jego średnia zawartość w tych błonach wynosi ~ 30 mol% (20% wagowych) wszystkich lipidów, a w błonie komórkowej erytrocytów może osiągać aż do 50 mol%. W błonach wewnątrzkomórkowych zawartość Chol jest mniejsza niż w błonie komórkowej i waha się od 3% wagowych w błonach mitochondrium do 8% w aparacie Golgiego. Obserwuje się niesymetryczne rozmieszczenie Chol pomiędzy zewnętrzną, bogatszą w Chol i cytoplazmatyczną, uboższą w Chol warstwę błony komórkowej. Powszechne występowanie Chol w zwierzęcych błonach komórkowych oraz precyzyjna regulacja jego zawartości w różnego typu błonach wskazuje, że cholesterol pełni tam istotne biologiczne funkcje.

Wyjaśnienie wpływu Chol na strukturę i dynamikę błon jest przedmiotem szeroko zakrojonych badań biofizycznych. Przegląd aktualnych poglądów na temat biofizycznych aspektów funkcjonowania Chol w błonie zebrany jest w pracach [1, 5, 7, 21, 22]. Wykazano, że Chol obniża przepuszczalność błony dla wody, jonów i małych obojętnych cząsteczek, kontroluje fazowe zachowanie błony, zwiększa jej mechaniczną wytrzymałość oraz kontroluje kształt komórki. Pełnienie tych funkcji jest możliwe, ponieważ na poziomie molekularnym Chol wywołuje wzrost uporządkowania łańcuchów węglowodorowych, obniżenie płynności błony oraz wywołuje jej kondensację.

Cholesterol jest najczęściej występującym w przyrodzie przedstawicielem sterydów, grupy naturalnych związków chemicznych o podobnej strukturze pierścieniowej. Badania porównawcze wpływu Chol i innych sterydów na właściwości błon modelowych i biologicznych wykazały, iż struktura cząsteczki Chol jest optymalna dla oddziaływania z błoną [1, 8]. Wszelakie zmiany w strukturze cząsteczki Chol, takie jak zmiana konformacji grupy hydroksylowej, jej brak lub jej estryfikacja, czy też obecność dodatkowych podstawników w pierścieniu sterydowym obniżają jej wpływ na właściwości fizyczne błony.

SYMULACJE DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

W pracy badano dwa modele błon:

- (1) błona zbudowana z 72 cząsteczek fosfatydylocholine dimyrystynowej (DMPC) i 1622 cząsteczek wody (błona DMPC),

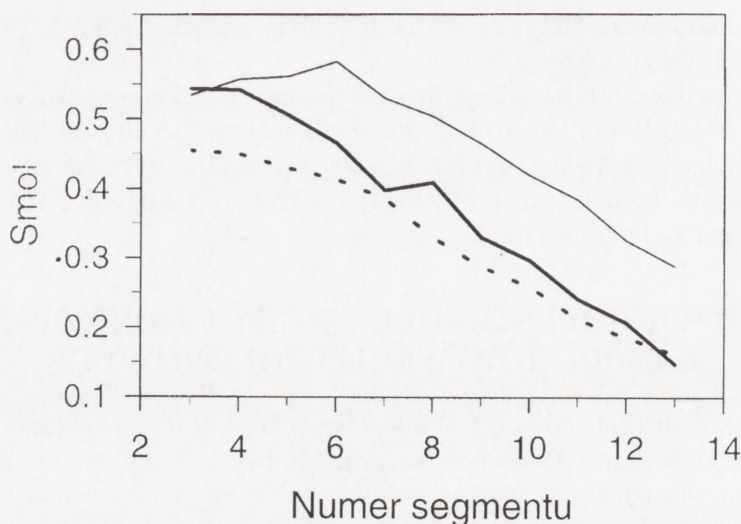
(2) błona zbudowana z 56 cząsteczek DMPC, 16 cząsteczek Chol oraz 1622 cząsteczek wody (błona DMPC-Chol).

Przeprowadzono 5ns symulacje dynamiki molekularnej obu modeli przy użyciu programu AMBER 4.0. Do analiz użyto wyników uzyskanych w trakcie ostatnich 2.5 ns symulacji. Dokładne informacje dotyczące budowy błon, procesu ich równoważenia oraz porównania uzyskanych wyników z danymi eksperymentalnymi zamieszczono w pracach [10, 11, 12, 13].

WPLYW CHOLESTEROLU NA UPORZĄDKOWANIE ŁAŃCUCHÓW WĘGLOWODOROWYCH

Wprowadzenie Chol do błony fosfolipidowej w fazie ciekłokrystalicznej powoduje wzrost uporządkowania łańcuchów węglowodorowych [2, 3, 9, 15, 19]. Postulowanym mechanizmem wzrostu uporządkowania błony jest spadek średniej liczby konformacji *gauche* w łańcuchach węglowodorowych. Badania eksperymentalne nie dostarczyły jednak jednoznacznych danych na temat wpływu Chol na tę liczbę. Wcześniejsze badania metodą symulacji dynamiki molekularnej błon zawierających 50 mol% Chol wykazały spadek liczby konformacji *gauche* [18], natomiast w błonach zawierających 12 i 22 mol% Chol nie wykazały takiego spadku [13, 15, 20]. Czynnikiem, który również wpływa na uporządkowanie błony, jest nachylenie łańcuchów węglowodorowych względem normalnej do powierzchni błony. W przeprowadzonych symulacjach dynamiki molekularnej stwierdzono, iż pod wpływem Chol nachylenie to maleje.

Analizy błony DMPC-Chol wykazały, iż wzrost uporządkowania jest największy w grupie cząsteczek DMPC, które znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczek Chol. Łańcuchy węglowodorowe tych cząsteczek charakteryzują się mniejszym nachyleniem względem normalnej do powierzchni błony niż pozostałe cząsteczki DMPC w błonie. Wśród cząsteczek DMPC sąsiadujących z cząsteczkami Chol można wyróżnić dwie grupy cząsteczek: pierwsza, to cząsteczki sąsiadujące z płaską powierzchnią α pierścieni sterydowych, na której nie ma żadnych podstawników oraz druga, to cząsteczki sąsiadujące z chropowatą powierzchnią β , na której znajdują się dwa podstawniki metylowe. Cząsteczki sąsiadujące z powierzchnią α Chol są bardziej uporządkowane niż cząsteczki sąsiadujące z powierzchnią β i charakteryzują się najmniejszą liczbą konformacji *gauche*/łańcuch i najmniejszym kątem nachylenia łańcuchów węglowodorowych względem normalnej do powierzchni błony. Na rysunku 1 przedstawiono profile parametru uporządkowania cząsteczek sąsiadujących z płaską i chropowatą powierzchnią Chol oraz nie sąsiadujących z Chol. Na rysunku 2 przedstawiono struktury cząsteczek DMPC, które sąsiadują z płaską i chropowatą powierzchnią Chol oraz nie sąsiadującą z Chol.



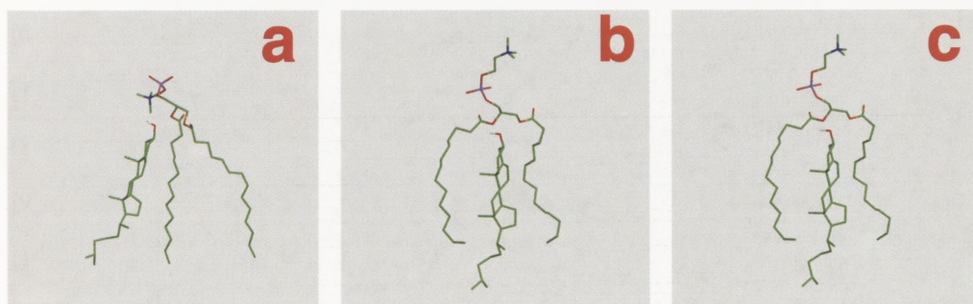
RYSUNEK 1. Profil parametru uporządkowania Smol wzdłuż łańcucha węglowodorowego w grupie lipidów sąsiadujących z płaską powierzchnią cholesterolu (cienka linia ciągła), z chropowatą powierzchnią cholesterolu (pogrubiona linia ciągła) i w grupie lipidów nie sąsiadujących z cholesterolu (linia przerywana)

MECHANIZM EFEKTU KONDENSACYJNEGO CHOLESTEROLU

Efekt kondensacyjny Chol w błonie fosfolipidowej polega na wzroście gęstości powierzchniowej błony po wprowadzeniu do niej Chol. Zjawisko to manifestuje się również zmniejszeniem pola powierzchni poprzecznej przypadającej na cząsteczkę fosfolipidu w błonie. Został on wykazany zarówno metodami eksperymentalnymi [16, 17], jak i metodą symulacji dynamiki molekularnej [13, 15, 18, 20].

Postulowanym mechanizmem efektu kondensacyjnego na poziomie atomowym jest wzrost oddziaływań van der Waalsa w błonach zawierających Chol [16]. Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej jednoznacznie wykazały, iż taki wzrost ma miejsce i jest największy w środkowej części łańcuchów węglowodorowych.

Wcześniejsze wyniki eksperymentalne pozwoliły na zaproponowanie dwóch modeli efektu kondensacyjnego. W pierwszym główną rolę odgrywają oddziaływania pomiędzy pierścieniami Chol a łańcuchami węglowodorowymi PC [4], a w drugim, tylko pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi PC [6]. Przeprowadzone symulacje wykazały, iż oddziaływania van der Waalsa pomiędzy pierścieniem sterydowym Chol a łańcuchami węglowodorowymi są słabe, natomiast pomiędzy samymi łańcuchami są one silne.



RYSUNEK 2. Struktura cząsteczki cholesterolu i DMPC sąsiadującej (a) z płaską powierzchnią cholesterolu, (b) z chropowatą powierzchnią cholesterolu oraz (c) nie sąsiadującej z cholesterolu

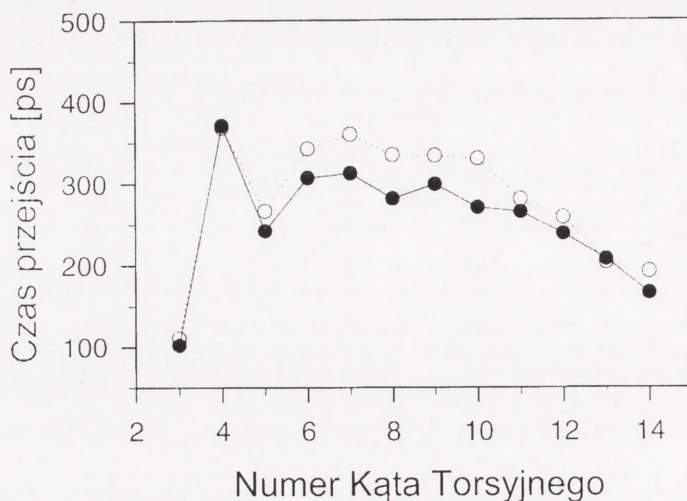
WPŁYW CHOLESTEROLU NA DYNAMICZNE PARAMETRY BŁONY

Obecność Chol w błonie powoduje obniżenie ruchliwości cząsteczek fosfolipidów. Efekt ten określany jest jako obniżenie płynności błony. Przeprowadzone badania symulacyjne wykazały, iż cholesterol spowolnia izomeryzację *trans-gauche* w łańcuchach węglowodorowych DMPC. Efekt ten jest nieznacznie silniejszy w grupie cząsteczek sąsiadujących z cząsteczkami Chol. Na rysunku 3 przedstawiono profile czasu izomeryzacji *trans-gauche* wzdłuż łańcuchów węglowodorowych w błonie zawierającej i nie zawierającej Chol.

Obserwuje się również spowolnienie dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej cząsteczek DMPC. Krótka skala czasowa symulacji dynamiki molekularnej nie pozwala jednak na pełną charakterystykę procesów dyfuzyjnych. Niemniej dla cząsteczek DMPC sąsiadujących z pierścieniem sterydowym obserwuje się wyższą wartość współczynnika dyfuzji translacyjnej niż dla cząsteczek nie sąsiadujących z cząsteczkami Chol. Prawdopodobnie wynika to ze słabszych oddziaływań pomiędzy pierścieniem a łańcuchami węglowodorowymi PC oraz silniejszych oddziaływań pomiędzy samymi łańcuchami.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej wykazały dużą przydatność tej metody do badania obszaru hydrofobowego błony. Komputerowe modele błon dobrze odtwarzają wiele właściwości błon znanych z badań eksperymentalnych, takich jak kształt profilu parametru uporządkowania czy też wywołany obecnością Chol efekt porządkujący i kondensacyjny. Przeprowadzone analizy modeli błon DMPC i DMPC-Chol pozwoliły na wskazanie mechanizmów tych efektów na poziomie atomowym. Są to:



RYSUNEK 3. Czas izomeryzacji *trans-gauche* (średni czas, po którym obserwuje się zmianę konformacji kąta torsyjnego) w błonie DMPC dla kolejnych kątów torsyjnych wzdłuż łańcucha węglowodorowego (pełne symbole) i DMPC-Chol (puste symbole)

- Mechanizm wzrostu uporządkowania nasyconych łańcuchów węglowodorowych pod wpływem cholesterolu polegający na zmniejszeniu liczby konformacji *gauche* oraz kąta nachylenia łańcuchów względem normalnej do powierzchni błony. Największy wzrost uporządkowania zachodzi wśród cząsteczek DMPC znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie płaskiej powierzchni α cholesterolu.
- Mechanizm kondensacji błony pod wpływem cholesterolu polegający na wzmocnieniu oddziaływań van der Waalsa zachodzących pomiędzy grupami metylenowymi łańcuchów węglowodorowych PC. Oddziaływania van der Waalsa zachodzące pomiędzy atomami łańcuchów PC a atomami pierścieni sterydowych są słabe.

LITERATURA

- [1] BITTMAN R. Has nature designed the cholesterol side chain for optimal interaction with phospholipid. *Subcellular Biochemistry* 1997; **28**: 145–171.
- [2] DAVIS JH. The description of membrane conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochim Biophys Acta* 1983; **737**: 117–171.
- [3] DOULIEZ JP, LEONARD A, DUFOURC EJ. Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splitting. *Biophys J* 1995; **68**: 1727–1739.
- [4] DUFOURC EJ, PARISH E, CHITRAKORN S, SMITH ICP. Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interactions as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* 1984; **23**: 6062–6071.
- [5] FINEAN JB. Interaction between cholesterol and phospholipid in hydrated bilayer. *Chem Phys Lipids* 1990; **54**: 147–156.

- [6] HYSLOP PA, MOREL B, SAUERHEBER RD. Organisation and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. *Biochemistry* 1990; **29**: 1925–1038.
- [7] McMULLEN TPW, McELCHANEY RN. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1996; **1**: 83–90.
- [8] MOURITSEN OG, JORGENSEN K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 1994; **73**: 2–25.
- [9] PARE C, LAFLEUR M. Polymorphism of POPE/Cholesterol system: a H₂ nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopic investigation. *Biophys J* 1998; **74**: 899–909.
- [10] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MYGAIWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: location, geometry and lipid-lipid bridging via hydrogen bonded water. *J Phys Chem* 1997; **101**: 3677–3691.
- [11] PASENKIEWICZ-GIERULA M, RÓG T. Conformations, orientations and time scales characterising dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. Molecular dynamics simulation studies. *Acta Biochem. Pol* 1997; **44**: 607–624.
- [12] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MYGAIWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 1999; **76**: 1228–1240.
- [13] PASENKIEWICZ-GIERULA M, RÓG T, KITAMURA K, KUSUMI A. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study. *Biophys J* 2000; **78**: 1376–1389.
- [14] RAMSTED B, SLOTTE JP. Interaction of cholesterol sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. *Biophys J* 1999; **76**: 908–915.
- [15] ROBINSON AJ, RICHARDS WG, THOMAS PJ, HANN MA. Behaviour of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 1995; **68**: 164–170.
- [16] SMABY JM, MOMSEN MM, KULKARNI VS, BROWN RE. Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* 1996; **35**: 5696–5704.
- [17] SMABY JM, MOMSEN MM, BROCKMAN HL, BROWN RE. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in the interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys J* 1997; **73**: 1492–1505.
- [18] SMONDYREV AM, BERKOWITZ ML. Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophys J* 1999; **77**: 2075–2089.
- [19] TROUARD TP, NEVZOROV AA, ALAM TM, JOB CC, ZAJICEK J, BROWN MF. Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation. *J Chem Phys* 1999; **110**: 8802–8818.
- [20] TU K, KLEIN ML, TOBIAS DJ. Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys J* 1998; **75**: 2147–2156.
- [21] YEAGLE PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; **822**: 267–287
- [22] YEAGLE PL. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 1990; **73**: 1303–1310.

ZORIENTOWANA KRYSTALIZACJA METALOPORFIRYN: WPŁYW POŁA MAGNETYCZNEGO I BŁON LIPIDOWYCH*

ORIENTED CRYSTALLIZATION OF METALLOPORPHYRINS:
EFFECT OF MAGNETIC FIELD AND LIPID MEMBRANES

Witold K. SUBCZYŃSKI¹, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA¹,
William E. ANTHOLINE²

¹Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków;

²Biophysics Research Institute, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

Streszczenie: Tetrafenylporfiryновый kompleks miedzi (CuTPP) wiąże się z lipidową dwuwarstwą. Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) zorientowanych, ciekłokrystalicznych błon z fosfatydylocholinoj dimyrystynowej (DMPC) zawierających CuTPP wskazują, że dla zawartości CuTPP ≤ 1 mol% powierzchnia cząsteczek CuTPP jest prostopadła do powierzchni błony, natomiast dla zawartości ≥ 4 mol% ich powierzchnia jest równoległa do powierzchni błony. Metody impulsowe ERP oraz symulacja komputerowa widm ERP wskazują, że za zmianę orientacji cząsteczek CuTPP ze wzrostem ich zawartości w błonie odpowiedzialna jest wzajemna asocjacja CuTPP w pobliżu środka błony. Tworzą się tam kilkucząsteczkowe struktury podobne do kryształów CuTPP. Innym czynnikiem, który może indukować zorientowaną krystalizację cząsteczek CuTPP, jest pole magnetyczne o natężeniu ≥ 1000 G. Kryształy powstające w przesyconych roztworach w polu magnetycznym zorientowane są tak, że płaszczyzny cząsteczek CuTPP są równoległe do linii sił pola. Szybkość krystalizacji cząsteczek CuTPP jest też większa w obecności pola magnetycznego. Przedyskutowane jest znaczenie wymienionych zjawisk dla fototerapii nowotworów wykorzystującej porfiryny jako czynniki fotouczulające. (*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 285–296*)

Słowa kluczowe: agregacja porfiryń; orientacja porfiryń w błonie; lipidowa dwuwarstwa; fototerapia z wykorzystaniem porfiryń.

Summary: Copper(II) tetraphenylporphyrin (CuTPP) has been found to partition favorably into lipid bilayer membranes. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of oriented fluid-phase dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) membranes indicate that for a low ($\leq 1/100$) CuTPP/DMPC molar

*Praca częściowo finansowana w ramach grantu RR 01008 z NIH, USA i częściowo przez Uniwersytet Jagielloński.

ratio the plane of CuTPP is preferentially perpendicular to the membrane surface while for a high ($\geq 1/25$) CuTPP/DMPC molar ratio the plane of the molecule is parallel to the bilayer surface. Additional saturation-recovery EPR measurements, as well as computer simulations of EPR spectra lead to the conclusion that the change of the CuTPP orientation at high CuTPP/DMPC molar ratio is coupled with self-association by planar stacking of CuTPP molecules near the lipid bilayer center. An additional factor that can induce oriented crystallization of CuTPP is a strong (≥ 1000 G) magnetic field. Crystals formed in oversaturated solutions are oriented with planes of molecules parallel to the magnetic field. The presence of the magnetic field also increases the rate of CuTPP crystallization. The relevance of these findings to porphyrin photodynamic therapy is discussed.

(Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 285–296)

Key words: porphyrin aggregation; porphyrin-membrane orientation; lipid bilayer; porphyrin phototherapy.

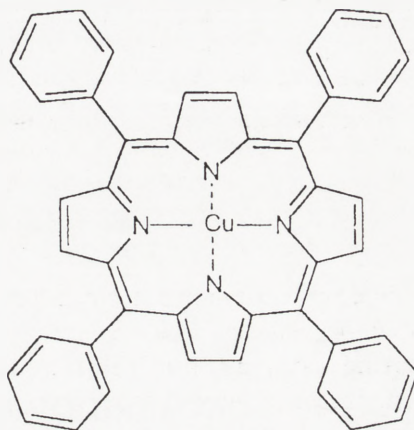
WSTĘP

Związki porfiryneowe stosowane są szeroko w fototerapii nowotworów jako czynnik fotouczulający. Zazwyczaj, czynnik ten jest mieszaniną porfiryn z różnymi grupami bocznymi [4, 11]. Uważa się, że głównym miejscem fotouczulanych reakcji zachodzących z udziałem porfiryn są błony komórkowe [5, 12]. Zastosowanie fotouczulaczy w terapii opiera się na ich selektywnym wchłanianiu przez komórki nowotworowe i długotrwałym przebywaniu w tych komórkach [7] lub/i ich selektywnym oddziaływaniu z błonami plazmatycznymi komórek nowotworowych [23]. Ważne jest więc zrozumienie podstawowych procesów odpowiedzialnych za oddziaływanie fotouczulacza z lipidową dwuwarstwą błon biologicznych oraz badanie procesów transportu fotouczulacza do miejsc jego działania. Istotne jest również określenie czynników zwiększających wydajność akumulacji fotouczulacza w nowotworach.

Prowadzone przez nas badania dotyczyły wymienionych powyżej zagadnień. Użyliśmy w nich głównie porfiryn skompleksowanych z miedzią. Wprowadzenie do pierścienia porfiryneowego jonu miedzi czyni tę cząsteczkę sondą paramagnetyczną. Umożliwia to zastosowanie różnych technik spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). Kompleks miedzi z tetrafenyloporfiryną (CuTPP) ma unikalne własności spektralne. Widma ERP pozwalają nie tylko określić ruchliwość i orientację cząsteczek CuTPP w układzie, gdy związek ten występuje w formie monomerów, ale także stopień agregacji oraz orientację mikrokryształów CuTPP względem zewnętrznego pola magnetycznego. Zdobyte przez nas wcześniej doświadczenie w badaniach oddziaływania kompleksów miedzi z lipidową dwuwarstwą [1, 19, 20, 24, 25] i białkami [30], a także w symulacji widm ERP tych kompleksów [15, 16] pozwoliło na przeprowadzenie eksperymentów i analiz, które dostarczyły nowych wyników. Trzeba podkreślić, że badane uprzednio związki miedzi wykazywały aktywność przeciwnowotworową [18], a także były stosowane jako środki kontrastowe w tomografii z wykorzystaniem emisji pozytronów [14].

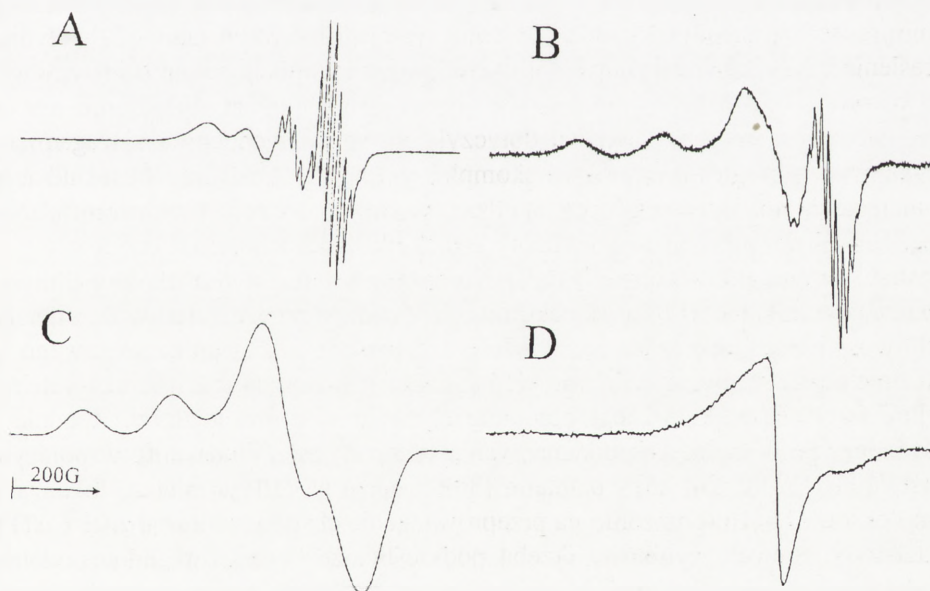
WIDMA ERP METALOPORFIRYNY

W badaniach prowadzonych metodą ERP, porfiryne kompleksy miedzi są bardziej użyteczne niż żelazoporfiryne, gdyż pomiary nie są ograniczone do niskich temperatur. Opisane w pracy badania dotyczą głównie CuTPP, w której jon miedzi tworzy wiązania koordynacyjne z czterema atomami azotu (rys. 1). Widmo ERP tego kompleksu składa się więc z czterech linii struktury nadsubtelnej, które ulegają rozszczepieniu supernadsubtelnemu, w wyniku oddziaływania niesparowanego elektronu z jądrami czterech atomów azotu o spinie jądrowym $I = 1$ dając złożoną strukturę supernadsubtelną. Struktura ta widoczna jest w widmach ERP dla roztworów CuTPP o niskiej (chloroform, rys. 2A) i wysokiej (olej parafinowy, rys. 2B) lepkości. W takich roztworach rotacja cząsteczek CuTPP powoduje częściowe lub całkowite uśrednienie anizotropii oddziaływania nadsubtel-



CuTPP

RYSUNEK 1. Struktura chemiczna CuTPP



RYSUNEK 2. Zarejestrowane w temperaturze pokojowej widma ERP kompleksu CuTPP: roztwór w chloroformie (A); roztwór w oleju parafinowym (B); w postaci polikrystalicznej (C) i w formie agregatów z przypadkową wzajemną orientacją cząsteczek (D)

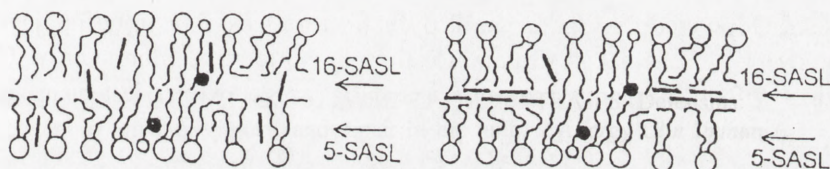
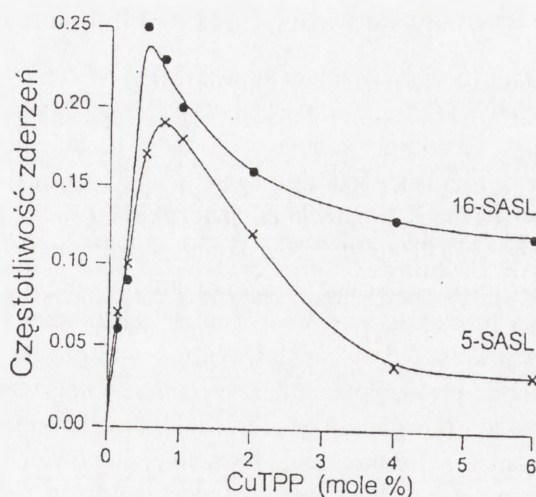
nego i współczynnika spektroskopowego rozszczepienia g . Dla niskich stężeń kompleksu magnetyczne oddziaływania między cząsteczkami są zaniedbywalne.

W magnetycznie czystych kryształach cząsteczki CuTPP ułożone są równolegle do siebie i przesunięte względem siebie o pół długości pierścienia [6]. Odległość Cu–Cu wynosi w tych kryształach $8,3 \text{ \AA}$, co sugeruje, że silne dipolowe oddziaływanie magnetyczne między sąsiadującymi jonami miedzi spowoduje poszerzenie linii ERP i „zlanie się” ich w jedną szeroką linię. Oddziaływanie dipolowe jest jednak silnie zredukowane przez cztery pierścienie fenylowe ustawione prostopadle do pierścienia porfiryny, dzięki czemu widma ERP takich kryształów mają dobrze rozdzieloną strukturą nadsubtelną (rys. 2C). Struktura supernadsubtelna jest jednak w tych widmach niewidoczna, co wskazuje na pewne dipolowe poszerzenie widm ERP [2, 13]. Magnetycznie czyste agregaty, w których cząsteczki CuTPP zorientowane są przypadkowo względem siebie, dają widma ERP mające pojedynczą, szeroką linię (rys. 2D).

LOKALIZACJA, ORIENTACJA I RUCHLIWOŚĆ CuTPP W LIPIDOWEJ DWUWARSTWIE

Porfiryny i metaloporfiryny znane są ze swej tendencji do agregacji w roztworach wodnych nawet przy niskich stężeniach [3]. Inaczej oddziałują one na błony w formie monomerów, a inaczej w formie zagregowanej. Na przykład hemina katalizuje utlenianie lipidów i białek błonowych przede wszystkim w formie monomerycznej, natomiast narusza strukturę błony głównie w formie zagregowanej [22]. Hydrofobowe składniki stosowanych w fototerapii mieszanin pochodnych porfiryny wykazują także tendencję do agregacji w roztworach wodnych. Włączanie ich do błon, głównego miejsca fotouczulanych reakcji, zachodzi po powtórnym rozpuszczeniu się zagregowanych cząsteczek porfiryn [4, 12]. Badania nad lokalizacją, orientacją, dynamiką i agregacją CuTPP w lipidowych dwuwarstwach prowadzone są przez naszą grupę od wielu lat [17, 20, 27].

W celu określenia lokalizacji CuTPP w błonach z fosfatydylocholino dimyrystynowej (DMPC) w fazie ciekłokrystalicznej mierzyliśmy częstotliwość zderzeń CuTPP z wolnorodnikowym, nitroksylowym fragmentem znacznika spinowego 5-SASL, zlokalizowanym w rejonie węgla C-5 łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów i znacznika 16-SASL, zlokalizowanym w centrum błony. Zgodnie z równaniem Smoluchowskiego częstotliwość zderzeń zależy od sumy współczynników dyfuzji zderzających się cząsteczek i stężenia CuTPP w miejscu lokalizacji fragmentu nitroksylowego. Jak widać na rysunku 3, dla niskich zawartości CuTPP w błonie ($\leq 0,5 \text{ mol\%}$) częstotliwości zderzeń z obydwojema znacznikami są podobne i wzrastają liniowo wraz ze wzrostem zawartości CuTPP. Częstotliwości zderzeń osiągają maksimum przy zawartości CuTPP $0,5\text{--}0,75 \text{ mol\%}$ i przy dalszym jej



RYSUNEK 3. Częstotliwość zderzeń (jednostki względne) cząsteczek CuTPP z wolnorodnikowym fragmentem znacznika spinowego 5-SASL i 16-SASL w funkcji zawartości CuTPP w błonie DMPC w fazie ciekłokrystalicznej (25°C). Schematy u dołu wskazują pozycję fragmentu wolnorodnikowego znacznika 5-SASL (w pobliżu głów polarnych) i 16-SASL (w centrum błony) oraz ilustrują lokalizację i orientację monomerycznej lub zasocjowanej formy CuTPP w błonie DMPC. Z lewej strony zilustrowany jest przypadek dla zawartości CuTPP w błonie o ≤ 1 mol%, a z prawej dla zawartości ≥ 4 mol%

wzroście spadają do 20–50% swej maksymalnej wartości. Przy zawartości 4–6 mol%, częstotliwość zderzeń CuTPP z 16-SASL jest około 3,5 razy większa niż z 5-SASL. Sugeruje to, że w tym zakresie stężeń, cząsteczki CuTPP zlokalizowane są głównie w centrum błony. A więc można wyróżnić dwa wyraźne obszary zawartości CuTPP w lipidowej dwuwarstwie (poniżej i powyżej 0,5–1 mol%), dla których sposób oddziaływania CuTPP z błoną w fazie ciekłokrystalicznej różni się w zasadniczy sposób. Częstotliwość zderzeń innego, hydrofobowego kompleksu miedzi, CuKTSM₂ (kompleks miedzi z bis(N⁴,N⁴-dimetylo-tiosemikarbazonom)3-etoksy-2-oksyaldehydu masłowego) ze zlokalizowanymi w błonie znacznikami spinowymi wzrastała liniowo aż do 2 mol% CuKTSM₂ (maksymalna użyta zawartość) [24]. Była ona porównywalna z częstotliwością zderzeń dla CuTPP w zakresie $<0,5$ mol%. Analiza widm ERP CuTPP w zorientowanych błonach pozwoliła na wyjaśnienie przyczyny tego nieoczekiwanego zachowania cząsteczek CuTPP w lipidowej dwuwarstwie.

Niskie zawartości CuTPP w błonie

• Widma ERP układu zorientowanych błon DMPC w fazie ciekłokrystalicznej zawierających 1 mol% CuTPP zarejestrowane dla pola magnetycznego równoległego i prostopadłego do powierzchni błony mają dobrze rozdzieloną strukturę supernadsubtelną. Widma te różnią się jednak znacznie między sobą. Obecność struktury supernadsubtelnej w widmach wskazuje na znaczną ruchliwość pojedynczych cząsteczek (monomerów) CuTPP w błonie. Różnice w widmach sugerują uprzywilejowaną orientację powierzchni cząsteczek CuTPP prostopadłą do powierzchni błony. Stosując opracowaną przez nas wcześniej metodę „pseudokonwolucji” [16] przeprowadzono symulacje komputerowe widm. Widma symulowane dobrze odtwarzały widma eksperymentalne przy założeniu silnie ograniczonej reorientacji cząsteczki CuTPP względem osi prostopadłej do powierzchni błony. Parametr uporządkowania powierzchni cząsteczek CuTPP względem normalnej do powierzchni błony wynosił $S_{\text{mol}} = 0,88$. Pomimo znacznego uporządkowania, dyfuzja rotacyjna kompleksu jest szybka. Odpowiednie współczynniki dyfuzji wraz z ich dokładną definicją podane są w pracy [17]. Schemat ilustrujący lokalizację i orientację monomerów CuTPP w błonie DMPC dla niskich zawartości CuTPP przedstawiony jest na rysunku 3 z lewej strony.

Wysokie zawartości CuTPP w błonie

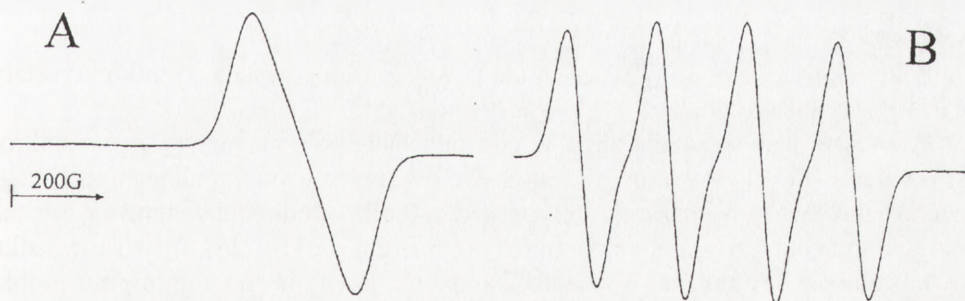
Widma ERP otrzymane dla wysokich zawartości CuTPP (4 mol%) w zorientowanych błonach DMPC w fazie ciekłokrystalicznej różnią się zasadniczo od widm otrzymanych dla niskich zawartości. Nie ma w nich struktury supernadsubtelnej, natomiast wyraźna struktura nadsubtelna (cztery linie składowej g_{\parallel}) obserwowana jest tylko wtedy, gdy pole magnetyczne jest prostopadłe do powierzchni błony. Dla pola równoległego do powierzchni błony linie składowej g_{\parallel} widma praktycznie znikają. Ten nieoczekiwany wynik może być wytłumaczony tylko przy założeniu, że dla zawartości CuTPP $\geq 4\text{mol}\%$ powierzchnia cząsteczek jest równoległa do powierzchni błony. A więc orientacja cząsteczek w błonie zależy od stosunku molowego CuTPP/DMPC i zmienia się z jego wzrostem z prostopadłej na równoległą do powierzchni błony. Brak struktury supernadsubtelnej sugeruje znaczne oddziaływanie dipolowe Cu–Cu, tak jak w kryształach CuTPP [2, 13].

Nasze wcześniejsze badania wskazują, że inne płaskie, hydrofobowe kompleksy miedzi CuKTSM₂ [25] i CuL [19] nawet przy wysokich zawartościach (4 mol%), orientują się w błonach w fazie ciekłokrystalicznej z powierzchnią kompleksu prostopadłą do powierzchni błony. Równoległa do powierzchni błony orientacja CuTPP dla zawartości powyżej 1 mol% wyróżnia porfiryny wśród innych płaskich kompleksów miedzi. Przyczyną tego jest łatwość porfiryn i metaloporfiryn do tworzenia agregatów i stosów cząsteczek z równoległym ułożeniem ich powierzchni w wyniku oddziaływania π – π [29].

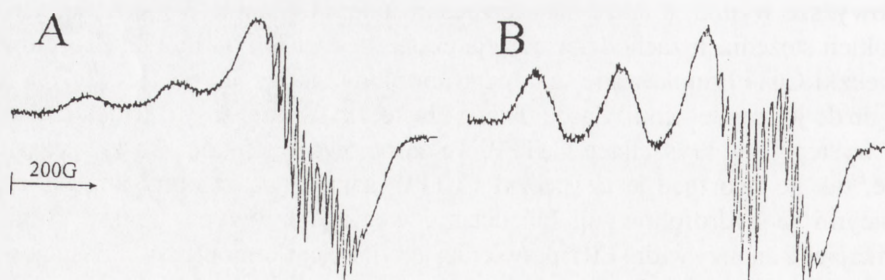
Powyższe wyniki, a także dane przedstawione na rysunku 3 wskazują, że przy wysokich stężeniach zachodzi asocjacja cząsteczek CuTPP w błonie. Zasocjowane cząsteczki CuTPP ulokowane są w centrum błony tak, że ich płaszczyzny są równoległe do jej powierzchni. Zasocjowane cząsteczki tworzą stopy o strukturze takiej, jaka występuje w kryształach CuTPP. Te zasocjowane struktury są kilkucząsteczkowe, tak że tworzące je cząsteczki CuTPP mają ciągle znaczny kontakt z otaczającymi je hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi lipidów. Wnioski wynikające z analizy widm ERP potwierdzają symulacje komputerowe. Zasocjowane struktury CuTPP i ich lokalizacja w błonie przedstawione są schematycznie na rysunku 3 z prawej strony.

KRYSZTAŁIZACJA W POLU MAGNETYCZNYM

Kryształy paramagnetycznych cząsteczek, takich jak CuTPP, mogą orientować się w polu magnetycznym, gdy mają anizotropię tensora podatności magnetycznej $\Delta\chi = \chi_{||} - \chi_{\perp}$ ($\chi_{||}$ i χ_{\perp} to podatności magnetyczne odpowiednio w kierunku równoległym i prostopadłym do normalnej do powierzchni cząsteczki CuTPP). Jeżeli $\Delta\chi$ jest ujemne, to kryształy orientują się tak, że linie sił pola magnetycznego są równoległe do powierzchni cząsteczek (orientacja negatywna), jeżeli natomiast $\Delta\chi$ jest dodatnie, to kryształy zorientują się powierzchnią cząsteczek CuTPP prostopadle do linii sił pola magnetycznego (orientacja pozytywna). Widma ERP wskazują, że powstające w polu magnetycznym kryształy CuTPP zorientowane są negatywnie [26]. Pod nieobecność pola orientacja kryształów CuTPP jest przypadkowa. Pole magnetyczne o natężeniu 200 G orientuje już kryształy CuTPP, natomiast maksymalny efekt uporządkowania wywołuje pole o natężeniu 1000 G.



RYSUNEK 4. Widma ERP kryształów CuTPP otrzymanych na płaskim dnie kiuwety po powolnym (7 dni) odparowaniu chloroformu w polu magnetycznym o natężeniu 12 000 G. Powierzchnia dna kiuwety równoległa była do linii sił pola magnetycznego: A – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego równoległy do powierzchni dna kiuwety. W widmie widoczna jest tylko jedna linia składowej g_{\perp} . B – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego prostopadły do powierzchni dna kiuwety. W widmie widoczne są tylko cztery linie składowej $g_{||}$. Widma zarejestrowano w pasmie X w temperaturze 25°C



RYSUNEK 5. Widma ERP roztworu CuTPP oraz zawieszonych w nim mikrokryształów utworzonych w mieszaninie olej parafinowy – chloroform po odparowaniu chloroformu. Próbką zamrożona była w polu magnetycznym o natężeniu 3000 G do temperatury -170°C i dopiero potem rejestrowane były widma ERP: A – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego równoległy do pola podczas zamrażania próbki. B – Kierunek rezonansowego pola magnetycznego prostopadły do pola zamrażania (po obrocie kapilary o 90°).

Gdy powierzchnia kiuwety, na której następuje krystalizacja, jest równoległa do linii sił pola magnetycznego, wtedy powstające na niej kryształy CuTPP są jednakowo zorientowane. Widma ERP takiego układu oraz pojedynczego kryształu CuTPP są identyczne. Widma ERP kryształów CuTPP otrzymanych w polu magnetycznym na płaskiej powierzchni pokazano na rysunku 4.

Można też otrzymać mikrokryształy CuTPP zawieszone bezpośrednio w roztworze i zorientowane w polu magnetycznym podczas odparowywania chloroformu z nasyconego roztworu CuTPP w mieszaninie olej parafinowy – chloroform. Uwidocznienie orientacji cząsteczek CuTPP możliwe jest tylko po zamrożeniu roztworu. Przypadek ten zilustrowano na rysunku 5. Po obrocie kapilary z niezamrożonym roztworem (w temperaturze pokojowej) mikrokryształy CuTPP wracają do orientacji zgodnej z kierunkiem działającego w danej chwili pola magnetycznego. Czas powrotu zależy od lepkości rozpuszczalnika i dla oleju parafinowego wynosi kilka sekund.

Pole magnetyczne nie tylko orientuje powstałe (lub powstające) mikrokryształy CuTPP, ale także zwiększa szybkość krystalizacji.

Powyższe dane wskazują na silne oddziaływanie pola magnetycznego z mikrokryształami CuTPP. Powinny być one zatem wciągane w obszar silnego pola magnetycznego i w tym obszarze utrzymywane. Bardzo podobnie zachowuje się też inny paramagnetyczny kompleks tetrafenyloporfiryny, FeTPP [26]. W tym przypadku uwidocznienie krystalizacji i orientacji możliwe jest tylko po zamrożeniu próbki do temperatury poniżej -150°C . W temperaturze pokojowej widmo ERP kompleksu FeTPP nie jest widoczne.

UWAGI KOŃCOWE

- Opisane powyżej badania podstawowe mogą mieć też znaczenie aplikacyjne:
- (1) Poznanie sposobu oddziaływania porfiryn z błoną lipidową jest ważne, gdyż właśnie błony są głównym miejscem ataku fotodynamicznego w fototerapii nowotworów. Jednakże, niewiele jest danych dotyczących tego zagadnienia. W prowadzonych przez inne ośrodki badaniach nad orientacją porfiryn w błonach używano specjalnie w tym celu chemicznie zmodyfikowanych związków [9, 10]. Zastosowane błony były też dalekie od błon biologicznych [10]. Co więcej, badania prowadzono w нефизjologicznych warunkach słabego uwodnienia błon i temperatury ciekłego azotu [9]. Gros i Ehrenberg [8] wykorzystali też metodę gaszenia fluorescencji porfiryn przez znaczniki spinowe do wyznaczenia lokalizacji porfiryn w błonie w fazie ciekłokrystalicznej. Jednakże, praca ta zawierała poważne błędy metodyczne (patrz dyskusja w [27]). Prowadzone przez nas badania [17, 20, 27] dotyczyły błon w fazie ciekłokrystalicznej i utworzonych z lipidów występujących w układach biologicznych. Poznanie orientacji, lokalizacji i agregacji porfiryn w błonie jest niezbędne dla lepszego zrozumienia procesu fotouczulania. Najważniejszym otrzymanym przez nas wynikiem jest wykazanie zależności stężeniowej; przy dużych stężeniach cząsteczki CuTPP agregują w błonie, w efekcie czego ulega zmianie ich orientacja i lokalizacja. Hydrofobowa komponenta stosowanych w fototerapii mieszanin porfiryn powinna zachowywać się w wyżej opisany sposób, to znaczy agregować i zmieniać orientację w błonie. Nasze prace niosą więc pewną wskazówkę (czy też ostrzeżenie) dla lekarzy i innych osób zaangażowanych w badania z tej dziedziny, gdyż akumulacja porfiryn w błonie niekoniecznie musi prowadzić do zwiększenia efektywności procesu fotouczulania.
 - (2) Silne oddziaływanie paramagnetycznych metaloporfiryn z polem magnetycznym sugeruje możliwość wykorzystania pola magnetycznego w celu ukierunkowania transportu porfiryn do fotouczulanego miejsca, którym może być nowotwór, a także zwiększenia efektywności akumulacji porfiryn w obszarze niszczonego nowotworu przez wzmożenie ich krystalizacji. W tym celu wystarczyłoby umieścić silny magnes nad nowotworem, a do krwioobiegu (lub w pobliże nowotworu) wstrzyknąć zawiesinę mikrokryształów paramagnetycznej metaloporfiryny.
 - (3) Anizotropia podatności magnetycznej fosfolipidów wykorzystana została w ostatnich latach do orientacji fragmentów błon lipidowych (*bicelles*) w silnym polu magnetycznym [21]. Skompleksowanie z powierzchnią błony paramagnetycznych jonów metali z grupy lantanowców znacznie wzmacnia ten proces [28]. Wydaje się, że paramagnetyczne kompleksy porfiryn (CuTPP lub FeTPP), które dobrze orientują się w błonie lipidowej, a także wykazują znaczną anizotropię podatności magnetycznej, mogą być wykorzystane do orientacji lipidowej dwuwarstwy w polu magnetycznym. W zależności od stężenia kompleksu możliwe byłoby orientowanie błony prostopadle lub równoległe do linii sił pola. Można przypuszczać, że silne

oddziaływanie CuTPP z polem magnetycznym pozwoli na zorientowanie fragmentów błon (*bicelles*) w polach magnetycznych stosowanych w konwencjonalnej spektroskopii ERP (~3000 G dla pasma X i ~ 12 000 G dla pasma Q).

Zdajemy sobie dobrze sprawę z niedostatków naszych „aplikacyjnych” rozważań. Stosowane w fototerapii porfiryny albo nie zawierają żadnych jonów metali lub zawierają jony diamagnetyczne. Obecność paramagnetycznego jonu w pierścieniu porfiryńowym znacznie skraca czas życia stanów wzbudzonych porfiryń, a co za tym idzie, zmniejsza efektywność ich fotodynamicznego działania. Wydaje się jednak, że wnioski z punktu (1) dotyczące CuTPP można też przenieść i na inne porfiryny, gdyż proces agregacji jest charakterystyczny dla wszystkich porfiryń. Omówiony w punkcie (2) indukowany polem magnetycznym ukierunkowany transport oraz akumulacja CuTPP nie zachodzi dla porfiryń diamagnetycznych. Wydaje się, że stosowane w fototerapii mieszaniny porfiryń można dotować pewną ilością porfiryńowych kompleksów miedzi lub żelaza. Pozwoliłoby to wykorzystać paramagnetyczną składową jako „ciągnącą” i zapoczątkowującą krystalizację (tworzącą zarodki krystalizacji w polu magnetycznym), podczas gdy diamagnetyczna składowa działałaby fotouczulająco. Mieszaniny porfiryń powinny być wprowadzane do organizmu w formie mikrokryształów zawierających „wystarczającą” ilość jednakowo zorientowanych paramagnetycznych kompleksów. Makroskopowa anizotropia podatności magnetycznej agregatów przypadkowo zorientowanych cząsteczek zanika. Omówione w punkcie (3) zastosowania wymagają jedynie sprawdzenia, jaka jest niezbędna ilość jednakowo zorientowanych cząsteczek CuTPP lub FeTPP we fragmentach błon (*bicelles*) do ich orientacji w polu magnetycznym.

LITERATURA

- [1] ANTHOLINA WE, SUBCZYŃSKI WK, HYDE JS, PETERING DH. A model study for transport of metallodrugs within lipid bilayers. [w] Soreson JRJ [red.] *Biology of Copper Complexes*. Clifton: Humana Press 1987: 493–500.
- [2] ASSOUR JM. Electron spin resonance of tetraphenylporphine chelates. *J Chem Phys* 1965; **43**: 2477–2489.
- [3] BROWN SB, VERNON DI. The quantitative determination of porphyrins in tissue and body fluids: applications in studies of photodynamic therapy. [w] Kessel D [red.] *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease*, Boca Rotan: CRC Press 1970: 109–129.
- [4] DOUGHERTY TJ. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 1986; **45**: 879–889.
- [5] DOUGHERTY TJ, KAUFMAN JE, GOLDFARB A, WEISHAUPT KR, BOYLE D, MITTLEMAN A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978; **38**: 2628–2635.
- [6] FLEISCHER EB, MILLER CK, WEBB LE. Crystal and molecular structures of some tetraphenylporphines. *J Am Chem Soc* 1964; **86**: 2342–2347.
- [7] GOMER CJ, DOUGHERTY TJ. Determination of ³H and ¹⁴C hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res* 1979; **39**: 146–151.

- [8] GROSS E, EHRENBERG B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1989; **983**: 118–122.
- [9] GROVES JT, NEUMANN R. Regioselective oxidation catalysis in synthetic phospholipid vesicles. Membrane-spanning steroidal metalloporphyrins. *J Am Chem Soc* 1989; **111**: 2900–2909.
- [10] ISHIKAWA Y, KUNITAKET. Design of spatial disposition of anionic porphyrins in matrices of ammonium bilayer membranes. *J Am Chem Soc* 1991; **113**: 621–630.
- [11] KESSEL D. Hematoporphyrin and HPD: photophysics, photochemistry and phototherapy. *Photochem Photobiol* 1984; **39**: 851–859.
- [12] MALIK Z, DJALDETTI M. Destruction of erythroleukemia, myeloma, leukemia and Burkitt lymphoma cells by photoactivated protoporphyrin. *Int J Cancer* 1980; **26**: 495–500.
- [13] MANOHARAN PT, ROGERS MT. ESR study of copper(II) and silver(II) tetraphenylporphyrin [w] Yen TF [red.] Electron Spin Resonance of Metal Complexes. New York: Plenum Press 1969: 143–173.
- [14] MATHIAS CJ, GREEN MA, MORRISON WB, KNAPP DW. Evaluation of CuPTSM as a tracer of tumor perfusion: comparison with labeled microspheres in spontaneous canine neoplasms. *Nucl Med Biol* 1994; **21**: 83–87.
- [15] PASENKIEWICZ-GIERULA M, ANTHOLINE WE, SUBCZYNSKI WK, BAFFA O, HYDE JS, PETERING DH. Assessment of the ESR spectra of CuKTSM₂. *Inorg Chem* 1987; **26**: 3945–3949.
- [16] PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Dynamics of cupric bithiosemicarbazone complex in solution and in oriented artificial membrane. [w] Proc 2nd Symp Inorg Biochem Mol Biophys. Wrocław 1989: 94–98.
- [17] PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Rotational motion of square planar copper complexes in solution and phospholipid bilayer membranes. *J Phys Chem* 1997; **101**: 5596–5606.
- [18] PETERING DH, PETERING HG. Metal chelates of 3-ethoxy-2-oxobutyraldehyde bis(thiosemicarbazone), H₂KTS [w] Scartorelli AC, Johns DG [red.] Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer 1975: 841–876.
- [19] PEZESHK A, PEZESHK V, SUBCZYNSKI WK. Orientational and motional properties of copper(II) complexes of dibenzotetraaza (14) annulenes in lipid bilayers: an ESR study. *J Inorg Biochem* 1991; **44**: 47–53.
- [20] PEZESHK A, PASENKIEWICZ-GIERULA M, SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE. Motional properties of copper(II) tetraphenylporphyrin and copper(II) hematoporphyrin IX in lipid bilayers: an ESR study. *J Phys Chem* 1990; **94**: 451–456.
- [21] SANDERS CR, SCHWONEK JP. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixture of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* 1992; **31**: 8898–8905.
- [22] SCHMITT TH, FREZZETTI WJ, SCHREIER S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys* 1993; **307**: 69–103.
- [23] SIEBER F. Merocyanine 540. *Photochem Photobiol* 1987; **46**: 1035–1042.
- [24] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, HYDE JS, KUSUMI A. Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structure of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of copper complex in the membrane. *Biochemistry* 1990; **29**: 7936–7945.
- [25] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, HYDE JS, PETERING DH. Orientation and mobility of copper square planar complex in a lipid bilayer. *J Am Chem Soc* 1987; **109**: 46–52.
- [26] SUBCZYNSKI WK, ANTHOLINE WE, PASENKIEWICZ-GIERULA M, HYDE JS. Magnetic field oriented crystallization of CuTPP. 22nd International EPR Symposium, Denver, USA 1999 Abstract No. 93.

- [27] SUBCZYŃSKI WK, PASENKIEWICZ-GIERULA M, ANTHOLINE WE, HYDE JS. Oriented self-association of copper(II) tetraphenylporphine in liquid-crystalline lipid bilayer membranes: an EPR study. *J Am Chem Soc* 1999; **121**: 4054–4059.
- [28] VOLD RR, PROSSER RS. Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *J Magn Reson B* 1996; **113**: 267–271.
- [29] WHITE WI. Aggregation of porphyrins and metalloporphyrins [w] Dolpin D [red.] *The Porphyrins*. New York: Academic Press 1978: 303–339.
- [30] YUAN H, ANTHOLINE WE, SUBCZYŃSKI WK, GHREEN MA. Release of CuPTSM from human serum albumin after addition of fatty acids. *J Inorg Biochem* 1996; **61**: 251–259.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

MOLECULAR SIMULATION STUDIES OF THE INTERFACIAL REGION IN LIPID BILAYERS

BADANIA OBSZARU INTERFAZY W BŁONACH LIPIDOWYCH
METODĄ SYMULACJI DYNAMIKI MOLEKULARNEJ

Marta PASENKIEWICZ-GIERULA, Tomasz RÓG, Krzysztof MURZYN

Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków

Summary: The structure and the dynamics of the membrane/water interface in pure dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and DMPC-cholesterol (DMPC-Chol) bilayers were studied using a molecular dynamics (MD) simulation method. In this region, an extended network of interactions among polar groups of lipid and water is formed. In the DMPC bilayer, these interactions involve 1) water cross-bridges between negatively charged oxygen atoms of PCs, which link 76% of DMPC molecules in the membrane, 2) charge pairs between positively and negatively charged groups of PCs, which link 93% of DMPC molecules in the membrane. Water bridges and charge pairs together link 98% of all membrane phospholipids at any instant. At the DMPC-Chol bilayer interface, in addition to the PC-PC links, 1) direct hydrogen bonds, 2) water bridges, and 3) charge pairs between PC polar groups and γ Chol are formed. PC-PC and PC-Chol links involve at any instant 97.5% of DMPC and 70% of Chol molecules. Average lifetimes of PC-PC and PC-Chol associations are 1 ns or more. These associations are dynamic and they temporarily break and re-form several times during their lifetime.

(Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 297–303)

Key words: phosphatidylcholine, cholesterol, hydrogen bonds, water bridges, charge pairs, molecular dynamics

Streszczenie: Badania struktury i dynamiki interfazy błona/woda w czystej błonie dimyrystynowo-fosfatydocholiny (DMPC) oraz błonie mieszanej DMPC-cholesterol (Chol), prowadzono metodą symulacji dynamiki molekularnej. W rejonie interfazy, grupy polarne lipidów i wody tworzą rozległą sieć połączeń. W błonie DMPC, połączenia są wynikiem oddziaływań: 1) poprzez cząsteczkę wody, która równocześnie tworzy wiązania wodorowe z dwoma ujemnie naładowanymi atomami tlenu PC (pomosty wodne), łączą one 76% cząsteczek DMPC; 2) między dodatnio naładowaną grupą cholinową i ujemnie naładowanym atomem tlenu PC (pary ładunkowe), łączą one 93% cząsteczek DMPC. W każdej chwili, 98% wszystkich cząsteczek DMPC w błonie jest połączonych poprzez pomosty wodne i/lub pary ładunkowe. W obszarze interfazy błony DMPC-Chol, oprócz połączeń PC-PC, występują także analogiczne połączenia PC-Chol poprzez 1) pomosty wodne, 2) pary ładunkowe, 3) bezpośrednie wiązania

wodorowe. W połączeniach tych bierze udział ~98% cząsteczek DMPC oraz 70% cząsteczek Chol. Średnie czasy życia połączeń są rzędu 1 ns lub dłuższe; połączenia te mają charakter dynamiczny i w czasie życia podlegają chwilowym zerwaniom.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 297–303)

Słowa kluczowe: fosfatydylocholina, cholesterol, wiązania wodorowe, pomosty wodne, pary ładunkowe, dynamika molekularna

INTRODUCTION

Biological membranes are multi-component systems. Their main structural element is a liquid-crystalline lipid bilayer. Other constituents i.e., proteins, sterols, peptides, either intercalate into or loosely attach to the bilayer. The most prevalent molecule that makes up a liquid-crystalline bilayer of eukaryotic cell membranes is phosphatidylcholine (PC). Cholesterol (Chol) often amounts to 50 mol% of the lipids in plasma membranes of these cells. Physico-chemical and biophysical properties that are common to the membranes can be explored by studying the lipid bilayers (model membranes). A molecular dynamics (MD) simulation method is well suited for this purpose because it gives atomic resolution and spans of the observation time (on the time scale of 10^{-8} – 10^{-7} s) by a few femtosecond steps.

PC and Chol are amphiphilic molecules that contain distinctly polar and hydrophobic parts. A PC polar part is called headgroup and it contains groups that are positively and negatively charged, whereas its net electrostatic charge is zero. Representative negatively charged groups of PC include the nonester phosphate oxygen atoms (Op) and the carbonyl oxygen atoms in the ester linkages between glycerol and acyl chains (Oc). The positively charged group is the choline moiety. A Chol polar group is the hydroxyl group (OH-Chol).

In the bilayer, the polar groups of PC and Chol are exposed to the water phase and participate in the formation of a multi-component region of the membrane/water interface (Figs 1 and 2). A MD simulation was applied to elucidate the structure and dynamics of the interfacial region in pure dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) [1, 2] and DMPC-Chol [3] bilayers. Due to its complex architecture and dynamic character, the region is particularly difficult to investigate by experimental and theoretical methods, so its contribution to the membrane integrity, stability and functioning has not been well determined so far.

BILAYER MODELS

Computer models of the pure PC bilayer consisted of 72 DMPC and 1622 water molecules (~23 water molecules/DMPC), and of the PC-Chol bilayer consisted of 56 DMPC, 16 Chol (~22 mol% of Chol) and 1622 water molecules. The models were simulated using AMBER 4.0 [4] for the total time of 5 and 4.3 ns, respectively.

Details concerning the construction and equilibration of pure DMPC and DMPC-Chol bilayers have been described in papers [1, 2] and [3], respectively.

STRUCTURAL PROPERTIES OF THE INTERFACE

The pure DMPC bilayer equilibrated within 2 ns [2], and the DMPC-Chol bilayer within 2.3 ns [3]. Thus 3-ns (pure PC) and 2-ns (PC-Chol) MD trajectories generated after the bilayers had reached thermal equilibrium, were used for analyses. The primary aim of the analyses was to investigate short-distance interactions among polar groups of PC, Chol, and water in the interfacial region of the membrane.

In the liquid crystalline DMPC bilayer, each DMPC makes, on average, 5.4 hydrogen (H) bonds with water, but only 4.5 water molecules are H bonded to each DMPC [1, 2]. In the DMPC-Chol bilayer, the average number of H bonds with water/DMPC is 5.7, and that of H bonded water molecules/DMPC is 4.8, thus is ~7% higher than in the pure DMPC membrane [3]. In both membranes, approximately 20% of H bonded water molecules are simultaneously bonded to oxygen atoms of two DMPCs and make water bridges. However, in the bilayer containing 22 mol% Chol, the number of intermolecular water bridges is by ~12% lower than in the pure DMPC bilayer. These bridges link 76 and 64% of DMPCs in pure DMPC and DMPC-Chol bilayers, respectively.

Negatively charged phosphate or carbonyl oxygen atoms of one PC and positively charged methyl groups of the choline moiety (N-CH₃) of another PC interact directly via Coulomb attraction and form relatively stable charge pairs [2]. In the DMPC-Chol bilayer, the number of intermolecular charge pairs is by ~20% lower than that in the pure DMPC bilayer. Charge pairing involves 93 and 91% of DMPCs in pure DMPC and DMPC-Chol bilayers, respectively.

DMPC-DMPC associations *via* both water bridges and charge pairs link 98 and 96% of DMPCs in pure DMPC and DMPC-Chol bilayers, respectively at any instant. On average, each DMPC molecule makes 2.7 and 2.2 links with other DMPCs in pure DMPC and DMPC-Chol bilayers, respectively.

At the interface of the DMPC-Chol bilayer, Chol makes 1.1 H bonds with water molecules, of which 0.5 are bridging H bonds. They link OH-Chol with carbonyl or nonester phosphate oxygen atoms of DMPC. Chol and DMPC can also be linked via charge pairs between OH-Chol and N-CH₃, and direct H bonds between OH-Chol and carbonyl or nonester phosphate oxygen atoms of DMPC. Consequently, 70% of Chol molecules are linked to 21% of DMPC molecules in the membrane at any instant. On average, a Chol molecule forms 0.9 links with DMPC molecules, while a DMPC molecule forms 2.2 and 0.3 links with DMPC and Chol molecules, respectively. Thus, in the DMPC-Chol bilayer, 97.5% of DMPC molecules are linked to either DMPC or Chol. When both DMPC-DMPC and DMPC-Chol links are included, then the average number of links formed by each DMPC molecule

is 2.5/DMPC. Because Chol forms far fewer links, the overall average of intermolecular links/lipid decreases to 1.9 in the DMPC membrane containing 22 mol% Chol.

DYNAMIC PROPERTIES OF THE INTERFACE

At the membrane/water interface, the polar groups of lipids interact via water bridges and charge-pairs, and, in the case of PC-Chol bilayers, direct H bonds. These pair-interactions between groups have relatively short lifetimes, about 50 ps for water bridges, 150 ps for charge pairs, and 70 ps for PC-Chol H bonds. However, in most cases, more than one polar group in one lipid molecules simultaneously interact with more than one polar group in another lipid molecule; also, if one water bridge or charge pair breaks then it is readily replaced by another one, thus inter-lipid associations have much longer lifetimes than individual pairs of groups. In the pure DMPC bilayer, the average lifetime of DMPC-DMPC associations via charge pairs, water bridges and both, are at least 730, 1400, and over 1500 ps, respectively. In the presence of 22 mol% Chol, these lifetimes are decreased by ~20%. The average lifetime of DMPC-Chol association is 920 ps. As was shown in the previous section, these inter-lipid links form extended networks of interactions, involving, on average, 98% of all membrane lipids. Nevertheless, PC-PC and PC-Chol associations are dynamic and they break and re-form several times during their lifetime. On average, 70% of Chol molecules are linked to DMPCs at any instant, however, transient DMPC-Chol associations involve all Chol molecules in the membrane. During the analysis time of 2.0 ns, every Chol molecule has been associated with a DMPC for at least 20% of this time and on average, for 70% of this time.

CONCLUSIONS

Our MD simulation studies of the membrane/water interface in pure DMPC [1, 2] and DMPC-Chol [3] bilayers indicate that DMPC and Chol headgroups are linked by water molecules (water bridges) and direct Coulomb attraction (charge pairs). Furthermore, DMPC and Chol interact via direct H bonds, which do not take place between PC headgroups. In both bilayers, ~98% of the lipid molecules are linked via these interactions which form an extended network. However, in the DMPC-Chol bilayer, the average number of interlipid links is 1.9/lipid (either DMPC or Chol), while in the pure DMPC bilayer, it is 2.7/lipid. This indicates that the network of interlipid links in both pure and PC-Chol bilayer, involves almost all membrane molecules, however, in the PC-Chol bilayer, it is less branched. The reasons for that is that Chol is often an „end” molecule in the lipid-lipid

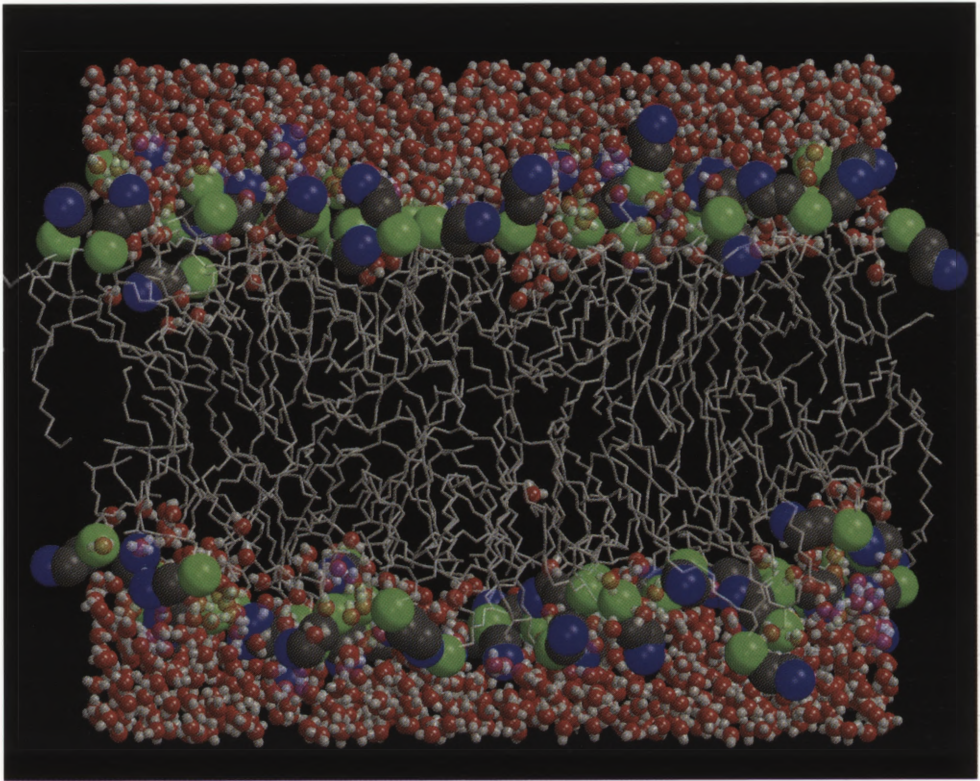


FIGURE 1. Hydrated DMPC bilayer membrane in the liquid-crystalline phase. The DMPC hydrocarbon chains form a hydrophobic core of the bilayer. The polar groups of DMPCs and water molecules form a membrane/water interface. The phosphate and the choline groups are green and blue, respectively, and the carbon atoms of the α -chain are grey. All membrane water molecules are shown, as the CPK model of the reduced size



FIGURE 2. DMPC-cholesterol bilayer membrane. The cholesterol molecules are shown as yellow sticks, the cholesterol hydroxyl group is shown in standard colours as the CPK model. The oxygen atoms of DMPC molecule are red. Only water molecules that are hydrogen bonded to DMPCs are included

network, and also, the average distance between PC headgroups is larger in the DMPC-Chol bilayer than in the pure one due to the spacing effect of Chol. These results agree with experimental data [5].

The network of lipid-lipid links in the interfacial region of PC and PC-Chol bilayers observed in MD simulations, has been postulated to make a preferential pathway for proton diffusion along the membrane [6].

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant 6P04A05715 from the Polish Committee for Scientific Research.

REFERENCES

- [1] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MIYAGAWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: location, geometry, and lipid-lipid bridging via hydrogen-bonded water. *J Phys Chem* 1997; **101**: 3677–3691.
- [2] PASENKIEWICZ-GIERULA M, TAKAOKA Y, MIYAGAWA H, KITAMURA K, KUSUMI A. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes. A molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 1999; **76**: 1228–1240.
- [3] PASENKIEWICZ-GIERULA M, RÓG T, KITAMURA K, KUSUMI A. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study. *Biophys J* 2000; **78**: 1376–1389.
- [4] PEARLMAN DA, CASE DA, CALDWELL JC, SEIBEL GL, SINGH UC, WEINER PK, KOLLMAN PA. AMBER 4.0. University of California, San Francisco. 1991.
- [5] SLATER SJ, HO C, TADDEO FJ, KELLY MB, STUBBS CD. Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol. *Biochemistry* 1993; **32**: 3714–3721.
- [6] TEISSIE J, PRATS M, LEMASSU A, STEWART LC, KATES M. Lateral proton conduction in monolayers of phospholipids from extreme halophiles. *Biochemistry* 1990; **29**: 59–65.

Authors' address: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3, Poland
E-mail: mpg@mol.uj.edu.pl.

METODA SYMULOWANEGO WYŻARZANIA – ZASTOSOWANIE DO BADANIA STRUKTURY I DYNAMIKI BIAŁEK*

SIMULATED ANNEALING METHOD – AN APPLICATION TO INVESTIGATE STRUCTURE AND DYNAMICS OF PROTEINS

Grzegorz JEZERSKI, Marta PASENKIEWICZ-GIERULA

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Symulowane wyżarzanie jest metodą obliczeniową, stosowaną zarówno w procesie rozwiązywania struktury biocząsteczek, jak również w modelowaniu struktury i dynamiki tych związków. Metoda ta stanowi wariant symulacji dynamiki molekularnej i jako taka zakłada klasyczne traktowanie atomów w badanym układzie. Stosuje się tutaj dodatkowe techniki pozwalające na lepszą penetrację przestrzeni konfiguracyjnej układu, m.in. podwyższenie temperatury. W pracy badano wpływ wymiany aminokwasu w antytrypsynie na strukturę jego mikrootoczenia i dynamikę całej cząsteczki białka. Podano także przykłady zastosowania tej metody w projektowaniu leków. Omówiono wady i zalety metody oraz wskazano na inne zastosowania, np. symulację związania białek. Praca oparta jest na wynikach badań własnych oraz na danych literaturowych pochodzących głównie z ostatnich dziesięciu lat i stanowiących ilustrację nowych trendów w dziedzinie symulacji białek metodami symulacji komputerowej.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 305–317)

Słowa kluczowe: modelowanie molekularne, symulacja dynamiki molekularnej, projektowanie leków, struktura białek, α_1 -antytrypsyna, kąty ψ i ϕ

Summary: Simulated annealing is a method applied to solve structures of biomolecules, as well as for modelling the structure and dynamics of these compounds. This method is a variation of a molecular dynamics method, and as such, it assumes classical treatment of atoms. Additional techniques, such as increasing temperature in a model system, which allow for better penetration of configurational space, are applied. The simulation of the influence of an aminoacid exchange in antitrypsin on the structure in

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, nr projektu badawczego 4 P05A 081 14. Obliczenia opisane w rozdziałach 3.1 i 3.2 wykonano w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego Uniwersytetu Warszawskiego.

the aminoacid's vicinity and on the dynamics of the protein has been investigated. Advantages and disadvantages of the method have been discussed; examples of applications of the method in drug design are given, eg. simulation of protein folding. This paper describes original and cited results, published mainly during the last decade and reflecting new trends in the field of protein simulation by means of computer simulation.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 305–317*)

Keywords: molecular modelling, molecular dynamics simulation, drug design, protein structure, α_1 -antitrypsin, ψ and ϕ angles

Wykaz skrótów: **AMBER** – *Assisted Model Building for Energy Refinement*; **HIV** – *Human Immunodeficiency Virus*; **NMR** – *Nuclear Magnetic Resonance*; **OPLS** – *Optimized Potentials for Liquid Simulations*; **RMSD** – *Root Mean Square Displacement*; **VAC** – *N,N-bis(2(R)-hydroxy-1(S)-indanyl)-2,6-(R,R)-diphenylmethyl-4-hydroxy-1,7-heptandiamide*.

1. WSTĘP

Symulacja dynamiki molekularnej jest metodą obliczeniową wykorzystywaną do badania struktury i dynamiki biocząsteczek, począwszy od końca lat siedemdziesiątych [14, 24]. Wariantem tej metody jest symulowane wyżarzanie (ang. *simulated annealing*). Jest to metoda optymalizacji, zastosowana po raz pierwszy przez Kirkpatricka [16] do rozwiązywania „problemu komiwojażera”¹ i wywodzi się z metody Monte Carlo.

Metoda Monte Carlo polega na losowaniu konfiguracji w danym układzie – przestrzeni konfiguracyjnej, a następnie weryfikacji uzyskanych konfiguracji określonymi metodami tak, aby uzyskać zbiór konfiguracji „najlepszych” pod względem żądanego kryterium [26]. Przykładem zastosowania metody Monte Carlo w biologii strukturalnej jest analiza stabilnych konformacji cząsteczki podczas zwijania białka [20].

Ideą metody symulowanego wyżarzania jest osiągnięcie stanu podstawowego badanego układu (np. modelowej cząsteczki białka) reprezentowanego z reguły przez globalne minimum energii potencjalnej. Procedura dochodzenia do stanu podstawowego odbywa się poprzez penetrację przestrzeni konfiguracyjnej układu, którą w przypadku białek stanowi zbiór dozwolonych konformerów.

Zastosowania metody Kirkpatricka do modelowania białek okazały się skuteczne w ich badaniu zarówno metodami rentgenograficznymi [4, 15], jak i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [5, 9, 30].

¹Problem komiwojażera polega na wyznaczeniu najkrótszej drogi przechodzącej dokładnie raz przez każde miasto ze zbioru N miast (punktów przestrzeni fazowej), przy czym punkt początkowy i końcowy drogi leży w tym samym mieście [31].

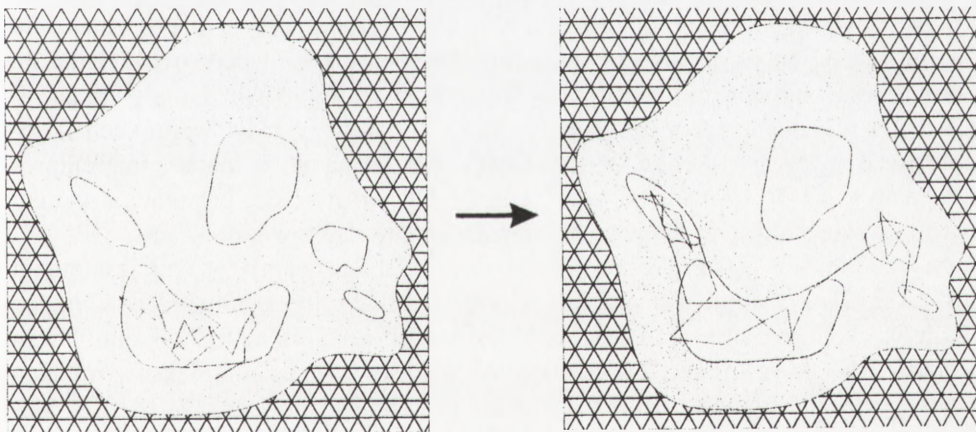
2. METODA SYMULOWANEGO WYŻARZANIA

Symulacja dynamiki molekularnej polega na wyznaczaniu trajektorii zbioru cząstek w przestrzeni przez obliczanie położeń i prędkości wszystkich atomów w kolejnych krokach czasowych (iteracjach)². Symulowane wyżarzanie jest wariantem symulacji dynamiki molekularnej, w którym zmieniamy parametry obliczeń tak, aby układ osiągnął większą „swobodę”. W istocie więc, modyfikujemy trajektorię układu. Modyfikację trajektorii $\Gamma(t)$ atomów w układzie można wyrazić wzorem:

$$\hat{O}\Gamma(t) = \Gamma'(t) \quad (2-1)$$

gdzie: operator \hat{O} oznacza skalowanie pewnych parametrów symulacji; są to najczęściej: zmiana (głównie zwiększenie) temperatury układu według zadanego profilu czasowego, zmniejszenie masy atomów bądź modyfikacja funkcji potencjału. Otrzymana trajektoria $\Gamma'(t)$ różni się od $\Gamma(t)$ zdolnością penetracji przestrzeni konfiguracyjnej. Różnice w trajektoriach przedstawiono na rysunku 1. Prócz tego, w obliczeniach metodą symulowanego wyżarzania nie stosuje się rozpuszczalnika *explicit*, a jedynie modelowanie uśrednionego efektu rozpuszczalnika.

Wykorzystywane w symulowanym wyżarzaniu białek techniki zapobiegają „zniszczeniu” modelu białka. W tym celu nakłada się więzy, czyli dodatkowy potencjał „ograniczający” (ang. *restraints*) na niektóre odcinki łańcucha polipeptydowego.



RYSUNEK 1. Przykładowe trajektorie cząstki w symulacjach: dynamiki molekularnej i symulowanego wyżarzania (odpowiednio: kwadrat po lewej i prawej stronie): Jasne obszary oznaczają fragmenty przestrzeni konfiguracyjnej o niskiej energii potencjalnej; ciemniejsze – wysokiej (bariera potencjału). Pozostały obszar jest zabroniony dla cząstki. Widoczna jest różnica w zdolności penetracji przestrzeni konfiguracyjnej przez obie techniki

²Podstawy dynamiki molekularnej zostały przystępnie omówione w [11]; szersze omówienie znajduje się w pracy [19].

W przypadku symulacji opisanych w rozdziale 3.2 technikę tę zastosowano, aby zachować trzeciorzędową i w większości przypadków drugorzędową strukturę białka, nie zaburzając jednocześnie swobodnych ruchów cząsteczki. Technika ta oraz techniki jej pokrewne są powszechnie stosowane przy określaniu struktury przestrzennej białek [21].

Metoda symulowanego wyżarzania pozwala na skuteczniejszą penetrację przestrzeni konfiguracyjnej niż symulacja dynamiki molekularnej bez zastosowania wyżej wspomnianych modyfikacji parametrów symulacji lub układu. Symulowane wyżarzanie stosowane jest do rozwiązywania następujących problemów:

- Udokładnianie struktury białka otrzymanej z widma NMR bądź dyfraktogramu (patrz rozdz. 1).
- Wpływ mutacji aminokwasowej na strukturę i dynamikę białka (patrz rozdz. 3).
- Projektowanie leków (patrz rozdz. 4).
- Symulacja zwijania białek [25, 27].
- Przewidywanie struktury białka i tworzenie mapy energii potencjalnej cząsteczki [21, 34].

3. SYMULACJA MUTACJI W ANTYTRYPSYNIE

3.1. Antytrypsyna – struktura i mutacja Z

Ludzka α_1 -antytrypsyna (α_1 PI, α_1 -antyproteinaza) jest inhibitorem proteaz serynowych należącym do grupy serpin [8, 29]. Cechy strukturalne o dużym znaczeniu dla funkcji α_1 -antytrypsyny to: eksponowana do roztworu pętla reaktywna, na której mieści się centrum reakcji inhibicji, duży arkusz β (A) i mały arkusz β (C). Pętla reaktywna łączy arkusze A i C [7, 22]. Białko to w warunkach fizjologicznych występuje w kilku konformacjach. Konformacja zdolna do inhibicji proteazy nazywana jest formą natywną; istnieje również forma cięta, powstała w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego w łańcuchu pętli reaktywnej.

Najczęściej występującą formą patologiczną ludzkiej α_1 -antytrypsyny jest mutant Z – Glu342Lys. Mutacja ta implikuje brak mostka solnego Glu342-Lys290, co z kolei powoduje polimeryzację cząsteczek białka. Badania metodami fluorescencyjnymi dowodzą istnienia dwóch mechanizmów tworzenia kompleksów mutantu antytrypsyny, jak również istnienia stadium pośredniego dimeru [17, 18, 23]. Mechanizm agregacji cząsteczek pozostaje jednak nieznan. Istotne jest więc zbadanie wpływu mutacji Glu342Lys na strukturę i dynamikę antytrypsyny; zastosowanie technik obliczeniowych jest tu korzystne ze względu na ograniczone możliwości

³Użyty został termin „dziki typ” będący bezpośrednim tłumaczeniem terminu *wild type*, spotykane w literaturze anglojęzycznej.

badania agregatów tego białka przy pomocy technik rezonansowych czy dyfrakcyjnych.

3.2. Procedura symulowanego wyżarzania

W strukturze krystalicznej α_1 -antytrypsyny rozwiązanej przez Elliotta i wsp. [7] dokonano wymiany kwasu glutaminowego 342 na lizynę. W celu uzyskania struktury wyjściowej do symulacji przeprowadzono minimalizację energii obu modeli białka: mutantu Z oraz dzikiego typu³, który stanowi strukturę odniesienia.

W celu wygenerowania struktur dynamicznych białka, modele otrzymane po minimalizacji energii poddano symulowanemu wyżarzaniu. W symulacjach stosowano klasyczne pole siłowe OPLS [13]; obliczenia przeprowadzono programem AMBER4.1 [28]. Temperaturę kontrolowano metodą Berendsena [2]. Środowisko wodne imitowano stosując zależną od odległości „stałą” dielektryczną w potencjale kulombowskim. Postępowanie takie, w przypadku symulowanego wyżarzania, pozwala uniknąć destabilizacji struktury białka na skutek oddziaływania z cząsteczkami wody w temperaturze znacznie wyższej niż fizjologiczna.

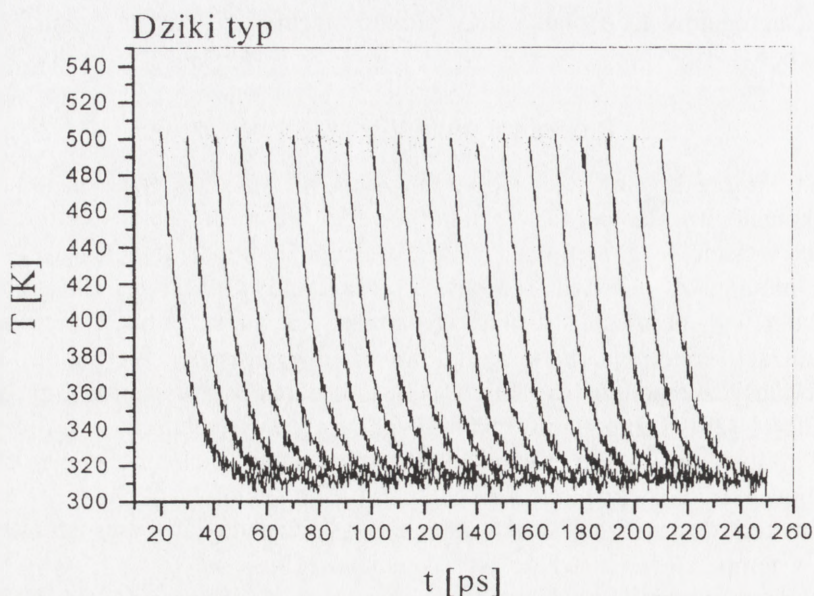
Symulacja dynamiki molekularnej obu modeli α_1 -antytrypsyny składała się z trzech etapów:

- A. Podgrzewanie: temperatura układu została liniowo w czasie zwiększona od 10 K do 500 K (czas symulacji: 10 ps).
- B. Dynamika wysokotemperaturowa: utrzymywano stałą temperaturę 500 K (czas symulacji: 200 ps).
- C. Schładzanie: otrzymywaną co 10 ps podczas symulacji wysokotemperaturowej (etap B) strukturę dynamiczną białka poddawano symulacji przy jednoczesnym eksponencjalnym obniżaniu temperatury. Końcowy odcinek tego etapu symulacji pozwala na „równoważenie” struktury w temperaturze bliskiej fizjologicznej. W ten sposób otrzymano 20 struktur pośrednich.

Wykres temperatury białka w funkcji czasu symulacji dla etapów symulacji B i C przedstawiono na rysunku 2.

Zależność energii całkowitej dla dzikiego typu i mutantu od czasu symulacji wysokotemperaturowej (etap B) przedstawiono na rysunkach 3a i b. Zależności te dla obu form białka wykazują znaczne różnice, pomimo że wymieniono jedynie jedną resztę aminokwasową w białku zawierającym 375 reszt. Wykresy zależności energii całkowitej i kinetycznej⁴ od czasu symulacji w procesie schładzania (etap C) przedstawiono na rysunkach 3c i d.

⁴Temperatura jednoatomowego gazu doskonałego jest wprost proporcjonalna do średniej energii kinetycznej cząstek tego gazu; taki gaz jednak w przyrodzie nie występuje [1]. W symulacjach białek przyjmuje się, że temperaturę można obliczać opierając się na teorii gazu doskonałego, jest to więc wartość przybliżona.



RYSUNEK 2. Zależność temperatury od czasu w symulacji dzikiego typu. Wykres odnosi się do etapu dynamiki wysokotemperaturowej (jasna linia) oraz 20 cykli schładzania do temperatury fizjologicznej (ciemna linia)

3.3. Optymalizacja struktur otrzymanych podczas symulowanego wyżarzania

Struktury białka otrzymane w wyniku symulowanego wyżarzania poddano minimalizacji energii w celu otrzymania bardziej optymalnych (stabilnych) konformacji. Spośród zoptymalizowanych modeli wybrano ten, który charakteryzował się najniższą wartością energii potencjalnej i jej gradientu. Dla typu dzikiego otrzymano ją po 230 ps symulacji, a dla mutantu – po 190 ps.

Porównanie struktur zoptymalizowanych dzikiego typu i mutantu wskazuje na ich znaczną rozbieżność jedynie w obszarze Lys290 i fragmencie pętli reaktywnej (rys. 4), co wynika z braku przyciągania elektrostatycznego między resztami Lys342 i Lys290 w białku zmutowanym. Stanowi to podstawę dla hipotezy, że zmiana wywołana tą mutacją ma charakter głównie dynamiczny. Modyfikacji ulega stopień ruchliwości poszczególnych aminokwasów, jak również zmienia się skład domen wykazujących kolektywne ruchy. Struktury krystaliczne zarówno mutantów α_1 -antytrypsyny w formie natywnej [7, 32], jak i polimerów tego białka w formie ciętej [8, 10] wykazują niewielkie rozbieżności strukturalne. Nie dostarczają one jednak informacji odnośnie różnic w dynamice dzikiego typu i mutantów.

3.4. Analiza przeprowadzonych symulacji

Z przeprowadzonej analizy mikrootoczenia Lys290 w α_1 -antytrypsynie wynika, że w typie dzikim oddziaływanie przyciągające Glu342Lys jest trwałe w trakcie dynamiki w temperaturze 500 K, w przeciwieństwie do mutantu Z [12]. Obliczono również wartości RMSD (ang. *Root Mean Square Displacement*) między strukturami otrzymanymi w kolejnych cyklach schładzania (etap C), a następnie zoptymalizowanymi. Analiza ta dostarcza informacji o stopniu zróżnicowania struktur otrzymywanych w kolejnych cyklach symulacji. Jak wynika z tej analizy, struktury o niskim stopniu zróżnicowania względem struktur otrzymywanych w innych cyklach symulacji korespondują ze strukturami zoptymalizowanymi o najniższej energii.

Badanie modelu mutantu Z ludzkiej α_1 -antytrypsyny metodą symulowanego wyżarzania wykazało efekt zmian w energii cząsteczki (a więc i w jej stabilności), indukowanych zerwaniem „mostka solnego” Glu342Lys.

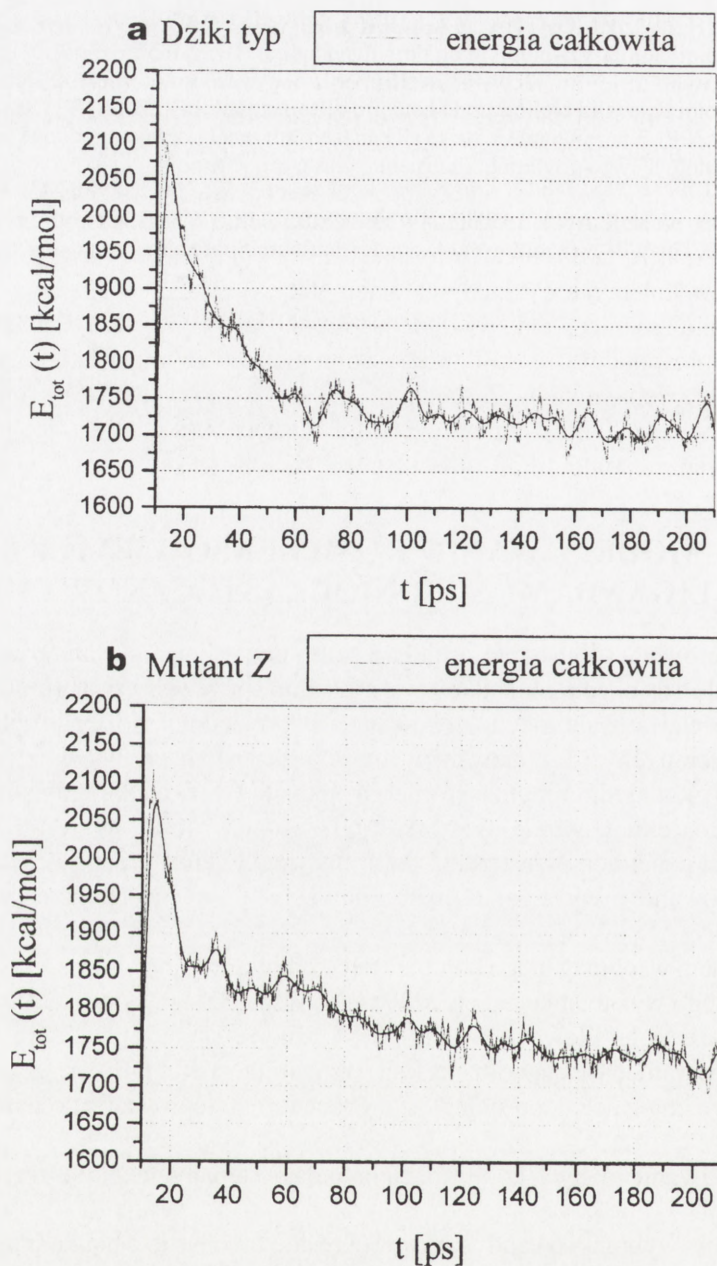
4. MODELOWANIE KOMPLEKSÓW BIAŁKA Z LIGANDAMI ŚREDNIOCZĄSTECZKOWYMI

Komputerowo wspomagane projektowanie leków (ang. *Computer Aided Drug Design*) stało się obecnie standardową procedurą przy wytwarzaniu nowego leku [3]. Najczęściej stosuje się tu dokowanie⁵ odpowiedniej liczby proponowanych struktur wybranych z baz danych w miejscu aktywnym białka oraz metody obliczeniowe, głównie minimalizację energii. Jednak w przypadku, gdy struktura proponowanego leku (liganda) jest skomplikowana, konieczne jest zwiększenie skuteczności penetracji przestrzeni konformacyjnej liganda przez zastosowanie metody symulowanego wyżarzania (mamy do czynienia z większą potencjalną liczbą konformacji).

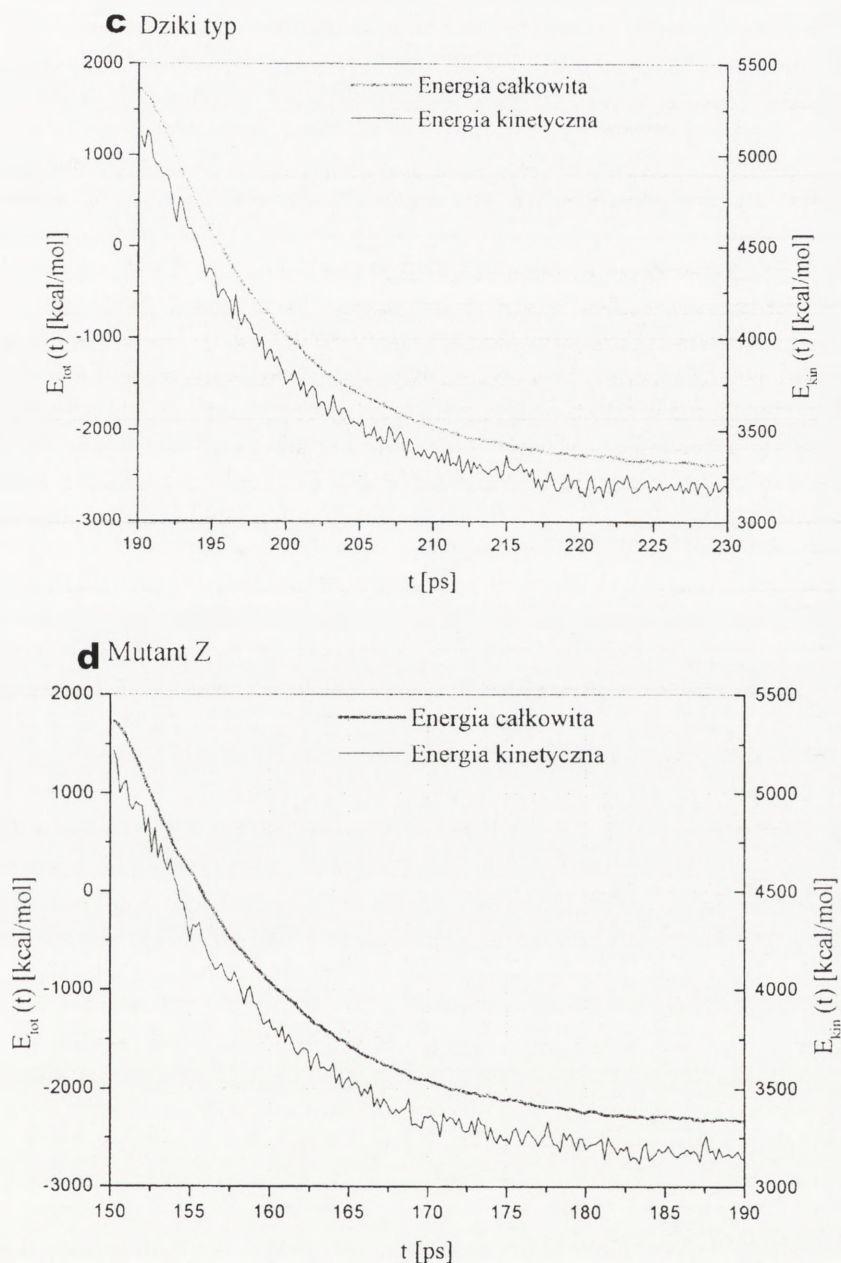
Przykładem wspomaganego komputerowo projektowania leków z zastosowaniem symulowanego wyżarzania jest praca Wanga i wsp. [35]. W symulacjach stosowane jest klasyczne pole siłowe AMBER [36] (różniące się w niewielkim stopniu od pola OPLS parametryzacją oddziaływań) oraz imitacja efektu rozpuszczalnika „stała” dielektryczną zależną od odległości. Procedurę przeprowadzono następującymi etapami:

1. Przeszukiwanie różnych konformacji liganda; wstępna selekcja struktur do dalszej symulacji.
2. Dokowanie wybranych kandydatów w określonym obszarze białka (np. w centrum aktywnym w przypadku enzymu); kolejna selekcja struktur.

⁵Dokowanie polega na modelowaniu oddziaływania niewiążącego – kompleksu, między kilkoma cząsteczkami, z których co najmniej jedna jest makrocząsteczką; procedura polega przede wszystkim na tworzeniu wielu konfiguracji próbnych danego kompleksu. Praca Sternberga i in. [33] zawiera omówienie i przykładowe zastosowania metody dokowania.



RYSUNEK 3. Zależność energii całkowitej i kinetycznej od czasu: rysunki a i b przedstawiają wykresy energii całkowitej (jasna linia) oraz krzywą wygładzoną (ciemna linia) ilustrując m.in. okres fluktuacji energii. Energia dzikiego typu stabilizuje się szybciej niż mutant (a), osiągając poziom ok. 1750 kcal/mol po 60 ps symulacji. Energia mutant (b) jest w tym samym czasie wyższa o 100 kcal/mol oraz podlega większym fluktuacjom



RYSUNEK 3 cd. Rysunki c i d przedstawiają wykresy energii całkowitej (lewa oś rzędnych; linia gruba) i kinetycznej (prawa oś rzędnych; linia cienka) podczas etapu schładzania, dla struktur przyjętych za najbardziej optymalne. Końcowa wartość energii całkowitej dla typu dzikiego jest niższa o 40 kcal/mol od analogicznej wartości dla mutantu. Wartość początkowa na osi odciętych odnosi się do całkowitego czasu symulacji wybranych struktur przed rozpoczęciem schładzania; wynosi on 150 ps dla dzikiego typu i 190 ps dla mutantu Z.

3. Minimalizacja energii liganda w miejscu wiążącym.
4. Systematyczna weryfikacja kolejnych konformerów w cząsteczce liganda, czyli skanowanie kątów dwuściennych (torsyjnych) różniących się wartościami tych kątów.
5. Symulowane wyżarzanie liganda w miejscu wiążącym (dla każdej z otrzymanych struktur); maksymalna temperatura symulacji wynosiła 773 K; czas symulacji: 4 ps.

Dwa ostatnie etapy powtarzano iteracyjnie, aż do osiągnięcia zadanej liczby różnych struktur.

Metodą tą zbadano w sumie 12 kompleksów białko-ligand, o liczbie możliwych rotacji wokół wiązań pojedynczych w ligandzie w zakresie od 3 dla kompleksu biotyny ze streptawidyną do 17 dla kompleksu proteazy HIV-1 ze związkami VAC⁶.

Metoda symulowanego wyżarzania zastosowana została w połączeniu z symulacją dokowania, skanowania kątów dwuściennych oraz minimalizacji energii. Procedura, zastosowana do ligandów średniocząsteczkowych, pozwoliła na otrzymanie struktur kompleksów bliskich strukturom rozwiązany krystalograficznie – wartości średnich odchyłeń kwadratowych (RMSD) struktur symulowanych od doświadczalnych wynoszą od 0,62 do 2,01 Å, co oznacza dobrą zgodność z doświadczeniem. Dużą zaletą metody jest oszczędność czasu obliczeniowego; w niniejszym przykładzie zastosowań do projektowania leków symulowane wyżarzanie wraz z procedurami towarzyszącymi zajęło 10–40 minut na stacji roboczej SGI z procesorem R10000.

5. PODSUMOWANIE

Podstawowym celem stosowania symulowanego wyżarzania jest generowanie zespołu zróżnicowanych (kryterium RMSD), stabilnych energetycznie (wartość energii potencjalnej) struktur wykazujących zgodność z danymi doświadczalnymi. Symulowane wyżarzanie jest również dogodną metodą badania dynamiki układów molekularnych.

Niewątpliwą zaletą metody jest możliwość ograniczenia się do krótkich czasów symulacji w porównaniu z symulacją w temperaturach fizjologicznych oraz możliwość uzyskania wiarygodnych wyników bez zastosowania modelu rozpuszczalnika *explicit*. Do wad metody należą:

1. Trudności w obliczaniu dynamicznych wielkości fizycznych, takich jak stała dyfuzji.
2. Niedokładna i niesystematyczna penetracja przestrzeni konfiguracyjnej układu w interesującym nas obszarze (brak pewności co do weryfikacji wszystkich ważniejszych struktur – wysp stabilności).

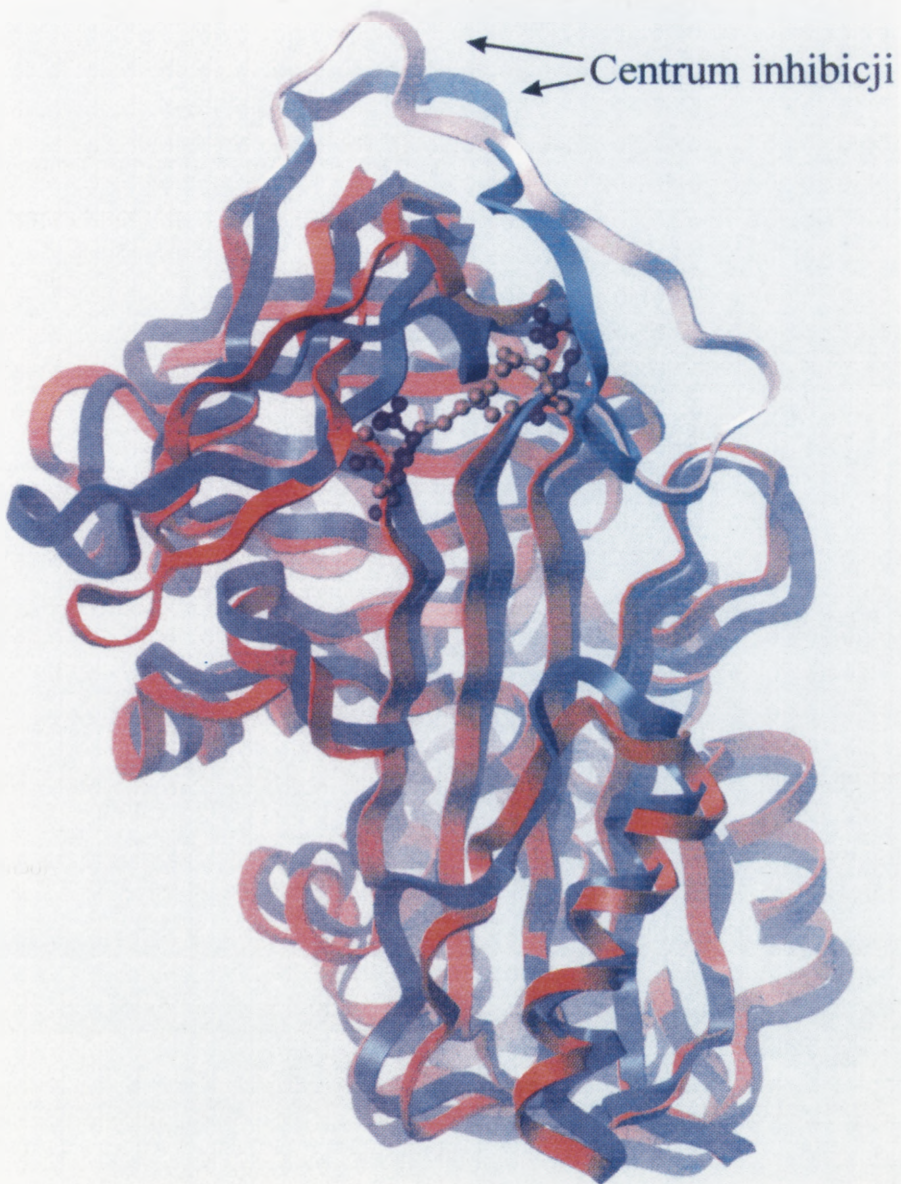
⁶Kody bazy danych *Protein Data Bank* odpowiednio: 1 stp i 4 phv.

Współczesne możliwości obliczeniowe nie pozwalają na symulację procesu rearanżacji całego łańcucha białkowego, trwającego nawet kilkaset milisekund (np. zwijanie lizozymu). Co więcej, obecne symulacje dynamiki molekularnej w temperaturze fizjologicznej lub pokojowej nie pokrywają zwykle skal czasowych tworzenia domen z rozwiniętego łańcucha polipeptydowego, tj. ok. 10^{-4} – 10^{-3} sekundy. W tej sytuacji zastosowanie metody symulowanego wyżarzania jest obiecujące, ponieważ pozwala na dotarcie do odległych konformacji polipeptydu w stosunkowo krótkim czasie.

LITERATURA

- [1] ANSELM AI. Podstawy fizyki statystycznej i termodynamiki. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980; rozdz. 4 § 5, str. 107 i nast.
- [2] BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, VAN GUNSTEREN WF, DINOLA A, HAAK JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984; **81**: 3684–3690.
- [3] BOHM H-J, KLEBE G. What Can We Learn from Molecular Recognition in Protein-Ligand Complexes for the Design of New Drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* 1996; **35**: 2588–2614.
- [4] BRUNGER A, KRUKOWSKI A, ERICKSON JW. Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Cryst* 1990; **A46**: 585–593.
- [5] BUCHLER NEG, ZUIDERWEG ERP, WANG H, GOLDSTEIN RA. Protein Heteronuclear NMR Assignments Using Mean-Field Simulated Annealing. *J Magn Res* 1997; **125**: 34–42.
- [6] DUNSTONE MA, DAI W, WHISSTOCK JC, ROSSJOHN J, PIKE RN, FEIL SC, LE BONNIEC BF, PARKER MW, BOTTOMLEY SP. Cleaved antitrypsin polymers at atomic resolution. *Protein Sci* 2000; **9**: 417–420.
- [7] ELLIOTT PR, ABRAHAMS JP, LOMAS DA. Wild-type α_1 -antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol* 1998; **275**: 419–425.
- [8] GETTINS PGW, PATSTON PA, OLSON ST. Serpins: structure, function and biology, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1996.
- [9] HOLADAY SK, MARTIN BM, FLETCHER PL, KRISHNA NR. NMR solution structure of butantoxin. *Arch Biochem Biophys* 3 2000; **79**: 18–27.
- [10] HUNTINGTON JA, PANNU NS, HAZES B, READ RJ, LOMAS DA, CARRELL RW. A 2.6 Å Structure of a Serpin Polymer and Implications for Conformational Disease. *J Mol Biol* 1999; **293**: 449–455.
- [11] JEZIERSKI G. Modelowanie molekularne oddziaływania trp represor-DNA. *Post. Biol. Kom* 1997; **24**, suppl. 8: 21–36.
- [12] JEZIERSKI G, PASENKIEWICZ-GIERULA M. The effect of the Glu342Lys mutation in α_1 -antitrypsin on its structure and dynamics, studied by molecular modelling methods. 2000; w przygotowaniu.
- [13] JORGENSEN WL, TIRADO-RIVES J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc* 1988; **110**: 1657–1666.
- [14] KARPLUS M, MCCAMMON JA. Protein structural fluctuations during a period of 100 ps. *Nature* 1979; **277**: 578.
- [15] KARTHIKEYAN S, YADAV S, PARAMASIVAM M, SRINIVASAN A, SINGH TP. Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å resolution at 277 K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; **56 Pt 6**: 684–689.
- [16] KIRKPATRICK S, GELATT CD JR, VECCHI MP. Optimization by Simulated Annealing. *Science* 1983; **220**: 671–680.

- [17] KOLOCZEK H, BANBULA A, SALVESEN GS, POTEMPA J. Serpin alpha1-proteinase inhibitor probed by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. *Protein Sci* 1996; **5**: 2226–2235.
- [18] KOLOCZEK H, GUZ A, KASZYCKI P. Fluorescence detected polymerisation kinetics of Human alpha1-Antitrypsin. *J Protein Chem* 1996; **15**: 447–454.
- [19] LESYNG B, MCCAMMON JA. Molecular Modeling Methods. Basic Techniques and Challenging Problems *Pharmac Ther* 1993; **60**: 149–167.
- [20] LI Z, SCHERAGA HA. Monte Carlo minimization approach to the multiple minima problem in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6611–6615.
- [21] LI H, TEJERO R, MONLEON D, BASSOLINO-KLIMAS D, ABATE-SHEN C, BRUCCOLERI RE, MONTELIONE GT. Homology modeling using simulated annealing of restrained molecular dynamics and conformational search calculations with CONGEN: Application in... *Protein Sci* 1997; **6**: 956–970.
- [22] LOEBERMANN H, TOKUOKA R, DEISENHOFER J, HUBER R. Human α_1 -proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol* 1984; **177**: 531–556.
- [23] LOMAS DA, ELLIOTT PR, SIDHAR SK, FOREMAN RC, FINCH JT, COX DW, WHISTOCK JC, CARRELL RW. α_1 -Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) Forms Loop-Sheet Polymers in Vivo. *J Biol Chem* 1995; **270** (28): 16864–16870.
- [24] MCCAMMON JA, WOLYNES PG, KARPLUS M. Picosecond dynamics of tyrosine side chains in proteins. *Biochemistry* 1979; **18**: 927–942.
- [25] MEIROVITCH H, VASQUEZ M. Efficiency of simulated annealing and the Monte Carlo minimization method for generating a set of low energy structures of peptides. *J Mol Struct (Theochem)* 1997; **398-399**: 517–522.
- [26] METROPOLIS N, ROSENBLUTH AW, ROSENBLUTH MN, TELLER AH, TELLER E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J Chem Phys* 1953; **21**: 1087–1092.
- [27] OKAMOTO Y. β -sheet formation in BPTI(16–36) by Monte Carlo simulated annealing. *Chem Phys Lett* 1999; **299**: 17–24.
- [28] PEARLMAN DA, CASE DA, CALDWELL JC, SEIBEL GL, SINGH UC, WEINER P, KOLLMAN PA. AMBER 4.0. University of California, San Francisco 1991.
- [29] POTEMPA J. Struktura, funkcja i ewolucja serpin, rozprawa habilitacyjna, UJ, Kraków, 1993.
- [30] QI PX, DI STEFANO DL, WAND AJ. Solution Structure of Horse Heart Ferrocycytochrome c Determined by High-Resolution NMR and Restrained Simulated Annealing. *Biochemistry* 1994; **33**: 6408–6417.
- [31] RAY JR, HARRIS RW. Simulated annealing in the microcanonical ensemble. *Physical Review E* 1997; **55** (5): 5270–5274.
- [32] SONG HK, LEE KN, KWON K, YU M, SE WS. Crystal structure of an uncleaved α_1 -antitrypsin reveals the conformation of its inhibitory reactive loop. *FEBS Lett* 1995; **377**: 150–154.
- [33] STERNBERG MJE, GABB HA, JACKSON RM. Predictive docking of protein-protein and protein-DNA complexes. *Curr Opin Struct Biol* 1998; **8**: 250–256.
- [34] TEJERO R, BASSOLINO-KLIMAS D, BRUCCOLERI RE, MONTELIONE GT. Simulated annealing with restrained molecular dynamics using CONGEN: Energy refinement of the NMR solution structures of epidermal and type-alpha. *Protein Sci* 1996; **5**: 578–592.
- [35] WANG J, KOLLMAN PA, KUNTZ ID. Flexible Ligand Docking: A Multistep Strategy Approach. *Proteins* 1999; **36**: 1–19.
- [36] WEINER SJ, KOLLMAN PA, CASE DA, SINGH UC, GHIO C, ALAGONA G, PROFETA S JR, WEINER P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J Am Chem Soc* 1984; **106**: 765–784.



RYSUNEK 4. Struktury α_1 -antytrypsyny po przeprowadzeniu symulowanego wyżarzania i minimalizacji energii – nałożenie struktury dzikiego typu (kolor czerwony) i mutantu Z (kolor niebieski). Parę Glu342-Lys290 w białku niezmutowanym, charakteryzującą się trwałym oddziaływaniem oraz aminokwasy Lys342 i Lys290 w mutancie Z przedstawiono w projekcji kijków. Pętla reaktywna zaznaczona jest jaśniejszymi odcieniami. Odcinek pętli reaktywnej stanowiący centrum reakcji inhibicji proteazy (projekcja kijków) zaznaczono elipsą

REFLEKSJE NA TEMAT BIOMEDYCYNY

REFLECTIONS ON BIOMEDICINE

Zofia PORWIT-BÓBR

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

Streszczenie: Stan biotechnologii lekarskiej w Europie w 1999 roku podsumowują publikacje dotyczące 20-letniej współpracy międzynarodowej. Europejska Federacja Biotechnologii (EFB) ma osiągnięcia w licznych dziedzinach wiedzy, zwłaszcza w medycynie. Współczesna inżynieria genetyczna, o zastosowaniu biomedycznym jest pomyślnie zintegrowana z badaniami biofarmaceutycznymi na potrzeby terapii od genomowych sekwencji nukleotydowych do sekwencji białkowych. Osiągnięcia dotyczą zastosowań genetyki molekularnej, do której zalicza się produkcję biofarmaceutyków: białek rekombinacyjnych, sond molekularnych, monoklonalnych przeciwciał, preparatów do molekularnej diagnostyki i terapii genowej.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 319–323*)

Słowa kluczowe: biofarmaceutyki, program R&D, genomika, proteomika, polimorfizm genetyczny, bazy danych, genom człowieka.

Summary: Present status in European medical biotechnology was summarised after 20 years international cooperation in 1999. European Federation of Biotechnology (EFB) has impact in many disciplines, especially in medical science. Present genetic engineering in biomedicine is integrated with biopharmacy for specific therapy using nucleotide and protein sequence. The biopharmaceutics are various recombinant peptides, monoclonal antibodies and molecular probes, used in molecular diagnostic and for gene therapy.

(*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 319–323*)

Keywords: biopharmaceutics, gene therapy, Single Nucleotide Sequences, genomics, proteomics

Według definicji przyjętej w 1989 roku biotechnologia to zintegrowanie nauk przyrodniczych i inżynierskich w celu zastosowania organizmów i komórek oraz ich części lub molekularnych analogów do produkcji dóbr i usług.

W 20-lecie postęp dotyczy poznawania genomów, a w biomedycynie przede wszystkim realizacji projektu poznania genomu człowieka (HGP – *Human Genome Project*) w celu przewidywania odpowiedzi na leki [1]. Postęp ten ocenia się na

97%, co ma ogromne znaczenie dla diagnostyki i terapii chorób. Obecnie HGP zmierza do otrzymania map zmiennych, pojedynczych sekwencji DNA: SNS (*Single Nucleotide Sequences*), występujących z częstością jeden na tysiąc nukleotydów, jako marker chorób człowieka [3].

Osiągnięcia w edukacji i bezpiecznej biotechnologii, oraz w publikacjach zebrane są w *The Biotechnology Directory* (1999), jedynej publikacji, która odzwierciedla międzynarodową naturę biotechnologicznego przemysłu i dostarcza referencji w liczbie 9000 na temat instytucji, produktów, usług i urzędzeń, oraz łączy bazy danych [6]. Biuletyny informacyjne Europejskiej Federacji Biotechnologii (EFB) wydawane w formie *Briefing Paper, International Bioforum Bioresearch plus Biotechnology* przynoszą informacje dotyczące aktywności EFB.

Genetyczne technologie obejmują genetykę molekularną różnych genów i genomów od wirusów do człowieka, a analiza danych prowadzi do zrozumienia aktywności organizmów, homeostazy i dziedziczności, w tym zaburzeń chorobowych człowieka [4]. Platformy debat i analitycznych dyskusji stały się bardziej powszechne, np. platformy przemysłu farmaceutycznego z programem R&D (*Research and Development*), tj. poszukiwania i rozwoju badań oraz ich stosowania w wyniku współpracy nauki i przemysłu [2].

W biotechnologii istnieje ciągły dialog dotyczący akceptacji i legislacji np. produktów modyfikowanej żywności, biofarmaceutyków oraz transgenicznych zwierząt i roślin, jako biologicznych fabryk białek [5]. Światowe bazy i banki danych są rozprowadzane na dyskach optycznych CD-ROM. Technologie kwasów nukleinowych stają się coraz bardziej dojrzałe, jako innowacje w biotechnologii, zarówno w mikrofabrykacjach jak w dostarczaniu bioinformacji [4].

W naukach biomedycznych biokoniuagacje wykraczają znacznie poza zastosowania takich technik rekombinacyjnych, jak np. otrzymywania przeciwciał monoklonalnych, koniugatów białek z małymi cząsteczkami i innymi reagentami.

Osiągnięcia do roku 2000 dotyczą więc produkcji biofarmaceutyków na potrzeby molekularnej diagnostyki, szczepionek, terapii, gromadzenia baz danych nukleotydowych i ekspresyjnych sekwencji EST (*Expressed Tagged DNA Sites*) [8].

Znaczenie baz danych wykrytych sekwencji polega na łączeniu tych danych z uzyskanymi w badaniach biochemicznych i fizjologicznych genomu człowieka (HGM) oraz genów poznanych w systemach modelowych. Integracja systemów bioinformatycznych dotyczy również edukacji. Projekt fundowany przez europejski komitet edukacji biotechnologicznej (*Biotechnology by open Learning – BIOTOL*) polega na wykorzystywaniu zasobów różnorodności cząsteczek biologicznych (*bio-diversity*) i partnerstwa w ich stosowaniu. Sprzyjają temu: dostępność zaawansowanych technologii, programy naukowe i platformy przemysłowe, molekularne analizy procesów biologicznych i patologicznych oraz profilowanie chorób i leków [5].

Obecnie wśród komercyjnych leków oligoterapeutycznych dominuje nowa klasa tzw. dendrymerów o określonej strukturze rdzeniowej i rozgałęzieniach złożonych z różnych monomerów. Mają one przewagę nad wektorami wirusowymi jako nośnikami DNA.

Do unikalnej terapii genowej wykorzystano metaloenzymy zwane rybozymami, które specyficznie katalizują cięcia patogennego mRNA w chorobach genetycznych i w zakażeniach wirusowych.

Koncepcja strategii oligomerów antysensownych została zaproponowana już w 1978 roku i polegała na hamowaniu genu chorobowego na poziomie DNA lub RNA [13]. Antysensowne oligomery mogą rozpoznawać i naprawić zmutowany RNA, np. p53, oraz modyfikować nukleotydy, katalizując różnorodne reakcje [11]. Wykryto mutacje punktowe w genie p53 różne w odmiennych nowotworach. Zmutowane białka p53 mają zdolność wiązania białek stresowych i po przyłączeniu do odpowiednich sekwencji DNA mogą uczestniczyć w regulacji transkrypcji, w mechanizmie supresji nowotworowej i w zaburzeniach proliferacyjnych. Wykrywanie mutacji genów Rb i p53 w nowotworach płuc jest stosowane rutynowo w prognozowaniu chorób nowotworowych. Poznane geny transformacji nowotworowej, zwłaszcza Rb i p53 i stosowanie reakcji PCR do wykrywania mutacji tych genów jest powszechne. Delecje alleliczne genu supresorowego określane jako utrata heterozygotyczności wykrywa się na podstawie zmienności wybranego fragmentu restrykcyjnego DNA komórki nowotworowej. Nienormalna ekspresja genów w uszkodzonym DNA towarzyszy złośliwej transformacji komórkowej i to stwarza możliwości wykrywania w raku człowieka powstających zmian, tzw. markerów nowotworowych oraz jest podstawą diagnozy laboratoryjnej choroby nowotworowej. Bez względu na to, jaką postać ma nowotwór, pozostaje on chorobą genów. Geny rozwojowe, onkogeny oraz supresorowe geny – tzw. anty-onkogeny zostały opisane. Genetyczna choroba, jaką jest rak, wiąże się z mutacjami w dominujących onkogenach i ich nienormalną ekspresją lub genami recesywnymi.

W ostatnich latach antysensowne oligonukleotydy modyfikowane są stosowane *in vitro*, *in vivo* (na modelach zwierzęcych) oraz w badaniach klinicznych. Metody antysensownej terapii w immunologii, onkologii, farmakologii i wewnętrznej medycynie, rokuje postęp, ponieważ modulują ekspresję genów chorobowych.

LITERATURA

- [1] ADAM GIR, SANSERS R, JONSSON J. The development of pharmacogenic models to predict drug response. *Pharma Informatics a trends guide*. 1999: 30–33
- [2] AGULAR A, INGERMANSON T, HOGAN S, MAGIENE E. Industrial platforms – a unique feature of the European Commissions biotechnology R&D programme. *TIBTECH* 1998; **16**: 365–368.
- [3] BOULOIS GJ Drug discovery in the new millenium, the pitoval role of Biotechnology. *TIBTECH* 2000; **18**: 31–33.

- [4] FANNON MR. Gene expression in normal and disease states – identification of therapeutic targets. *TIBTECH* 1996; **14**: 295–298.
- [5] GUND P, SIGAL NH. Applying informatics systems to high – throughput screening and analysis. *Pharma Informatics a trends guide*. 1999; 25–29.
- [6] HACCKWOOD S. *The Biotechnology Directory* 1999. MacMill. Ref. Ltd2.
- [7] JAMES P (ed.) *Proteome Research: mass spectrometry*. Zurich 2000; 285.
- [8] LYALL A. Bioinformatic in the pharmaceutical industry. *TIBTECH* 1996; **14**: 273–279.
- [9] MOUNTAIN A. Gene therapy the first decade. *TIBTECH* 2000; **18**: 119–128.
- [10] PHOST DR, BOYCE-JACINO MT, GRANT DM. A SNP shot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *TIBTECH* 2000; **18**: 334–338.
- [11] PORWIT-BÓBR Z. *Zastosowanie biotechnologii w badaniach podłoża molekularnego chorób człowieka. Słownik pojęć stosowanych w biologii i genetyce molekularnej*. Kraków, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. 1999.
- [12] WILKINS MR, WILLIAMS KI, APPEL RD, HOCHSTRASSER DF EDS. *Proteome research: New Frontiers in functional Genomics*. University Geneve 1997; 243.
- [13] ZAMECNIK OC, STEPHENSON ML. Inhibition of *Rous sarcoma* virus replication and transformation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 280–284.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków,
e-mail ADM@mol.uj.edu.pl

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2001

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2001 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813
Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2001:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2001 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski

Podstawy zagadnienia: jedno zdanie
Podtytuły: do każdego podtytułu 3-5 zdań
Wnioski: 2 zdania
Słowa kluczowe: do 8 słów

j. angielski

Background:
Subtitles:
Conclusions:
Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2000 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

TREŚĆ cd. – CONTENTS continued

Część trzecia: INTERAKCJA LIGAND-BIAŁKO W UKŁADACH TRANSPORTU WITAMIN	181
KOZIK A.: Białko wiążące ryboflawinę z jaj kurzych – Struktura białka i mechanizm wiązania ligandu Chicken egg riboflavin-binding protein – Protein structure and ligand-binding mechanism	183
KOTAS I.: Biosynteza i bioaktywacja tiaminy Thiamine biosynthesis and bioactivation	199
BOŚ M.: Hipotetyczna funkcja tiaminy w układzie nerwowym Hypothetical function of thiamine in nervous system	213
DULIŃSKI R.: Transport oraz metabolizm tiaminy w komórkach <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Thiamine transport and metabolism in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells	221
ADAMEK-ŚWIERCZYŃSKA S.: Białka transportowe w przestrzeni peryplazmatycznej bakterii gramujemnych Transport proteins in the periplasmic space of gram-negative bacteria	229
Część czwarta: PEPTYDY ANTYBAKTERYJNE	243
MICKOWSKA B.: Peptydy antybakteryjne – Struktura i funkcja Antimicrobial peptides – Structure and function	245
CHMIEL D.: Mechanizm działania peptydów antybakteryjnych Mode of action of antimicrobial peptides	261
Część piąta: WSPÓLCZESNA METODY BADANIA STRUKTURY I DYNAMIKI BIOCZĄSTECZEK	275
RÓG T., PASENKIEWICZ-GIERULA M.: Oddziaływanie cholesterolu z fosfolipidami w błonie – Badania metodą symulacji dynamiki molekularnej Molecular simulation studies of the cholesterol-phospholipid interactions	277
SUBCZYŃSKI W. K., PASENKIEWICZ-GIERULA M., ANTHOLINE W. E.: Zorientowana krystalizacja metaloporfiryn: wpływ pola magnetycznego i błon lipidowych Oriented crystallization of metalloporphyrins: effect of magnetic field and lipid membranes	285
PASENKIEWICZ-GIERULA M., RÓG T., MURZYN K.: Molecular simulation studies of the interfacial region in lipid bilayers Badania obszaru interfazy w błonach lipidowych metodą symulacji dynamiki molekularnej	297
JEZIERSKI G., PASENKIEWICZ-GIERULA M.: Metoda symulowanego wyżarzania – Zastosowanie do badania struktury i dynamiki białek Simulated annealing method – An application to investigate structure and dynamics of proteins	305
PORWIT-BÓBR Z.: Refleksje na temat biomedycyny Reflections on biomedicine	319
Warunki pręnumeraty i wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń	324

TREŚĆ – CONTENTS

Wstęp – Introduction	1
<i>Część pierwsza: SYNTEZA I DZIAŁANIE CYTOKIN</i>	3
KOJ A.: Niektóre cytokiny przeciwzapalne: własności i mechanizm działania Some anti-inflammatory cytokines: Properties and mechanism of action	5
ZARĘBSKI A.: Niektóre inhibitory przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego w hamowaniu syntezy cytokin Some inhibitors of signal transduction in the down-regulation of cytokine synthesis	15
BAZELA K.: Leptyna – Przekaz sygnału i współdziałanie z cytokinami Leptin – Signal transduction and interaction with cytokines	23
STALIŃSKA K.: Receptory wiążące późne produkty glikacji Receptors for advanced glycosylation endproducts	35
CISOWSKI J.: Wpływ stanu redoks komórki na aktywację czynników transkrypcyjnych i ekspresję genów The influence of cellular redox state on the activation of transcription factors and gene expression	43
<i>Część druga: MOLEKULARNE PODSTAWY INŻYNIERII KOMÓRKOWEJ I TKANKOWEJ</i>	61
SROKA J.: Zjawisko naprowadzania komórek zwierzęcych przez kontakt z podłożem – Wykorzystanie w praktyce klinicznej Contact guidance of animal cells – Clinical application	63
MADEJA Z.: Metody badania aktywności inwazyjnej komórek nowotworowych Assays for analysis of tumour invasion	81
DRUKAŁA J.: Kokultury komórkowe w rekonstrukcji skóry w zastosowaniu klinicznym Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications	97
KLEIN A., SIŃCZAK A., JUREK A.: EGF-podobne czynniki wzrostowe i ich udział w procesach regeneracji naskórka EGF-like growth factors and their contribution in epidermis regeneration	111
MICHALIK M.: Wykorzystanie endocytozy kierowanej receptorami do selektywnego wprowadzania genów w terapii genowej Targeted gene delivery by receptor-mediated endocytosis for gene therapy	135
KLEJMAN M., BERETA J.: Znaczenie przeciwciał Anti-Gal The significance of Anti-Gal antibodies	159
ŚCIUBISZ A., SZOSTEK M., SKOTNICKI A., SILBERRING J.: Katecholaminy w układzie immunologicznym – Identyfikacja i funkcja Catecholamines in the immune system – Identification and function	171

ciąg dalszy Spisu treści na odwrocie