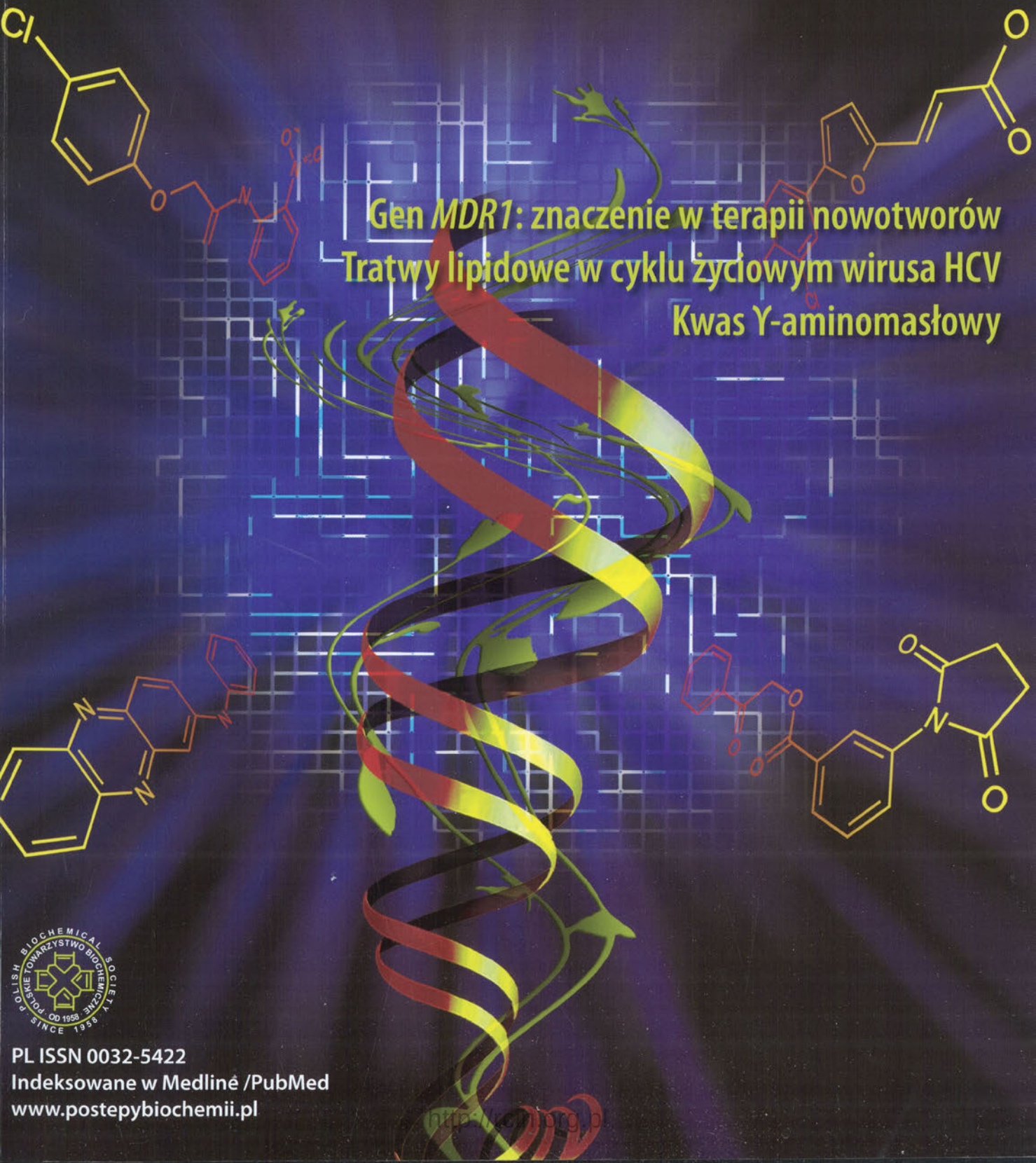
POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2007
TOM 53
NUMER 4



Gen *MDR1*: znaczenie w terapii nowotworów
Tratwy lipidowe w cyklu życiowym wirusa HCV
Kwas Y-aminomasłowy

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE · POLISH BIOCHEMICAL SOCIETY · OD 1958 · SINCE 1958

PL ISSN 0032-5422
Indeksowane w Medline /PubMed
www.postepybiochemii.pl

http://rcin.org.pl

Novagen®

GeneJuice®

Ekonomiczny

- Niższy koszt pojedyńczej transfekcji w porównaniu do innych odczynników

Łatwy

- Bardzo prosty protokół do badań - nie ma potrzeby wymiany podłoża
- Współdziała z podłożami do hodowli zawierającymi surowice oraz pozbawionymi surowicy

Wydajny

- Najlepsza wydajność transfekcji DNA
- Rzetelne i powtarzalne wyniki badań

Uniwersalny

- Doskonała wydajność zarówno stabilnej jak i przejściowej transfekcji
- Idealny do wysokowydajnej transfekcji (HT) na płytkach wielodołkowych

Łagodny

- Minimalna toksyczność dla komórek

Merck Sp. z o.o.
Aleje Jerozolimskie 178
02-486 Warszawa
tel.: 022 53 59 770
fax: 022 53 59 945/703
dzial.handlowy@merck.pl
www.merck.pl

GeneJuice® Transfection Reagent

Wysoka wydajność transfekcji DNA do komórek ssaczych

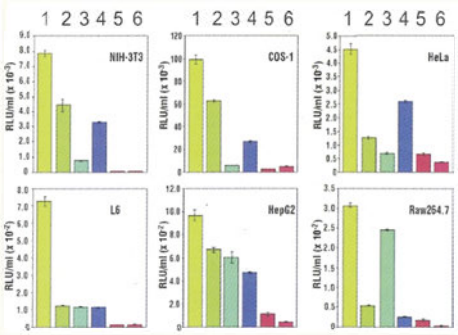
Odczynnik do transfekcji GeneJuice® jest łatwy w użyciu, zapewnia maksymalną wydajność transfekcji oraz minimalną toksyczność.

Większość dostępnych na rynku odczynników do transfekcji zawiera lipidy kationowe, które mogą być toksyczne dla komórek. Natomiast, odczynnik GeneJuice® składa się z nietoksycznego białka komórkowego oraz niewielkiej ilości poliaminy.

GeneJuice® jest dostarczany w formie gotowego do użycia roztworu. Opakowanie 1-ml wystarcza na przeprowadzenie 500 reakcji transfekcji w standardowych 35-mm płytkach.

Odczynnik do transfekcji GeneJuice® może być używany z wektorami reporterowymi (pMLuc™), wektorami zawierającymi oporność na antybiotyki (pTK-neo) oraz wektorami ekspresyjnymi (pTriEx™ oraz pTandem™-1).

Porównanie wydajności transfekcji z użyciem GeneJuice® oraz innych odczynników dostępnych na rynku



1-GeneJuice®. 2-6 inne odczynniki

Nr kat.	Opk.	Ilość transfekcji*	Cena netto (zł)**
CN70967-5	0.3 ml	150	592,08
CN70967-3	1.0 ml	500	1313,53
CN70967-6	5.0 ml	2500	5527,78
CN70967-4	10 x 1 ml	5000	10229,63

*W standardowych 35-mm płytkach
**Do ceny należy doliczyć 22% VAT.
Ceny ważne do 21 XII 2007 r

Linie komórkowe, na których testowano GeneJuice®. Kompletna lista jest dostępna na: **www.novagen.com/transfection**

10T1/2	CFPAC-1	HTB-37	P4
293T	Chang Liver	HTB-45	P19
3T3 NIH	CHO	Huh-7	PC12
3T3 Swiss	CHO-7	HUVEC	PA317
3T3-L1	CHO-IR	IC21	PAM212
A204	CHO-K1	IEC-6	PS-1
A431	COS-1	JEG-3	R2C
A549	COS-7	Jurkat	RAW 264.7
alpha TC1-6	CS-1	KB L57-3-11	RBL-2H3
AR 42J	CV-1	L-6	RMP-41
As4.1	Daudi	L-929	SAOS-2
AtT-20	DDTI MF-2	MA-10	SC-1
B50	DT40	McARH7777	Schneider line2
BC-1	ECV304	MCF-7	SK-N-MC
BC-2	EL4 ES-E14TG2a	MCF-10-2A	SK-N-SH
BC3	EVSCC17M	MDCK	SKOV3
BCBL	H9c2	Melanocyte	STO
BHK-21	HCT-116	MG-63	SW-480
C3H/10T1/2	HEK293	Neuro 2A	SW-837
C6	HeLa	Neuroblas-toma	T3M4
C2C12	HeLa B	NPK	TM4
Caco-2	HeLa T4	NT2/D1	U937
Caki-1	Hep 3B2.1-7	OV-1063	UCD
Calpan-1	HepG2	OVCAR3	Vero
Calu-1	Hepa 1-6		WE-38
Calu-6	Ht-29		
CCL-131			

Porównanie toksyczności po 48 h od transfekcji (komórki COS-7)

Kontrola

Lipid kationowy

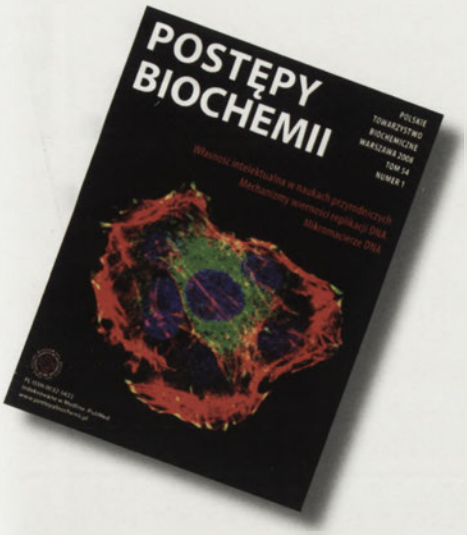
GeneJuice®

MERCK

http://rcin.org.pl

S P I S T R E Ś C I

Postępy Biochemii — vol. 53, nr 4, 2007



W NASTĘPNYM NUMERZE:

Własność intelektualna w naukach przyrodniczych
Tomasz Twardowski

Mechanizmy wierności replikacji DNA
Anna Bębenek

Mikromacierze DNA
Iza Roman

Rysunek na okładce:

Front cover image „A DNA strand wrapped around Arabidopsis", with permission. Cover image from Plant Physiology: June 2005; Volume 138, Issue 2, copyright owner American Society of Plant Biologists, image rendered by Jocelyn Brimo from the University of California, Riverside. Double helix image credit: U.S. Department of Energy Genomics:GTL Program, http://genomicsgtl.energy.gov

XLII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie
Dariusz Chlubek 305

Rozstrzygnięcie konkursu Doktoraty 2006
Anna Wójtowicz-Krawiec 307

6. Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa w Krakowie
Anna Bilska, Piotr Laidler 310

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Kod genetyczny
Maciej Szymański, Jan Barciszewski 311

Wiadomości krajowe
pod red. Teresy Wesołowskiej 313

ARTYKUŁY SPONSOROWANE

Wprowadzanie biomolekuł do komórek zwierzęcych — artykuł sponsorowany przez firmę MERCK Sp. z o.o.
Marcin Schmidt, Agnieszka Olejnik-Schmidt 321

Polska rekombinowana proteinaza K — artykuł sponsorowany przez firmę A&A Biotechnology
Adam Burkiewicz, Sławomir Dąbrowski, Piotr Barski 327

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Biologia chemiczna — nowa dyscyplina nauki
Jan Barciszewski, Henryk Koroniak, Wojciech T. Markiewicz 329

Rola tratw lipidowych w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C
Martyna Grek, Jacek Bartkowiak, Małgorzata Sidorkiewicz 334

Udział receptorów kolagenu płytek krwi w hemostazie pierwotnej
Urszula Kralisz, Marta Stasiak 344

Kwas γ-aminomasłowy — metabolizm i jego zaburzenia
Antoni Kowalski, Elżbieta Rębas, Ludmiła Żylińska 356

Gen *MDR1* (*ABCB1*) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABC — znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów
Mariusz Panczyk, Aleksandra Sałagacka, Marek Mirowski 361

Transferazy glutationowe — bioaktywacja S-koniugatów glutationu z udziałem β-liazy
Maria Sokołowska-Jeżewicz, Agata Kryczyk, Paulina Dudzik, Lidia Włodek 347

Wpływ O-GlcNAcylacji białek komórkowych na proces przekazywania sygnału
Anna Krześlak 389

Proces translacji zachodzący niezależnie od obecności kapu na końcu 5′ eukariotycznych mRNA
Leszek Błaszczyk, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiołka 400

MikroRNA — nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów
Agata Filip 413

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Terminacja translacji u Prokaryota i Eukaryota
Jan Kutner 420

http://rcin.org.pl

C O N T E N T S

ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 53, NO. 4, 2007

Events/Opinions/Comments 305

REVIEWS

Biomolecules transfection into animal cells 321
Polish recombinant proteinase K 327
Chemical biology — a new branch of science 329
Role of lipid rafts in hepatitis C virus life cycle 334
Involvement of platelet collagen receptors in primary hemostasis 344
Gamma-aminobutyric acid — metabolism and its disorders 356
Gen *MDR1* (*ABCB1*) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABC — znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów 361
Glutatione transferases — structure and functions. β-lyase-dependent bioactivation of cysteine S-conjugates 374
Role of O-GlcNAc modification of cellular proteins in signal transduction 389
Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode 400
miRNA — new mechanisms of gene expression control 413
Termination of prokaryotic and eukaryotic translation 420

III edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2007 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłasza trzecią edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w **2007** roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 000 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie tez doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii" w 2008 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu w firmą Merck.

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

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz z pracą doktorską w formacie pdf należy przesłać **w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2008 roku** tylko drogą elektroniczną na adres:

s.pikula@nencki.gov.pl

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2008 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Olsztynie we wrześniu 2008 roku.

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

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

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

Redaktor naczelny: Sławomir Pikuła; e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl, **Redaktor senior:** Zofia Zielińska
Redaktor działu krajowego: Teresa Wesołowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, **Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików":** Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl
Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikuła, Jolanta Barańska, Andrzej Dzugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz
Sekretarz redakcji: Hanna Laskowska; e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441
Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl
Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska; e-mail: 3mip@neostrada.pl lub marta.izdebska@gmail.com
Adres redakcji: "Postępy Biochemii", ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: postepy@nencki.gov.pl; http://www.postepybiochemii.pl
Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax (022) 6582099, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, http://www.ptbioch.edu.pl
Kwartalnik "Postępy Biochemii" jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, "Postępy Biochemii" są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

http://rcin.org.pl

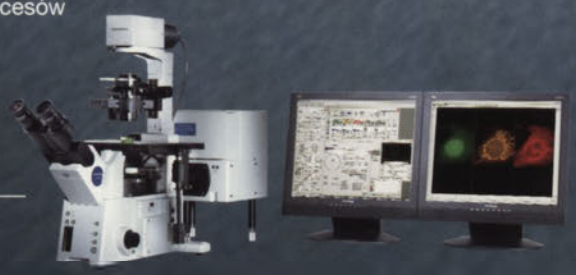
OLYMPUS

Your Vision, Our Future

P: Czy może być coś lepszego niż skaner laserowy w Państwa mikroskopie konfokalnym?

O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

Odpowiedź jest prosta: nowy mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 pracuje z dwoma skanerami, a nie jak inne podobne systemy, tylko z jednym. Wprowadzenie dodatkowego skanera stwarza zupełnie nowe możliwości w analizie żywych komórek, rozwiązuje problem utraty danych podczas rejestracji procesów. W systemach konfokalnych poprzedniej generacji do pobudzania komórek i do obserwacji używany był jeden tylko układ skanujący. Powodowało to, że niemożliwe było rejestrowanie szybkiej odpowiedzi komórek podczas i bezpośrednio po stymulacji. Dwa zsynchronizowane układy skanujące zastosowane w mikroskopie FV1000 umożliwiają jednoczesne prowadzenie obserwacji procesów oraz dokonywanie stymulacji. Ułatwia to wszechstronną, precyzyjną dokumentację i analizę zjawisk na poziomie komórkowym, bez utraty istotnych informacji. FluoView FV1000 wprowadza nową jakość w badaniach procesów przeżyciowych: rejestrację i zrozumienie zjawisk w stopniu poprzednio nieosiągalnym. Wystarczy tylko chwila pracy z naszym nowym systemem, aby to potwierdzić. Z nami rozwiązanie Państwa problemów badawczych będzie dwa razy prostsze.



Wiecej informacji pod adresem:
Olympus Polska Sp. z o.o.
Tel. 022 366-00-77, Faks 022 831-04-53
mikroskopy@olympus.pl
www.olympus-europa.com

O L Y M P U S M I C R O S C O P

http://rcin.org.pl

SYMBIOS

SYMBIOS sp. z o.o.
www.symbios.com.pl; symbios@symbios.com.pl
t./f. +58 692 8083
83-010 Straszyn, ul. Modrzewiowa 37

Maxwell™ 16

Promega

Sprawdź jak działa aparat Maxwell™ 16 !!!

Krok 1 - wypożycz kompletny system do automatycznego oczyszczania kwasów nukleinowych i białek;
Krok 2 - dokonaj zakupu aparatu – **możliwość zakupu ratalnego!!!**
Krok 3 - skorzystaj z **RABATU** na wybrane zestawy do oczyszczania.

Maxwell™ 16 Systems firmy PROMEGA
Nr kat.: AS1000

CECHY URZĄDZENIA

czas izolacji od 15 minut
oczyszczanie różnego rodzaju próbek
niewielkie rozmiary
nie wymaga komputera do pracy
wysoki stopień czystości
bezpieczeństwo i wygoda
gotowe zestawy firmy Promega

ZASTOSOWANIE

Aparat opracowano specjalnie do szybkiej i wydajnej izolacji ultraczystego genomowego DNA oraz RNA i białek fuzyjnych.

Maxwell 16 to aparat do oczyszczania kwasów nukleinowych i białek z próbek m.in. z:
- ludzkiej krwi
- wymazówek oraz bibuły
- tkanek zwierzęcych
- tkanek roślinnych
- bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych

SPECYFIKACJA TECHNICZNA

wymiary (W x S x G) - 31,4 x 37,4 x 29,5 mm;
waga - 18 kg;
czas oczyszczania - 15 ÷ 40 min;
liczba próbek - do 16;
wielkość próbki - 10 ÷ 400 µl;
wyświetlacz – LCD;
zasilanie - 100 ÷ 240V AC, 50 ÷ 60 Hz

DOSTĘPNE ZESTAWY

Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit	AS1010
Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit	AS1020
Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit	AS1030
Maxwell® 16 Total RNA Purification Kit	AS1040
DNA IQ™ Reference Sample Kit for Maxwell™ 16	AS1050
Maxwell® 16 Polyhistidine Protein Purification Kit	AS1060

http://rcin.org.pl

SPRAWOZDANIE Z XLII ZJAZDU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO SZCZECIN, 18-21 WRZEŚNIA 2007 R.

Fotografia 1. Panorama Szczecina.

W dniach 18-21 września 2007 roku Szczecin (Fot. 1) gościł uczestników XLII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady odbywały się w Centrum Kongresowym Uniwersytetu Szczecińskiego. Głównym sponsorem Zjazdu była firma Sigma-Aldrich. Uroczystość inauguracji poprzedzona została posiedzeniem Zarządu Głównego Towarzystwa w składzie rozszerzonym o przewodniczących oddziałów terenowych. Podczas spotkania, któremu przewodniczył Prezes PTBioch. prof. Lech Wojtczak, powołano m.in. członków komisji, które podczas Zjazdu miały dokonać oceny prac zgłoszonych do konkursów o nagrody przyznawane przez Towarzystwo. Zapoznano się także z przebiegiem przygotowań do kolejnego zjazdu PTBioch. w Olsztynie.

W organizacji Zjazdu uczestniczyły dwie szczecińskie szkoły wyższe: Pomorska Akademia Medyczna i Uniwersytet Szczeciński. W składzie Komitetu Organizacyjnego znaleźli się przedstawiciele obu uczelni (Fot. 2). Przewodniczenie pracom Komitetu Organizacyjnego powierzono prof. Dariuszowi Chlubkowi (PAM), natomiast funkcję sekretarza pełniła dr Barbara Dołęgowska (PAM) (Fot. 3). Wśród członków Komitetu znaleźli się ponadto: dr hab. Joanna Bober (PAM), prof. Maria Jastrzębska (PAM), prof. Zygmunt Machoy (PAM), dr Krzysztof Safronow (PAM), prof. Jolanta Tarasiuk (US) i dr Teresa Wesołowska (PAM).

Patronat nad Zjazdem objęli: Prezydent Szczecina Pan Piotr Krzystek i Prezes Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej prof. Maciej Żylicz. Do Komitetu Honorowego Zjazdu organizatorzy zaprosili wszystkich Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: prof. Jerzego Chmielewskiego, prof. Mieczysława Chorążego, prof. Janinę Kwiatkowską-Korczak, prof. Zygmunta Machoya, prof. Bronisławę Morawiecką, prof. Włodzimierza Ostrowskiego, prof. Konstancję Raczyńską-Bojanowską, prof. Davida Shugara, prof. Lecha Wojtczaka i prof. Mariusza M. Żydowo. Poza nimi, zaproszenie do uczestnictwa w Komitecie Honorowym przyjęli rektorzy: Pomorskiej Akademii Medycznej prof. Przemysław Nowacki, Uniwer-

Fotografia 2. Organizatorzy Zjazdu.

http://rcin.org.pl

Fotografia 3. Dr Barbara Dołęgowska i prof. Dariusz Chlubek.

sytetu Szczecińskiego prof. Waldemar Tarczyński i Akademii Rolniczej w Szczecinie prof. Jan B. Dawidowski.

Komitet Naukowy Zjazdu zgromadził organizatorów poszczególnych sesji zjazdowych. Znaleźli się wśród nich: prof. Jolanta Barańska (Warszawa), prof. Jan Barciszewski (Poznań), prof. Grzegorz Bartosz (Łódź, Rzeszów), prof. Ewa Birkner (Katowice), dr hab. Joanna Bober (Szczecin), prof. Dariusz Chlubek (Szczecin), prof. Andrzej Ciechanowicz (Szczecin), prof. Barbara Gawrońska-Szklarz (Szczecin), dr hab. Bohdan Górski (Szczecin), prof. Maria Jastrzębska (Szczecin), prof. Jan Kępczyński (Szczecin), prof. Liliana Konarska (Warszawa), prof. Piotr Laidler (Kraków), prof. Bogusław Machaliński (Szczecin), prof. Zygmunt Machoy (Szczecin), dr hab. Anna Machoy-Mokrzyńska (Szczecin), dr hab. Przemysław Mrozikiewicz (Poznań), prof. Marek Naruszewicz (Szczecin), dr hab. Grażyna Nowicka (Warszawa), prof. Ryszard Oliński (Bydgoszcz), prof. Chrystian Schmidt (Greifswald), dr Ewa Stachowska (Szczecin), prof. Marta Stryjecka-Zimmer (Lublin), prof. Adam Szewczyk (Warszawa), dr hab. Leszek Szmigiero (Łódź), prof. Jan Szopa-Skórkowski (Wrocław), prof. Julian Świerczyński (Gdańsk), prof. Jolanta Tarasiuk (Szczecin), prof. Cezary Watała (Łódź) i dr Teresa Wesołowska (Szczecin).

Uroczystość inauguracji Zjazdu odbyła się 18 września 2007 r. o godz. 17:00, w auli Wydziału Humanistycznego Uniwersytetu Szczecińskiego. Słowo powitalne skierował do obecnych przewodniczący Komitetu Organizacyjnego prof. Dariusz Chlubek. Kolejno głos zabrali: przedstawiciel Prezydenta Szczecina, JM Rektor Uniwersytetu Szczecińskiego prof. Waldemar Tarczyński, Pani Prorektor ds. Nauki Pomorskiej Akademii Medycznej prof. Barbara Gawrońska-Szklarz i Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. Lech Wojtczak, który uhonorował laureatów nagród: im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce i opublikowaną w 2006 roku oraz im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku Postępy Biochemii w 2006 roku. W pierwszym konkursie nagrody otrzymali: Grzegorz Kudla, Leszek Lipiński, Fanny Caffin, Aleksandra Helak i Maciej Żylicz za pracę pt.: „High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells", opublikowaną w **PLoS Biol., 2006; 4(6): e180**. W konkursie im. Bolesława Skarżyńskiego nagrodzono publikację „Mitochondrialne kanały jonowe" autorstwa: Jolanty Skalskiej, Grażyny Dębskiej-Vielhaber, Marty Głąb, Bogusza Kulawiaka, Dominiki Malińskiej, Izabeli Koszeli-Piotrowskiej, Piotra Bednarczyka, Krzysztofa Dołowego i Adama Szewczyka, opublikowaną w kwartalniku Towarzystwa **Postępy Biochemii vol. 52, nr 2, 2006**. Nagrodę za najlepszą pracę w dziedzinie chemii i biochemii kwasów nukleinowych otrzymali: Bartosz Brzezicha, Marcin Schmidt, Izabela Makałowska, Artur Jarmołowski, Joanna Pieńkowska i Zofia Szweykowska-Kulińska, za pracę pt. „Identification of human tRNA:m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu(CAA)", opublikowaną w **Nucleic Acid Research 2006; 34(20): 6034-6043.** Nagrodę, ufundowaną przez Firmę Sigma-Aldrich wręczył prof. Lech Wojtczak w towarzystwie dr Aleksandra Jankowskiego, dyrektora Firmy.

Fotografia 4. Mgr Izabela Sacewicz i prof. Lech Wojtczak.

Fotografia 5. Pani Marta Rybicka i prof. Lech Wojtczak.

Nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii otrzymał prof. Jerzy Buchowicz za książkę **„Biotechnologia molekularna"** wydaną przez PWN w 2006 roku. Nagrody im. Bronisława Filipowicza za specjalne zasługi w dziedzinie popularyzacji biochemii w 2007 roku nie przyznano.

Biochemicy zebrani na inauguracji zostali także zaproszeni do Olsztyna, gdzie w 2008 roku odbędzie się kolejny, XLIII Zjazd Towarzystwa, organizowany tym razem wspólnie z Towarzystwem Biologii Komórki. Wykład inauguracyjny pt.: „Własność intelektualna w naukach przyrodniczych" wygłoszony przez prof. Tomasza Twardowskiego zakończył oficjalną część inauguracji. Następnie goście Zjazdu wysłuchali koncertu zespołu „Stare Dzwony", wykonującego muzykę szantową i spotkali się przy "lampce" wina.

Obrady Zjazdu obejmowały szeroki zakres zagadnień biochemicznych ujętych w 14 następujących sesjach: Biochemia hemostazy, Biochemia kliniczna, Biochemia komórek macierzystych, Biochemia lipidów, Biochemia nowotworów, Biochemia roślin, Biochemia żywności i żywienia, Bioenergetyka, Kwasy nukleinowe, Metabolizm biopierwiastków, Molekularne mechanizmy działania leków, Przepływ informacji w komórce, Stres oksydacyjny i Varia. Większość sesji podzielona została na dwie części: wystąpienia ustne i prezentacje plakatowe. W sumie wygłoszono 123 referaty i doniesienia oraz zaprezentowano 227 posterów. Kilku sesjom

http://rcin.org.pl

towarzyszyły wykłady firm sponsorujących Zjazd.

Podczas Zjazdu wyłoniono tradycyjnie laureatów konkursów o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego i nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth. Nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymali: Izabela Sacewicz (Fot. 4), Magdalena Wiktorska, Tomasz Wysoki, Czesław S. Cierniewski i Jolanta Niewiarowska za pracę pt.: „Influence of DNAzymes to β1 integrin subunit on tumoral neovascularisation". Nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth otrzymała Marta Rybicka (Fot. 5) za pracę pt.: „Influence of conjugated linoleic acid diens (CLA) on the glutathione peroxidase and catalase activity in macrophages". Obie nagrody wręczył Prezes PTBioch. prof. Lech Wojtczak podczas uroczystości zamknięcia obrad Zjazdu w dniu 21 września 2007 r. (Fot. 4 i 5).

Fotografia 6. Dr Valery A. Hurynowich i prof. Andrey G. Moiseenok z Grodna.

W trakcie trwania Zjazdu przyznano również nagrodę Polskiej Sieci Mitochondrialnej. Nagroda ta jest wyróżnieniem dla młodego bioenergetyka za szczególnie interesujące przedstawienie wartościowej pracy na Sesji Bioenergetycznej na Zjeździe PTBioch. Nagrodę w tym roku otrzymał Andrzej M. Woyda-Płoszczyca z pracowni prof. Wiesławy Jarmuszkiewicz (UAM) za prezentacje pt. „Regulation of the energy-dissipating systems in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria by purine nucleotides". Nagrodę ufundowała firma OLYMPUS. Przewodniczącym Komisji był prof. Lech Wojtczak.

W szczecińskim spotkaniu biochemików wzięło udział ok. 500 osób, wśród nich goście z Białorusi, Danii, Niemiec, Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii (Fot. 6). Oprócz udziału w obradach mieli oni okazję do spotkania się przy okazji bankietu zorganizowanego w auli Pomorskiej Akademii Medycznej oraz uczestniczenia w rejsie po wodach śródlądowych Szczecina. Z inicjatywy prof. Adama Szewczyka odbyło się także spotkanie nowych członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z przedstawicielami Zarządu Głównego, podczas którego prezentowano różne formy aktywności Towarzystwa, m.in. ofertę stypendialną dla najzdolniejszych młodych pracowników nauki (Fot. 7).

Szczeciński Zjazd PTBioch. przeszedł do historii. W imieniu Komitetu Organizacyjnego i własnym pragnę serdecznie podziękować wszystkim, którzy ten Zjazd przygotowywali, organizowali, wspierali materialnie i intelektualnie. Przede wszystkim dziękuję jednak naszym Gościom, którzy zechcieli przyjąć zaproszenie do Szczecina i uczestniczyć w tym wyjątkowym wydarzeniu.

Fotografia 7. Spotkanie nowych członków PTBioch. z przedstawicielami Zarządu Głównego.

Prof. dr hab. n. med.
Dariusz Chlubek
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. Z O.O. NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2006 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Tadeusz Chojnacki, prof. Mieczysław Chorąży, prof. Andrzej Dżugaj, prof. Teresa Jakubowicz, prof. Piotr Laidler i prof. Sławomir Pikuła (przewodniczący), ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 000 zł otrzymuje **Pani dr Anna Wójtowicz-Krawiec** za pracę p.t. „Biotechnologiczne zastosowania proteaz odcinających ubikwitynę", wykonaną w Zakładzie Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Płucienniczaka. Wręczenie nagrody odbyło się 13 listopada 2007 r. w Warszawie.

Prof. Lech Wojtczak
Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Prof. Sławomir Pikuła
Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

http://rcin.org.pl

SYLWETKA ANNY WÓJTOWICZ-KRAWIEC

Anna Wójtowicz-Krawiec ukończyła studia biologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Uzyskała tytuł magistra biologii o specjalności mikrobiologia za pracę pt. „Klonowanie i ekspresja pętli – GDKDGDGYISAAEM wiążącej wapń w *Escherichia coli*". Pracę magisterską pod kierunkiem prof. dr hab. Magdaleny Fikus wykonała w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN) w Warszawie. W 1999 roku rozpoczęła studia doktoranckie w IBB PAN. Pracę doktorską wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Płucienniczaka w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Rozprawa doktorska pt.: „Biotechnologiczne zastosowania proteaz odcinających ubikwitynę" została obroniona z wyróżnieniem 31.01.2006 roku przed Radą Naukową IBB PAN. Promotorem pracy był prof. dr hab. Andrzej Płucienniczak, recenzentami prof. dr hab. Monika Hryniewicz (IBB PAN) oraz prof. dr hab. Józef Kur (Politechnika Gdańska, Gdańsk).

Anna Wójtowicz-Krawiec jest współautorem czterech patentów i zgłoszeń patentowych oraz dwóch prac opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Od 2003 roku pracuje w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie w zespole prof. dr hab. Andrzeja Płucienniczaka i dr Grażyny Płucienniczak. Od lipca 2006 roku jest adiunktem w Zakładzie Bioinżynierii. Bierze udział w projektach dotyczących nowych form białek aktywnych biologicznie, konstrukcji wektorów ekspresyjnych, badaniach porównawczych wektorów ekspresyjnych bakteryjnych oraz kontynuuje badania nad aktywnością proteazy deubikwitylującej UBPD2C. W ramach pracy dydaktycznej sprawuje opiekę nad badaniami studentki wykonującej pracę magisterską.

BIOTECHNOLOGICZNE ZASTOSOWANIA PROTEAZ ODCINAJĄCYCH UBIKWITYNĘ

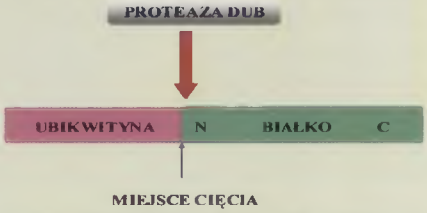
STRESZCZENIE PRACY

Anna Wójtowicz-Krawiec

Zakład Bioinżynierii, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa; tel. (022) 849-60-51 wew. 281, e-mail: wojtowicza@iba.waw.pl, a_wojtowicz_15@hotmail.com

Białka fuzyjne stanowią bardzo ważny element współczesnej biotechnologii. Tworzenie białek fuzyjnych ma na celu m. in. uproszczenie procesu oczyszczania białka, podniesienie odporności białka na proteazy, ekspresję genu kodującego białko celem ustalenia jego konkretnej lokalizacji w komórce lub wirusie, badanie czasu aktywności leków białkowych.

Ubikwityna jest zbudowana z 76 reszt aminokwasowych o łącznej masie 8,6 kDa. Białko to jest elementem uniwersalnego systemu modyfikowania białek. Zjawisko ubikwitylacji towarzyszy wszystkim nieomal procesom metabolicznym, od podziałów i różnicowania się komórki aż po jej śmierć. Ubikwityna pośrednio zaangażowana jest w naprawę DNA, wpływa na aktywność chromatyny a także bierze udział w transformacji nowotworowej. Białko to odgrywa podstawową rolę w proteolizie białek regulacyjnych o krótkim czasie półtrwania, a także białek o dłuższym czasie półtrwania [1]. Ubikwitylacja białek nie zachodzi u bakterii. Dowiedziono, iż geny białek włączone pod ten sam promotor co gen kodujący sekwencję ubikwityny podlegają wyższej ekspresji w *Escherichia coli* niż geny nierekombinowane. Dowiedziono także, że białka hybrydowe są silniej stabilizowane oraz łatwiej przyjmują właściwą konformację II i III-rzędową. Dlatego ubikwityna jako białko nośnikowe stosowana jest od wielu lat w biotechnologii i biologii molekularnej. Te dziedziny nauki mają coraz większy wpływ na medycynę kliniczną, diagnostyczną oraz przemysł farmaceutyczny. Jednak obecność ubikwityny w białkach rekombinowanych, które mają być stosowane jako leki, np. UBI::ludzki hormon wzrostu, nie jest pożądana. Do usunięcia cząsteczki ubikwityny konieczne jest zastosowanie bardzo specyficznej proteazy deubikwitylującej (DUB). Proteazy DUB są to enzymy proteolityczne zaliczane do klasy proteaz cysteinowych o właściwościach endopeptydaz. Proteazy te wykazują wysoce specyficzną aktywność. Hydrolizują one wiązania estrowe, peptydowe i izopeptydowe grupy karboksylowej reszty glicyny 76 lub reszt lizynowych (odpowiednio) cząsteczki ubikwityny [2,3]. Istotną zaletą fuzji z ubikwityną jest brak potrzeby zmiany sekwencji białka docelowego na jego N-końcu (Ryc. 1).



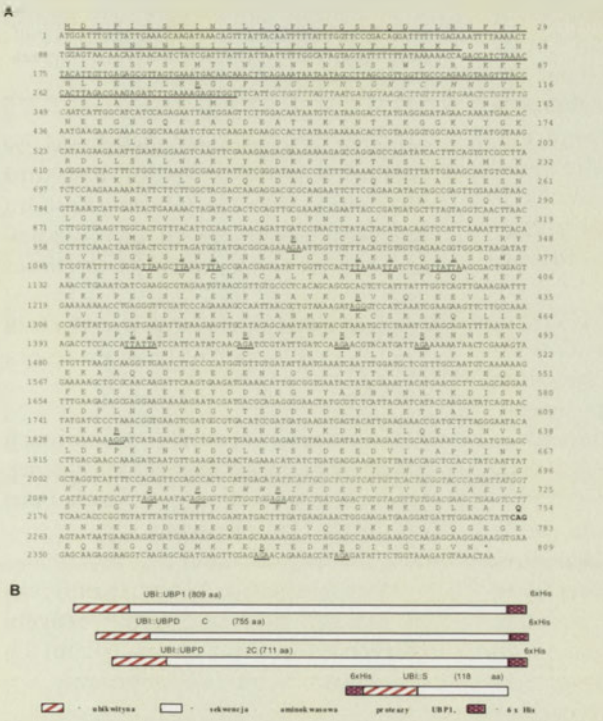
Rycina 1. Przykładowy schemat białka hybrydowego zawierającego ubikwitynę.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie dużych ilości wysoko specyficznej i oczyszczonej deubikwitylującej proteazy drożdżowej w bakteriach *E. coli* umożliwiającej odzyskanie natywnego ludzkiego hormonu wzrostu hGH z białka fuzyjnego UBI::hGH (otrzymanego w zespole prof. dr hab. Andrzeja Płucienniczaka), a także opracowanie metody reakcji trawienia białek hybrydowych enzymem deubikwitylującym. Zastosowanie czystego preparatu proteazy ma zasadnicze znaczenie dla opracowania metody otrzymywania białek stosowanych w farmaceutyce. Dotychczasowe badania opierają się głównie na stosowaniu do odtrawiania ubikwityny z białek hybrydowych proteaz znajdujących się w lizatach drożdży, bakterii lub retikulocytów [4-6]. Stosowanie nieoczyszczonego enzymu jest poważną wadą z powodu konieczności powtórnego oczyszczania produktu trawionego lizatem.

http://rcin.org.pl

Otrzymanie oczyszczonej i aktywnej proteazy deubikwitylującej jest celem wielu laboratoriów. Ułatwiłoby to zastosowanie systemu opartego na syntezie białek hybrydowych połączonych z ubikwityną i podniosło jego uniwersalność [2,7].

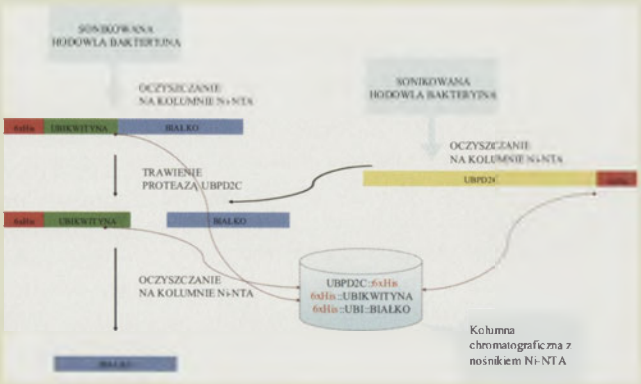
W pierwszym etapie pracy sklonowano geny pięciu proteaz pochodzących z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w bakteriach *Escherichia coli* i sprawdzono aktywność lizatów bakteryjnych zawierających te enzymy. Szczegółowa analiza wydajności produkcji tych białek, ich rozpuszczalności oraz — co najważniejsze — ich preferencji substratowych doprowadziła do konkluzji, że enzymem rokującym największe nadzieje w zastosowaniu do substratu UBI::hGH jest proteaza kodowana przez gen *UBP1* drożdży. W dalszym etapie pracy skupiono się na doskonaleniu systemu ekspresji rekombinowanej proteazy — pochodnej UBP1, oczyszczaniu białka i monitorowaniu jego aktywności. Wykonano szereg modyfikacji genu kodującego proteazę, między innymi: usunięcie segmentu kodującego przypuszczalną domenę transmembranową proteazy; zamianę 12 kodonów argininowych (Arg) i 9 kodonów leucynowych (Leu) na inne kodony Arg i Leu — preferowane w przypadku biosyntezy białka w bakteriach (Ryc. 2); wybiórczą dalszą eliminację fragmentów genu (Ryc. 2); zamianę natywnej sekwencji kodującej ubikwitynę z drożdży w genie hybrydowym *UBI::UBP1* na sekwencję syntetyczną (zawierającą kodony preferowane w *E. coli*); odkryto pozytywne znaczenie przypadkowej mutacji „C" w 5'- końcowym odcinku genu proteazy dającą w wyniku pojedynczą substytucję glutaminy na leucynę w pozycji 754 sekwencji białka (Ryc. 2). W rezultacie otrzymano duże ilości oczyszczonej i specyficznie aktywnej proteazy deubikwitylującej — analoga proteazy z drożdży UBP1, która jest zasadniczym enzymem koniecznym do opracowania metody produkcji ludzkiego hormonu wzrostu. Opracowano optymalne warunki hodowli bakteryjnej syntetyzującej enzym pochodzący z drożdży *S. cerevisiae* oraz metody jego oczyszczania.



Rycina 2. Sekwencja nukleotydowa i aminokwasowa genu proteazy *UBP1* (Varshavsky i Tobias, 1991; Tobias i Varshavsky, 1991). A) Reszty nukleotydowe są ponumerowane z lewej strony sekwencji, reszty aminokwasowe — z prawej. Podkreślone kodony argininowe AGA lub AGG i leucynowe TTA były zamienione na kodony: CGC lub CGT i CTG, odpowiednio. Kodon CAG (zaznaczony pogrubioną czcionką) w pozycji 2260-2262 zmieniony na kodon CTG (mutacja C). Centrum aktywne proteazy zaznaczono kursywą. Konstrukcję genów *UBI::UBPDC* oraz *UBI::UBPD2C* (*D* — oznacza delecję genu, *C* — mutację w pozycji 754 aa) określono poprzez podkreślenie oraz zakreślenie usuniętych sekwencji 162 pz. lub 294 pz., odpowiednio. B) Schemat konstrukcji nowych wariantów proteazy UBP1 (w nawiasach podano długość łańcucha aa sekwencji proteazy UBP1).

Uzyskano uniwersalny system ekspresji genów i syntezy białek oparty na syntezie białek hybrydowych typu: 6xHis::UBI::Białko. Opracowano metodę oczyszczania białek hybrydowych przed i po trawieniu zmodyfikowaną proteazą UBP1 z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa (Ryc. 3).

Otrzymano przeciwciała monoklonalne mysie skierowane przeciw rejonowi N-końcowemu proteazy UBP1 i poliklonalne królicze skierowane przeciw rejonowi C-końcowemu proteazy UBP1, które posłużą do opracowania metody oznaczania śladowych ilości proteaz — analogów proteazy UBP1 w preparatach nimi traktowanych.



Rycina 3. Schemat zastosowania systemu ekspresji genów oraz oczyszczania białek z dołączonymi sześcioma resztami histydyny.

Otrzymany wariant proteazy z drożdży UBP1 jest obecnie używany do produkcji rekombinantowego ludzkiego hormonu wzrostu na skalę zabezpieczającą potrzeby w Polsce.

Podziękowania: Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Bioinżynierii w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Płucienniczaka oraz dr Grażyny Płucienniczak. Dziękuję wszystkim, z którymi współpracowałam podczas wykonywania tej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. Annu Rev Biochem 61: 761-807
2. Baker RT, Smith SA, Marano R, McKee J, Board PG (1994) Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase. J Biol Chem 269: 25381-25386
3. Papa FR, Hochstrasser M (1993) The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. Nature 366: 313-319
4. Baker R (1996) Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. Curr Opin Biotechnol 7: 541-546
5. Tobias J, Varshavsky A (1991) Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBP1 of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 266: 12021-12028
6. Varshavsky A, Tobias J (1991) Ubiquitin - specific protease. Patent WO9117245
7. Hall J, SUMO gene fusion technology. LifeSensors Inc. Malvern, 2005

http://rcin.org.pl

6. KONFERENCJA IM. JAKUBA KAROLA PARNASA „MOLECULAR MECHANISM OF CELLULAR SIGNALING" KRAKÓW, 30 MAJA–2 CZERWCA 2007 R.

W dniach 30 maja–2 czerwca 2007 roku odbyły się w Krakowie obrady 6. Konferencji im. Jakuba Karola Parnasa pt. „Molecular Mechanism of Cellular Signaling". Mające dziesięcioletnią już tradycję Konferencje Parnasa są wspólnym dziełem członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego, których intencją było stworzenie platformy do zbliżenia środowisk naukowych zaangażowanych w badania nad szeroko pojętymi zagadnieniami sygnalizacji komórkowej w aspekcie podstawowym i biomedycznym.

Pracom Komitetu Organizacyjnego 6. Międzynarodowej Konferencji Parnasa przewodniczył ze strony polskiej – organizator Konferencji – profesor Piotr Laidler, kierownik Katedry Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum oraz ze strony ukraińskiej – profesor Sergiy Komisarenko, prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego z Instytutu Biochemicznego im. Palladina w Kijowie.

W Konferencji uczestniczyło około 200 osób z różnych państw, głównie z Polski i Ukrainy, ale nie zabrakło również uczonych z Białorusi, Emiratów Arabskich, Grecji, Izraela, Norwegii, Rosji, Rumunii, Stanów Zjednoczonych, Szwajcarii, Wielkiej Brytanii i Włoch. Celem umożliwienia wzięcia udziału w Konferencji większej liczbie młodych uczonych z Ukrainy, Komitet Organizacyjny przyznał stypendia pieniężne w wysokości pokrywającej koszty uczestnictwa oraz pobytu w Krakowie w czasie trwania Konferencji, dwudziestu, wyłonionym w drodze konkursu, uczestnikom z Ukrainy.

Patronami honorowymi Konferencji byli: Prezydent Krakowa – profesor Jacek Majchrowski, JM Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego — profesor Karol Musioł, Prorektor Uniwersytetu Jagiellońskiego ds. Collegium Medicum — profesor Wiesław Pawlik oraz Dziekan Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum – profesor Wojciech Nowak. Wśród honorowych gości znaleźli się znani uczeni: profesor Ryszard Gryglewski, profesor Aleksander Koj, profesor Janina Kwiatkowska-Korczak, profesor Włodzimierz S. Ostrowski, profesor Zofia Zielińska oraz — synowa Profesora Parnasa, Pani Barbara Parnasowa.

W przygotowaniu Konferencji pomocy udzieliły firmy: Merck (Main Sponsor), Ambion, BD Bioscience, Bank BPH, Immuniq, Perkin-Elmer, Sarsted oraz instytucje: Wydział Lekarski UJ CM, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Uniwersytet Jagielloński, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

Informację o Konferencji podały lokalne media, prasa akademicka (Alma Mater, Newsletter) oraz poświęcony polskiej nauce portal internetowy www.naukawpolsce.pl.

Ceremonia otwarcia odbyła się 30 maja o godzinie 17 w Auli Collegium Novum UJ przy ulicy Gołębiej 24 w Krakowie. Gości serdecznie powitali: w imieniu Komitetu Organizacyjnego profesor Piotr Laidler i profesor Sergiy Komisarenko, a także Prorektor Uniwersytetu Jagiellońskiego ds. Collegium Medicum, profesor Wiesław Pawlik (Fot. 1).

Podczas inauguracyjnego wykładu *Jakub Karol Parnas – life and creativity* o życiu i działalności naukowej Profesora Jakuba Karola Parnasa – wielkiego polskiego biochemika – mówili prof. prof.: Jolanta Barańska (*Parnas heritage*) (Fot. 2), Janina Kwiatkowska-Korczak (*Parnas life*), Andrzej Dżugaj (*Parnas` work*) i Georgio Semenza (*Parnas in eyes of world*). Następnie profesor Włodzimierz Ostrowski, w latach 1963–1996 dyrektor Instytutu Biochemii Lekarskiej (obecnie Katedra Biochemii Lekarskiej UJ CM) w swoim krótkim wystąpieniu *Jakub Parnas and his visit to the oldest departament of physiological chemistry* przedstawił „wątek krakowski" w życiu Profesora Parnasa.

Fotografia 1. Inauguracja Konferencji. W imieniu władz Uniwersytetu Jagiellońskiego gości wita Prorektor UJ ds. Collegium Medicum – profesor Wiesław Pawlik. Kolejno od lewej siedzą prof. prof.: Piotr Laidler, Sergiy Komisarenko i Lech Wojtczak.

Ceremonię otwarcia Konferencji zakończył koncert muzyki klasycznej. Po wyjściu z Auli na gości czekał poczęstunek i lampka wina.

W programie naukowym Konferencji znalazło się 5 sesji tematycznych, których tytuły wraz z nazwiskami ich organizatorów podajemy poniżej:

1. Receptors and effectors in cell signaling – Jolanta Barańska (Polska) i Ernesto Carafoli (Włochy)
2. Hypoxia and cellular signaling – Józef Dulak (Polska) i Maria Czyżyk-Krzeska (Stany Zjednoczone)
3. Signalling and immune response – Sergyi Komisarenko (Ukraina) i Israel Pecht (Izrael)

http://rcin.org.pl

4. Defects in signaling and disease – Piotr Laidler (Polska) i Ludmiła Drobot (Ukraina)

Fotografia 2. Inauguracja Konferencji. Aula Collegium Novum UJ.

5. Signal transduction in nucleus – Luccio Cocco (Włochy) i Sjur Olsnes (Norwegia).

Interesująca tematyka prezentacji wzbudzała duże zainteresowanie słuchaczy, o czym świadczyła wysoka frekwencja na wszystkich wykładach oraz sesjach plakatowych. Materiały z Konferencji opublikowane zostały w suplemencie do *Acta Biochimica Polonica* (vol. 54, Suplement 2/2007).

W czasie Konferencji zorganizowano również konkurs na najlepszą prezentację plakatu. Nagrodzono autorów 5 plakatów: P.1.19, P.1.38, P.1.36, P.1.41, P.4.5. Wszyscy autorzy otrzymali pamiątkowe dyplomy, a pierwsi autorzy również drobne upominki, w tym monety wybite z okazji 750-lecia lokacji Krakowa (w dniach Konferencji Parnasa, Kraków bawił się na licznych imprezach z okazji 750-lecia lokacji miasta), natomiast pierwszym autorom, pierwszych dwóch posterów (P.1.19 i P.1.38 – Serhiy Havrylov i Daria Miroshnychenko) – przyznano stypendia pieniężne w wysokości pokrywającej koszty uczestnictwa oraz pobytu na tegorocznym, 42. Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie.

Organizatorzy starali się dostarczyć uczestnikom Konferencji także innych – poza przewidzianym programem naukowym Konferencji – przeżyć; w tym możliwość wybrania się na liczne, zorganizowane przez Biuro Podróży „Orbis", wycieczki: zwiedzanie Krakowa, zwiedzanie jednej z najstarszych kopalni soli w Wieliczce, zwiedzanie Muzeum Auschwitz-Birkenau oraz spływ Dunajcem. Imprezą dodatkową było również, pełne ciepła i serdeczności, spotkanie towarzyskie w Ogrodzie Botanicznym UJ (Fot. 3), zorganizowane dzięki uprzejmości dyrektora Ogrodu, profesora Bogdana Zemanka, stwarzające możliwość pełniejszej integracji uczestników w niepowtarzalnym otoczeniu przepięknej przyrody.

Fotografia 3. Spotkanie towarzyskie w Ogrodzie Botanicznym UJ.

Następna Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa, na którą serdecznie zapraszają Polskie Towarzystwo Biochemiczne i Ukraińskie Towarzystwo Biochemiczne, odbędzie się w 2009 roku na Krymie. Wydaje się, że wspólne, polsko-ukraińskie organizowanie, odbywających się już od 1996 roku, Międzynarodowych Konferencji im. Jakuba Karola Parnasa bardzo sprzyja zacieśnieniu wzajemnej polsko-ukraińskiej współpracy i budowaniu dobrych relacji między akademickimi środowiskami obu naszych krajów.

Anna Bilska, Piotr Laidler

WYDARZENIA – OPINIE – KOMENTARZE

KOD GENETYCZNY*

W stosunkowo krótkiej historii biologii molekularnej było kilka wydarzeń, które miały kluczowe znaczenie dla postępu w tej dziedzinie. Bez wątpienia jednym z nich było rozszyfrowanie kodu genetycznego. W latach 40-tych ubiegłego wieku po raz pierwszy wykazano, wbrew istniejącym do tego czasu poglądom, że to kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) jest nośnikiem informacji genetycznej umożliwiającym jej przekazywanie z pokolenia na pokolenie. Do wyjaśnienia istoty i chemicznych podstaw tego procesu przyczyniło się zaproponowanie w 1953 roku modelu struktury DNA, znanego jako podwójna helisa. Biologia musiała się natychmiast zmierzyć z nowymi wyzwaniami. Kluczowym pytaniem było w jaki sposób, sekwencja czterech nukleotydów DNA (język kwasów nukleinowych) jest tłumaczona na sekwencje dwudziestu aminokwasów (język białek). W związku z tym, w drugiej połowie lat 50-tych problemy dotyczące struktury kodu genetycznego stały się przedmiotem opracowań teoretycznych, głównie za sprawą George Gamova, Leslie Orgela, Francisa Cricka i innych członków ekskluzywnego *Tie Club*.

Postęp w chemicznej syntezie oligonukleotydów RNA, możliwy dzięki pracom H.G. Khorany, pozwolił na uzyskanie pierwszych danych eksperymentalnych. Przełom nastąpił w 1961 roku w laboratorium Nirenberga. Wykazano wtedy, że w lizatach komórek *E. coli*, na matrycy poli-U syntetyzowana jest polifenyloalanina. Wcześniejsze rozważania teoretyczne doprowadziły do wniosku, że podstawowymi jednostkami kodu genetycznego (kodonami) są prawdopodobnie trójki nukleotydów. Tym samym, pierwszy trójnukleotyd UUU, został rozszyfrowany jako kodujący fenyloalaninę [1]. W ciągu następnych pięciu lat (1961-1966), w serii podobnych eksperymentów z użyciem syntetycznych RNA udało się przypisać wszystkie trójki nukleotydowe odpowiadającym im aminokwasom [2]. Z nielicznymi wyjątkami, kod genetyczny opisany przez M. Nirenberga w 1966 roku okazał się być uniwersalny i jednoznaczny dla wszystkich form życia. Znaczenie jego odkrycia dla rozwoju biologii można porównać ze znaczeniem układu okresowego pierwiastków w chemii. Robert W. Holley, Har Gobind Khorana oraz Marshall W. Nirenberg, którzy odegrali kluczową rolę w jego rozszyfrowaniu zostali w 1968 roku uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

http://rcin.org.pl

STANDARD I ODSTĘPSTWA

Początkowo sądzono, że kod genetyczny wykorzystywany przez współczesne organizmy jest uniwersalny i niezmienny, gdyż jakakolwiek zmiana w znaczeniu kodonów prowadziłaby do syntezy białek o błędnych sekwencjach. Ta hipoteza została z biegiem lat zrewidowana w wyniku odkryć alternatywnych kodów genetycznych, które w nieznacznym stopniu odbiegają od pierwotnie opisanego przez Nirenberga schematu [3]. Odstępstwa te ograniczone są do kodów jądrowych wąskich grup taksonomicznych oraz mitochondriów (Tabela). Wyjątki od ogólnych zasad kodowania zdefiniowanych przez standardowy kod genetyczny nie zmieniają jednak uniwersalnych cech kodu genetycznego, które wskazują iż podstawowy rdzeń aparatu biosyntezy białka powstał w obecnym kształcie przed oddzieleniem się trzech królestw organizmów.

W mitochondriach, które posiadają własny aparat biosyntezy białka, kodon AUA koduje metioninę a nie izoleucynę. U *Mycoplasma* tryptofan determinowany jest zarówno przez UGG jak i przez UAG, który w standardowym kodzie genetycznym oznacza zakończenie translacji. Kodowanie glutaminy przez terminatorowe kodony UAA i UAG ma miejsce u niektórych pierwotniaków i zielenic.

Zmiana znaczenia kodonów może występować w niektórych przypadkach również u organizmów wykorzystujących standardowy kod genetyczny w wyniku np. supresji kodonów stop czy zależnego od rybosomów przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshift*). W odniesieniu do supresji, kod genetyczny może zostać rozszerzony przez wprowadzenie niekanonicznych (innych niż podstawowe 20) aminokwasów w miejsce zdefiniowane przez kodony terminatorowe.

ROZSZERZONY KOD GENETYCZNY

W białkach występujących w przyrodzie znajdowanych jest ok. 140 różnych reszt aminokwasowych. Podstawowy zestaw złożony jest tylko z 20, które mają swoje odpowiedniki w postaci kodonów kodu genetycznego i są wprowadzane do łańcuchów polipeptydowych podczas translacji. Ten zestaw jest uniwersalny dla wszystkich organizmów niezależnie od ich złożoności czy środowiska, w którym żyją. Ograniczenie pojemności kodu genetycznego, zostało prawdopodobnie ustalone na bardzo wczesnych etapach jego ewolucji. Przyjmuje się, że dzisiejszy trzyliterowy kod trójkowy powstał na bazie dwuliterowego kodu trójkowego, w którym jedynie dwa pierwsze nukleotydy wykorzystywane były do kodowania [4]. Znajduje to odzwierciedlenie we współczesnym kodzie genetycznym, w którym większość aminokwasów kodowana jest przez grupy różniących się jedynie w trzeciej pozycji kodonów. Pozwala to na zminimalizowanie szkodliwego efektu mutacji punktowych.

Kod dwuliterowy pozwalał na zakodowanie jedynie 16 różnych reszt aminokwasowych. W trakcie ewolucji doszło do rozszerzenia zdolności kodowania, co doprowadziło do powstania uniwersalnego trzyliterowego kodu. Ślady tego procesu ewolucyjnego zachowane są do dzisiaj. Niektóre organizmy nie posiadają aminoacylo-tRNA syntetaz specyficznych dla reszt asparaginy i glutaminy. Jednocześnie występują u nich specyficzne tRNA, które pozwalają na swoiste wprowadzanie tych reszt aminokwasowych do łańcuchów polipeptydowych.

Synteza Asn-$tRNA^{Asn}$ i Gln-$tRNA^{Gln}$ zachodzi w dwustopniowym procesie. W pierwszym etapie $tRNA^{Asn}$ i $tRNA^{Gln}$ aminoacylowane są resztami kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego przy wykorzystaniu odpowiednich syntetaz, a następnie aminokwasy te przekształcane są w amidy przez amidotransferazy [5].

W przyrodzie występują jednak dwa przykłady rozszerzenia zdolności kodowania wykraczające poza podstawowy kanoniczny zestaw 20 reszt aminokwasowych. Selenocysteina (Sec) i pyrrolizyna (Pyl) są wstawiane w określonych warunkach, do łańcucha białkowego w trakcie translacji w pozycje określone kodonami stop UGA (selenocysteina) i UAG (pyrrolizyna). W obydwu przypadkach wykorzystywane są jednak odmienne strategie. W komórkach brak jest syntetaz specyficznych dla selenocysteiny i podobnie jak Asn-$tRNA^{Asn}$ czy Gln-$tRNA^{Gln}$ opisane powyżej, Sec-$tRNA^{Sec}$ powstaje w dwóch etapach. Aminoacylacja tRNA zachodzi z wykorzystaniem seryny i specyficznej dla niej syntetazy. W następnym etapie, przyłączona do tRNA seryna jest substratem dla syntezy selenocysteiny [6]. Pyrrolizyna przyłączana jest do swoistego $tRNA^{Pyl}$ bezpośrednio przez swoistą dla niej syntetazę [7].

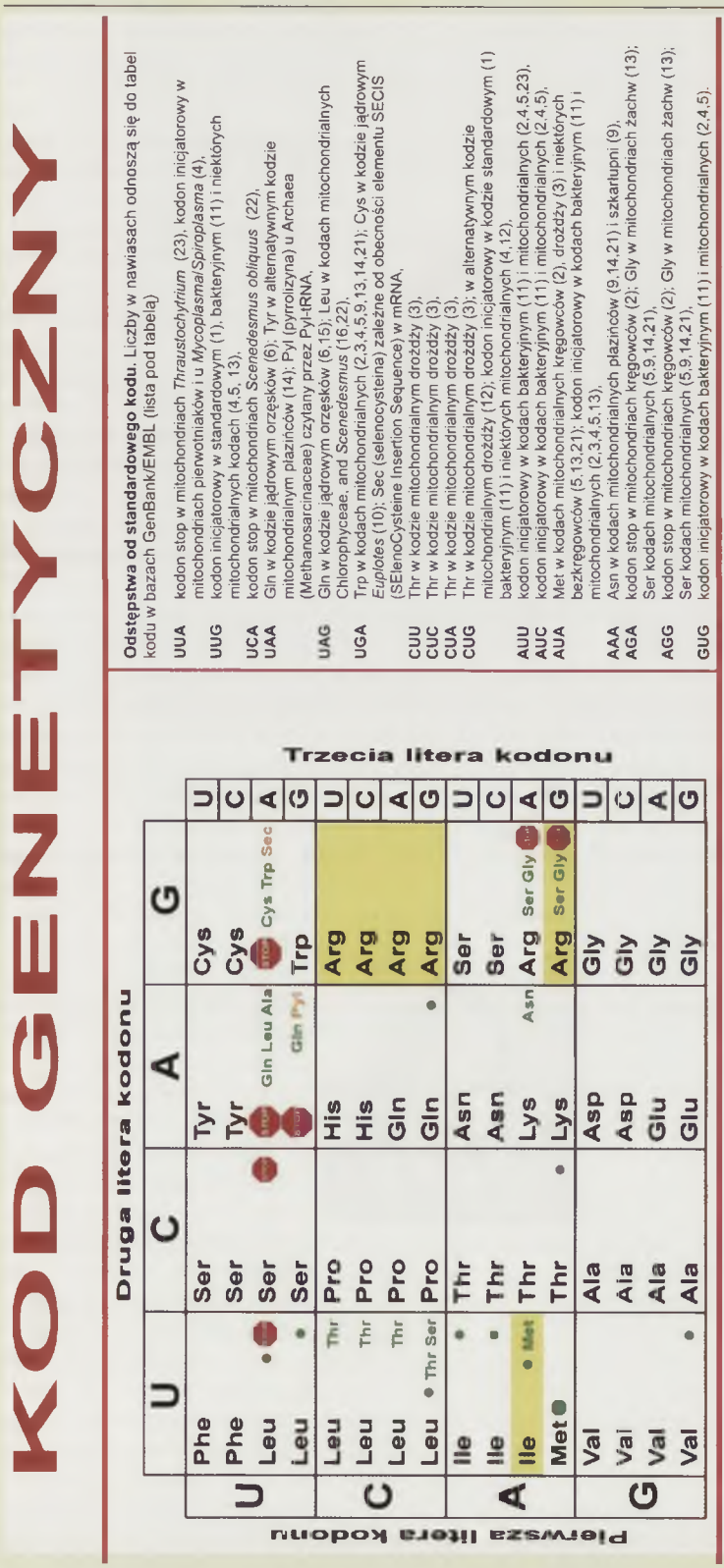
Włączanie do białek selenocysteiny i pyrrolizyny jest faktycznym ewolucyjnym rozszerzeniem standardowego kodu genetycznego. Dla obydwu reszt aminokwasowych istnieją bowiem swoiste tRNAs rozpoznające ściśle określone kodony. W odróżnieniu jednak od kodonów odpowiedzialnych za wprowadzanie innych aminokwasów ich obecność w sekwencji mRNA nie jest warunkiem wystarczającym dla odczytania ich w trakcie translacji jako odpowiednio Sec i Pyl. Przyłączanie pyrrolizyny lub selenocysteiny wymaga obecności elementów struktury RNA określanych jako PYLIS (ang. *pyrrolysine insertion sequence*) i SECIS (ang. *selenocysteine insertion sequence*) w otoczeniu odpowiedniego kodonu stop [8,9]. Przypomina to supresję kodonów terminatorowych powszechnie występującą zarówno u prokariotów jak i eukariotów [10]. Ponadto, w przypadku selenocysteiny jej wstawienie do łańcucha polipeptydowego zależne jest od aktywności specyficznego czynnika elongacyjnego [11].

PODSUMOWANIE

Kod genetyczny rozumiany jako przypisanie poszczególnych reszt aminokwasowych do odpowiednich trójek nukleotydowych stanowi szyfr dla zachodzącej na matrycy mRNA biosyntezy białka. Nie można jednak w rozważaniach jego natury i właściwości pomijać innych składników aparatu dekodującego. Już w 1955 roku w niepublikowanym opracowaniu napisanym dla *Tie Club*, Francis Crick przewidział istnienie cząsteczek adaptorowych stanowiących łączniki pomiędzy trójnukleotydami matrycy i odpowiadającymi im resztami aminokwasowymi [12]. Hipoteza ada-

http://rcin.org.pl

ptorowa znalazła potwierdzenie w odkrytych kilka lat później cząsteczkach tRNA. Proces dekodowania informacji genetycznej wymaga zatem wysoce specyficznego mechanizmu, który wiąże reszty aminokwasowe z właściwymi dla nich cząsteczkami tRNA. Zadanie to spełniają syntetazy aminoacylo-tRNA, które katalizują przyłączanie reszt aminokwasowych do 3'-końców tRNA. Tym samym, enzymy te są faktycznymi "tłumaczami" kodu genetycznego, a czynniki determinujące specyficzne rozpoznanie tRNA przez syntetazy są niekiedy określane terminem drugiego kodu genetycznego [13].



Odstępstwa od standardowego kodu. Liczby w nawiasach odnoszą się do tabel kodu w bazach GenBank/EMBL (lista pod tabelą)

UUA	kodon stop w mitochondriach *Thraustochytrium* (23); kodon inicjatorowy w mitochondriach pierwotniaków i u *Mycoplasma/Spiroplasma* (4);
UUG	kodon inicjatorowy w standardowym (1), bakteryjnym (11) i niektórych mitochondrialnych kodach (4,5, 13);
UCA	kodon stop w mitochondriach *Scenedesmus obliquus* (22);
UAA	Gln w kodzie jądrowym orzęsków (6); Tyr w alternatywnym kodzie mitochondrialnym płazińców (14); Pyl (pyrrolizyna) u Archaea (Methanosarcinaceae) czytany przez Pyl-tRNA;
UAG	Gln w kodzie jądrowym orzęsków (6,15); Leu w kodach mitochondrialnych Chlorophyceae, and *Scenedesmus* (16,22);
UGA	Trp w kodach mitochondrialnych (2,3,4,5,9,13,14,21); Cys w kodzie jądrowym *Euplotes* (10); Sec (selenocysteina) zależne od obecności elementu SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence) w mRNA;
CUU	Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
CUC	Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
CUA	Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3);
CUG	Thr w kodzie mitochondrialnym drożdży (3); w alternatywnym kodzie mitochondrialnym drożdży (12); kodon inicjatorowy w kodzie standardowym (1) bakteryjnym (11) i niektórych mitochondrialnych (4,12);
AUU	kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5,23);
AUC	kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5);
AUA	Met w kodach mitochondrialnych kręgowców (2), drożdży (3) i niektórych bezkręgowców (5,13,21); kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,3,4,5,13);
AAA	Asn w kodach mitochondrialnych płazińców (9,14,21) i szkarłupni (9);
AGA	kodon stop w mitochondriach kręgowców (2); Gly w mitochondriach żachw (13);
AGG	kodon stop w mitochondriach kręgowców (2); Gly w mitochondriach żachw (13); Ser kodach mitochondrialnych (5,9,14,21);
GUG	kodon inicjatorowy w kodach bakteryjnym (11) i mitochondrialnych (2,4,5).

Tabela kodu genetycznego. Kodony inicjatorowe i terminatorowe są oznaczone odpowiednio zielonymi kropkami i znakami STOP. W prawej kolumnie zaznaczono odstępstwa od standardowego kodu kolorami zielonym (20 podstawowych reszt aminokwasowych), pomarańczowym (selenocysteina i pyrrolizyna) i małymi symbolami (kodony inicjatorowe i stop). Żółte tło oznacza kodony nie wykorzystywane przez niektóre organizmy. Kodony inicjatorowy i terminatorowe w standardowym kodzie oznaczone są dużymi znakami.

Reszty aminokwasowe: Ala-Alanina, Arg-Arginina, Asn-Asparagina, Asp-Kwas asparaginowy, Cys-Cysteina, Gln-Glutamina, Glu-Kwas glutaminowy, Gly-Glicyna, His-Histydyna, Ile-Izoleucyna, Leu-Leucyna, Lys-Lizyna, Met-Metionina, Phe-Fenyloalanina, Pro-Prolina, Pyl-Pyrolizyna, Sec-Selenocysteina, Ser-Seryna,Thr-Treonina, Trp-Tryptofan, Tyr-Tyrozyna, Val-Walina.

Numery tabel kodu wg. GenBank. **1.** kod standardowy; **2.** kod mitochondrialny kręgowców; **3.** kod mitochondrialny drożdży; **4.** kod mitochondrialny pierwotniaków, jamochłonów oraz niektórych bakterii (Mycoplasma/Spiroplasma); **5.** kod mitochondrialny bezkręgowców; **6.** kod jądrowy orzęsków; **9.** kod mitochondrialny szkarłupni i orzęsków; **10.** kod jądrowy *Euplotes*; **11.** kod bakteryjny i plastydowy; **12.** alternatywny kod mitochondrialny drożdży; **13.** kod mitochondrialny żachw; **14.** alternatywny kod mitochondrialny płazińców; **15.** kod jądrowy *Blepharisma*; **16.** kod mitochondrialny Chlorophyceae; **21.** kod mitochondrialny Trematoda; **22.** kod mitochondrialny *Scenedesmus obliquus*; **23.** kod mitochondrialny *Thraustochytrium*. (Źródło: *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi*)

PIŚMIENNICTWO

1. Nirenberg MW, Matthae JH, Jones OW (1962) An intermediate in the biosynthesis of polyphenylalanine directed by synthetic template RNA. Proc Natl Acad Sci USA 48: 104-109
2. Nirenberg M, Caskey T, Marshall R, Brimacombe R, Kellogg D, Doctor B, Hatfield D, Levin J, Rottman F, Pestka S, Wilcox M, Anderson F (1966) The RNA code and protein synthesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 31: 11-24
3. Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF (2001) Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. Nat Rev Genet 2: 49-58
4. Travers A (2006) The Evolution of the Genetic Code Revisited. Orig Life Evol Biosph 36: 549-555
5. Ibba M, Söll D (2001) The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. EMBO Rep 2: 382-387
6. Ambrogelly A, Palioura S, Soll D (2007) Natural expansion of the genetic code. Nat Chem Biol 3: 29-35
7. Srinivasan G, James CM, Krzycki JA (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. Science 296: 1459-1462
8. Mix H, Lobanov AV, Gladyshev VN (2007) SECIS elements in the coding regions of selenoprotein transcripts are functional in higher eukaryotes. Nucleic Acids Res 35: 414-423
9. Longstaff DG, Blight SK, Zhang L, Green-Church KB, Krzycki JA (2007) In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine. Mol Microbiol 63: 229-241
10. Beier H, Grimm M (2001) Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. Nucleic Acids Res 29: 4767-4782
11. Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A (2000) Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. EMBO J 19: 4796-4805
12. Crick FHC (1955) On degenerate templates and adaptor hypothesis. http://genome.wellcome.ac.uk/assets/wtx030893.pdf
13. Beuning PJ, Musier-Forsyth K (1999) Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. Biopolymers 52: 1-28

*Opracowano na podstawie: Szymański M, Barciszewski J (2007) The Genetic Code — 40 years on. Acta Biochim Polon 54: 51-54

Dr Maciej Szymański
Prof. dr hab. Jan Barciszewski

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: mszyman@ibch.poznan.pl
e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

http://rcin.org.pl

Nabór wniosków do Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych rozpoczęła konferencja inauguracyjna, podczas której minister nauki i szkolnictwa wyższego z udziałem prof. Michała Seweryńskiego i norweskiego ministra edukacji i badań — Oystein Djupedal'a. Fundusz jest grantem blokowym wydzielonym z Norweskiego Mechanizmu Finansowego (NMF) w ramach Priorytetu nr 6: Badania Naukowe. Jego celem jest budowa oraz zacieśnienie współpracy pomiędzy polskimi i norweskimi naukowcami zajmującymi się szeroko pojętą ochroną środowiska i ochroną zdrowia. Rolę Operatora Funduszu pełni Ośrodek Przetwarzania Informacji w Warszawie, do którego zadań należy m.in. bezpośrednia współpraca z beneficjentami, szczególnie w zakresie podpisywania umów, refundacji środków oraz monitoringu i kontroli projektów.

W sumie na wspólne polsko-norweskie projekty naukowe przeznaczono ponad 14,5 mln euro. O środki te ubiegać się mogą zarówno instytucje prowadzące działalność badawczą (szkoły wyższe, jednostki PAN oraz jednostki badawczo-rozwojowe), jak również organizacje pozarządowe działające na rzecz pożytku publicznego. Warunkiem koniecznym jest to, aby partnerem wiodącym w projekcie była instytucja polska. Tylko ona może też wystąpić o przyznanie środków na dofinansowanie projektu.

Beneficjenci Funduszu mogą ubiegać się o środki na dwóch płaszczyznach - na dofinansowanie projektów badawczych realizowanych w obszarach ochrony środowiska (np. zachowania różnorodności biologicznej, badań polarnych i alternatywnych źródeł energii) oraz ochrony zdrowia i zagadnień takich, jak starzenie się czy nowe leki. Na te działanie przeznaczone jest 90 proc. środków. Drugą grupą realizowanych zadań finansowanych z tych funduszy będzie organizacja warsztatów i seminariów, które mogą przyczynić się do ułatwienia polsko-norweskiej współpracy naukowej (we wszystkich priorytetowych obszarach NMF). Poziom dofinansowania będzie natomiast zależeć od charakteru środków własnych beneficjentów i może wynieść 60–90 proc. wartości całego projektu. **Informacje na temat funduszu**, jak i także dokumenty oraz informacje o naborze wniosków, można znaleźć na stronie funduszu: **www.fbn.opi.org.pl.**

POLPHARMA w 2001 r. powołała do życia **Fundację Na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny.** Jej celem jest udzielanie wsparcia finansowego projektom badawczym z zakresu nauk farmaceutycznych i medycznych. To pierwsza tego typu instytucja założona przez polską, prywatną firmę farmaceutyczną.

Fotografia 1. Mgr Marek Nocuń.

W 2006 r. Fundacja uruchomiła **program stypendialny** adresowany do młodych naukowców, uczestników studiów doktoranckich uczelni medycznych i Centrum Podyplomowego Kształcenia Medycznego. Celem programu jest promowanie i nagradzanie najzdolniejszych doktorantów z udokumentowanym dorobkiem naukowym. **Nagrodą jest stypendium naukowe w wysokości 10 tys. zł finansowane ze środków Fundacji.** Stypendyści wyłaniani są w drodze konkursu organizowanego przez Fundację raz na dwa lata. Doktorantów do udziału w konkursie rekomendują uczelnie, przy czym każda ma prawo zgłoszenia trzech kandydatów. Stypendia przyznaje zarząd Fundacji na wniosek Rady Naukowej. Na pierwszą edycję konkursu wpłynęło 17 wniosków o stypendium, które zostały przeanalizowane przez Radę Naukową Fundacji. Laureatami pierwszej edycji konkursu o stypendium naukowe Fundacji zostali: **Agnieszka Gach** i **Marek Nocuń z** UM w Łodzi (Fot. 1), **Katarzyna Kocbuch** z AM w Gdańsku, **Aleksandra Szczepankiewicz z** AM w Poznaniu i **Dorota Żelaszczyk z CM** UJ (Fot. 2). Decyzją Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 28.02.2007 r. stypendium doktoranckie Fundacji zostało uznane za stypendium naukowe zgodnie z przepisami o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki. Decyzja Ministerstwa ma znaczenie nie tylko prestiżowe dla Fundacji, ale także finansowe dla stypendysty.

Fotografia 2. Mgr Dorota Żelaszczyk.

Zgodnie z intencją założycieli, **Fundacja Na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny corocznie ogłasza konkurs** na najlepsze projekty badawcze w dziedzinie nauk farmaceutycznych i medycznych. W marcu 2007 r. rozpoczęto VI edycję konkursu. Tematem VI edycji konkursu jest: **„Problem współpracy z pacjentem w leczeniu oraz profilaktyce chorób przewlekłych: wytypowanie, ocena, propozycje poprawy.** Od momentu powstania w 2001 r. Fundacja przeprowadziła pięć edycji konkursu, na który wpłynęło ponad 300 projektów prac badawczych. W wyniku postępowania konkursowego granty otrzymało już 38 zespołów badawczych. Realizacja wybranych prac jest finansowana przez Fundację. Środki finansowe przeznaczone na działalność statutową Fundacji w całości pochodzą z budżetu **Zakładów Farmaceutycznych POLPHARMA SA** w Starogardzie Gdańskim. Firma przekazała na ten cel już 12 milionów złotych.

Projekt Mapa Polski. W roku 2006 **Fundacja na rzecz rozwoju Nauki Polskiej** rozpoczęła **badania nad mobilnością młodych naukowców.** Celem badań jest analiza obecnej migracji młodego pokolenia badaczy: jej skali, częstotliwości, dynamiki, kierunków, przyczyn, skutków, etc. FNP w swych działaniach na rzecz nauki pragnie opierać się na wiarygodnych analizach i zweryfikowanych danych, dotyczących najistotniejszych potrzeb środowisk naukowych. Wnioski ra-

http://rcin.org.pl

portu, jako efekt podjętych badań, posłużą lepszemu dopasowaniu programów Fundacji do oczekiwań młodych naukowców. Raport zostanie opracowany w 2007 r.

Utworzenie Międzynarodowej Sieci Uniwersytetów Badawczych – IRUN. 7 września 2007 roku na Uniwersytecie w Nijmegen w Holandii przedstawiciele **Uniwersytetu Jagiellońskiego**, Katolickiego Uniwersytetu im. Petera Pazmanyego w Budapeszcie, Uniwersytetu Radboud w Nijmegen, Uniwersytetu Barcelońskiego, Uniwersytetu w Duisburgu-Essen, Uniwersytetu w Glasgow, Uniwersytetu w Münster, Uniwersytetu w Poitiers i Uniwersytetu Sieneńskiego podpisali kartę założycielską Międzynarodowej Sieci Uniwersytetów Badawczych (International Research Universities Network). IRUN zamierza zintensyfikować współpracę między tworzącymi tę organizację uczelniami w zakresie prac badawczych, wymiany kadry oraz studentów, jak również nadać im charakter wielostronny. Planowane jest także jednoczesne nadawanie tytułów BA, MA i PhD przez przynajmniej dwie uczelnie. W trakcie spotkania założycielskiego zdecydowano o powołaniu Komitetu Nadzorującego oraz Sekretariatu IRNU. Zapadły również decyzje o najbliższych działaniach tej organizacji w 2008 roku: Uniwersytet w Poitiers zorganizuje szkołę letnią dla studentów „Europa i jej regiony", a Uniwersytety w Barcelonie i Münster zorganizują Nano sympozjum.

Polscy naukowcy jako eksperci w 7 Programie Ramowym. Komisja Europejska i Krajowy Punkt Kontaktowy zachęcają naukowców do rejestrowania się w bazie ekspertów oceniających projekty w 7 PR. Niewielki udział Polaków zmniejsza szanse na powodzenie polskich wniosków! Ekspertem może zostać każda osoba działająca w sferze badawczo-rozwojowej. Podstawowym wymogiem jest posiadana wiedza i doświadczenie w danej dziedzinie oraz znajomość języka angielskiego. Do udziału zapraszani są profesorowie, doktorzy (także młodzi pracownicy nauki), przedsiębiorcy i administratorzy. Eksperci zyskują doświadczenie nieocenione w przygotowaniu własnych projektów, poznają wymogi KE, nawiązują kontakty pracując w międzynarodowej grupie oraz otrzymują gratyfikację finansową od KE. Zgłoszenia mogą być dokonywane w trybie ciągłym przez instytucje i osoby indywidualne w całym siedmioletnim okresie działania 7 PR. Zgłaszając się należy wypełnić formularze zgłoszeń dostępne na stronie CORDIS https://cordis.europa.eu/emmfp7/index.cfm?fuseaction=wel.welcome. Więcej szczegółów na stronie Krajowego Punktu Kontaktowego 7 PR http://www.kpk.gov.pl/7pr/eksperci.html.

Nagrody dla fizyków z Uniwersytetu Jagiellońskiego. Polskie Towarzystwo Fizyczne uhonorowało w bieżącym roku fizyków z Uniwersytetu Jagiellońskiego przyznając im swe doroczne nagrody. PTF przyznaje corocznie nagrodę naukową im. Wojciecha Rubinowicza dla wyróżniania aktualnych naukowych osiągnięć fizyków polskich; nagrodę przyznaje się za wybitne i twórcze prace badawcze z zakresu fizyki. Nagrodę za rok 2007 i dyplom otrzymał **prof. dr hab. Wojciech Gawlik** (Fot. 3) z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego, za osiągnięcia z zakresu spektroskopii laserowej i fotoniki, a w szczególności za prace, które doprowadziły do wytworzenia w Polsce **kondensatu Bosego-Einsteina**.

Fotografia 3. Prof. dr hab. Wojciech Gawlik.

Pierwszy w Polsce kondensat Bosego-Einsteina został otrzymany 2 marca 2007 roku w Krajowym Laboratorium Fizyki Atomowej, Molekularnej i Optycznej. Osiągnęła to grupa ośmiu fizyków, pod kierunkiem prof. Wojciecha Gawlika z IF UJ: Wojciech Gawlik, Andrzej Noga, Jerzy Zachorowski i Michał Zawada (UJ), Franciszek Bylicki i Michał Zawada (UMK), Włodzimierz Jastrzębski (IF PAN, Warszawa), Jacek Szczepkowski (Pomorska Akademia Pedagogiczna, Słupsk) Marcin Witkowski (Uniwersytet Opolski). Projekt wytworzenia polskiego kondensatu powstał w Instytucie Fizyki UJ, gdzie przed dziesięciu laty prof. Gawlik ze współpracownikami podjęli pierwsze w kraju doświadczenia nad laserowymi metodami ochładzania i pułapkowania atomów. W 1998 roku powstała w Krakowie pierwsza polska pułapka magnetooptyczna, w której osiągnięto temperaturę 100 mikrokelwinów (0,0001 K). Dzięki powstaniu w 2001 r. Krajowego Laboratorium Fizyki Atomowej, Molekularnej i Optycznej przy UMK w Toruniu, można było rozszerzyć zakres tych badań na jeszcze niższe temperatury, w których możliwa jest już kondensacja Bosego-Einsteina. Można też było w nie włączyć również inne ośrodki. Dzięki temu do zespołu dołączył Włodzimierz Jastrzębski z IF PAN w Warszawie, który jako jedyny wówczas polski fizyk eksperymentował z kondensatem za granicą. Duży wkład do projektu w jego wstępnej fazie wnieśli też: Maria Brzozowska i Tomasz Brzozowski z IFUJ i Paweł Kruk (pierwotnie z IFDośw. UW, potem z IF UJ). Badania finansował Komitet Badań Naukowych. Mimo upływu dwunastu lat od jego odkrycia, kondensat Bosego-Einsteina jest badany w zaledwie szesnastu krajach; od 2 marca br. Polska jest jednym z nich – jedynym między Łabą a Pekinem.

Kondensat Bosego-Einsteina to postulowany teoretycznie przez Satyendrę Natha Bosego i Alberta Einsteina w 1924 roku, bardzo egzotyczny stan materii, który może zostać osiągnięty przez obiekty kwantowe należące do grupy cząstek zwanych bozonami. W czystej formie zaobserwowano go dopiero w roku 1995 w doświadczeniach wykonanych w USA z rozrzedzonymi atomami. Autorzy tych doświadczeń w 2001 roku otrzymali nagrodę Nobla.

Kondensacja Bosego-Einsteina jest jednym z najważniejszych zjawisk, w których przejawia się falowa natura atomów i w których możemy obserwować efekty kwantowe w skali ma-

http://rcin.org.pl

kroskopowej. Niezwykłość kondensatu polega na tym, że jest to zbiór dużej liczby atomów (w polskim doświadczeniu rzędu 100000) z których wszystkie są w tym samym stanie o najniższej energii i zachowują się w identyczny sposób. Badania własności kondensatu umożliwiają fizykom poznawanie zjawisk, takich jak nadciekłość i nadprzewodnictwo. Kondensat Bosego-Einsteina stwarza też nadzieję na stworzenie komputerów kwantowych, które do niedawna należały do obszaru fantastyki naukowej, a także może pozwolić na tysiąckrotne poprawienie dokładności obecnych zegarów atomowych, istotnej dla telekomunikacji i nawigacji (wg www.UJ).

Stacja naukowa PAN w Wiedniu zaprasza. Wg informacji dyrektora Stacji Naukowej PAN w Wiedniu, dr hab. Bogusława Dybasia istnieją możliwości współpracy w obszarze polsko-austriackich kontaktów naukowych. Stacja Naukowa PAN mieści się w dawnym „Domu Polskim" w 3. dzielnicy Wiednia, w bezpośrednim sąsiedztwie kompleksu pałacowego Belweder, a także w pobliżu Dworca Południowego (Südbahnhof); tu zwykle przyjeżdżają autobusy i pociągi z Polski.

Głównym zadaniem Stacji Naukowej PAN w Wiedniu jest popularyzowanie osiągnięć nauki polskiej na terenie Austrii oraz wspomaganie polsko-austriackiej współpracy naukowej. Stacja dysponuje odpowiednim zapleczem lokalowym w gmachu przy Boerhaavegasse 25, w którym są odpowiednio wyposażone sale konferencyjne dla ok. 80 i 30 osób i 40 miejsc noclegowych w pokojach gościnnych. Stacja jest otwarta na propozycje organizowania imprez o charakterze naukowym. Pokoje gościnne z aneksem kuchennym i dostępem do internetu na terenie Stacji mogą być wykorzystane przez polskich (i zagranicznych) uczonych, stypendystów, doktorantów, a także studentów, przy krótszych lub dłuższych pobytach na terenie Wiednia. Więcej informacji można uzyskać na stronie www.viennapen.org, w korespondencji z Dyrektorem Dybasiem: dybas.viennapen@ycn.com oraz w kontaktach telefonicznych: +43-1-713-03 83-305 lub faksem: + 43-1-713-5929-550 (301).

Fotografia 4. Prof. Zygmunt Machoy.

Profesor Zygmunt Machoy doktorem honoris causa Pomorskiej Akademii Medycznej. Współzałożyciel i kilkukrotny przewodniczący Oddziału PTBiochemicznego w Szczecinie, niezmordowany propagator biochemii, a od 1994 roku Członek Honorowy Towarzystwa, prof. Zygmunt Machoy otrzymał najwyższą godność akademicką w swojej Alma Mater, w dniu 1 października podczas uroczystej inauguracji roku akademickiego 2007/2008 (Fot. 4). Laudację przedstawiał prof. Dariusz Chlubek – wychowanek i następca Profesora (Fot. 5).

Profesor Machoy jest Wielkopolaninem; urodził się w roku 1924 w Wolsztynie. Zanim osiągnął akademickie wykształcenie przeżył ponure czasy II wojny światowej i lata okupacji w Polsce. Mając dystans czasowy do tego okresu Profesor opowiada z uśmiechem o tych niełatwych latach, dziś ocenianych jako znakomita szkoła życia; były wstępem do wykształcania trudnej umiejętności życia w gromadzie, współpracy i podejmowania niełatwych decyzji. Jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Poznańskiego, z roku 1951. Od tej pory jest związany z Pomorską Akademią Medyczną, choć stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał na UAM. W 1962 r. uzyskał stopień doktora nauk przyrodniczych na podstawie rozprawy pt. Kontaktowe odbarwianie niektórych barwników spożywczych przy współudziale tlenu powietrza, a stopień doktora habilitowanego w 1970 r. broniąc rozprawy pt. Fizykochemiczne badania procesu pobierania tlenu przez układ oksydazy cytochromowej. Posiada dwa stopnie specjalizacji w zakresie analityki chemicznej. W roku 1976 objął kierownictwo Zakładu Chemii Fizjologicznej PAM, przemianowanego później na Zakład Biochemii PAM. W 1986 r. uzyskał tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 1992 tytuł profesora zwyczajnego. Prof. Machoy był czynny w życiu Uczelni. W latach 1981–84 pełnił obowiązki prodziekana Wydziału Lekarskiego PAM, a przez kolejne 3 lata kierował Wydziałem Lekarskim jako dziekan. W wyniku Jego starań w 1987 r. Uczelnia uzyskała prawa do nadawania stopni doktora i doktora habilitowanego w zakresie biologii medycznej. Przez 50 lat pełnił różne funkcje w komisjach Senackich PAM. W latach 1996–2006 był organizatorem i kierownikiem Studium Doktoranckiego PAM.

Fotografia 5. Prof. Dariusz Chlubek.

Ujmując sprawę statystycznie Profesor jest autorem lub współautorem ok. 250 publikacji w czasopismach polsko- i anglojęzycznych, w tym prac oryginalnych i poglądowych, autorem lub redaktorem wydawnictw książkowych, w tym „Metabolizm fluoru", skryptu „Chemia", podręcznika „Biochemia", 18 zeszytów Studenckiego Towarzystwa Naukowego PAM, rozdziałów w książkach: „Szkodliwość zanieczyszczeń chemicznych dla człowieka i zwierząt" – wydanej przez PAN, „Bioaccumulation and elimination of fluorine compounds" wydanej przez ISFR oraz „Historia nauczania medycyny w Polsce" wydanej przez PAU. Profesor Machoy jest autorem niezliczonej liczby referatów programowych prezentowanych podczas naukowych spotkań tak w kraju, jak i poza Polską. Początkowo zajmowały Profesora zagadnienia z dziedziny analityki lekarskiej, tj. wykorzystanie badań białka krwi

http://rcin.org.pl

i płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce patologii przebiegających z ostrym lub przewlekłym procesem zapalnym układu nerwowego. Przez kolejne lata badał mechanizmy działania enzymów łańcucha oddechowego komórki, ze szczególnym odniesieniem do oksydazy cytochromowej oraz prowadził lub inicjował badania zmian energetycznych towarzyszących reakcjom biochemicznym. Uchodził wówczas w środowisku biochemików za wielkiego znawcę zagadnienia. Badania te były kontynuacją oraz rozwinięciem wcześniej prowadzonych badań łańcucha oddechowego komórki. Badania biopierwiastków, poza fluorem, z uwzględnieniem roli i znaczenia pierwiastków chemicznych w organizmach żywych, zajmowały Profesora i Jego zespół w latach 1986–2001. Były i są to badania odnoszące się do różnych tkanek i organizmów. Dzięki poznawaniu mechanizmów — korzystnych i szkodliwych — działania związków fluoru w roślinach, u zwierząt i ludzi, zostało stworzone pojęcie biologicznego zagrożenia ze strony związków fluoru dla różnych organizmów żywych oraz rozpoczęto w praktyce rolniczej i medycznej aplikacje teoretycznych przesłanek wynikających z badań doświadczalnych. Problematyka związana z bioenergetyką i przemianami fluoru zyskała największe uznanie środowisk biochemicznego i lekarskiego. Te kierunki badawcze zyskały uznanie na arenie międzynarodowej.

Podejmowana i rozwijana przez Profesora i Jego Zespół problematyka badawcza doprowadziła do ukształtowania swoistej szkoły analitycznej dysponującej różnorodnymi technikami i narzędziami analitycznymi. W oparciu o doświadczenia Katedry organizowane są w niej okresowo warsztaty problemowe dostępne dla uczestników spoza Szczecina. Problematyka naukowa, zajmująca bez reszty Katedrę Biochemii i Chemii PAM zainteresowała wiele laboratoriów i klinik nie tylko w PAM i uczelniach Szczecina, ale badania nad oddziaływaniem fluoru rozwinęły się w pozostałych akademiach medycznych w Polsce oraz w niektórych uczelniach rolniczych i technicznych kraju.

Szeroko pojęta i zakrojona na znaczną skalę krajowa i międzynarodowa publikacja osiągnięć badań nad naturą fluoru stanowiła odpowiedź uczonych tej miary co Profesor Machoy na oczekiwania ekologów i świata lekarskiego w sprawie przeciwdziałania degradacji środowiska naturalnego przez postępujące uprzemysłowienie oraz wskazywały na zagrożenie zdrowia i życia wskutek stosowania pochodnych fluorowych w medycynie, stomatologii i rolnictwie. Wymiernym skutkiem realizacji badań była chociażby zmiana technologii produkcji nawozów fosforowych w Zakładach Chemicznych „Police", emitera niebezpiecznych ilości fluoru do atmosfery.

Promocja problematyki badawczej i merytorycznych nowości uzyskanych przez Profesora i Jego Zespół miała miejsce podczas spotkań naukowych organizowanych przez Profesora lub w kooperacji z innymi partnerami. Organizowane przez szczeciński Oddział PTBioch. konferencje pod nazwą Dni Biochemiczne PAM, niemal cyklicznie przygotowywane przez Zespół Profesora sympozja fluorowe, specjalistyczne sesje w programach krajowych zjazdów biochemicznych, zorganizowana z wielką determinacją w Szczecinie, w roku 2000, światowa konferencja ISFR stanowiły platformy, na których naukowcy rozmaitych specjalności dyskutowali uzyskane wyniki badań doświadczalnych i klinicznych oraz zalety użytych selektywnych technik i metod analitycznych. Naukowcy o szczególnym autorytecie naukowym przede wszystkim nagłaśniali odpowiednim służbom administracyjnym miasta i państwa problemy ekologiczne i zdrowotne wynikające z coraz bardziej zaawansowanych badań.

Fotografia 6. Prof. Marek Drożdzik.

Pan prof. Zygmunt Machoy jest Człowiekiem bardzo aktywnym. Przynależność do towarzystw naukowych, pełnione w nich funkcje są wykładnikiem Jego zaangażowania w sprawy nauki i jej promocję. Przynależność do towarzystw biochemicznego (1961), chemicznego, toksykologicznego jest naturalnym następstwem wykształcenia i zainteresowań naukowych Profesora. Od roku 1986 jest członkiem International Society for Fluoride Research (ISFR), był drugim i pierwszym wiceprzewodniczącym Towarzystwa w latach 1996–1998 i 1998–2000, a przez kolejne dwa lata kierował ISFR. Brał czynny udział w pracach Rady Redakcyjnej Environmental Sciences (Japonia), „Hungarian Fluoride", „Fluoride"(USA).

Katedra pod rządami Profesora Machoya rozwijała się bujnie. Nadal osiągnięcia jej pracowników, dzisiaj młodych i bardzo młodych, realizacja programów naukowych wydaje się być pod czujnym, acz raczej łagodnym, bardziej ojcowskim niż kierowniczym, okiem Profesora. Sprawy kierownicze bowiem przejął wychowanek Profesora, najmłodszy z grona samodzielnych pracowników, pan profesor Dariusz Chlubek. Profesor wypromował blisko 30 doktorów; z tej grupy Profesor doczekał się czworga doktorów habilitowanych. Aktualnie, trzej z nich, z tytułami naukowymi „profesora", kierują Katedrami i Kliniką w Pomorskiej Akademii Medycznej.

Zachodniopomorski Nobel. Laureatem Zachodniopomorskiego Nobla w naukach medycznych za 2006 r. został **profesor Marek Droździk z Pomorskiej Akademii Medycznej** (Fot. 6). Otrzymał go za poszukiwanie czynników genetycznych wpływających na skuteczność i bezpieczeństwo farmakoterapii, szczególnie lekami immunosupresyjnymi i immunomodulującymi u chorych po przeszczepieniu narządów oraz z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Wyniki jego badań przyczyniają się do indywidualizacji leczenia pacjentów, prowadząc tym samym do wzrostu skuteczności i bezpieczeństwa leczenia. W niektórych przypadkach działań niepożądanych badania te mogą mieć też znaczenie diagnostyczne.

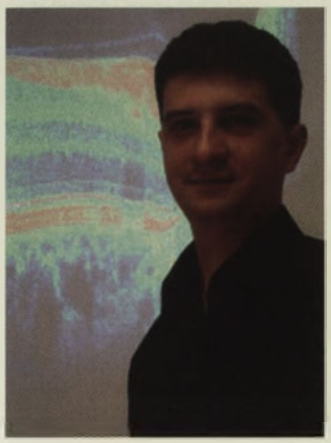
http://rcin.org.pl

Profesor Marek Droździk jest kierownikiem Katedry Farmakologii oraz Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej PAM, a także prodziekanem Wydziału Lekarskiego ds. studentów zagranicznych. Jego zainteresowania naukowe obejmują farmakokinetykę leków w stanach patologicznych oraz wzajemne oddziaływanie leków. Prowadzi również badania nad właściwościami farmakologicznymi surowców pochodzenia naturalnego oraz zajmuje się zagadnieniami terapii genowej i farmakogenetyki. Profesor Droździk jest absolwentem PAM. Jego kariera naukowa jest związana z Akademią oraz Uniwersytetem Nawarra w Hiszpanii i Uniwersytetem Pensylwania w USA. Jest autorem 120 publikacji naukowych i promotorem pięciu przewodów doktorskich. Prowadził badania w ramach 12 grantów KBN, jest także laureatem Nagrody Prezesa Rady Ministrów. Zachodniopomorskie Noble to prestiżowe wyróżnienia za szczególne osiągnięcia naukowe. Przyznawano je już po raz siódmy, w tym roku w sześciu kategoriach: w naukach podstawowych, humanistycznych, medycznych, technicznych, rolniczych i naukach o morzu. W tej ostatniej kategorii przyznano je po raz pierwszy w uznaniu rozwoju tej dziedziny wiedzy.

Odkrycie naukowców z PAM. Skuteczność chemioterapii raka piersi zależy od zmian w genach. W numerze majowym „Breast Cancer Research Treatment" ukazała się praca opisująca niezwykle ważne dla doboru skutecznej chemioterapii raka piersi odkrycie naukowców z Międzynarodowego Centrum Nowotworów Dziedzicznych Pomorskiej Akademii Medycznej. Jako pierwszy w świecie zespół pod kierunkiem prof. Jana Lubińskiego (Fot. 7) wykazał brak skuteczności chemioterapii przedoperacyjnej z użyciem taksanów (zastosowanym lekiem był docetaxel) w leczeniu kobiet z rakiem piersi będących nosicielkami mutacji genu BRCA1. Doktor Tomasz Byrski dokonał analizy skuteczności schematów leczenia przedoperacyjnego w grupie około 3500 chorych w wieku poniżej 51. roku życia z 20 szpitali z większości regionów Polski. U około 800 z nich stopień zaawansowania raka piersi w chwili rozpoznania był tak znaczny, że pacjentki zostały zakwalifikowane do przedoperacyjnej chemioterapii. Okazało się, że w grupie kobiet z mutacją BRCA1 skuteczne były tylko te rodzaje chemioterapii, w których nie stosowano taksanów. U większości pacjentek z rakiem piersi i mutacją genu BRCA1 chemioterapia z użyciem taksanów nie powodowała zmniejszania się masy guza. Taksany należą do leków, których stosowanie wiąże się z występowaniem istotnych powikłań, np. neutropenii, reakcji nadwrażliwości i polineuropatii. W świetle opisanego odkrycia, jak również danych eksperymentalnych z badań na liniach komórkowych oraz obserwacji leczenia raków jajnika wydaje się wysoce celowe, by pacjentkom z mutacją BRCA1 przedstawić do wyboru opcje leczenia neoadjuwantowego raka piersi chemioterapią bez udziału taksanów. Taka procedura jest zgodna z najnowszym stanowiskiem Polskiej Unii Onkologii. Około 6% chorych z rakiem piersi zdiagnozowanym przed 51. rokiem życia to kobiety będące nosicielkami mutacji genu BRCA1. W celu wykrycia mutacji BRCA1 u wszystkich pacjentek z rakiem piersi należy wykonać test DNA, najlepiej z krwi obwodowej, refundowany przez NFZ (wg opracowania prof. J. Lubińskiego, ze strony www.PAM).

Fotografia 7. Prof. Jan Lubiński.

Doktor Maciej Wojtkowski laureatem prestiżowej Nagrody dla Młodego Naukowca (EURYI). Celem nagrody EURYI, utworzonej z inicjatywy European Heads of Research Councils (EuroHORCs) i we współpracy z European Science Foundation (ESF) jest zachęcanie wyjątkowo uzdolnionych, młodych uczonych z całego świata do pracy na rzecz naukowego rozwoju Europy. Tegoroczna edycja EURYI odbyła się po raz ostatni ze względu na uruchomienie podobnego programu przez nowopowstałą Europejską Radę ds. Badań Naukowych – European Research Council (ERC). Konkurs EURYI jest dwuetapowy; na poziomie krajowym procedura selekcyjna koordynowana jest przez organizację członkowską (w Polsce przez FNP), a przebieg konkursu na poziomie europejskim nadzoruje ESF. Wyłoniony w polskim konkursie, **dr Maciej Wojtkowski** (Fot. 8) z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika konkurował z 112 kandydatami z różnych krajów europejskich. 51 osób, w tym dr Wojtkowskiego, zaproszono na rozmowy kwalifikacyjne, które zadecydowały o werdykcie komisji przyznającej nagrody. W tym roku, oprócz Polaka, nagrody otrzymało 19 młodych naukowców: Francuzi (5), Niemcy, Szwajcarzy (á 4), Holendrzy (3) oraz po jednym naukowcu z Turcji, Czech i Szwecji. Wysokość przyznanych nagród waha się od 900 tys. do nieco ponad 1 200 mln euro, wypłacanych w ciągu 5-ciu lat trwania projektu. Całkowita wartość nagrody przyznana polskiemu laureatowi wynosi 1 224 923,91 euro.



Fotografia 8. Dr Maciej Wojtkowski.

32-letni dr Wojtkowski, fizyk medyczny, konstruktor tomografu do badania siatkówki oka, ma ogromny wkład w rozwój metod badań okulistycznych. Pracował w Massachusetts Institute of Technology; odbył także staże na Uniwersytecie w Wiedniu oraz na Uniwersytecie w Kent w Cantenbury; jest stypendystą programów START oraz POWROTY/Homing FNP; otrzymał też stypendium „Polityki". Posiada doświadczenie w projektach finansowanych wspólnie przez Komitet Badań Naukowych i National Institute of Heath (NIH). Stopień naukowy doktora otrzymał na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w 2003 r. Laureat w ramach nagrodzonego projektu zamierza zbadać rozwój me-

http://rcin.org.pl

tod umożliwiających otrzymanie, w nieinwazyjny i bezkontaktowy sposób, nowych informacji o strukturze i czynności organizmów żywych za pomocą światła. Punktem wyjścia interdyscyplinarnego projektu badawczego dr Wojtkowskiego jest rozwój nowych metod obrazowania opartych na tomografii optycznej z użyciem światła częściowo spójnego. Tomografia optyczna OCT (Optical Coherence Tomography) pozwala na rekonstruowanie trójwymiarowej struktury tkanki z rozdzielczością rzędu mikrometrów, która umożliwia szczegółową analizę struktur. Otrzymywane obrazy mogą być analizowane automatycznie przez komputer i dzięki temu możliwa jest ocena postępu zmian patologicznych badanych struktur. Dzięki dotychczasowym pracom dr Wojtkowskiego, tę nowatorską metodę można już teraz zastosować do oceny postępu zmian patologicznych siatkówki, w takich schorzeniach jak: jaskra, zwyrodnienie plamki, otwory w plamce, odwarstwienia siatkówki, błony przedsiatkówkowe i innych. Autor proponuje w swoim projekcie dodatkowe połączenie OCT z mikroskopią fluorescencyjną; może to umożliwić otrzymywanie informacji o czynności i strukturze badanych obiektów biologicznych w skali komórkowej.

Fotografia 9. Prof. Arkadiusz Jawień.

Wykłady popularnonaukowe przeznaczone dla szerokiego kręgu słuchaczy organizuje Polska Akademia Nauk wspólnie z Towarzystwem Naukowym Warszawskim od października 2003 r. Inicjatywa ta — to z jednej strony przypomnienie pięknej tradycji działającej przed laty Wszechnicy PAN, z drugiej — reaktywowanie sprawdzonych form upowszechniania wiedzy o nauce. Wykłady otwarte Wszechnicy **odbywają się w drugą środę miesiąca** (z wyłączeniem dni ustawowo wolnych od pracy) o godz. 17.30 w Sali Lustrzanej w Pałacu Staszica przy ul. Nowy

Świat 72 w Warszawie. Do wygłaszania wykładów zapraszani są znakomici naukowcy i ludzie kultury z wielu ośrodków krajowych i zagranicznych.

Pierwszą nagrodę na dorocznym Europejskim Forum Żylnym (EVF) w Stambule zdobyli **prof. Arkadiusz Jawień (Fot. 9) i dr Paweł Brazis (Fot. 10)**. Praca Polaków p.t. „Haemodynamic assessment of iliac veins and their relationship with the sapheno-femoral junction" została uznana za najlepszą spośród blisko 100 zgłoszonych do konkursu. Ich praca dotyczyła oceny przepływów w układzie żylnym kończyny dolnej u chorych z przewlekłymi zaburzeniami żylnymi. Nad zagadnieniem tym pracowali rok. Odkryli, że dokładna ocena przepływu żylnego już w obrębie miednicy oddziałuje na przepływ w obrębie kończyn dolnych. Do tej pory kończyny dolne badano tylko do pachwiny. Gdańscy specjaliści udowodnili, że poszerzone badania mogą pomóc w diagnozowaniu i leczeniu żylaków nóg u chorych na całym świecie. W ramach nagrody obu naukowców zaproszono do udziału w Amerykańskim Forum Żylnym, które odbędzie się w USA w lutym 2008 roku. Będzie to dla nich okazja do zapoznania zgromadzonych naukowców z tematyką i założeniami swojej pracy. Prof. Jawień kieruje Katedrą i Kliniką Chirurgii Ogólnej CM Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a dr Paweł Brazis jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej tej uczelni.

Fotografia 10. Dr Paweł Brazis.

Paweł Walewski, dziennikarz tygodnika Polityka, zdobył pierwsze miejsce w prestiżowym konkursie Best Cancer Reporter Award 2007. Konkurs, jako inicjatywa European School of Oncology (ESO) z roku 2006, promuje artykuły dziennikarskie, pomagające zrozumieć doświadczenia ludzi chorych na raka, i przypominają, że szanse i jakość przeżycia w wielkiej mierze zależą od zastosowania skutecznych metod wczesnego wykrycia, leczenia i rehabilitacji. Jurorzy zwracali uwagę na dociekliwość dziennikarzy, umiejętność propagowania wiedzy o postępach w onkologii i umieszczania w artykułach informacji społecznie przydatnych. Ocenie jury podlegała umiejętność zachowania wrażliwości dziennikarza wobec pacjenta i rodziny chorego, podejmowanie skutecznej próby uświadamiania chorej osobie, że życie nie zatrzymuje się w chwili poznania lekarskiej diagnozy. ESO uznała, że pan Paweł Walewski ma cechy warunkujące spełnianie oczekiwań pacjentów i jury.

pod redakcją Teresy Wesołowskiej

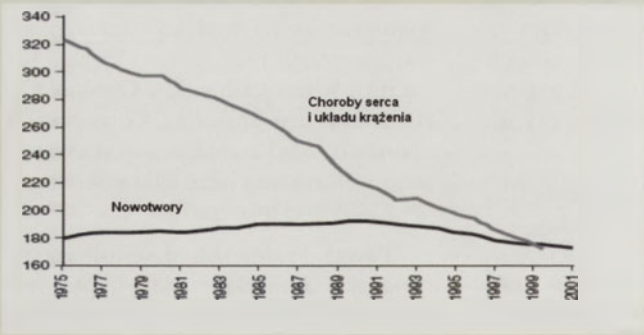
LISTY DO REDAKCJI

Polifenole, nowotwory i chemoprewencja

Związki o charakterze polifenoli występują powszechnie w wielu jadalnych owocach i warzywach. Ocenia się, że codzienna dieta człowieka może zawierać od 1–2 g tych substancji. Do tej zróżnicowanej grupy roślinnych fenoli, obok wielu innych, należą kwasy fenolowe i pochodne stilbenu. Związki te wykazują nie tylko zróżnicowaną budowę, ale także aktywność biologiczną. Większość z nich zaliczyć można do przeciwutleniaczy (antyoksydantów). Szczególnie interesujące są ich właściwości związane z możliwością prewencji i/lub wspomaganej terapii chorób określanych jako degeneracyjne, przede wszystkim nowotworów. Postęp w zrozumieniu molekularnych mechanizmów rozwoju nowotworów z jednej strony i brak sukcesów w zmniejszaniu wskaźników śmiertelności z powodu nowotworów z drugiej, wskazuje, że jedyną alternatywą leczenia ostatnich stadiów choroby jest kontrola tego procesu. Jak wskazuje porównanie

http://rcin.org.pl

analizy śmiertelności z powodu chorób układu krążenia (Ryc. 1), z danymi dotyczącymi nowotworów, ta pierwsza przynajmniej w USA, uległa znacznemu zmniejszeniu, m.in. dzięki skutecznej profilaktyce polegającej np. na stosowaniu statyn obniżających poziom cholesterolu.



Rycina 1. Śmiertelność z powodu chorób serca i układu krążenia oraz nowotworów w USA w latach 1975-2001. Przestawione dane odnoszą się do grupy wiekowej poniżej 85 lat i obrazują ilość zgonów na 100 000 mieszkańców (za Jamel A et al. Cancer Statistics , 2005. CA: A Cancer Journal for Clinicians 55: 10-30).

W odniesieniu do nowotworów tego rodzaju podejście, określane jako chemoprewencja, zostało zaproponowane już na początku lat 70. ubiegłego wieku jako postępowanie mające na celu zahamowanie, odwrócenie lub opóźnienie procesu kancerogenezy poprzez interwencję na możliwie najwcześniejszych jego etapach. W tym celu mogą być wykorzystane związki syntetyczne np. niesteroidowe leki przeciwzapalne lub pochodzenia naturalnego. Szczególne zainteresowanie budzą składniki diety. Badania prowadzone w zespole Katedry Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wykazały, że roślinne kwasy fenolowe, protokatechowy, chlorogenowy i taninowy, a także pochodne stilbenu, resweratrol i jego analogi mogą ingerować zarówno w inicjację, jak i w promocję kancerogenezy w modelowych układach doświadczalnych. W odniesieniu do tego pierwszego etapu, jest to związane z hamowaniem dróg aktywacji kancerogenów, indukcją enzymów detoksykacyjnych i/lub zmniejszaniem poziomu uszkodzeń DNA. Szczególnie aktywny w tym względzie okazał się występujący w wielu owocach jagodowych kwas taninowy oraz resweratrol, będący podobnie jak kwas taninowy składnikiem m.in. czerwonego wina. Kwas taninowy hamował niemalże całkowicie tworzenie adduktów modelowego kancerogenu 7,12-dimetylbenz[a]antracenu z dAdo. Ta obserwacja jest istotna w kontekście danych wskazujących, że właśnie te addukty są odpowiedzialne za mutacje A-T w onkogenie *H-ras* stwierdzane w indukowanych przez ten związek brodawczakach w skórze mysiej.

Roślinne fenole ingerują także w etap promocji, charakteryzujący się się klonalnym rozrostem zainicjowanych komórek. Zarówno kwasy fenolowe jak i pochodne stilbenu zmniejszają aktywność i ekspresję uważanych za markery promocji enzymów takich jak PKC i będących odpowiedzią na procesy zapalne czynników transkrypcyjnych NFκB i AP-1 oraz kontrolowanych przez nie genów *COX-2* i *iNOS*. Resweratrol, pochodna stilbenu (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilben) jest od 10 lat przedmiotem intensywnych badań wielu zespołów. Związek ten wydaje się być bardzo obiecującym czynnikiem chemoprewencyjnym. Istotnym jego ograniczeniem jest niska biodostępność. Badane przez wspomniany wyżej zespół we współpracy z US Department of Agriculture University of Minnesota, naturalne analogi, szczególnie pterostilben (3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) wykazują taką samą, a nawet większą aktywność w odniesieniu do niektórych parametrów, ale charakteryzują się większą biodostępnością. Szczególnie wyraźne różnice stwierdzano w hamowaniu aktywności cytochromu P450 1A1 i 1B1. Pterostilben również w większym stopniu niż resweratrol hamował aktywację NFκB i AP-1. Dieta to nie tylko pojedyncze składniki, ale cała matryca dostarczająca wielu związków aktywnych w jednym produkcie (patrz Postępy Biochemii 53: 103-105 i 174-181, 2007). Badania realizowane w ramach zakończonego w tym roku wieloośrodkowego grantu zamawianego MNiSW, koordynowanego przez prof. Grajka z Akademii Rolniczej w Poznaniu, wykazały, że tradycyjne składniki polskiej diety zawierają znaczący poziom antyoksydantów o dużej aktywności biologicznej (podsumowaniem tych badań jest książka „Przeciwutleniacze w żywności: Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne" wydana przez WNT). Szczególnie interesujący okazał się spożywany powszechnie burak ćwikłowy, w którym występują żółte i czerwone barwniki betalainowe. Właściwości antyoksydacyjne tych związków zostały niedawno odkryte. Burak jest także źródłem betainy (trimetylglyciny). Coraz więcej danych wskazuje, że związek ten może chronić przed działaniem wielu czynników patogennych. Badania wykonane w ramach grantu, m.in. przez zespoły Katedry Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (UMP) i Katedrę Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej (PG) wykazały, że sok z buraka może zapobiegać uszkodzeniom wątroby i efektom kardiotoksycznym wywołanym działaniem cytostatyków. Działanie ochronne w stosunku do wątroby stwierdzone także w eksperymentach z sokiem z aronii i nieklarownym sokiem z jabłek. Ten ostatni jest dobrym przykładem na to, jak właściwa technologia przetwarzania może wzbogacić lub pozbawić produkt związków aktywnych. W przypadku jabłek są nimi polimeryczne procyjanidyny, które jak się wydaje mogą być szczególnie skutecznie w zapobieganiu nowotworom jelita grubego. Związki te są obecne wyłącznie w soku nieklarowanym.

Przedstawione dane wskazują, że przynajmniej niektóre z badanych przez polskie zespoły badawcze fenoli mogą być wykorzystane jako prototypy nowych czynników chemoprewencyjnych i/lub terapeutycznych. W powiązaniu zaś z właściwą matrycą żywieniową mogą być skutecznym narzędziem prewencji nowotworów, a także przyczyniać się do zmniejszenia niekorzystnych ubocznych skutków terapii. Niektóre z omawianych związków będą przedmiotem dalszych badań w ramach tworzącej się sieci EUROPREVENT, której powstanie zostało „sprowokowane" znacznym opóźnieniem Europy w tej dziedzinie w porównaniu z USA. Do udziału w tej sieci zostały zaproszone wspomniane w tej notatce zespoły UMP i PG.

Prof. Wanda Baer-Dubowska
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

http://rcin.org.pl

Wprowadzanie biomolekuł do komórek zwierzęcych

STRESZCZENIE

Zastosowanie kultur komórkowych w badaniach naukowych umożliwiło poznanie wielu procesów metabolicznych. Natomiast technologia wprowadzania makromolekuł (w szczególności DNA) do komórek pozwoliła na analizę funkcji genów i sekwencji niekodujących. Obecnie procedury transfekcji stały się powszechnie dostępne dla badaczy. Artykuł ten przybliża zarówno podstawowe, klasyczne techniki transfekcji oraz najnowsze osiągnięcia z tej dziedziny.

WPROWADZENIE

Postęp nauki pozwalający na hodowlę komórek zwierzęcych w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) umożliwia płynne przejście pomiędzy badaniami biochemicznymi a doświadczeniami na zwierzętach. Eksperymenty prowadzone na liniach komórkowych zachowują całokształt wpływu kontekstu metabolizmu komórkowego na badany proces przy jednoczesnym ograniczeniu oddziaływania czynników egzogennych. Technologia hodowli linii komórkowych pozwoliła na gwałtowny postęp nauk biomedycznych gdyż stanowi tańszą i etycznie dopuszczalną alternatywę wielu badań na zwierzętach.

Technika przyżyciowego wprowadzania do wnętrza komórek biomolekuł (DNA, oligonukleotydów, RNA i białek — m.in. przeciwciał) umożliwia badanie wielu procesów (Ryc. 1). Najczęściej wprowadza się DNA w postaci wektorów plazmidowych do ekspresji genów kodujących białka. Można w ten sposób uzyskać nadekspresję genu kodującego natywne białko o modyfikacjach potranslacyjnych typu ssaczego (gdy systemy prokariotyczne czy drożdżowe nie dają satysfakcjonujących rezultatów), analizować procesy regulacji transkrypcji stosując systemy reporterowe lub badać subkomórkową lokalizację białek, oddziaływania makromolekuł czy też rekombinację.

GŁÓWNE TECHNIKI TRANSFEKCJI

Prace nad transfekcją DNA do komórek rozpoczęto już pod koniec lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku. Pierwotne techniki opierały się na mechanicznym wprowadzaniu DNA do komórek poprzez mikroiniekcję [1], zeskrobywanie komórek z podłoża oraz ich rozbijanie ultradźwiękami [2]. Pierwszymi technikami, charakteryzującymi się zadawalającą wydajnością i powtarzalnością, były procedury strącania DNA solami fosforanowymi wapnia i kompleksacji z cząsteczkami DEAE-dekstranu, które zostały wyparte przez zastosowanie liposomów złożonych z lipidów kationowych [3]. Inne techniki, takie jak elektroporacja, mikroiniekcja i mikrowstrzeliwanie wymagają kosztownego sprzętu. Dlatego optymalną alternatywą są kompleksacje z substancjami organicznymi (m.in. lipidy kationowe, białka, poliaminy), które należą do aktualnie najpowszechniej stosowanych gdyż cechują się wysoką powtarzalnością i wydajnością.

Elektrotransfekcja czyli transfekcja komórek przy użyciu impulsów pola elektrycznego (zwana także elektroporacją) została wynaleziona przez Neumann i wsp. [4]. Pozwala ona na wprowadzenie obcych makrocząsteczek do komórek ssaków, owadów, roślin, pierwotniaków, a także bakterii i grzybów. Mechanizm elektrotranslokacji DNA przez błonę komórkową nie został dokładnie poznany, dlatego też parametry impulsów elektrycznych określa się doświadczalnie. Istnieje wiele hipotez dotyczących mechanizmu wprowadzania DNA do komórek poprzez elektroporację. Ostatnie badania sugerują, że DNA wnika do komórek podczas trwania impulsu lub zespołu impulsów elektrycznych. Pole elektryczne powoduje powstanie w błonie komórkowej porów, przez które DNA wnika do komórki na drodze migracji elektroforetycznej [5]. Technika ta wymaga zastosowania drogiego zasilacza umożliwiającego wygenerowanie impulsu lub zespołu impulsów o ściśle określonej charakterystyce (m.in. napięcie impulsu od 5 do

Marcin Schmidt
Agnieszka Olejnik-Schmidt

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; tel. (061) 846 60 24, e-mail: mschmidt@au.poznan.pl

Słowa kluczowe: transfekcja, GeneJuice

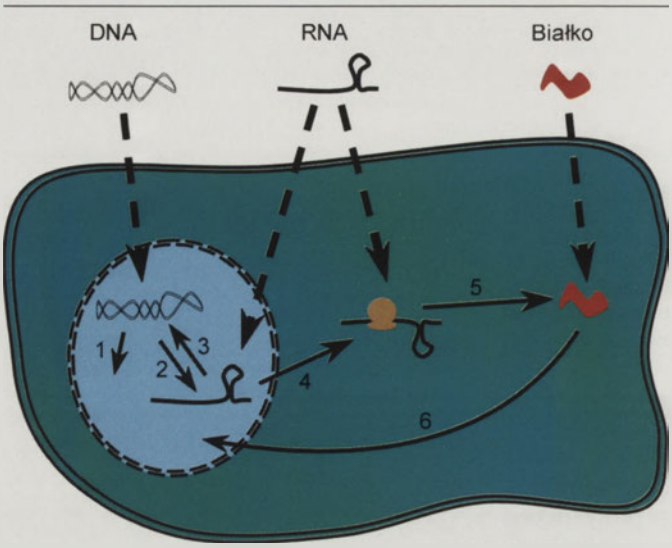
Wykaz skrótów: CPP (ang. *cell-penetrating proteins/peptides*) — zastosowanie białek i peptydów zdolnych wprowadzać makrocząsteczki do komórek; HIV-1 — wirus niedoboru odporności człowieka; HSV — wirus opryszczki pospolitej; L-T-Ag — duży antygen T; PEG — glikol polietylenowy; PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*) — kwas peptydonukleinowy; SV40 — Simian Virus 40

ARTYKUŁ SPONSOROWANY PRZEZ FIRMĘ

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

MERCK

http://rcin.org.pl



Rycina 1. Technika wprowadzania do komórki różnych makrocząsteczek: DNA, RNA i białek (strzałki o linii przerywanej) umożliwia badanie wielu procesów komórkowych. Wprowadzone do komórki DNA ulec może rekombinacji z genomem (1) lub transkrypcji (2). Powstające lub wprowadzone RNA może wyciszać geny (RNAi, 3) albo przejść procesy dojrzewania (4) i posłużyć jako matryca do syntezy białek w procesie translacji (5). Wprowadzone do komórki białko, podobnie jak powstające w niej (5) wykazuje natywną aktywność i może ulec translokacji (6) do jemu właściwego przedziału komórkowego.

3000 V, czas trwania od 0,01 ms do 10 s, kształt impulsu wykładniczy lub prostokątny).

Jedną z pierwszych „chemicznych" metod transfekcji komórek zwierzęcych była technika strącania DNA solami fosforanowymi wapnia. Jest to technika szeroko stosowana ze względu na dostępność i niską cenę odczynników. Kompleksy DNA-$CaPO_4$ przygotowywane są poprzez połączenie roztworu $CaCl_2$ i DNA z buforowaną solą fizjologiczną (HBS, ang. *HEPES buffered saline*). Powstałą zawiesinę strontów soli fosforanowych wapnia i DNA nanosi się na komórki i inkubuje z nimi od 4 do 16 godzin [6]. Stronty pobierane są przez komórki na drodze endo- i fagocytozy, a fosforan wapnia jest czynnikiem chroniącym DNA przed nukleazami [7]. Technika ta daje zadawalające rezultaty przy transfekcji transformowanych komórek przyczepnozależnych, jednak trudność w uzyskaniu powtarzalnych wyników skłoniła badaczy do stosowania techniki wykorzystującej DEAE-dekstran.

Metoda kompleksacji DNA z wysokocząsteczkowymi polikationami DEAE-dekstranu [8] zyskała dużą popularność ze względu na prostotę wykonania, jednak ze względu na wysoką toksyczność tego czynnika ograniczone jest spektrum komórek względem, których można go użyć. Kompleksy DEAE-dekstran-DNA adsorbują do powierzchni komórki dzięki przyciąganiu elektrostatycznemu i wnikają do wnętrza komórki prawdpodobnie na drodze endocytozy [9]. Metoda ta była stosowana głównie dla uzyskania czasowej transfekcji (ang. *transient transfection*). Aby zwiększyć wydajność transfekcji kompleksami DNA-$CaPO_4$ i DEAE-dekstran-DNA procedury te rozszerzono dodatkowo o etap szoku DMSO lub glicerolem [10].

Innymi kationowymi polimerami testowanymi do wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek były polilizyna i poliornityna [11], polibren [12] oraz polietylenimina [13] jednak nie zdobyły one powszechnego uznania. Spośród syntetycznych polimerów kationowych jedynie dendramery są praktycznie stosowane.

Dendramery to syntetyczne wielokrotnie rozgałęzione polimery bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie [14]. Końce rozgałęzionych struktur posiadają dodatnie ładunki odpowiadające za oddziaływania z kwasami nukleinowymi, które po kompleksacji z nimi chronione są przed nukleazami [15]. Sposób, w jaki dendripleksy wnikają do komórek nie został jeszcze poznany, zakłada się jednak, że proces ten zachodzi na drodze podobnej do endocytozy [16]. Dendramery posiadają zdolność buforującą, dzięki czemu dochodzi do hamowania lizosomalnych nukleaz [17].

Najobszerniejszą grupą odczynników stosowanych obecnie do transfekcji są związki lipidowe, które charakteryzują się od 100- do 1000-krotnie wyższą wydajnością wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek niż kompleksy z fosforanem wapnia czy DEAE-dekstranem [18]. Lipofekcja umożliwia wprowadzanie do komórek cząsteczek DNA o różnej wielkości (od oligonukleotydów do sztucznych chromosomów drożdżowych), RNA czy białek. W trakcie formowania lipopleksów kwasy nukleinowe zamykane są wewnątrz powstających liposomów lub przyczepiają się do ich powierzchni [19]. Lipopleksy wnikają do komórki na drodze endocytozy [20]. Większość protokołów obejmuje kompleksację liposomów z plazmidowym DNA w określonej proporcji, po której kompleksy te nakładane są na komórki umieszczone, najczęściej, w pożywce pozbawionej surowicy. Po około 1 do 8 godzin inkubacji pożywka z lipopleksami wymieniana jest na pełną pożywkę [21]. Wydajność lipofekcji w dużej mierze uzależniona jest od typu lipidów (ilości dodatnich ładunków lipidu kationowego, typu połączenia pomiędzy hydrofobową i kationową składową cząsteczki oraz strukturą reszty hydrofobowej [22]), składu lipidowego liposomu i jego typu, a także obecności surowicy w pożywce [23]. Lipofekcja pozwala na transfekcję szerokiego spektrum komórek (w porównaniu do DNA-$CaPO_4$ i DEAE-dekstran-DNA), w tym także komórek pierwotnych oraz umożliwia przeprowadzenie zarówno czasowej jak i stabilnej transfekcji.

Jednym z najnowszych podejść do zagadnienia transfekcji komórek jest zastosowanie białek i peptydów zdolnych wprowadzać makrocząsteczki do komórek (CPP, ang. *cell-penetrating proteins/peptides*). Umożliwiają one wprowadzanie do komórek peptydów, białek, kwasów nukleinowych, kwasów peptydonukleinowych (PNA), polisacharydów i nanocząsteczek [24]. Jednym z pierwszych opisanych białek o tych właściwościach był aktywator transkrypcji Tat HIV-1, który wprowadzony do pożywki hodowlanej wydajnie wnika do wielu typów komórek [25-26]. Podobne właściwości wykazuje czynnik transkrypcyjny Antp (ang. *Antennapedia homeodomain*) z *Drosophila melanogaster* (jego fragment został nazwany penetratyną) [27], białko VP22 HSV [28], peptydy MPG [29] i MPGα [30] będące peptydami fuzyjnymi fragmentów gp41 HIV-1 i L-T-Ag SV40, M918 [31], poliargininowe [32] i polilizynowe [33], Pep-1 [34], Pep-2 [35], $S4_{13}$-PV [36], magainina 2 [37], buforyna 2 [38] i apidecyna [39]. Generowane są także syntetyczne CPP przy zastosowaniu techniki *phage display* [40].

http://rcin.org.pl

Swoją zdolność do translokacji przez błonę komórkową CPP zawdzięczają krótkim sekwencjom, poniżej 20 reszt aminokwasowych, bogatym w zasadowe reszty boczne [41-42]. Białka te wnikają do komórek na drodze różnych mechanizmów. Niektóre pobierane są przez komórki w procesie makropinocytozy lub endocytozy, po którym następuje uwolnienie makromolekuły z endosomu do cytoplazmy. Inny model przewiduje powstanie oddziaływań elektrostatycznych i tworzenia wiązań wodorowych z elementami błony komórkowej prowadzącymi do utworzenia porów lub przejściowej destabilizacji błony [43-45].

ODCZYNNIKI DO TRANSFEKCJI Z RODZINY „JUICE"

Zastosowanie CPP do transfekcji komórek zwierzęcych jest na etapie badań rozwojowych. W sprzedaży dostępne są jednak inne czynniki służące do transfekcji zawierające komponenty białkowe. Jednym z nich jest GeneJuice™ Transfection Reagent (Merck-Novagen®), który jest mieszaniną nietoksycznego białka komórkowego i syntetycznej poliaminy [46]. W takich odczynnikach do transfekcji wykorzystywane są kationowe białka wiążące DNA, m.in. histony (np. H1). Mogą one być użyte w postaci natywnego białka izolowanego z grasicy cielęcej lub wątroby albo uzyskane w procesie nadekspresji w *E.coli* w postaci białka fuzyjnego z sygnałem lokalizacji jądrowej L-T-Ag SV40 [47]. Białka histonowe powodują kondensację DNA, chronią je przed nukleazami i wydajnie wprowadzają je do jądra dzięki własnemu sygnałowi lokalizacji jądrowej [48]. Unikalny skład odczynnika GeneJuice™ Transfection Reagent powoduje, że posiada on cechy przewyższające inne dotychczasowo dostępne odczynniki lipidowe. Charakteryzuje się on wysoką wydajnością transfekcji DNA zarówno w przypadku przejściowych jak i stabilnych transfekcji. Wykazuje bardzo niską toksyczność, dzięki czemu umożliwia transfekcję szerokiego spektrum komórek, a w tym również komórek pierwotnych (Tab. 1). Pozwala na prowadzenie transfekcji w obecności surowicy, przez co może być stosowany nawet wobec bardzo wrażliwych komórek. Protokół wykonania transfekcji jest prosty, nie wymaga wymiany pożywki po transfekcji i może być adoptowany do transfekcji w wielodołkowych płytkach w technologiach *„high throughput"*. Wyjątkowa charakterystyka GeneJuice™ Transfection Reagent powoduje, że jest on stosowany przez szeroką grupę użytkowników, dzięki czemu z oryginalnych publikacji (lista dostępna na stronie internetowej producenta) uzyskać można informację o zoptymalizowanych warunkach transfekcji dla wielu linii [49].

Do transfekcji DNA do komórek owadzich został opracowany specjalny odczynnik zwany Insect GeneJuice™ Transfection Reagent (Merck-Novagen®). Oparty jest on na unikalnej formule lipidowej zoptymalizowanej do niezwykle wydajnego wprowadzania DNA do komórek Sf9, Sf21, HiFive i in. Charakteryzuje się on niezwykle niską toksycznością i funkcjonalnością zarówno w obecności jak i przy braku surowicy w pożywce podczas transfekcji. Odczynnik ten idealnie nadaje się do kotransfekcji komórek owadów plazmidem transferowym ze zlinearyzowanym wirusowym DNA w celu konstrukcji rekombinowanych bakulowirusów oraz do transfekcji na dużą skalę komórek Sf9 w hodowlach zawiesinowych dla nadprodukcji białek z użyciem wektorów takich jak pIEx™ i pBiEx™ [50].

Rodzina odczynników „Juice" obejmuje także reagenty dedykowane do transfekowania komórek siRNA (RiboJuice™ siRNA Transfection Re-

Tabela. 1. Linie komórkowe wydajnie transfekowane odczynnikiem GeneJuice™ Transfection Reagent. Komórki przetestowane w transfekcji odczynnikiem RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent i ProteoJuice™ Protein Transfection Reagent oznaczono, odpowiednio, gwiazdką i plusem [49].

Linie komórkowe:					Komórki pierwotne:
117	C33A	H1299	JEG-3	PK15	komórki mięśni gładkich
121	Caco-2	H295R	Jurkat	Plat-E	aorty*
1321N1	Caki-1	H36CE2	K562	PS-1	astrocyty
astrocytoma	Calpan-1	HAEC	KB	R2C	angiobłasty
10T1/2	Calu-1	HCC1937	L57-3-11	QT-6	chondrocyty
293T	Calu-6	HCC-BR116	L-6+	Rat1a	komórki chromochłonne
3T3 NIH	CCL-131	HCC-EV	L-929	RAW 264.7+	komórki nabłonkowe:
3T3 Swiss	CFPAC-1	H9c2	LNCaP	RBL-2H3	gruczołu sutkowego
3T3-L1	Chang Liver	HCT-116	MA-10	RMP-41	prostaty
A204	CHO*	HEK293*+	McA-RH7777	SAOS-2	tchawicy
A431	CHO-7	HEK293MD-2	MCF-7*+	SC-1	fibroblasty
A498	CHO-IR	HEK293A	MCF-10-2A	Schneider line2	keratynocyty*
A549*+	CHO-K1+	HEK293T	MDA MB468	SG3	mioblasty
ACHN	CHO-T	HEK 293-TLR3	MDCK	SK-N-MC	CJ179
alpha TC1-6	COS-1	HEK 293-TLR4	MEF	SK-N-SH	makrofagi wyprowadzone z monocytów
AR 42J	COS-7*+	HEK-b2	Melanocyty	SKOV3	
AR42J-B13	CS-1	HEK-CXCR2	MG-63	STO	
As4.1	CV-1+	HEK-m3	Neuro 2A*+	SW13/cl.2	
AtT-20	Daudi	HeLa*+	Neuroblastom	SW-480	
B16-F10	DDTI MF-2	HeLa B	NIH 293T	SW-837	
B50	DT40	HeLa T4	NIH 3T3*+	THP-1	
BALB/3T3	DU145	Hep 3B2.1-7	NPK	T3M4	
BC-1	E14TG2a	HepG2*+	NRK	TM4	
BC-2	EA	Hepa 1-6	NT2/D1	TREX-SERT	
BC3	ECV304	HS578T	OV-1063	tsA201	
BCBL	EL4	Ht-29	OVCAR3	U2-OS	
BHK	EPC	HTB-37	P4	U373	
BHK-21*+	ES-E14TG2a	HTB-45	P19	U937	
C3H/10T1/2	EVSCC17M	Huh-7	PC12+	UCD	
C6	Fish ES	HUVEC	PA317	Vero	
C2C12	GOF18	IC21	PAM212	WE-38	
		IEC-6	Phoenix	XR-1	

http://rcin.org.pl

agent, Merck-Novagen®) i białkami (ProteoJuice™ Protein Transfection Reagent, Merck-Novagen®).

Technologia RNAi umożliwia selektywne potranskrypcyjne wyciszanie genów w komórce [51], które można uzyskać wprowadzając do komórki plazmidowy wektor ekspresyjny kodujący siRNA lub poprzez ich bezpośrednią transfekcję siRNA. Do realizacji tego drugiego podejścia doświadczalnego można z powodzeniem zastosować odczynnik RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent, który podobnie jak GeneJuice™ Transfection Reagent charakteryzuje się wysoką wydajnością transfekcji, stabilnością i niską toksycznością. Stosując ten odczynnik można transfekować siRNA do komórek pierwotnych (Tab. 1) w pożywce zawierającej surowicę. Dodatkową zaletą jest jego kompatybilność z GeneJuice™ Transfection Reagent, dzięki czemu można przeprowadzać kotransfekcję DNA i siRNA do komórek w tym samym czasie [52].

Bezpośrednie wprowadzanie białek do komórek umożliwia analizę, w natywnym środowisku wnętrza komórki, oddziaływań białko-białko, procesów sygnalizacyjnych, degradacji czy regulacji ekspresji genów przez czynniki transkrypcyjne. ProteoJuice™ Protein Transfection Reagent jest odczynnikiem do wydajnego wprowadzania natywnych białek i peptydów do szerokiego spektrum komórek ssaków (Tab.1). Odczynnik ten łączy się niekowalencyjnie z białkiem chroniąc je przed endosomalnymi proteazami, dzięki czemu w nienaruszonej formie wprowadzane jest do komórki, gdzie ulega właściwej sobie lokalizacji. Po wprowadzeniu badanego białka do komórek mogą one być analizowane przyżyciowo np. przy użyciu mikroskopu. ProteoJuice™ Protein Transfection Reagent umożliwia transfekcję peptydów, zarówno małych (np. histony, ok. 11 kDa) jak i dużych białek (np. przeciwciała, ok. 150 kDa), oraz multimerycznych kompleksów (np. tetramer β-galaktozydazy, 465 kDa). Wprowadzane białko może być wcześniej chemicznie wyznakowane fluorochromem (np. FITC, Cy3, AlexaFluor488). Takie podejście eksperymentalne jest szczególnie przydatne, gdy analizie poddaje się toksyczne białka lub proces apoptozy — w tych przypadkach poziom ekspresji białek z plazmidowego DNA bardzo często jest niewystarczający dla przeprowadzenia obserwacji [53].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WYDAJNOŚĆ TRANSFEKCJI

Planując doświadczenie z wykorzystaniem transfekcji poza doborem właściwej techniki należy wziąć pod uwagę także takie czynniki jak czystość wprowadzanej molekuły, charakterystykę linii komórkowej będącej przedmiotem badań a także proces optymalizacji procesu transfekcji.

Jakość plazmidowego DNA używanego do transfekcji jest krytycznym czynnikiem. Preparat taki powinien być wolny od białek, RNA, oligosacharydów, chemicznych zanieczyszczeń (np. soli, fenolu) a przede wszystkim endotoksyn *E. coli*. Jednym z wykładników czystości preparatu DNA jest stosunek absorbcji A_{260}/A_{280}, którego wartość powinna być równa lub większa od 1,8 [54]. Oczyszczone plazmidowe DNA powinno być wytrącone etanolem (procedura ta poza oczyszczaniem dodatkowo sterylizuje preparat), po czym rozpuszczone w sterylnej wodzie lub buforze TE (Tris-EDTA). Do jego izolacji można zastosować klasyczną lizę alkaliczną, po której preparat oczyszczany jest poprzez strącanie PEG i fenolizę [55] lub wirowanie w gradiencie $CsCl_2$ [54]. Jednak najprostszą, wysoce powtarzalną i wydajną metodą jest zastosowanie kolumn do oczyszczania plazmidowego DNA przy zastosowaniu chromatografii anionowymiennej takich jak UltraMobius™ Plasmid Kit (Merck-Novagen®), który gwarantuje usunięcie endotoksyn do poziomu poniżej 20 EU/mg plazmidowego DNA [56]. Podobnie jak plazmidowe DNA, inne cząsteczki wprowadzane do komórek na drodze transfekcji powinny być możliwie jak najwyższej czystości.

Niezależnie od środka użytego do transfekcji na wydajność tego procesu wpływają takie czynniki jak kondycja komórek, stopień porostu powierzchni (tzw. konfluencja, od 40% do 80%) i numer pasażu (najlepiej, aby hodowla miała poniżej 50 pasaży). Komórki przeznaczone do transfekcji powinny być w fazie logarytmicznego wzrostu. Zaleca się dokonanie pasażu na 24 godziny przed transfekcją. Optymalna gęstość komórek w momencie transfekcji jest cechą indywidualną każdej linii i należy ją określić doświadczalnie. Dla zapewnienia wysokiej wydajności transfekcji komórki muszą być wolne od zanieczyszczenia bakteriami (w szczególności z rodziny *Mycoplasmataceae*) i grzybami.

Podczas optymalizacji procesu transfekcji należy rozpatrywać takie czynniki jak gęstość komórek, ilość wprowadzanej makrocząsteczki (np. DNA) i jej stosunek wobec czynnika do transfekcji oraz długość inkubacji komórek z transfekowanymi kompleksami. W miarę możliwości (wrażliwości komórek) zaleca się prowadzenie transfekcji w pożywce pozbawionej surowicy i antybiotyków. Jako parametry wyjściowe należy przyjąć procedurę proponowaną przez producenta odczynnika do transfekcji. W przypadku transfekcji DNA i siRNA komórki poddaje się analizie ok. 24-72 godzin po transfekcji, natomiast wprowadzając białko analizę należy przeprowadzić w przeciągu 2-5 godzin.

Transfekcja stała się rutynową techniką badawczą stosowaną w wielu laboratoriach. Obecnie zyskuje ona także coraz większe zainteresowanie klinicystów pracujących nad terapiami genowymi. Stanowi ona realną alternatywę dla wektorów wirusowych, które mogą wywoływać procesy zapalne, stanowić zagrożenie dla pacjentów z obniżoną odpornością, a z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego są trudne do produkcji na dużą skalę i kłopotliwe w kontroli jakości.

PIŚMIENNICTWO

1. Mueller G, Graessmann A, Graessmann G (1978) Mapping of early SV40 specific functions by microinjection of different early viral DNA fragments. Cell 15: 579-585
2. Fechheimer M, Boylan JF, Parker S, Sisken JE, Patel GL, Zimmer SG (1987) Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8463-8467
3. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7413-7417

http://rcin.org.pl

4. Neumann E, Schaefer-Rider M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J 1: 841-845
5. Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA (1992) Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. Biophys J 63: 1320-1327
6. Song W, Lahiri DK (1995) Efficient transfection of DNA by mixing cells in suspension with calcium phosphate. Nucleic Acids Res 23: 3609-3611
7. Batard P, Jordan M, Wurm F (2001) Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. Gene 270: 61-68.
8. Schenborn ET, Goiffon V (2000) DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. Methods Mol Biol 130: 147-153
9. Yang YW, Yang JC (1997) Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer. Biotechnol Appl Biochem 25: 47-51
10. Lopata MA, Cleveland DW, Sollner-Webb B (1984) High-level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. Nucleic Acids Res 12: 5707-5717
11. Dong Y, Skoultchi AI, Pollard JW (1993) Efficient DNA transfection of quiescent mammalian cells using poly-L-ornithine. Nucleic Acids Res 21: 771-772
12. Aubin RA, Weinfeld M, Mirzayans R, Paterson MC (1994) Polybrene/DMSO-assisted gene transfer. Generating stable transfectants with nanogram amounts of DNA. Mol Biotechnol 1: 29-48
13. Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R (2005) Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. J Gene Med 7: 657-663
14. Ramaswamy C, Sakthivel T, Wilderspin AF, Florence AT (2003) Dendriplexes and their characterisation. Int J Pharm 254: 17-21
15. Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr (1997) The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. Biochim Biophys Acta 1353: 180-190
16. Manunta M, Tan PH, Sagoo P, Kashe K, George AJT (2004) Gene delivery by dendrimers operates via a cholesterol dependent pathway. Nucleic Acids Res 32: 2730-2739
17. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG (2005) Dendrimers in gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 57: 2177-2202
18. Malone RW, Felgner PL, Verma IM (1989) Cationic liposome-mediated RNA transfection. Proc Nat Acad Sci USA 86: 6077-6081
19. Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A (1993) Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. Biochemistry 32: 7143-7151
20. Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D (2002) Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesteroldependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. J Biol Chem 277: 18021-18028
21. Farhood H, Serbina N, Huang L (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta 1235: 289-295
22. Ryhanen SJ, Saily MJ, Paukku T, Borocci S, Mancini G, Holopainen JM, Kinnunen PKJ (2003) Surface charge density determines the efficiency of cationic gemini surfactant based lipofection. Biophysical J 84: 578–587
23. Zhao DD, Watarai S, Lee JT, Kouchi S, Ohmori H, Yasuda T (1997) Gene transfection by cationic liposomes: comparison of the transfection efficiency of liposomes prepared from various positively charged lipids. Acta Med Okayama 51: 149-154
24. Henriques ST, Melo MN, Castanho MA (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? Biochem J 399: 1–7
25. Green M, Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. Cell 55: 1179-1188
26. Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human Immunodeficiency virus. Cell 55: 1189–1193
27. Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C, Prochiantz A (1991) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. New Biol 3: 1121–1134
28. Elliott G, O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233
29. Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. Nucleic Acids Res 25: 2730–2736
30. Veldhoen S, Laufer SD, Trampe A, Restle T (2006) Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. Nucleic Acids Res 34: 6561–6573
31. El-Andaloussi S, Johansson HJ, Holm T, Langel U (2007) A Novel Cell-penetrating Peptide, M918, for Efficient Delivery of Proteins and Peptide Nucleic Acids. Mol Ther 15: 1820-1826
32. Wu RP, Youngblood DS, Hassinger JN, Lovejoy CE, Nelson MH, Iversen PL, Moulton HM (2007) Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. Nucleic Acids Res 35: 5182-5191
33. Ryser HJ, Drummond I, Shen WC (1982) The cellular uptake of horseradish peroxidase and its poly (lysine) conjugate by cultured fibroblasts is qualitatively similar despite a 900-fold difference in rate. J Cell Physiol 113: 167–178
34. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nat Biotechnol 19: 1173–1176
35. Morris MC, Gros E, Aldrian-Herrada G, Choob M, Archdeacon J, Heitz F, Divita G (2007) A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. Nucleic Acids Res 35: e49
36. Hariton-Gazal E, Feder R, Mor A, Graessmann A, Brack-Werner R, Jans D, Gilon C, Loyter A (2002) Targeting of nonkaryophilic cell-permeable peptides into the nuclei of intact cells by covalently attached nuclear localization signals. Biochemistry 41: 9208–9214
37. Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5449–5453
38. Park CB, Kim MS, Kim SC (1996) A novel antimicrobial peptide from Bufo bufo gargarizans. Biochem Biophys Res Commun 218: 408–413
39. Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. EMBO J 8: 2387-2391
40. Nomura T, Kawamura M, Shibata H, Abe Y, Ohkawa A, Mukai Y, Sugita T, Imai S, Nagano K, Okamoto T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda S (2007) Creation of a novel cell penetrating peptide, using a random 18mer peptides library. Pharmazie 62: 569-573
41. Schwarze SR, Dowdy SF (2000) In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. Trends Pharmacol Sci 21: 45-48
42. Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U (2000) Cell-penetrating peptides. Trends Pharmacol Sci 21: 99-103
43. Veldhoen S, Laufer SD, Trampe A, Restle T (2006) Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. Nucleic Acids Res 34: 6561-6573
44. Torchilin VP (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. AAPS J 9: Article 15
45. Henriques ST, Melo MN, Castanho MA (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? Biochem J 399: 1–7
46. Chukwurah GA, Hill VJ, Dickson JG (2006) GeneJuice mediated transfection of plasmid vectors into C2C12, Sol8, and 293T cell lines. inNovations 24: 11-13

http://rcin.org.pl

47. United States Patent nr 5744335, Process of transfecting a cell with a polynucleotide mixed with an amphipathic compound and a DNA-binding protein
48. Balicki D, Putnam CD, Scaria PV, Beutler E (2002) Structure and function correlation in histone H2A peptide-mediated gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 99: 7467–7471
49. http://www.novagen.com/transfection
50. Insect Cell Expression Brochure (220021-2007), Novagen, Merck
51. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498
52. Hayes S, Bruggink F (2002) Targeted suppression of gene expression using siRNA and RiboJuice siRNA Transfection Reagent, inNovations 14: 9-11
53. Hayes S (2003) Protein delivery into mammalian cells using ProteoJuice Protein Transfection Reagent. inNovations 17: 13–16
54. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY
55. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc.
56. Hendriks R, Wehsling M, Lantos A, Berg J, McCormick M (2000) Mobius 1000 Plasmid Kits for convenient isolation of ultrapure plasmid DNA. inNovations 11: 1-3

Biomolecules transfection into animal cells

Marcin Schmidt✉, **Agnieszka Olejnik-Schmidt**

Department of Biotechnology and Food Microbiology, August Cieszkowski University of Agriculture, Wojska Polskiego 48 Str., 60-627 Poznań, Poland

✉mschmidt@au.poznan.pl

Key words: transfection, GeneJuice

ABSTRACT

***In vitro* cell culture technology allowed examining many metabolic processes. Transfection tool of macromolecules (especially DNA) into cells permits testing gene and noncoding sequences function. Transfection procedures are widely available for researchers nowadays. This paper describes mostly used transfection techniques as well as the latest achievements in the field.**

Calbiochem®

New Research Tools for Signal Transduction and Life Science Research

Nowość

Ponad 550 nowych produktów z następujących kategorii:

Angiogenesis Research Products
Antibiotics
Calcium Signaling
Cancer/Cell Cycle/Apoptosis Related Products
Cytoskeletal Research Products
DNA Damage/Repair Related Products
G-Protein coupled Receptor Agonist/Antagonist
Glycobiology Related Products
Heat Shock Proteins and Related Products
Histone Deacetylase (HDAC) and HDAC Inhibitor
Hormones, Growth Factors, and Cytokines
Lipid Signaling Related Products
Matrix Metalloproteinases and Related Products
Mitochondrial Research Antibodies
Neuroscience Related Products
NF-kB Related Products
Nitric Oxide and Oxidative Stress Related Products
Phosphodiesterases
Proteases and Related Products
Protein Sample Preparation Tools
Proteasome/Ubiquitination Products
Protein/Lipid Kinases and Related Products
Protein Phosphatase Related Products
Transcription Factors and Related Products

Zamów broszurę na www.merckbio.eu

http://rcin.org.pl

Polska rekombinowana proteinaza K

Adam Burkiewicz

Sławomir Dąbrowski

Piotr Barski

A&A Biotechnology, Gdynia

A&A Biotechnology, Al. Zwycięstwa 96/98, 81-451 Gdynia; tel./faks: 058 6228578, e-mail: info@aabiot.com

Słowa kluczowe: proteinaza K; oczyszczanie i właściwości rekombinowanego enzymu

ARTYKUŁ SPONSOROWANY PRZEZ FIRMĘ

STRESZCZENIE

Gen kodujący proteinazę K został zamplifikowany i sklonowany do dwóch drożdżowych systemów ekspresji białek w *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha*. Rekombinowany enzym został wyprodukowany w 25 L bioreaktorze, oczyszczony z użyciem chromatografii jonowymiennej i zagęszczony w procesie ultrafiltracji. Wykazano, że własności wyprodukowanej rekombinowanej proteinazy K i enzymów komercyjnie dostępnych są identyczne.

WPROWADZENIE

Proteinaza K jest alkaliczną proteazą wyizolowaną z hodowli pleśni *Tritirachium album* Limber [1]. Litera „K" oznacza zdolność enzymu do hydrolizy natywnej keratyny. Proteinaza K należy do rodziny proteinaz subtylizynowych (S8). Łańcuch polipeptydowy proteinazy K składa się z 278 reszt aminokwasowych, posiada masę molekularną 28 930 Da i pI = 8,9 [1]. Proteinaza K jest endopeptydazą zawierającą centrum aktywne zbudowane z triady katalicznej, tworzonej przez Asp39, His69 i Ser224. Enzym uzyskuje pełną aktywność w obecności jonów Ca^{2+} [1,2] i w zakresie pH od 7,5 do 12,0. Proteinaza K ulega autohydrolizie w niskich stężeniach (~ 0.01 mg/ml), ale wykazuje wysoką stabilność w stężonych preparatach, gdzie jej stężenie przekracza 1 mg/ml [2,3]. Enzym ten hydrolizuje białka stosunkowo niespecyficznie preferując, podobnie jak inne proteazy z rodziny subtylizyny, reszty aminokwasów aromatycznych i hydrofobowych w pozycji P1.

Proteinaza K jest białkiem sekrecyjnym produkowanym przez *Tritirachium album* Limber podczas wzrostu na podłożach zawierających keratynę lub inne białko, jako jedyne źródło azotu. W procesie oczyszczania enzym jest wytrącany z medium po separacji grzybni z użyciem siarczanu amonu, a następnie poddany oczyszczaniu z użyciem chromatografii jonowymiennej na DEAE-cellulozie. Zagęszczony enzym jest krystalizowany w roztworze wodnym zawierającym jony Ca^{2+} [1].

Proteinaza K jest enzymem aktywnym zarówno w niskich, jak i wysokich temperaturach (<70°C), w środowisku związków denaturujących, detergentów, takich jak mocznik, SDS (do 0,5%) i Triton X-100. W związku z tym, że proteinaza K nie posiada aktywności nukleolitycznych oraz z łatwością hydrolizuje białka natywne i zdenaturowane stosuje się ją powszechnie w celu degradacji białek w procesach izolacji i oczyszczania DNA i RNA [3,4].

MATERIAŁY I METODY

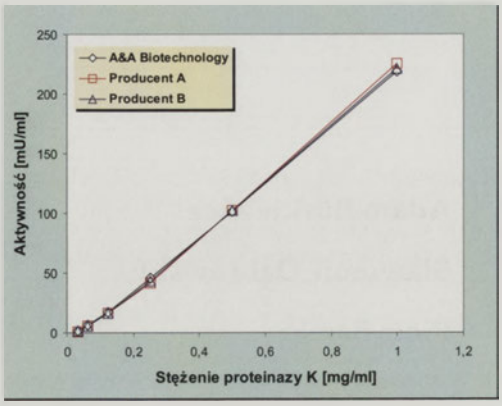
KLONOWANIE GENU KODUJĄCEGO PROTEINAZĘ K

Gen kodujący proteinazę K został zamplifikowany techniką PCR z użyciem dwóch par specyficznych starterów z wykluczeniem sekwencji intronu z DNA szczepu *T. album* pochodzącego z kolekcji japońskiej. Gen ten został następnie wklonowany do plazmidu ekspresyjnego pPICzαA (Invitrogen) oraz pMOX/FAD (A&A Biotechnology). Zlinearyzowane plazmidy pPIZ-PJ1 i pMOX/FAD-PJ1 niosące gen rekombinowanej proteinazy K zostały użyte do transformacji szczepów odpowiednio *P. pastoris* (DSM 70382) oraz *H. polymorpha* (DSM 70276). W celu określenia wydajności ekspresji proteinazy K i selekcji wydajnego producenta enzymu, uzyskane kolonie rekombinantów przesiano na podłoża płynne zawierające metanol lub glicerynę.

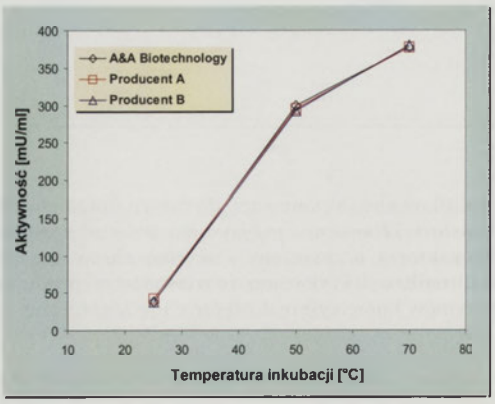
OCZYSZCZANIE PROTEINAZY K

Hodowlę rekombinowanych szczepów przeprowadzono w 25 litrowym bioreaktorze (New Brunswick Scientific) wypełnionym pożywką zawierającą podłoże YNB, niezbędne aminokwasy oraz metanol lub glicerol. Hodowle prowadzono

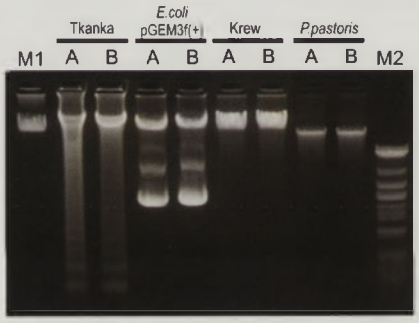
http://rcin.org.pl



Rycina 1. Porównanie aktywności komercyjnie dostępnych preparatów proteinazy K z proteinazą K firmy A&A Biotechnology. Test aktywności przeprowadzono różnymi ilościami enzymu w 50°C w buforze 10 mM Tris-HCl z użyciem 2% azo-kazeiny. Reakcję zatrzymywano po 15 min z użyciem 25% TCA.



Rycina 2. Porównanie aktywności w różnych temperaturach komercyjnych preparatów proteinazy K z proteinazą K firmy A&A Biotechnology. Test aktywności przeprowadzono z użyciem 2 µg proteinazy w temperaturze 25, 50 i 70°C, w buforze 10 mM Tris-HCl z użyciem 2% azo-kazeiny. Reakcję zatrzymywano po 15 min z użyciem 25% TCA.



Rycina 3. Wyniki izolacji chromosomalnego DNA z użyciem zestawów firmy A&A Biotechnology oraz proteinazy K firmy A&A Biotechnology (ścieżki A) i komercyjnej rekombinowanej proteinazy K (ścieżki B). DNA izolowano z: tkanki (zestaw Genomic Mini AX Tissue); hodowli *E. coli* zawierającej plazmidowe DNA (zestaw Mini AX Bacteria); z krwi (zestaw Genomic Mini AX Blood); hodowli drożdży *P. pastoris* (zestaw Genomic Mini AX Yeast). M1 - DNA faga Lambda ; M2 - marker wielkości fragmentów DNA - DNA faga lambda trawione restryktazą AvaII (A&A Biotechnology).

w 30°C przy silnym napowietrzaniu. Maksymalna produkowana ilość rekombinowanej proteinazy K była obserwowana po 4-5 dniach hodowli. Enzym z hodowli oczyszczano po separacji komórek z użyciem chromatografii jonowymiennej, dializowano i zagęszczano na drodze diafiltracji, ultrafiltracji i precypitacji.

TESTY AKTYWNOŚCI

Aktywność oraz termostabilność w uzyskiwanych preparatach rekombinowanej proteinazy K porównywano względem innych dostępnych komercyjnych preparatów z użyciem azo-kazeiny (SigmaAldrich). Preparat rekombinowanej proteinazy K testowano również w izolacji genomowego DNA z tkanek, krwi, hodowli baktrii *E. coli* i drożdży *P. pastoris* z użyciem odpowiednich zestawów A&A Biotechnology (Ryc. 3).

WYNIKI

Wykazano, że wyprodukowana w dwóch systemach drożdżowych i oczyszczona rekombinowana proteinaza K wykazuje własności identyczne z własnościami komercyjnie dostępnych preparatów. W teście 1 (Ryc. 1) wykazano, że aktywność specyficzna uzyskanego preparatu rekombinowanej proteinazy K nie odbiega od aktywności proteinaz K dostępnych na rynku. Również termostabilność rekombinowanej proteinazy K jest identyczna z termostabilnością preparatów innych producentów (Ryc. 2). Ilość oraz jakość genomowego DNA izolowanego z użyciem rekombinowanej proteinazy K jest taka sama, jak w przypadku zastosowania w procesie izolacji komercyjnie dostępnych enzymów (Ryc. 3).

PIŚMIENNICTWO

1. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Eur J Biochem 47: 91-97
2. Bajorath J, Saenger W, Pal GP (1988) Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber. Biochim Biophys 954: 176-182
3. Sweeney PJ, Walker JM (1993) Proteinase K (EC 3.4.21.14). Methods Mol Biol 16: 305-311
4. Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M (1995) A simple universal DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. PCR Methods Appl 4: 368-370

Polish recombinant proteinase K

Adam Burkiewicz, Sławomir Dąbrowski✉, Piotr Barski

A&A Biotechnology, 96/98 Al. Zwycięstwa St., 81-451 Gdynia, Poland

✉e-mail: info@aabiot.com

Key words: proteinase K; purification of recombinant enzyme; properties

ABSTRACT

Proteinase K encoding gene was amplified and cloned in two yeast protein expression systems in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*.

http://rcin.org.pl

Biologia chemiczna — nowa dyscyplina nauki

Jan Barciszewski[1,✉]

Henryk Koroniak[2]

Wojciech T. Markiewicz[1]

[1]Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań
[2]Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań

✉Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań; e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: biologia chemiczna, chemia, biologia, biologia systemów.

Artykuł otrzymano 28 września 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 29 września 2007 r.

STRESZCZENIE

Biologia chemiczna jest nową gałęzią nauki charakteryzującą się globalnym opisem procesów zachodzących w organizmach żywych. Obejmuje syntezę nowych połączeń chemicznych dla badań systemów biologicznych a także wyszukiwanie małocząsteczkowych związków chemicznych występujących w przyrodzie, wyróżniających się olbrzymim potencjałem regulującym procesy komórkowe. Siłą biologii chemicznej jest równocenność jej podstawowych członów: syntezy chemicznej, komputerowych metod obliczeniowych oraz biologii systemów.

WPROWADZENIE

Biologia chemiczna jest jedną z wielu gałęzi nauki charakteryzujących się odchodzeniem od redukcjonistycznego na rzecz holistycznego podejścia w opisie zjawisk.

Biologia chemiczna ma swoje historyczne a także filozoficzne korzenie w wielu naukach pogranicza chemii i biologii, takich jak chemia medyczna, chemia supramolekularna, chemia bioorganiczna, genetyka czy biochemia. Jej początki sięgają lat 50-tych ubiegłego wieku i są związane między innymi z L. Paulingiem.

Biologia chemiczna opiera się na przekonaniu, że poznanie i zrozumienie chemicznych mechanizmów procesów biologicznych da możliwość sterowania nimi w określony i przewidywalny sposób.

Biologia chemiczna obejmuje syntezę nowych połączeń chemicznych dla badań systemów biologicznych a także wyszukiwanie naturalnych związków niskocząsteczkowych istotnych dla jakości zdrowia człowieka, regulujących procesy komórkowe [1].

Miarą siły biologii chemicznej jest równocenność jej trzech członów: syntezy chemicznej, komputerowych metod obliczeniowych oraz biologii systemów. Każdy z nich reprezentuje oddzielną dziedzinę wiedzy z własnymi prawami [2-4].

Biologia chemiczna obejmuje cztery główne kierunki badawcze:

1. syntezę chemiczną i biologiczną (biologia syntetyczna),
2. badania chemicznych podstaw mechanizmów biologii systemów przy pomocy narzędzi zarówno biologicznych i chemicznych,
3. pogłębianie wiedzy biologicznej polegające na wykorzystaniu technik chemicznych do poszerzenia obszaru biologii systemów,
4. przesuwanie granic wykorzystania chemii poprzez biologię, pokazując atrakcyjność biologicznej różnorodności dla badań chemicznych.

W polu zainteresowań biologii chemicznej jest poszukiwanie nowych leków, znajdowanie lepszych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych, zrozumienie elementów biologii strukturalnej, transdukcja sygnałów a także inspiracja do rozwoju nowych kierunków w chemii [4-6]. Biologia chemiczna wykorzystuje metody chemii do manipulacji cząsteczkami biologicznymi i pozwala wykorzystywać nie tylko materiały dostępne w przyrodzie.

Biologia chemiczna opiera się na wielkim potencjale chemii do otrzymywania nowych połączeń i nieznanych wcześniej związków chemicznych. Wykorzystuje oryginalne strategie syntezy inspirowane złożonością struktury naturalnych związków chemicznych, a przede wszystkim szlakami biosyntezy obserwowanymi w organizmach żywych. Wykazuje, że związki chemiczne o niewielkim

http://rcin.org.pl

podobieństwie do połączeń naturalnych mogą mieć bardzo dużą aktywność biologiczną.

Biologia chemiczna wykorzystuje syntezę, analizę struktury i funkcji do badań mechanizmów chemicznych w celu uzyskania odpowiedzi na podstawowe pytania biologiczne. Tworzy biologia chemiczna narzędzia chemo-informatyczne oraz różnorodne bazy danych małych związków chemicznych i makrocząsteczek. Gromadzi informacje o ich funkcjach, właściwościach oraz metodach ich uzyskiwania, a także o szlakach metabolicznych, ich wzajemnych zależnościach, regulacji i kompleksowych oddziaływaniach. Istnieje olbrzymia potrzeba gromadzenia oraz przetwarzania informacji dotyczących genomów, proteomów oraz metabolomów, w celu poznania i zrozumienia struktury białek, a także ich funkcji komórkowych.

DNA, RNA lub białka syntezowane są w komórce, a także *in vitro*, wykorzystując metody biologii molekularnej lub inżynierii genetycznej. Można je otrzymywać również w układach komórkowych i za pośrednictwem wirusów wg reguł podobnych do tych funkcjonujących w komórce żywej. Wielorakie wzajemne oddziaływania różnych grup związków chemicznych w komórce decydują o mechanizmach jej funkcjonowania. Niskocząsteczkowe związki chemiczne wiążą się do DNA i wpływają na jego aktywność, ale również DNA jest „matrycą" dla syntezy małych związków chemicznych. Małocząsteczkowe ryboprzełączniki wpływają na aktywność RNA. Także niektóre antybiotyki wiążą się do RNA wywierając na tej drodze „inhibitorowy" efekt biologiczny. O ile synteza nowych połączeń chemicznych służących między innymi jako sondy strukturalne jest ważnym zadaniem chemii organicznej, to synteza naturalnych składników komórki żywej jest siłą motoryczną w biologii chemicznej.

Wspólnym elementem obszarów biologii chemicznej jest systematyczna manipulacja małymi cząsteczkami w celu rozwiązywania podstawowych problemów biologicznych przez współdziałających specjalistów z różnych dziedzin badawczych wykorzystujących dowolne techniki chemii i biologii.

Biologia chemiczna pokazuje również, w jaki sposób narzędzia chemii (małe cząsteczki oraz zaawansowane metody ich analizy) mogą być stosowane do poznania złożonych problemów biologicznych, takich jak mechanizmy powstawania chorób, regulacja szlaków metabolicznych oraz rola różnych biocząsteczek w regulacji funkcji komórkowych. Korzystną stroną stosowania małych połączeń jest ich zdolność do modulacji aktywności określonych makrocząsteczek w zależności od dawki oraz możliwości „wyłączania" tylko jednej z kilku różnych funkcji badanego białka.

W przeciwieństwie do biochemii, genetyki czy biologii molekularnej, gdzie mutageneza decyduje o powstaniu nowej wersji danego organizmu (mutanta) lub komórki, badania biologii chemicznej, wykorzystując swoiście adresowane małe cząsteczki, modulują działanie układów *in vitro* i *in vivo* [7].

Biologia chemiczna to multidyscyplinarna gałąź nauki wymagająca od chemików, biologów, informatyków, programistów oraz inżynierów umiejętności łączenia ich kompetencji i wiedzy dla osiągnięcia maksymalnej efektywności w rozwiązywaniu interesujących i ważnych problemów przyrody. Wywiera istotny wpływ zmieniający postawy badaczy, zachęcając do swobodnego stawiania pytań o przebieg danego procesu biologicznego.

DWA ŚWIATY: CHEMIA I BIOLOGIA

Chemia i biologia wydają się być dwoma odrębnymi przestrzeniami badawczymi z nie do końca sprecyzowanymi różnicami i niekiedy negatywnie wpływającymi na siebie nawzajem. Pomimo zauważalnych różnic między chemią i biologią, również kulturowych, właśnie język chemii wydaje się wspólny dla nich oraz innych nauk o życiu. Język chemiczny jest pomostem łączącym nauki fizyczne i biologiczne. Ma także swoje piękno [8-10].

Chemia i biologia są postrzegane jako odrębne dyscypliny akademickie. Faktyczne relacje między chemią i biologią przekraczają formalne granice między nimi, które nie pozwalają wyłonić z nich jednej dyscypliny. W postrzeganiu biologii jako nauki badającej procesy życiowe, a chemii jako sposobu opisu zachowań cząsteczek, rola chemii w procesach biologicznych nie jest ewidentna. Różnica między chemią i biologią nie zasadza się na technikach badawczych, ale może być widoczna w podejściu badaczy do rozwiązywania różnych problemów badawczych [8,10]. Coraz częściej wykorzystuje się chemiczne narzędzia do badania procesów biologicznych na poziomie genu, komórki czy organizmu. Wydaje się, że biolog będzie zadawał pytania o powstanie wszechświata oraz jego istnienie w obecnym kształcie. Dla chemików ważne będą pytania o zasady i prawa tłumaczące obserwacje badawcze. Nie oznacza to bynajmniej, że biolodzy nie rozumieją zasad fizyki, a chemicy nie wierzą w ewolucję. Systemy biologiczne podlegają ewolucji, a układy chemiczne można opisać prawami fizyki [10].

Chemia ze względu na swoje naturalne zainteresowanie oddziaływaniami międzycząsteczkowymi stara się rozwiązywać problemy biologiczne stosując syntetyczne analogi związków naturalnych (modele) począwszy od związków małocząsteczkowych do wielkich, takich jak DNA i białka. Jako przykład badań modelowych w obszarze biologii chemicznej, można przywołać oddziaływania związku chemicznego obdarzonego ładunkiem dodatnim (kation) z elektronami π oraz badania wpływu efektów sterycznych i wiązania wodorowego na proces replikacji DNA.

Można zapytać, jakie istotne problemy chemia skupiająca się na problemach biologii rozwiązuje obecnie lub na jakie podstawowe pytania szuka odpowiedzi? Chciałaby ona poznać podstawy chemiczne funkcjonowania komórki, molekularne mechanizmy myślenia oraz pamięci, projektować cząsteczki mające określone funkcje oraz dynamikę molekularną, tworzyć materiały niezbędne dla medycyny i innych działów przemysłu [7]. Interesujące wydaje się pytanie, jak powstało życie na ziemi, a także jak wykorzystać możliwe permutacje wszystkich pierwiastków. Chemia jest mocna swym potencjałem syntetycznym. Z jej pomocą można stworzyć różne obiekty, realizować nowe zadania

http://rcin.org.pl

nieznane w przeszłości. Dzięki swoim narzędziom i językowi jest olbrzymim źródłem wiedzy i faktów, które musi opisywać i interpretować niezwykle ostrożnie, gdyż nie do niej należy ostatnie słowo w opisie procesów biologicznych. Jednakże bez informacji z tego obszaru ta ostatnia konkluzja nigdy nie zostanie wypowiedziana.

Biologia postrzegana do niedawna jako luźna federacja botaniki, zoologii, genetyki a także muzeów przyrodniczych, obecnie staje się bardziej całościowa. Dla biologii ewolucyjnej, behawioralnej i fizjologii komórkowej wspólną płaszczyzną są geny i białka, ich lokalizacje i funkcje, które można śledzić w procesie ewolucji [11,12].

Wiedza o molekularnych podstawach organizmów żywych jaka została zgromadzona w XX wieku jest dowodem wielkiego postępu nauki. Po zaproponowaniu modelu podwójnej helisy dla DNA w 1953 roku, biologia molekularna zaproponowała głębszą analizę wielu zjawisk biologicznych. Wydawało się, że genetyka została zredukowana do chemii makrocząsteczek a biologia stanie się taką samą dziedziną nauki jak fizyka czy chemia.

Na pograniczu chemii i biologii od dawna umiejscawia się biochemię. Poszukuje ona zrozumienia mechanizmów oddziaływania i funkcjonowania makrocząsteczek na poziomie atomowym. Szuka odpowiedzi na pytania, co jest ligandem, co substratem, a co jest kofaktorem, jaki jest wpływ środowiska na przebieg reakcji, jaki jest mechanizm reakcji katalitycznej. Na tym pograniczu chemii i biologii powstały także inne dyscypliny badawcze. Należy tu wymienić chemię biologiczną, ekologię chemiczna, chemię bioorganiczną i ostatnio powstałą biologię chemiczną.

Chemia biologiczna obejmuje prawie wszystkie obszary badań biologicznych dotyczących białek, DNA, RNA oraz związków niskocząsteczkowych. Chemia bioorganiczna powstała jako nauka interdyscyplinarna w okresie kiedy wydawało się, że cząsteczki przypominające właściwościami enzymy mogą funkcjonować jako katalizatory a nawet je zastępować. Oczekiwanie takie było uzasadnione, ponieważ niektóre enzymy było trudno wyodrębnić, mutageneza nie była jeszcze wtedy optymalnym rozwiązaniem, a techniki inżynierii genetycznej nie były wówczas powszechnie dostępne. Rozwój łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i klonowania zredukowały zapotrzebowanie na mimetyki enzymów, ponieważ techniki sztucznej ewolucji białek wykazujących określone właściwości są łatwiejsze niż synteza związków podobnych do enzymów. Chemia bioorganiczna rozwija się w kierunku poznania mechanizmu rozpoznawania oraz chemii supramolekularnej.

CELE BIOLOGII CHEMICZNEJ

Początków tej dyscypliny naukowej można się doszukać, jak już wspomnieliśmy w wieku XIX, chociaż jej burzliwy rozwój rozpoczął się na początku lat 80-tych poprzedniego wieku. Niezwykle ciekawymi obserwacjami były:

- hydroliza DNA pod wpływem małych cząsteczek,
- kataliza reakcji chemicznych przez przeciwciała,
- włączanie nienaturalnych aminokwasów do naturalnych peptydów (mutanty białkowe),
- wykorzystanie małych cząsteczek do śledzenia szlaków metabolicznych,
- chemiczna modyfikacja powierzchni komórkowych,
- klonowanie receptorów produktów naturalnych,
- dostępność analogów ATP do badań specyficzności kinaz białkowych,
- synteza nowych związków wiążących hormony dla badań funkcji i specyficzności jądrowych receptorów hormonów,
- wykorzystanie modyfikacji kwasów rybonukleinowych do badań ich struktury i właściwości,
- synteza chemicznych induktorów sygnalizacji komórkowej,
- synteza małych cząsteczek swoiście wiążących się do DNA.

Do strategicznych celów biologii chemicznej należy:

1. poznanie naturalnych, niskocząsteczkowych składników komórki oraz ich wpływu na biopolimery w celu stworzenia dobrych podstaw do badań klinicznych. Zadania te są zasadne ze względów aplikacyjnych, są ambitne naukowo i niezwykle trudne, ale przede wszystkim ważne dla społeczeństwa [4].

2. wykorzystanie syntezy chemicznej do poznawania i wyjaśniania szlaków metabolicznych kluczowych dla komórki oraz rozpoznania biologii chorób. Synteza i wykorzystanie małych cząsteczek w badaniach funkcji genomów przyspieszy przekazywanie odpowiedniej wiedzy w celu opracowania nowych skutecznych leków.

3. wykorzystanie syntezy chemicznej i masowych testów komórkowych oraz na zwierzętach, połączonych z analizami obliczeniowymi umożliwiającymi biologom opracowanie nowych metod diagnostycznych, a chemikom zrozumienie swoistego wpływu właściwości składników komórkowych na procesy biologiczne. Chociaż można zauważyć pewne analogie do procesów poszukiwania nowych leków w przemyśle farmaceutycznym i biotechnologii, to biologia chemiczna jest skoncentrowana dodatkowo na podstawowych problemach ważnych dla chemii oraz biologii.

4. charakterystyka funkcji regulatorowych małych cząsteczek w pojedynczych szlakach metabolicznych. Dziedzina ta jest komplementarna do tzw. *forward genetics*, gdzie dany szlak może być włączany i wyłączany w określonym czasie.

Ukierunkowanie chemii na biologię zaobserwowano również pół wieku temu kiedy to klasyczna biochemia *de facto* przekształciła się w biologię molekularną. Obecny lawinowy rozwój badań w obszarze nauk biologicznych przejawiający się poznaniem sekwencji genomów, narodzinami genomiki i proteomiki, szybkim rozwojem biologii komórki oraz rozpoznaniem konieczności prowadzenia badań ilościowych transkryptomu, proteomu i metabolomu, stworzył olbrzymie zapotrzebowanie na większe zaangażowanie chemii, która ma własne narzędzia i wielki potencjał

http://rcin.org.pl

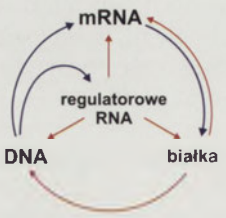
badawczy do rozwiązywania ważnych problemów biologii. Część problemów dotycząca chemii procesów życiowych w dalszym ciągu pozostaje bez odpowiedzi.

MODELE BIOLOGICZNE

Obecnie w biologii coraz powszechniejszy jest pogląd, że poznanie zależności między strukturą i funkcją jest odległe. Konieczne jest uwzględnienie lokalizacji danego procesu w przestrzeni energetycznej komórki. Oddziaływania między makrocząsteczkami nie są jednak tak proste jak dopasowanie klucza do zamka, ponieważ uzyskanie wzajemnej komplementarności między miejscem wiązania (centrum aktywacyjne) oraz cząsteczką docelową zależy od konformacyjnej dynamiki molekularnej cząsteczek oddziaływujących i rozpuszczalnika. Właśnie biologia chemiczna analizuje reakcje zachodzące w skomplikowanej przestrzeni energetycznej. Próbuje określić, w jaki sposób cząsteczka peptydu znajduje swoją trajektorię w szerokiej panoramie energetycznej, kończącą się na dnie lejka energetycznego odpowiadającego poprawnej konformacji białka [10,11].

Wydaje się oczywiste, że komórkowe oddziaływania kwasów nukleinowych i białek nie mogą być dobrze poznane z pomocą nawet tak mocnego oręża badawczego jakim są mikromacierze. Biologia chemiczna może natomiast dostarczyć nowych obserwacji oraz ich śmiałej interpretacji, które pozwolą na zrozumienie mechanizmów biologicznych.

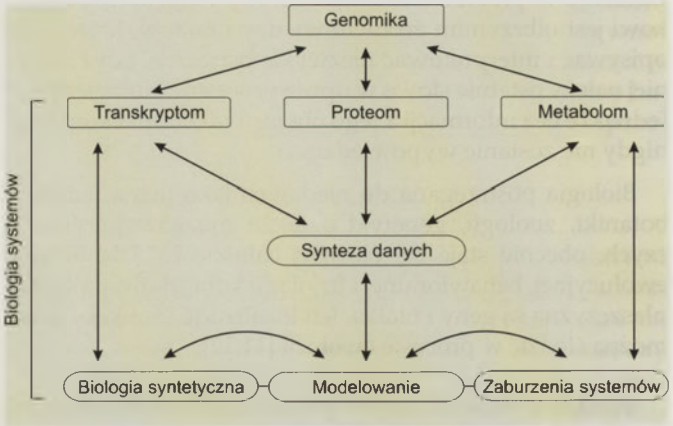
Główny dogmat biologii molekularnej zakłada przepływ informacji genetycznej zakodowanej w makrocząsteczkach biologicznych, od kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) przez kwas rybonukleinowy (RNA) do białka (Ryc. 1). Jednakże do pełnego funkcjonowania (życia) komórka potrzebuje również mniejszych cząsteczek, bez których nie można wyobrazić sobie takich kluczowych zjawisk jak powstanie życia, pamięć, świadomość, rozpoznawanie, przekazywanie sygnałów, zrozumienie szlaków metabolicznych oraz zwalczanie chorób.



Rycina. 1. Mechanizm zarządzania „życiem" [14].

Biologia chemiczna dostarcza informacji właśnie o małych cząsteczkach i dlatego stanowi brakujące ogniwo w głównym dogmacie.

Ciągle nie do końca znane są podstawowe procesy biologii, takie jak tworzenie struktury przestrzennej aktywnych białek, kod genetyczny funkcji biologicznych, czy swoisty mechanizm rozpoznawania. Są to faktycznie problemy chemiczne. Wydaje się, że biologia molekularna nadmiernie podkreśla niekiedy, że niektóre mechanizmy biologiczne są w istocie poznane, chociaż z chemicznego punktu widzenia im głębiej rozpoznawany jest problem tym więcej i dokładniej ujawnia się różnorodność form oddziaływania cząsteczek, czy doprecyzowania języka ich opisu. Istota funkcjonowania komórki żywej jest niewątpliwie zagadnieniem molekularnym, nie mającym wiele wspólnego z biologią.



Rycina. 2. Nowe kierunki badawcze tworzące przestrzeń biologii chemicznej.

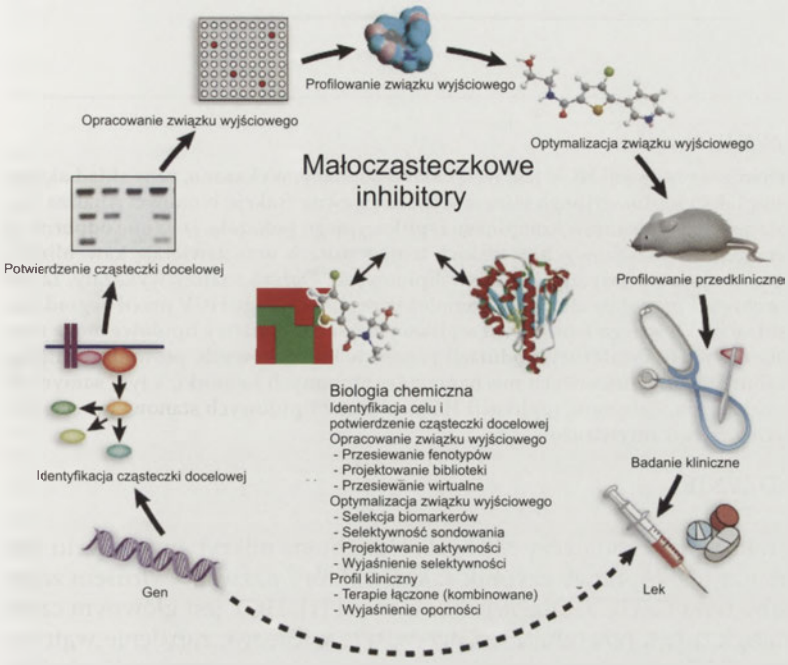
Biologia systemów jest to połączenie teorii, modelowania komputerowego i eksperymentów wieloobiektowych, które doprowadziło do przełomu w zrozumieniu szlaków sygnałowych, biologii rozwoju, fizjologii komórki oraz powiązań metabolicznych (Ryc. 2). Jednakże pomimo olbrzymiego postępu w zrozumieniu biologii brak jest całościowej wiedzy, w jaki sposób np. małe cząsteczki wpływają na systemy biologiczne. Potrzeba nowych narzędzi, które będą integrowały bioinformatyczne i chemoinformatyczne bazy danych, dostarczały nowych symulacji szlaków biologicznych oraz nowych algorytmów niezbędnych do osiągnięcia systemowego zrozumienia wpływu małych cząsteczek na systemy biologiczne. Takie podejście oferuje chemoinformatyka, która koncentruje się na uzyskiwaniu i analizie informacji z chemicznych baz danych i jest obecnie częścią programów poszukiwania nowych leków oraz główną bazą badań systemów biologicznych modulowanych chemicznie. Podobnie jak bazy danych w genomice i proteomice kształtują nasze wyobrażenie o biologii i medycynie, nowe chemo-banki mają olbrzymi potencjał moderujący myślenie chemików i biologów. Będą torowały drogę nowym strategiom biologii chemicznej, czyli racjonalnego modulowania funkcji wszystkich białek za pomocą małych cząsteczek. Pełna integracja baz danych eksperymentalnych, chemicznych, biologicznych oraz obliczeniowych tworzy spójny obszar chemicznej biologii systemów [12].

PERSPEKTYWY

Biologia chemiczna pozwala na realną ocenę wpływu nowych związków chemicznych na zmiany w profilu genomowym (genomika) oraz proteomu (proteomika) prowadząc do zmian w systemach biologicznych i selektywności np. inhibitorów kinaz (Ryc. 3). Biologia chemiczna wykorzystując małe cząsteczki wyselekcjonowane w procesie poszukiwania leku nie tylko przyspiesza osiągnięcie etapu klinicznego, ale także racjonalizuje wysiłki działania na poszczególnych etapach (Ryc. 3). W ten sposób sondy niskocząsteczkowe mogą być wykorzystane do planowania dobrych modeli cząsteczkowych służących poszukiwaniu nowych leków.

Potwierdzają to przykłady dobrze znane w nauce, np. odkrycie podwójnej helisy DNA. Jest ono rezultatem bardzo zaawansowanej analizy stereochemicznej, obserwacji Erwi-

http://rcin.org.pl



Rycina. 3. Strategia biologii chemicznej w selekcji małocząsteczkowych związków dla celów terapeutycznych.

na Chargaffa o stosunkach ilościowych zasad purynowych i pirymidynowych, a także stwierdzenia L. Paulinga, że komplementarność oraz identyczność może być wyrażana przez antyrównoległą strukturę DNA. Wszystkie te obserwacje pozwoliły zrozumieć Watsonowi i Crickowi, w jaki sposób może powstać podwójna helisa DNA.

Po odkryciu struktury DNA i poznaniu kodu genetycznego, zainteresowanie biologii skoncentrowało się na zrozumieniu braku powtarzalności elementów w DNA, czyli sekwencji nukleotydów i ostatecznie genów. Chemiczna metoda ustalania kolejności zasad w DNA Maxama-Gilberta, czy metoda terminacji syntezy łańcucha DNA z użyciem dideoksynukleotydów Sangera, a następnie jej chemiczne udoskonalenia (wprowadzenie związków fluoryzujących i stabilnych termicznie polimeraz), nowe technologie (lasery, elektroforeza kapilarna) i ostatecznie poznanie sekwencji nukleotydowej genomu człowieka, świadczą jednoznacznie o decydującym wkładzie chemii w zrozumieniu procesów biologicznych [13]. Poznanie struktury genomów (genom człowieka — ok. 3 miliardy nukleotydów) świadczy nie tylko o olbrzymim potencjale poznawczym, ale jest jednym z największych i pięknych sukcesów chemii. Wskazuje również, że chemicy byli głównymi aktorami tego wydarzenia, a poznanie sekwencji genomu człowieka oraz innych genomów jest wielkim tryumfem chemii [13]. Biologia chemiczna, jako wynik kreatywnego oddziaływania między chemią i biologią oferuje wszechstronne techniki doświadczalne do poznawania nowych faktów i zdobywania informacji, niezbędnych do szybkiego przebycia drogi od genu do leku.

PIŚMIENNICTWO

1. Austin DJ (2000) The chemistry and biology interface: an emerging field or an old friend. Cell 101: 125–126
2. Oprea TI, Tropsha A, Faulon JL, Rintoul MD (2007) Systems chemical biology. Nat Chem Biol 3: 447-450
3. Morrison KL, Weiss GA (2006) The origins of chemical biology. Nat Chem Biol 2: 3–6
4. Collins J, Workman P (2006) New approaches to molecular cancer therapeutics. Nat Chem Biol 2: 689–700
5. Sigler PB (1994) Chemogenetics. Struct Biol 1: 3–4
6. Ball P (2006) What chemists want to know. Nature 442: 500-502
7. Gura T (2000) A chemistry set for life. Nature 407: 282–284
8. Kornberg A (1987) The two cultures: chemistry and biology. Biochemistry 26: 6888–6891
9. Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. Science 235: 1173–1178
10. Kornberg A (1996) Chemistry — the *lingua franca* of the medical and biological sciences. Chem Biol 3: 3–5
11. Kool ET, Waters ML (2007) The model student: what chemical model systems can teach us about biology. Nat Chem Biol 3: 70–73
12. Fierke CA, Herschlag D (2006) The wide reach of enzymology: from bioorganic chemistry to chemical biology. Curr Opin Chem Biol 10: 1-2
13. Jekely G (2002) The human genome sequence: a triumph of chemistry. EMBO Rep 3: 594–595
14. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J (2005) A new frontier for molecular medicine. Noncoding RNAs. Biochim Biophys Acta 1756: 65-75

Chemical biology — a new branch of science

Jan Barciszewski[1]✉, Henryk Koroniak[2], Wojciech T. Markiewicz[1]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 12 Noskowskiego St., 61-704 Poznań, Poland
[2]Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 6 Grunwaldzka St., 60-780 Poznań, Poland

✉e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Key words: chemical biology, biology, chemistry, systems biology.

ABSTRACT

Chemical biology is a new branch of science characteristic with global description of biological processes occurring within the cell. It covers synthesis of new chemical compounds for systems biology studies and search for natural small molecular weight chemical compounds with high cellular regulatory potential. Chemical biology power is based on 3 pillars as chemical synthesis, computer calculations and systems biology.

http://rcin.org.pl

Rola tratw lipidowych w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C

Martyna Grek✉

Jacek Bartkowiak

Małgorzata Sidorkiewicz

Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

✉Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (042) 678 06 20 wew. 138 lub tel./faks: (042) 678 24 65, e-mail: martyna.grek@wp.pl

Artykuł otrzymano 6 czerwca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 29 sierpnia 2007 r.

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu C, tratwy lipidowe, kompleks replikacyjny, białka tratw lipidowych, terapia antywirusowa

Wykaz skrótów: AKT — kinaza białkowa A; CD81 — białko błonowe należące do rodziny tetraspanin; HCV (ang. *hepatitis C virus*) — wirus zapalenia wątroby typu C; Huh-7 (ang. *Human hepatoma cell line*) — linia komórkowa ludzkiego raka wątroby; hVAP-33 (ang. *human vesicle associated protein*) — białko błonowe, aktywne w transporcie pęcherzykowym; LFA-1 (ang. *leukocyte function-associated molekule-1*) — antygen związany z funkcją leukocytów, integryna CD11a/CD18; NS (ang. *nonstructural*) — niestrukturalne; PI3K — 3-kinaza fosfatydyloinozytolu; RC (ang. *replication complex*) — kompleks replikacyjny

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego 502-16-415, finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi

STRESZCZENIE

Choć mechanizm replikacji HCV jest wciąż słabo poznany, wykazano, że w skład aktywnego kompleksu replikacyjnego wirusa wchodzą pewne frakcje błonowe. Analiza biochemiczna błonowych elementów kompleksu replikacyjnego pokazała, iż są one odporne na działanie detergentów niejonowych w niskich temperaturach oraz zawierają kaweolinę-2, co stanowi cechy charakterystyczne dla tratw lipidowych. Dalsze analizy wykazały, iż tratwy lipidowe chronią pozostałe elementy kompleksu replikacyjnego HCV przed degradacją. Oprócz organizacji aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV, tratwy lipidowe mogą również pośredniczyć w HCV-zależnej modulacji procesów komórkowych, prowadząc między innymi do zaburzeń antywirusowych mechanizmów obronnych komórki, a tym samym do przetrwania zakażenia. Zależność replikacji HCV od tratw lipidowych stanowi potencjalne źródło nowych strategii antywirusowych.

WPROWADZENIE

W 1989 roku zespół badawczy Michaela Houghtona odkrył, przy użyciu metod rekombinacji DNA, nowy czynnik zakaźny, który nazwano wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*) [1]. HCV jest głównym czynnikiem etiologicznym, powodującym przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby u człowieka (CHC, ang. *chronic hepatitis C*), które w konsekwencji u 4% do 20% pacjentów prowadzi do rozwoju marskości wątroby w ciągu 20 lat. Uważa się, iż ryzyko wykrycia u tych osób raka pierwotnego wątroby (HCC, ang. *hepatocarcinoma*), w porównaniu z populacją ludzi zdrowych, wzrasta od 1% do 5% na rok [2]. Najnowsze dane wskazują, iż 170 milionów osób na świecie jest zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C, a liczba ta cały czas rośnie, co w przyszłości może grozić globalną epidemią [3].

Wirus zapalenia wątroby typu C należy do rodziny *Flaviviridae*. Jego genom stanowi pojedyncza, dodatnia (+) nić RNA, o długości 9.5 tysiąca nukleotydów, która zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF, ang. *open reading frame*), o długości 9 tysięcy nukleotydów [2,4]. Na końcach 3' i 5' ORF HCV jest ograniczona przez sekwencje, które nie podlegają translacji (UTR, ang. *untranslated region*). Sekwencja UTR na końcu 5' zawiera strukturę IRES (ang. *internal ribosome entry site)*, która, łącząc się bezpośrednio z podjednostką 40S rybosomu, służy jako inicjator procesu translacji [5]. Pojedyncza dodatnia (+) nić RNA jest zawarta w nukleokapsydzie, a całość otacza, zawierająca lipidy, otoczka białkowa [2,4,6].

Chociaż głównym miejscem replikacji HCV w organizmie człowieka są hepatocyty, to jednojądrzaste komórki krwi (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*), komórki nabłonka jelita cienkiego oraz centralny układ nerwowy stanowią pozawątrobowy rezerwuar wirusa [7]. Do wewnątrzkomórkowych struktur błonowych, zaangażowanych w cykl życiowy HCV, należą: siateczka śródplazmatyczna (ER), aparat Golgiego, lizosomy i endosomy. W obrębie aparatu Golgiego znajdują się charakterystyczne frakcje błonowe, określane mianem tratw lipidowych, pełniące istotną funkcję w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C [8,9].

Celem niniejszej pracy jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat roli tratw lipidowych w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w formowaniu aktywnych kompleksów replikacyjnych oraz analiza modyfikacji proteomu tratw lipidowych komórek, zawierających replikon HCV. Zależność między tratwami lipidowymi a zakażeniem HCV została przedyskutowana w kontekście mechanizmów, umożliwiających utrzymanie wirusa w zakażonym organizmie, jak również jako potencjalne źródło nowych strategii terapeutycznych.

http://rcin.org.pl

UDZIAŁ TRATW LIPIDOWYCH W FORMOWANIU KOMPLEKSU REPLIKACYJNEGO WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

DOSTĘPNE MODELE BADAWCZE

Szczegółowy mechanizm replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C nie został dotąd poznany. Przeszkodę stanowił brak odpowiednich systemów zwierzęcych oraz linii komórkowych, gdzie HCV mógłby efektywnie replikować [6].

Zwierzęcym modelem badawczym, umożliwiającym analizę wiremii, odpowiedzi biochemicznej, serologicznej oraz zmian histopatologicznych w wątrobie jest szympans. Zakażenie u szympansów charakteryzuje się znacznie łagodniejszym przebiegiem wirusowego zapalenia wątroby typu C, niż ma to miejsce w organizmie człowieka. Istotnym ograniczeniem są również kwestie etyczne oraz wysokie koszty badań [6,10]. Do alternatywnych modeli zwierzęcych, wykorzystywanych w badaniach nad HCV, należą transgeniczne myszy oraz ryjówki (*Tupaia belangeri chinensis*) [11].

Cennych informacji na temat cyklu życiowego wirusa zapalenia wątroby typu C dostarczały analogie z pokrewnymi wirusami RNA oraz systemy, pozwalające na ekspresję pojedynczych białek wirusowych [12] lub funkcjonalnych pseudocząstek wirusa [13]. Szansą na znaczny postęp w tej dziedzinie stało się wprowadzenie linii komórkowych ludzkiego raka wątroby — Huh-7 (ang. *Human hepatoma cell line*), umożliwiających wydajną replikację genomu wirusa [6,7]. Przełomem w badaniach okazały się prace Lohmann'a i współautorów, którzy skonstruowali, przy użyciu metod molekularnych, bicystronowy, subgenomowy replikon HCV i wprowadzili go do linii komórkowych Huh-7 [14]. Po dalszych modyfikacjach opracowano system pozwalający na ciągłą replikację wirusa oraz produkcję zakaźnych cząstek HCV (HCVcc), zdolnych do namnażania się w kulturze komórkowej [15-17] i do zakażania szympansów i myszy [18].

Udoskonalenie powyższych systemów pozwala dokładniej pokazać dynamikę zakażenia zachodzącą *in vivo*, co jest istotne przede wszystkim dla rozwoju badań nad zastosowaniem nowych, skuteczniejszych leków antywirusowych.

CYKL REPLIKACYJNY HCV — WPROWADZENIE

Podobnie jak u pokrewnych wirusów RNA, replikacja HCV ma miejsce w cytoplazmie. Wirus wnika do wnętrza komórki na drodze endocytozy, czemu towarzyszy wiązanie się jego glikoprotein powierzchniowych — E1 i E2 z receptorem obecnym na powierzchni komórki docelowej. Choć za wiązanie z komórką gospodarza odpowiada glikoproteina E2, wykazano, iż jej fuzja z błoną komórki docelowej wymaga obecności białka E1 [6]. Obecnie najwięcej uwagi poświęca się trzem receptorom, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za wnikanie wirusa do wnętrza komórki. Są nimi: cząsteczka CD81 [19], receptor LDL [20] oraz receptor resztkowy klasy B (ang. *human scavenger receptor class B type I*, SR-BI) [21], który wykazuje nasiloną asocjację z tratwami lipidowymi w komórkach Huh-7, zawierających replikon HCV [22]. Po wniknięciu wirusa do komórki dochodzi do usunięcia otoczki i uwolnienia jego genomu w postaci dodatniej nici RNA [7].

Genom HCV stanowi matrycę do syntezy ujemnej (-) nici RNA, która służy do syntezy „potomnych" genomów wirusa. Enzymem katalizującym oba te etapy jest RNA – zależna RNA polimeraza, NS5B [23]. „Potomne" dodatnie (+) nici RNA są upakowywane w nukleokapsyd jako genom lub służą jako matryca w kolejnej rundzie syntezy białek wirusowych [7].

Pierwotnym produktem translacji dodatniej (+) nici RNA jest, składająca się z 3000 aminokwasów, poliproteina. Poliproteina ta jest źródłem 10 niestrukturalnych i strukturalnych białek wirusowych, których powstawaniem kierują komórkowe i wirusowe proteazy. W części aminokońcowej poliproteiny znajdują się prekursory białek strukturalnych: tworzącego nukleokapsyd białka rdzeniowego (białko C, ang. *core protein*), glikoprotein powierzchniowych E1 i E2 oraz białka p7, które prawdopodobnie pełni funkcje kanału jonowego. Pozostała część poliproteiny obejmuje prekursory białek niestrukturalnych: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. Za dojrzewanie białek strukturalnych odpowiadają sygnalazy komórki gospodarza. Uwalnianiem funkcjonalnych białek niestrukturalnych, regulujących proces translacji i replikacji wirusa, kierują enzymy wirusowe. Hydroliza wiązania między NS2 i NS3 jest katalizowana przez metaloproteinazę wirusową (NS2-3). Natomiast proteinaza typu serynowego (NS3) jest odpowiedzialna za dojrzewanie pozostałych niestrukturalnych białek HCV [24]. Wiązania NS3-NS4A oraz NS5A-NS5B hydrolizowane są przez nią znacznie szybciej niż pozostałe, co prowadzi do powstania kompleksu białkowego NS4A-NS4B-NS5A [25].

Powstanie otoczki białkowo-lipidowej to ostatni etap dojrzewania cząstki wirusa, która następnie jest uwalniana z komórki przez pączkowanie. Formowanie wirionów HCV odbywa się prawdopodobnie w siateczce śródplazmatycznej [7].

MIEJSCE REPLIKACJI HCV W ZAKAŻONEJ KOMÓRCE

Cykl życiowy wirusów, których genom stanowi RNA o dodatniej polarności, jest ściśle związany z błonami komórkowymi. Większość z tych wirusów, jak: poliowirusy [26], wirus Kunjin [27], arteriwirusy [28], wirus mozaiki stokłosy (BMV) [29], modyfikuje architekturę błonową zakażonej komórki, w celu organizacji odrębnych struktur błonowych. Istnienie takich struktur zapewnia koncentrację elementów wirusowych oraz komórkowych, niezbędnych przy formowaniu aktywnych kompleksów replikacyjnych i stanowi korzystną dla patogenu ochronę [26-30].

W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C istnienie odrębnych struktur błonowych, uważanych za właściwe miejsce replikacji, zostało potwierdzone w hodowlach ludzkich linii komórkowych, zawierających replikon HCV [31]. Autorzy publikacji anglojęzycznych stosują wobec tych specyficznych struktur błonowych określenie *„speckle – like*

http://rcin.org.pl

structure". Choć nie istnieje polski odpowiednik tej nazwy, to w bezpośrednim tłumaczeniu brzmi ona jako „struktury przypominające cętki" [9,31]. Interesujące jest to, iż morfologicznie podobne zmiany odkryto w hepatocytach szympansów, zakażonych HCV, gdzie nazwano je *„sponge-like inclusion"*, czyli „gąbczaste inkluzje" [10].

Powyższe obserwacje sugerują, że w skład kompleksu replikacyjnego wirusa zapalenia wątroby typu C, oprócz niestrukturalnych białek wirusowych (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), wchodzą pewne frakcje błonowe. Analiza biochemiczna błonowych elementów kompleksu replikacyjnego HCV wykazała, iż są one odporne na działanie detergentów niejonowych (Triton X-100, Nonidet P-40) w temperaturze 4°C. Natomiast w wyniku działania Tritonu X-100 w temperaturze 37°C oraz β-oktyloglukozy w temperaturze 4°C kompleks replikacyjny ulega degradacji [8], co, wraz z udowodnioną obecnością kaweoliny-2 [9], jest charakterystyczne dla tratw lipidowych i świadczy o ich udziale w replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C.

ZNACZENIE TRATW LIPIDOWYCH W REPLIKACJI HCV

Wiele czynników zakaźnych (wirusy, bakterie, pasożyty) wykorzystuje tratwy lipidowe, czyli bogate w cholesterol i sfingolipidy domeny błon komórkowych [32], jako miejsce kolonizacji komórki gospodarza. Tratwy lipidowe biorą udział w cyklu życiowym wirusa grypy [33], wirusa zespołu nabytego niedoboru odporności typu I (HIV-1) [34], wirusów Ebola i Marburg [35], gdzie między innymi stanowią platformy, pośredniczące we wnikaniu cząstek wirusowych do komórki docelowej oraz w formowaniu nowych wirionów [33-35].

Rola tratw lipidowych w replikacji HCV polega głównie na ochronie pozostałych elementów kompleksu replikacyjnego wirusa przed degradacją [9]. Zauważono, iż RNA oraz niestrukturalne białka wirusowe, wchodzące w skład aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV, są odporne na działanie nukleaz i proteaz. Stają się one wrażliwe na działanie tych enzymów dopiero po zastosowaniu czynników niszczących strukturę tratw lipidowych (Tritonu X-100 w temperaturze 37°C) [8].

Pokrycie kompleksu replikacyjnego wirusa przez tratwy lipidowe czyni go niedostępnym dla innych cząsteczek wirusowego RNA, które w wyniku tego nie mogą służyć jako matryca do syntezy RNA HCV. Natomiast potomne nici RNA mogą stanowić matrycę w kolejnej rundzie replikacyjnej [36].

LOKALIZACJA BIAŁEK WIRUSOWYCH W ZAKAŻONEJ KOMÓRCE

Użycie metod immunofluorescencyjnych oraz mikroskopii elektronowej pozwoliło na zlokalizowanie niestrukturalnych białek wirusa w siateczce śródplazmatycznej oraz aparacie Golgiego zakażonej komórki. Uważa się, iż ER jest jedynie miejscem syntezy strukturalnych i niestrukturalnych białek HCV [9]. Natomiast aktywny kompleks replikacyjny wirusa jest związany głównie z aparatem Golgiego, zawierającym struktury tratw lipidowych [37].

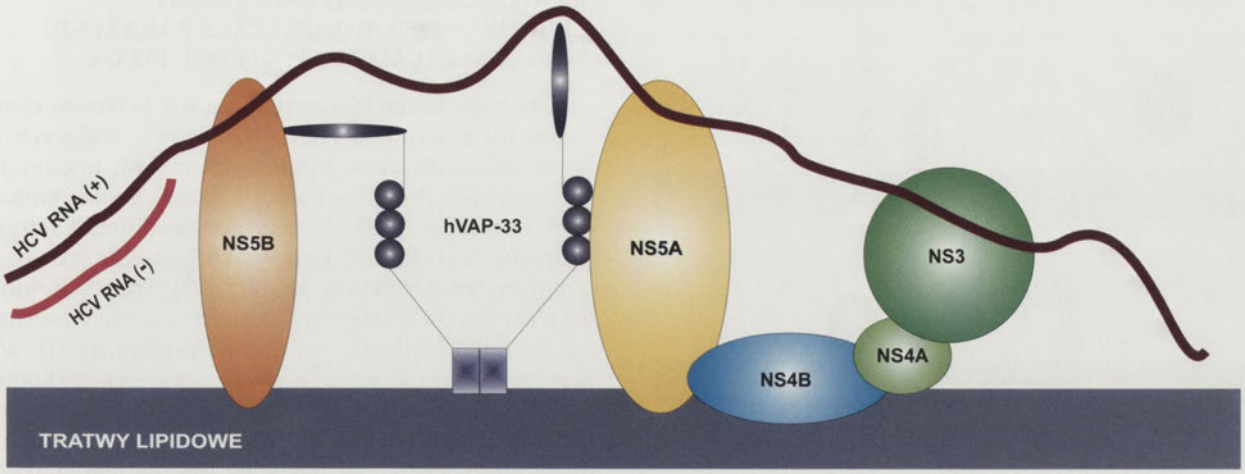
Obecność *„speckle-like structure"* oraz rekrutacja niestrukturalnych białek wirusowych do tratw lipidowych została zaobserwowana w systemach, umożliwiających syntezę RNA HCV. Potwierdza to dodatnia korelacja między ilością *„speckle-like structure"* w zakażonej komórce, ilością niestrukturalnych białek wirusowych związanych z tratwami lipidowymi, a aktywnością replikacyjną HCV. Jest to również kolejnym dowodem, iż *„speckle-like structure"* to właściwe miejsce replikacji wirusa [9,38]. Obserwacje te są sprzeczne z doniesieniami innych badaczy, którzy wykazali, iż niestrukturalne białka HCV są związane głównie z siateczką śródplazmatyczną [39]. Przypuszcza się, iż te odmienne wyniki są związane z różnicami w aktywności replikacyjnej wirusa w komórkach, które były wykorzystywane przez każdą z grup badawczych [9].

RNA HCV oraz mniej niż 5% niestrukturalnych białek wirusowych, obecnych w zakażonej komórce, jest odpornych na działanie nukleaz i proteaz oraz bierze bezpośredni udział w procesie replikacji [40,41]. Ze względu na wysoką stabilność tych białek replikacja wirusa nie zależy od ich syntezy [25]. Pozostała część niestrukturalnych białek HCV (>95%) jest prawdopodobnie wymagana przy formowaniu kompleksu replikacyjnego, bądź zaangażowana jest w proces translacji ORF HCV [40,41].

FORMOWANIE KOMPLEKSU REPLIKACYJNEGO HCV

Kluczową rolę w formowaniu kompleksu replikacyjnego (RC, ang. *replication complex*) HCV odgrywa hydrofobowe białko NS4B [42]. Jego właściwości kotwiczące umożliwiają połączenie kompleksu białkowego NS4A-NS4B-NS5A z tratwami lipidowymi, co inicjuje tworzenie kompleksu replikacyjnego wirusa w ich obrębie [38]. Pozostałe niestrukturalne białka wirusowe (NS3, NS4A, NS5A, NS5B) nie posiadają takich właściwości. Stanowią one jednak ważne elementy kompleksu replikacyjnego wirusa, co sugeruje, iż oddziaływania między niestrukturalnymi białkami wirusowymi, a także pewnymi błonowymi białkami gospodarza są niezbędne przy organizacji RC HCV. NS4A pełni funkcję kofaktora proteinazy serynowej NS3, który pozwala na rekrutację NS3 do tratw lipidowych [43]. Ponieważ białko NS5B (polimeraza RNA), w wyniku aktywności enzymatycznej wirusowej proteazy, zostaje oddzielone od NS4A-NS4B-NS5A, jego połączenie z kompleksem replikacyjnym wymaga obecności dodatkowych czynników białkowych. Rolę tę odgrywa błonowe białko komórkowe hVAP-33 (ang. *human vesicle associated protein*), którego domena N-końcowa wiąże się z NS5B, a C-końcowa z NS5A. Występuje ono w strukturach błonowych opornych na działanie detergentów niejonowych (DRM, ang. *detergent resistant membrane*), co wraz z jego zdolnością wiązania białek wirusowych, jest kolejnym dowodem na formowanie kompleksu replikacyjnego wirusa w obrębie tratw lipidowych (Ryc. 1). Białko hVAP- 33 zostało także zidentyfikowane we frakcjach błonowych wrażliwych na działanie detergentów niejonowych (DSM, ang. *detergent sensitive membrane*), obecnych w siateczce śródplazmatycznej, gdzie znajduje się ono prawdopodobnie w miejscu syntezy NS5A i NS5B [38,44].

http://rcin.org.pl



Rycina 1. Model aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV, opracowany na podstawie prac [38,44].

NS5A jest fosfoproteiną o masie 56 kDa, która również występuje w postaci hiperfosforylowanej (58 kDa). Wyniki badań zaprezentowane przez Evans'a i współautorów pokazały, iż poziom fosforylacji NS5A wpływa na zdolność jego wiązania się z białkiem hVAP-33, a tym samym reguluje aktywność replikacyjną wirusa. Zaobserwowano, iż hiperfosforylacja uniemożliwia białku NS5A połączenie się z hVAP-33, co jest koniecznym warunkiem powstania aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV [45].

Kolejnym białkiem komórkowym niezbędnym w procesie replikacji i translacji HCV jest białko wiążące trakt polipirymidynowy (PTB, z ang. *polypyrimidine-tract-binding protein*). Wiąże się ono z obecnymi na końcach 3' i 5' genomu wirusa sekwencjami UTR [46]. Ostatnie badania udowodniły, iż białko PTB jest obecne w tratwach lipidowych, gdzie bierze udział w formowaniu aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV [47].

SIEĆ BŁONOWA JAKO WŁAŚCIWE MIEJSCE REPLIKACJI WIRUSA

Wykorzystanie mikroskopii elektronowej oraz metod immunofluorescencyjnych pozwoliło na obserwacje, indukowanych przez wirusa zapalenia wątroby typu C, odrębnych struktur błonowych, w komórkach zawierających replikon HCV. Celem tych analiz była charakterystyka *„speckle-like structure"* oraz identyfikacja roli poszczególnych białek HCV w ich formowaniu. Na podstawie badań ekspresji całej poliproteiny wirusa zaobserwowano dwa główne typy modyfikacji błonowej architektury komórki: sieć błonowa (ang. *membranous web*) oraz ciasno ułożone pęcherzyki, które ją otaczają [31,48].

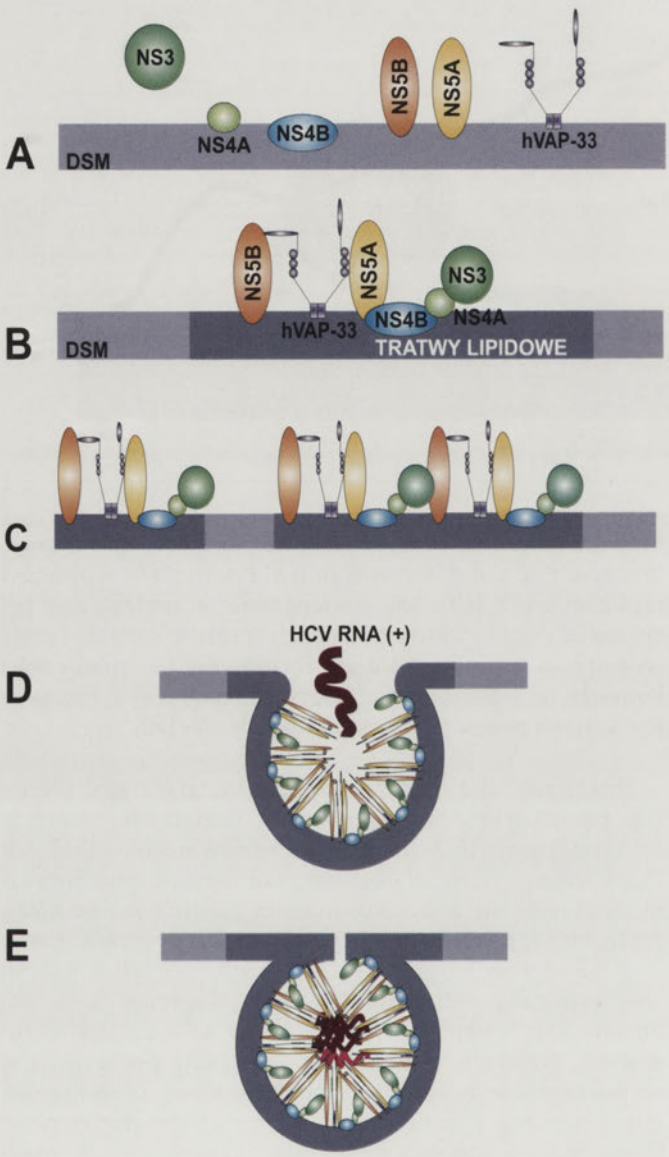
Sieć błonowa składa się z pęcherzyków o średnicy 85 nm, które są zanurzone w matriks błonowej. Przypuszcza się, iż pęcherzyki te mogą być formowane przez ciasno ułożone, falujące błony, tworzące zbitą strukturę. Wykazano, iż za organizację sieci błonowej jest odpowiedzialne niestrukturalne białko wirusa — NS4B [31]. Wydaje się, iż sieć błonowa jest najbardziej odpowiednim kandydatem do miejsca replikacji HCV w zakażonej komórce, gdyż gromadzi większość, odpornych na działanie proteaz i nukleaz komórkowych, niestrukturalnych białek wirusa, biorących udział w formowaniu aktywnych kompleksów replikacyjnych [49]. Nie stwierdzono natomiast, aby pęcherzyki sieci błonowej zawierały cząstki wirusa. Nowe wiriony są prawdopodobnie formowane w innej części komórki, w siateczce śródplazmatycznej, a sieć błonowa jest jedynie miejscem syntezy RNA HCV [50].

Drugi rodzaj zmian stanowią, otaczające sieć błonową, pęcherzyki o nieregularnych kształtach, podobne do występujących w zakażeniu wirusem Polio [51]. Ich błony ulegają fuzji, dlatego w publikacjach anglojęzycznych określa się je często mianem *„contiguous vesicles"*, czyli „stykających się pęcherzyków". Ich obecność została stwierdzona jedynie w systemach, umożliwiających ekspresję całej poliproteiny wirusa. Sugeruje to, iż ich formowanie wymaga współdziałania kilku białek wirusowych. Niektóre, różniące się wielkością pęcherzyki są wyposażone w rybosomy. Podejrzewa się, iż mogą one mieć związek z szorstką siateczką śródplazmatyczną. Obok nich występują duże ilości pojedynczych, gładkich pęcherzyków, za powstawanie których wydaje się być odpowiedzialny kompleks NS3-NS4A. Uważa się, iż białka NS5A i NS5B nie przyczyniają się do formowania *„speckle-like structure"* [31,48].

FORMOWANIE PĘCHERZYKÓW SIECI BŁONOWEJ

Formowanie nowego pęcherzyka jest wynikiem modyfikacji lipidów błon komórkowych oraz polimeryzacji białka — klatryny, co prowadzi do powstania struktury przypominającej klatkę [52]. Istotny może być tu również udział białka — NS4B, gdyż dzięki właściwościom kotwiczącym w tratwach lipidowych oraz zdolności do oligomeryzacji, przyczynia się ono do łączenia się oraz stabilizacji tratw lipidowych. Połączone tratwy lipidowe ułatwiają rekrutację licznych kopii niestrukturalnych białek wirusa i organizację kolejnych kompleksów replikacyjnych. Proces ten ma na celu zamknięcie RNA wirusa wraz z pozostałymi elementami kompleksu replikacyjnego wewnątrz pęcherzyka (Ryc. 2) [8].

http://rcin.org.pl



Rycina 2. Model formowania pęcherzyków sieci błonowej, zawierających wiele kopii aktywnych kompleksów replikacyjnych HCV, opracowany na podstawie prac [8,38,40,44]. (A) Synteza niestrukturalnych białek HCV w siateczce śródplazmatycznej (ER), zawierającej komórkowe białko hVAP-33. (B) Organizacja kompleksów replikacyjnych wirusa w obrębie tratw lipidowych aparatu Golgiego (AG). (C) Łączenie się i stabilizacja, zawierających kompleksy replikacyjne HCV, tratw lipidowych aparatu Golgiego. (D) Formowanie, zawierających wiele kopii kompleksów replikacyjnych HCV, pęcherzyków sieci błonowej w wyniku oligomeryzacji NS4B i przyłączanie nici RNA HCV (+). (E) Dojrzały pęcherzyk sieci błonowej, zawierający wiele kopii aktywnych kompleksów replikacyjnych; brązowa linia reprezentuje RNA (+), a czerwona RNA (-).

Choć prawdopodobnie wnętrze każdego pęcherzyka pozostaje w kontakcie z cytoplazmą komórki, w celu dostarczania nukleotydów do syntezy RNA HCV niemożliwe jest wniknięcie molekuł, których masa przekracza 16 kDa [40,41]. Stanowi to ochronę przed działaniem nukleaz i proteaz. Zaobserwowano, iż wewnątrz pęcherzyka, zawierającego wiele aktywnych kompleksów replikacyjnych, obecna jest pojedyncza ujemna oraz kilka dodatnich nici RNA wirusa [40].

MODYFIKACJE PROTEOMU TRATW LIPIDOWYCH, TOWARZYSZĄCE ZAKAŻENIU WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

Obok cholesterolu i sfingolipidów ważnym elementem tratw lipidowych są białka. Do białek, będących stałymi komponentami tratw lipidowych należą, między innymi: kaweolina-2, flotylina, białka z kotwicą GPI, kinazy z rodziny Sarcoma, białka G, receptory endoteliny i czynników wzrostu (EGF, PDGF), kinazy MAP, gangliozyd G_{M1}, rozpoznawany przez toksynę cholery [53]. Tratwy lipidowe stanowią również platformy, z którymi czasowo asocjują pewne czynniki białkowe, np. immunoreceptory. To wiązanie jest modulowane przez zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe bodźce i świadczy o wysokiej dynamice struktury tratw lipidowych. Ponieważ konsekwencją modyfikacji ich składu białkowego może być nasilenie lub osłabienie aktywności wielu biologicznych procesów komórki [54], analiza tego zagadnienia w kontekście zakażenia drobnoustrojami może pozwolić na dokładniejsze poznanie patogenezy wielu zakażeń.

Tratwy lipidowe, stanowiąc istotny element kompleksu replikacyjnego HCV, pośredniczą również w HCV-zależnej modulacji wielu procesów komórki. Mannova i współautorzy zaobserwowali różnice w kumulacji wybranych czynników białkowych przez tratwy lipidowe w komórkach Huh-7, zawierających replikon HCV w porównaniu z komórkami, które go nie posiadały. Ujawnili oni, iż wśród 1036 białek wyizolowanych z komórek Huh-7, zawierających replikon HCV, 150 wykazywało nasiloną (110) lub osłabioną (40) asocjację z tratwami lipidowymi. Okazało się, iż białka te biorą udział między innymi w procesach transportu pęcherzykowego, reorganizacji cytoszkieletu oraz przekazywaniu sygnałów [22].

TRANSPORT BIAŁEK WIRUSA ORAZ PĘCHERZYKÓW SIECI BŁONOWEJ W ZAKAŻONEJ KOMÓRCE

Uważa się, iż w formowaniu oraz utrzymaniu pęcherzyków sieci błonowej bierze udział cytoszkielet komórki. Mikrotubule oraz filamenty aktynowe mogą pośredniczyć w migracji białek NS HCV między siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego, czemu towarzyszą właśnie modyfikacje struktury tych organelli — *„speckle-like structure"*. Ponieważ za miejsce powstawania nowych wirionów uważana jest siateczka śródplazmatyczna, podejrzewa się, iż pęcherzyki zawierające aktywne RC HCV są transportowane z aparatu Golgiego do ER. Dochodzi tam do rozpadu struktur tratw lipidowych i uwolnienia „potomnych" genomów HCV, które mogą stanowić matryce w procesie translacji lub zostać upakowane w nukleokapsydach wirusa [55].

Reorganizacją cytoszkieletu kierują, między innymi, białka należące do rodziny Rho — RhoA oraz Cdc42, które wykazują nasiloną asocjację z tratwami lipidowymi w komórkach Huh-7, zawierających replikon HCV [22]. Skutkiem ich przemieszczenia do tratw lipidowych jest zamiana nieaktywnej formy białka w aktywną. Prowadzi to do powstania różnych struktur cytoszkieletalnych [56], które mogą uczestniczyć w transporcie niestrukturalnych białek wirusowych oraz pęcherzyków sieci błonowej.

http://rcin.org.pl

W procesie migracji pęcherzyków sieci błonowej mogą również pośredniczyć białka, które biorą udział w transporcie pęcherzykowym oraz fuzji błon. Wykazują one nasiloną asocjację z tratwami lipidowymi komórek Huh-7, zawierającymi replikon HCV [22], która sprzyja ich aktywacji [57]. Wśród nich największy odsetek stanowią białka z rodziny Rab — Rab18, Rab9a, Rab7 oraz syntaksyna-7 [22].

Rola, związanego z kroplami lipidowymi, białka Rab18 polega na kontroli transportu między siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego [58]. Białko Rab9 reguluje transport ładunku z endosomów późnych do aparatu Golgiego i dalej do błony komórkowej. Wcześniejsze badania pokazały, iż białko Rab9 jest niezbędne, między innymi, w cyklu życiowym wirusa zespołu nabytego niedoboru odporności typu 1 (HIV-1), filowirusów oraz wirusa odry, gdzie przyczynia się on do uwolnienia nowych wirionów z komórki [59]. Rab7 reguluje transport substancji ulegających endocytozie z endosomów wczesnych do późnych i przedziałów degradacyjnych, a także kontroluje dojrzewanie fagosomów i koordynację ich fuzji z lizosomami [60]. Syntaksyna-7, podobnie jak białka Rab, kontroluje transport pęcherzykowy [61], a spadek jej zawartości o 60% w komórkach, zawierających replikon HCV, prowadzi do redukcji aktywności replikacyjnej wirusa [22].

Uzyskane przez Mannova i współautorów wyniki sugerują, iż nadmierna dystrybucja niektórych białek z rodziny Rab do tratw lipidowy komórek Huh-7, zawierających replikon HCV, sprzyja kumulacji kropli lipidowych, umożliwia formowanie aktywnych kompleksów replikacyjnych, bądź powstawanie nowych wirionów, ułatwiając tym samym uwalnianie z komórki kolejnych kopii wirusa [22].

HAMOWANIE APOPTOZY ORAZ REDUKCJA AKTYWNOŚCI REPLIKACYJNEJ HCV

Apoptoza, umożliwiając eliminację komórki wraz z wirusem, jest kluczowym procesem wykorzystywanym przez organizm jako antywirusowy mechanizm obronny. Aby zapewnić sobie przetrwanie, wirusy hamują apoptozę poprzez kodowanie białek, które unieczynniają kaspazy komórkowe lub hamują przekazywanie „sygnału śmierci". Prowadzi to do powstania przewlekłych zakażeń wirusowych, które stanowią podłoże dla rozwoju wielu nowotworów, w tym raka pierwotnego wątroby [62].

Ostatnie badania wykazały, iż zawierające replikon HCV komórki Huh-7 charakteryzują się zwiększoną aktywnością jednego z głównych szlaków prożyciowych — szlaku fosfatydyloinozytolu (PI3K/AKT) [63]. Jest to najprawdopodobniej spowodowane nasiloną asocjacją z tratwami lipidowymi białek Cdc42 oraz N-Ras [22,63], aktywatorów kinazy PI3 [64].

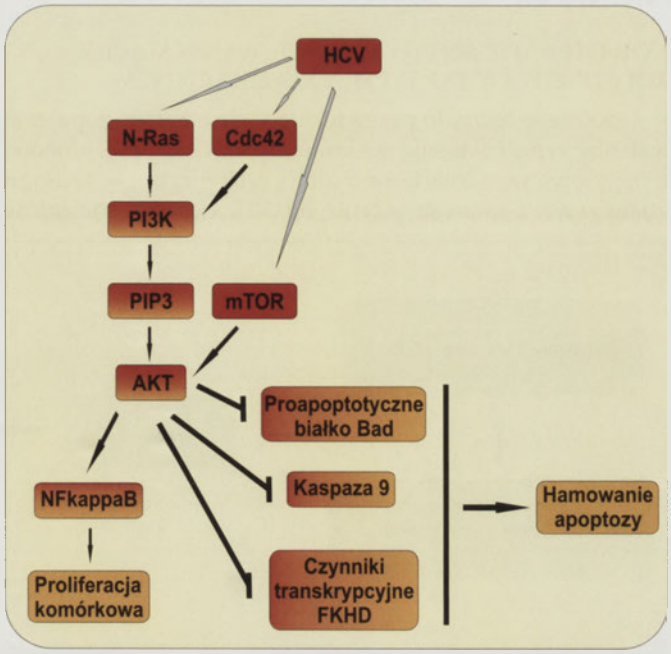
Aktywacja kinazy AKT zachodzi po jej połączeniu się z błoną, na drodze fosforylacji treoniny oraz seryny. Fosforylacja przy reszcie treoniny następuje poprzez działanie kinazy PI3 i wymaga pośrednictwa fosfolipidów inozytolu (PIP3). Natomiast za fosforylację przy reszcie seryny jest odpowiedzialny aktywny kompleks kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) i białka rictor [65]. Stwierdzono, iż komórki Huh-7, zawierające replikon HCV, wykazują wzmożoną aktywność kinazy mTOR [63].

Kinaza AKT jest inhibitorem proapoptotycznego białka Bad, kaspazy 9 oraz negatywnym regulatorem czynników transkrypcyjnych FKHD (ang. *forkhead transcription factor*), indukujących ekspresję genów wielu proapoptotycznych białek, jak CD95L. Kinaza AKT, indukując aktywność czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB, przyczynia się również do zwiększenia proliferacji komórkowej (Ryc. 3) [66].

Ostatnie doniesienia wskazują na udział wirusowego białka NS5A w aktywacji szlaku PI3K/AKT. Choć dokładny mechanizm pozostaje niejasny i wymaga dalszych analiz, to Street i współautorzy sądzą, iż NS5A oddziałuje z domeną SH3 podjednostki regulatorowej (p85) kinazy PI3. Przypuszczają oni, iż miejsce oddziaływania w białku NS5A obejmuje reszty aminokwasowe 270–300 i charakteryzuje je brak sekwencji bogatych w prolinę. Aktywacja podjednostki p85 odbywa się na drodze fosforylacji. Dotychczas nie wykryto aktywności enzymatycznej białka NS5A, co sugeruje, iż pośrednio przez aktywację kinaz tyrozynowych może ono przyczyniać się do fosforylacji p85, a w konsekwencji do aktywacji drogi PI3K/AKT [67,68].

Aktywacji szlaku PI3K/AKT w komórkach, oprócz zmniejszonej podatności komórki na apoptozę, towarzyszy również stały, niski poziom replikacji wirusa [63]. Jako przyczynę spadku aktywności replikacyjnej HCV wskazuje się odwrotną zależność między hiperfosforylacją białka NS5A a poziomem replikacji HCV. Kinazy AKT, mTOR oraz p70S6 wykazywały bowiem w warunkach *in vitro* zdolność do fosforylacji NS5A. Nie zostało to jednak potwierdzone *in vivo* [69].

Zaburzone działanie drogi sygnałowej PI3K/AKT hamuje apoptozę, a tym samym pozwala wirusowi uniknąć odpowiedzi immunologicznej, co skutkuje przetrwaniem



Rycina 3. Aktywacja szlaku fosfatydyloinozytolu (PI3K/AKT) w zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu C; omówienie schematu w tekście.

http://rcin.org.pl

zakażenia i zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju marskości oraz raka pierwotnego wątroby [63].

ZAHAMOWANIE MIGRACJI LIMFOCYTÓW Tc W ZAKAŻENIU HCV

Zauważono, iż wirus zapalenia wątroby typu C wykazuje działanie supresyjne wobec składników odporności naturalnej. Potwierdza to związek przewlekłego zapalenia wątroby typu C z upośledzeniem odpowiedzi komórkowej organizmu i ucieczką wirusa spod kontroli jego układu immunologicznego [70]. Do szeregu mechanizmów wirusowych skierowanych przeciwko odporności naturalnej organizmu zalicza się, między innymi, hamowanie migracji limfocytów T do miejsca zapalenia, w czym, przez skupianie izoenzymu βI kinazy białkowej C, uczestniczą tratwy lipidowe [71].

Volkov i współautorzy zaobserwowali, iż wiązanie wirusowej glikoproteiny powierzchniowej E2, biorącej udział w rozpoznawaniu i wnikaniu HCV do wnętrza komórki, z białkiem błonowym CD81 upośledza funkcje (migracje) limfocytów Tc we wczesnej fazie wirusowego zapalenia wątroby typu C [71]. Białko błonowe CD81 należy do rodziny tetraspanin zaangażowanych w takie procesy komórkowe, jak: adhezja, migracja, przekazywanie sygnału, namnażanie i różnicowanie. Ponieważ stanowi ono ligand dla integryny LFA-1 (ang. *leukocyte function-associated molekule-1*) obecnej na powierzchni limfocytów [19], wiązanie glikoproteiny E2 z białkiem błonowym CD81 w przebiegu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C, może w istotny sposób modulować funkcję leukocytów. Konsekwencją tego oddziaływania jest zahamowanie aktywacji receptora LFA-1 na powierzchni limfocytu T, w wyniku czego dochodzi do wzmożonej asocjacji izoenzymu βI kinazy białkowej C z tratwami lipidowymi. Oddysocjowanie izoenzymu βI kinazy białkowej C od mikrotubul cytoszkieletu uniemożliwia jego reorganizację, co hamuje funkcje obronne limfocytów (Ryc. 4) [71].

NOWE TERAPIE ANTYWIRUSOWE, WYNIKAJĄCE Z ROLI TRATW LIPIDOWYCH W REPLIKACJI HCV

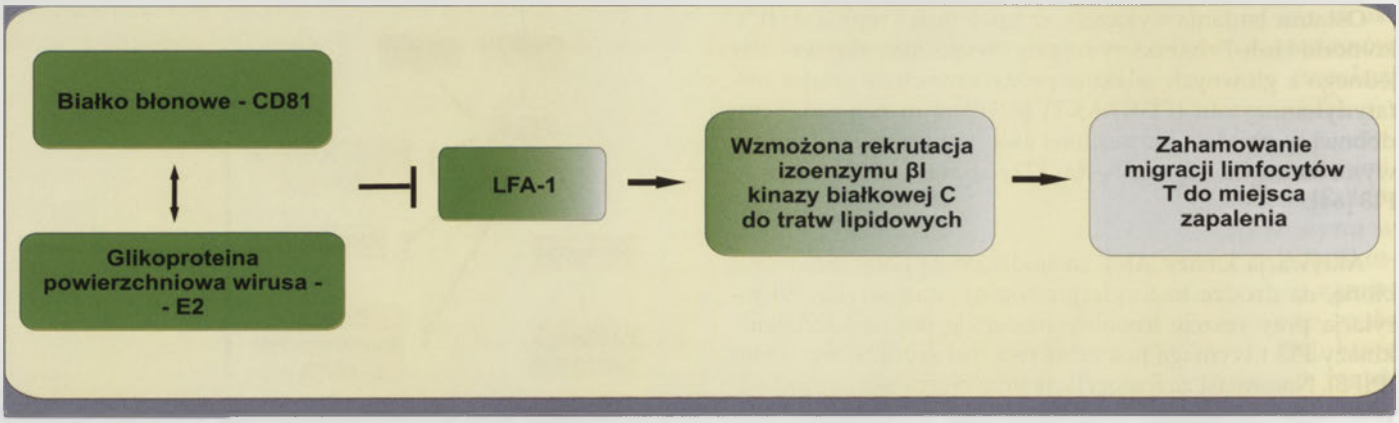
Obecnie w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C stosuje się kombinowaną terapię, złożoną z pegylowanego interferonu alfa i rybawiryny — analogu guanozyny. Ponieważ jedynie od 30% do 50% pacjentów odpowiada pozytywnie na leczenie, wciąż intensywnie poszukuje się nowych rozwiązań terapeutycznych [72-74].

Wśród nowych kierunków terapii przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C znalazły się preparaty skierowane przeciwko dobrze poznanym, niestrukturalnym białkom wirusa, które jednocześnie są kluczowymi enzymami jego cyklu replikacyjnego. Do tej grupy należą: NM283 (Valopicitabine), R1626, HCV-796 — blokujące aktywność zależnej od RNA polimerazy RNA oraz VX-950, SCH503034 — inhibitory proteazy serynowej NS3/NS4A. Istnieją również preparaty, których działanie polega na celowanym ataku na słabiej poznane struktury białkowe wirusa, jak: NS5A, NS4A, p7 oraz NS3. Prowadzone są również badania, gdzie poprzez wykorzystanie rybozymów i antysensownych oligonukleotydów (AVI-4065), zostaje zahamowana translacja wirusowego RNA. Istotnymi możliwościami terapeutycznymi są również: zahamowanie wnikania wirusa (przeciwciała poliklonalne — Civacir oraz monoklonalne — HCV-AB68, HCV-AB65), blokowanie powstania jego osłonki oraz zastosowanie szczepionki terapeutycznej [75,76].

Podstawą rozwoju nowych terapii w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C okazało się być również formowanie kompleksu replikacyjnego HCV, związanego z tratwami lipidowymi. Wykazano, iż uszkodzenie struktur błonowych lub/i pozostałych komponentów (niestrukturalne białka wirusa, białka gospodarza, RNA HCV) kompleksu replikacyjnego wirusa hamuje proces syntezy RNA HCV. Ponieważ replikacja ma miejsce w kompleksach replikacyjnych składających się z wielu kopii niestrukturalnych białek wirusowych, które są związane z tratwami lipidowymi, nowe działania terapeutyczne mogą dotyczyć hamowania oddziaływania białko — białko oraz białko — tratwy lipidowe [48].

ROLA PRODUKTÓW SZLAKU MEWALONOWEGO

Jeden z potencjalnych kierunków w terapii antywirusowej wykorzystuje rolę produktów szlaku mewalonowego w cyklu życiowym HCV. Regulacja metabolizmu szlaku mewalonowego odbywa się głównie na poziomie reduktazy HMG-CoA, toteż stosowanie statyn, czyli inhibitorów reduktazy HMG-CoA, zmniejsza stężenie pochodnych kwasu mewalonowego. W hodowlach komórek, zawierających replikon HCV, zastosowanie statyn prowadziło do zahamowania pro-



Rycina 4. Schemat zahamowania migracji limfocytów Tc we wczesnej fazie wirusowego zapalenia wątroby typu C; omówienie schematu w tekście.

http://rcin.org.pl

cesu replikacji wirusa. Poziom RNA HCV w tych komórkach został zredukowany do 25% w porównaniu z komórkami kontrolnymi, wobec których nie stosowano leku [48,77].

Stosowanie statyn obniża stężenie cholesterolu w komórce, co prowadzi do zmian w morfologii struktur błonowych (tratwy lipidowe), biorących udział w cyklu życiowym wirusa [48]. Działając na komórki metylo-β-cyklodekstryną, związkiem umożliwiającym ekstrahowanie cholesterolu z błon komórkowych, nie zmieniając przy tym ich struktury ani przepuszczalności, obniżano wewnątrzkomórkowy poziom cholesterolu. Wykazano w ten sposób, iż zmniejszenie stężenia cholesterolu w komórce o około 70% sprawia, iż tratwy lipidowe kurczą się, czego konsekwencją jest utrata związanych z nimi białek [54], w tym prawdopodobnie również białek wirusa uczestniczących w organizacji aktywnego kompleksu replikacyjnego HCV.

Wpływ statyn na spadek aktywności replikacyjnej wirusa ma związek nie tylko z obniżeniem poziomu wewnątrzkomórkowego cholesterolu, ale i innych produktów szlaku mewalonowego. Należą do nich izoprenoidy — pirofosforan farnezylu i pirofosforan geranylgeranylu [78]. Zaobserwowano, iż replikacja wirusa wymaga obecności jednego lub więcej białek komórkowych, które ulegają procesowi geranylgeranylizacji, gdyż zastosowanie egzogennego geranylgeraniolu pozwoliło na zabezpieczenie syntezy RNA HCV przed hamującym działaniem statyn, co nie zostało potwierdzone wobec farnezolu [79]. Dalsze badania wykazały, iż geranylgeranylizacji ulega białko komórkowe FBL2, tworzące kompleks z białkiem NS5A HCV [80]. Za przeniesienie reszt geranylgeranylu na białka błon komórkowych odpowiada transferaza geranylgeranylu I. Podanie inhibitora tego enzymu (GGTI-286) może mieć znaczenie w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C [78,79]. Zahamowanie syntezy izoprenoidów zmniejsza również stopień izoprenylacji białek N-Ras, Rho oraz Rab [81], które biorą udział w cyklu życiowym wirusa zapalenia wątroby typu C [22].

ZAHAMOWANIE SYNTEZY SFINGOLIPIDÓW JAKO NOWY NURT W LECZENIU ZAKAŻENIA HCV

Ostatnie dane wskazują, iż ingerencja w syntezę sfingolipidów może okazać się obiecującym źródłem nowych strategii terapeutycznych w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C. Sfingolipidy, odpowiadając za zmniejszenie płynności błony komórkowej, stanowią ważny komponent tratw lipidowych [32]. Niestrukturalne białko wirusowe — NS5B posiada domenę wiążącą bezpośrednio sfingomielinę, przez co sfingolipidy przyczyniają się do organizacji aktywnego kompleksu replikacyjnego wirusa. Zidentyfikowany niedawno wtórny metabolit — NA255, pochodzący z grzybka z rodzaju *Fusarium* sp. (F1476), hamuje syntezę *de novo* sfingolipidów, prowadząc do zahamowania replikacji HCV. NA255 wykazuje strukturalne podobieństwo do myriocyny, która stanowi selektywny inhibitor palmitoilotransferazy serynowej (SPT), katalizującej pierwszy etap biosyntezy sfingolipidów [82,83].

PODSUMOWANIE

Wirus zapalenia wątroby typu C jest obiektem intensywnych badań, gdyż wciąż stanowi poważny problem epidemiologiczny z powodu małej skuteczności stosowanych terapii antywirusowych oraz wciąż rosnącej liczby zachorowań. W ostatnich latach wykazano, iż właściwym miejscem syntezy RNA wirusa jest sieć błonowa. Składa się ona z licznych pęcherzyków, zawierających struktury tratw lipidowych, które biorą udział w organizacji aktywnych kompleksów replikacyjnych wirusa. Zapewnia to koncentrację produktów wirusowych i komórkowych, niezbędnych do formowania aktywnych kompleksów replikacyjnych HCV, chroniąc je przy tym przed degradacją. Udział tratw lipidowych w cyklu życiowym HCV pośrednio znalazł potwierdzenie również w innych badaniach, które pokazały, iż podanie inhibitorów reduktazy HMG-CoA (statyny), prenylacji białek czy syntezy sfingolipidów w znaczący sposób hamuje replikację wirusa. Replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C towarzyszą również modyfikacje składu białkowego tratw lipidowych. Zmiany dotyczą białek będących mediatorami wielu kluczowych procesów komórki. Najlepiej poznane są modyfikacje, prowadzące do zaburzeń apoptozy oraz wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, kontrolujących odpowiedź immunologiczną organizmu. Uniemożliwia to podjęcie przez komórki układu odpornościowego funkcji obronnych, w tym migracji limfocytów T do miejsca zapalenia. Ponieważ aktualne metody leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C pozostają ograniczone, zależność replikacji HCV od tratw lipidowych stanowi szansę na rozwój nowych działań antywirusowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244: 359-362
2. Brass V, Moradpour D, Blum HE (2006) Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. Int J Med Sci 3: 29-34
3. Sy T, Jamal MM (2006) Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int J Med Sci 3: 41-46
4. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM (2004) Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology 39: 5-19
5. Dutkiewicz M, Świątkowska A, Ciesiołka J (2006) Struktura i funkcja regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C. Postępy Biochem 52: 62-71
6. Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of hepatitis C virus. J Gen Virol 81: 1631-1648
7. Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature 436: 933-938
8. Aizaki H, Lee KJ, Sung VMH, Ishiko H, Lai MMC (2004) Characterization of hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. Virology 324: 450-464
9. Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MMC (2003) Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. J Virol 77: 4160-4168
10. Pfeifer U, Thomssen, R, Legler K, Böttcher U, Gerlich W, Weinmann U, Klinge O (1980) Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 33: 233-243
11. Xie ZC, Riezu JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. Virology 244: 513-520
12. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. Science 277: 570-574

http://rcin.org.pl

13. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. J Exp Med 197: 633-642

14. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herman U, Theilman U, Bartenschalger R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285: 110-113

15. Cai Z, Zhang C, Kyung-Soo C, Jiang J, Ahn BC, Wakita T, Liang TJ, Luo G (2005) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. J Virol 79: 13963-13973

16. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 309: 623-626

17. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV (2005) Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 102: 9294-9299

18. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3805-3809

19. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. J Virol 78: 1448-1455

20. Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R (1999) Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. J Med Virol 57: 223-229

21. Scarsellii E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. EMBO J 21: 5017-5025

22. Mannova P, Fang R, Wang H, Deng B, McIntosh MW, Hanash SM, Beretta L (2006) Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. Mol Cell Proteomics 5: 2319-2325

23. Behrens SV, Tomei L, Francesco1 RD (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. EMBO J 15: 12-22

24. Sidorkiewicz M (2002) Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C. Postepy Biochem 48: 143-149

25. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R (2001) Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. J Virol 75: 1252-1264

26. Bienz K, Egger D, Pfister T, Troxler M (1992) Structural and Functional Characterization of the Poliovirus Replication Complex. J Virol 66: 2740-2747

27. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA (1997) Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. J Virol 71: 6650-6661

28. Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ (1999) Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. J Virol 73: 2016-2026

29. Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsid. Mol Cell 9: 505-514

30. Moradpour D, Gosert R, Egger D, Penin F, Blum HE, Bienz K (2003) Membrane associateion of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alternation that harbors the viral replication complex. Antiviral Research 60: 103-109

31. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus protein induces distinct membrane alternations including a candidate viral replication complex. J Virol 76: 5974-5984

32. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569-572

33. Leser GP, Lamb RA (2005) Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. Virology 342: 215-227

34. Campbell SM, Crowe SM, Mak J (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. J Clin Virol 22: 217-227

35. Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, Hevey M, Schamjohn C, Schamjohn A, Aman AJ (2002) Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. J Exp Med 195: 593-602

36. Lai VC, Dempsey S, Lau JY, Hong Z, Zhong W (2003) *In vitro* RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. J Virol 77: 2295-2300

37. Choi J, Lee KJ, Zheng Y, Yamaga AK, Lai MMC, Ou JH (2004) Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells. Hepatology 39: 81-89

38. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MMC (2004) Interaction between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid rafts. J Virol 78: 3480-3488

39. El-Hage N, Guangxiang L (2003) Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. J Gen Virol 84: 2761-2769

40. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V (2005) Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. J Virol 79: 13594-13605

41. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotoho K (2003) Hepatitis C virus nonstructural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. J Biol Chem 278: 50301-50308

42. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. Virology 284: 70-81

43. Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C (2003) Protein - protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. J Virol 77: 5401-5414

44. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MMC, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y (2005) Human VAP-B involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. J Virol 79: 13473-13482

45. Evans MJ, Rice CM, Goff SP (2004) Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. Proc Natl Acad Sci USA 101: 13038-13043

46. Chang KS, Luo G (2006) The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA. Virus Res 115: 1-8

47. Aizaki H, Choi KS, Liu M, Li YJ, Lai MM (2006) Polypyrimidine tract-binding protein is a component of HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. J Biomed Sci 13: 469-480

48. Sagan SM, Rouleau Y, Leggiadro C, Supekova L, Schultz PG, Su AI, Pezacki JP (2006) The influence of cholesterol and lipid metabolism on host cell structure and hepatitis C virus replication. Biochem Cell Biol 84: 67-79

49. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Binz K, Moradpour D (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. J Virol 77: 5487-5492

50. Rouille Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, Maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J (2006) Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. J Virol 80: 2832-2841

51. Teterina NL, Egger D, Bienz K, Brown DM, Semler BL, Ehrenfeld E (2001) Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. J Virol 75: 3841-3850

52. Ford MGJ, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJK, Evans PR, McMahon HT (2002) Curvature of clathrin — coated pits driven by epsin. Nature 419: 361-366

http://rcin.org.pl

53. Dąbrowska G, Głowacka B (2005) Błona plazmatyczna – porządek czy chaos? Postepy Biochem 51: 414-420

54. Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. J Cell Biol 165: 735-746

55. Bost AG, Venable D, Liu L, Heinz BA (2003) Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. J Virol 77: 4401-4408

56. Hunter I, Nixon GF (2006) Spatial compartmentalization of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells. J Biol Chem 281: 34705-34715

57. Raffaella G, Patrussi L, Pirozzi K, Pellegrini M, Lazzerini PE, Capecchi PL, Pasini FL, Baldari CL (2005) Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. FASEB J 19: 605-607

58. Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R (2004) Association of stomatin lipid bodies. J Biol Chem 279: 23699-23709

59. Murray JL, Mavrakis M, McDonald NJ, Yilla M, Sheng J, Bellini WJ, Zhao L, Le Doux JM, Shaw MW, Luo CC, Lippincott-Schwartz J, Sanchez A, Rubin DH, Hodge TW (2005) Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses and measles virus. J Virol 79: 11742-11751

60. Clague MJ (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway. J Biochem 336: 271-282

61. Bennett MK, García-Arrarás JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD, Scheller RH (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. Cell 74: 863-873

62. Shen Y, Shenk TE (1995) Viruses and apoptosis. Curr Opin Genet Develop 5: 105-I 11

63. Mannova P, Beretta L (2005) Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: control of cell survival and viral replication. J Virol 79: 8742-8749

64. Schwartz M (2004) Rho signaling at glance. J Cell Sci 117: 5457-5458

65. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 307: 1098-1101

66. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 13: 2905-2917

67. Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M (2004) The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. J Biol Chem 279: 12232-12241

68. He Y, Nakao H, Tan S, Polyak SJ, Nedderman P, Vijaysri S, Jacobs B, Katze MG (2002) Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructrural 5A protein via interaction with Grb2 and p85 phospatidylinositol 3-kinase. J Virol 76: 9207-9217

69. Coito C, Diamond DL, Neddermann P, Korth MJ, Katze MG (2004) High-throughput screening of the yeast kinome: identification of human serine/threonine protein kinases that phosphorylate the hepatitis C virus NS5A protein. J Virol 78: 3502-3513

70. Mozer-Liszewska I (2005) Odporność naturalna (wrodzona) w wirusowych zapaleniach wątroby u dzieci. Alergia Astma Immunologia 10: 21-25

71. Volkov Y, Long A, Freeley M, Golden-Mason L, O'Farrelly C, Murphy A, Kelleher D (2006) The hepatitis C envelope 2 protein inhibits LFA-1-transduced protein kinase C signaling for T-lymphocyte migration. Gastroenterology 130: 482-492

72. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK (1998) Interferon alfa – 2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. N Engl J Med 339: 1485-1492

73. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J (1998) Interferon alfa – 2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. N Engl J Med 339: 1493-1498

74. Kowala-Piaskowska A (2006) Wirus zapalenia wątroby typu C — budowa i replikacja a możliwości terapeutyczne i zjawisko oporności. Postepy Biochem 52: 399-407

75. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG (2007) The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. Gastroenterology 132: 1979-1998

76. Neyts J (2006) Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. Antiviral Res 71: 363-371

77. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N (2006) Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. Hepatology 44: 117-125

78. Ye J, Wang C, Sumpter R, Brown MS, Goldstein JL, Gale M (2003) Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. Proc Natl Acad Sci USA 100: 15865-15870

79. Kapadia SB, Chisari FV (2004) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA 102: 2561-2566

80. Wang C, Gale M, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J (2005) Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis c virus RNA replication. Mol Cell 18: 425-434

81. Jamroz-Wiśniewska A, Bełtowski J (2004) Izoprenylacja białek. Postepy Biochem 50: 316-329

82. Sakamoto H, Okamoto K, Masahiro A, Hideyuki K, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M (2005) Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. Nature 1: 333-337

83. Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M (2006) Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. Biochem Biophys Res Commun 346: 67-73

Role of lipid rafts in hepatitis C virus life cycle

Martyna Grek✉, Jacek Bartkowiak, Małgorzata Sidorkiewicz

Department of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

✉e-mail: martyna.grek@wp.pl

Key words: hepatitis C virus, lipid rafts, replication complex, antiviral therapy, lipid rafts proteins

ABSTRACT

Although the mechanism of HCV RNA replication is still poorly characterized, we know that HCV active replication complex contains membrane structures. Biochemical analysis showed that these membrane structures were resistant to nonionic detergents at low temperature and contained caveolin-2, characteristic of lipid rafts. Further analysis suggested that lipid rafts protect HCV replication complex against degradation. Lipid rafts provide also a mechanism of how HCV may modulate cellular processes, what can lead to disruption of antiviral immune response and then to chronic infection. Association hepatitis C virus with lipid rafts can be also a source of new antiviral therapies..

http://rcin.org.pl

Udział receptorów kolagenu płytek krwi w hemostazie pierwotnej

Urszula Kralisz

Marta Stasiak

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. (042) 678 33 93 wew. 213, e-mail: ulakral@gmail.com

Artykuł otrzymano 27 czerwca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 17 sierpnia 2007 r.

Słowa kluczowe: płytki krwi, kolagen, czynnik von Willebranda, adhezja, aktywacja

Wykaz skrótów: ADAMTS (ang. *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin like motifs*) – dezintegryna i metaloproteaza zawierająca motyw podobny do motywu trombospondyny); DG – diacyloglicerol; GEMs (ang. *glycolipid-enriched membrane domains*) – domeny błony plazmatycznej wzbogacone w glikolipidy; GP – glikoproteina; ICAM (ang. *intercellular adhesion molecule*) – międzykomórkowe białko adhezyjne; IP_3 – 1,4,5-trisfosforan inozytolu; ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) – motyw aktywujący receptorów immunologicznych zawierający reszty tyrozynowe; MIDAS (ang. *metal ion dependent adhesion site*) – miejsce przylegania zależne od jonów metalu; PI-3K (ang. *phosphoinositide-3 kinase*) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PLCγ2 – fosfolipaza γ2; PSGL (ang. *P-selectin glycoprotein ligand*) – ligand P-selektyny; TNFα (ang. *tumor necrosis factor* α)- czynnik martwicy nowotworu α; TxA_2 – tromboksan A_2; vWF (ang. *von Willebrand Factor*) – czynnik von Willebranda

STRESZCZENIE

Płytki krwi natychmiast przylegają do ściany naczynia krwionośnego w miejscu jego uszkodzenia i inicjują powstawanie czopu płytkowego. Płytki łączą się z wieloma składnikami uszkodzonego naczynia, ale ich połączenie z kolagenem i czynnikiem von Willebranda (vWF, ang. *von Willebrand factor*) ma największe znaczenie w hemostazie. Wiązanie się płytek ze ścianą naczynia podczas przepływu krwi następuje dzięki oddziaływaniu kompleksu glikoprotein GPIb/IX/V błony płytek z unieruchomionym na kolagenie czynnikiem vWF. Wiązanie to jest szczególnie istotne w inicjowaniu adhezji płytek w tętnicach podczas przepływu krwi z dużym gradientem prędkości. Przez wiele lat uważano, że oddziaływanie GPIb/IX/V z vWF nie powoduje aktywacji płytek krwi. Badania ostatnich lat pokazały, że adhezja płytek do vWF uruchamia szlaki przekazywania sygnału w płytkach i powoduje aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, która jest niezbędna do powstania stabilnych agregatów płytkowych. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najnowszych mechanizmów prowadzących do wytworzenia czopu płytkowego, ze szczególnym uwzględnieniem opisu oddziaływania pomiędzy kompleksem GPIb/IX/V i czynnikiem vWF.

WPROWADZENIE

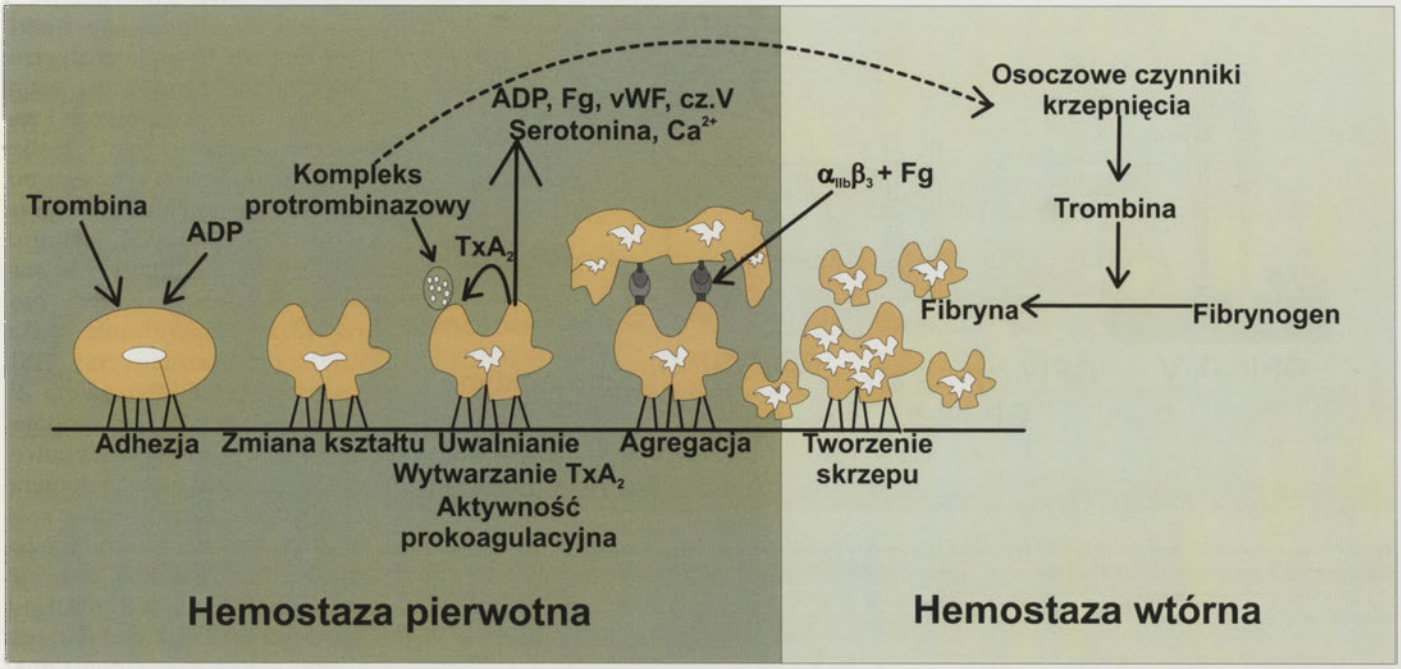
Płytki krwi są wyspecjalizowanymi elementami morfotycznymi krwi, biorącymi udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, takich jak: hemostaza pierwotna i wtórna, gojenie ran, obrona przed zakażeniami bakteryjnymi, metastaza komórek nowotworowych oraz powstawanie i rozwój stanów zapalnych i miażdżycy [1-6]. Adhezja płytek krwi do uszkodzonej ściany naczynia krwionośnego inicjuje tworzenie czopu hemostatycznego, który tamuje wypływ krwi poza naczynie. Tworzenie czopu hemostatycznego jest procesem bardzo szybkim - trwa kilkadziesiąt sekund. Adhezji płytek towarzyszy ich aktywacja, polegająca na zmianie kształtu z dysku na kulisty, rozpościeraniu się płytek i tworzeniu wypustek, tzw. filopodiów, zwiększających powierzchnię przyczepną płytek. Płytki uwalniają składniki ziarnistości do krwi, w tym m.in.: ADP, jony wapnia, serotoninę, fibrynogen, vWF, płytkowy czynnik wzrostu i czynnik V. Płytki wytwarzają i uwalniają również wysoce reaktywne metabolity kwasu arachidonowego szlaku cyklooksygenazy, w tym tromboksan A_2 (TxA_2). Na powierzchni błony płytek następuje ekspozycja fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy, niezbędnych do wiązania kompleksu tenazowego i protrombinazowego. Aktywne płytki wiążą białka adhezyjne, fibrynogen lub vWF, które, tworząc połączenia pomiędzy dwoma płytkami, umożliwiają powstawanie agregatów płytkowych, nazywanych czopem płytkowym, w miejscu uszkodzonego naczynia. Proces powstawania czopu płytkowego to hemostaza pierwotna [1-4].

Równoczesna aktywacja czynników krzepnięcia krwi, z udziałem kompleksu protrombinazowego i tenazowego na powierzchni płytek, doprowadza do powstania trombiny. Trombina przekształca rozpuszczalny fibrynogen w nierozpuszczalną sieć przestrzenną fibryny wzmacniającą czop płytkowy [4-5]. Ten etap to hemostaza wtórna (Ryc. 1).

Aktywację płytek krwi wywołaną adhezją potęguje wiele czynników obecnych we krwi, w tym trombina i ADP oraz czynniki uwalniane z płytek – ADP, TxA_2, serotonina i adrenalina [2,6].

Proces tworzenia czopu hemostatycznego jest zjawiskiem bardzo złożonym, ponieważ równolegle lub w sposób kaskadowy bierze w nim udział wiele czynników płytek krwi, osocza i ściany naczynia. Zmiany stężenia i aktywności któregoś z tych czynników lub delikatnego balansu oddziaływań pomiędzy nimi mogą prowadzić do krwawień lub zakrzepów.

http://rcin.org.pl



Rycina 1. Hemostaza fizjologiczna. Uszkodzenie naczynia krwionośnego powoduje adhezję płytek krwi do ściany naczynia. Adhezja wywołuje aktywację płytek, na którą składają się: zmiana kształtu płytek, tworzenie wypustek i uwalnianie wielu substancji z ziarnistości płytkowych, w tym: ADP, fibrynogenu, vWF, serotoniny i jonów wapnia, które potęgują aktywację płytek. Płytki wytwarzają TxA_2, który również wzmacnia ich aktywację. Na powierzchni płytek następuje ekspozycja fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy, które są potrzebne do związania kompleksu protrombinazowego na błonie płytek. Aktywna integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ wiąże fibrynogen, który tworzy połączenia pomiędzy dwoma płytkami i umożliwia powstawanie agregatów płytkowych, nazywanych czopem płytkowym. Powstawanie czopu płytkowego to hemostaza pierwotna. Równoczesna aktywacja czynników krzepnięcia osocza, z udziałem kompleksu protrombinazowego, prowadzi do powstania trombiny, która przekształca fibrynogen w nierozpuszczalną sieć fibryny, wzmacniającą czop płytkowy (hemostaza wtórna).

RECEPTORY KOLAGENU PŁYTEK KRWI

Warstwa podśródbłonka odsłonięta w wyniku uszkodzenia naczynia zawiera wiele białek adhezyjnych, do których mogą przylegać płytki krwi. Białkami tymi są: kolagen, fibronektyna, fibrynogen, laminina, witronektyna, trombospondyna. Czynnik vWF, przylegający do kolagenu jest również niezbędny dla inicjowania adhezji [7-8].

Najważniejsze z białek adhezyjnych to czynnik vWF i kolagen, a udział innych białek w adhezji płytek do ściany naczynia jest dużo mniejszy [8-10].

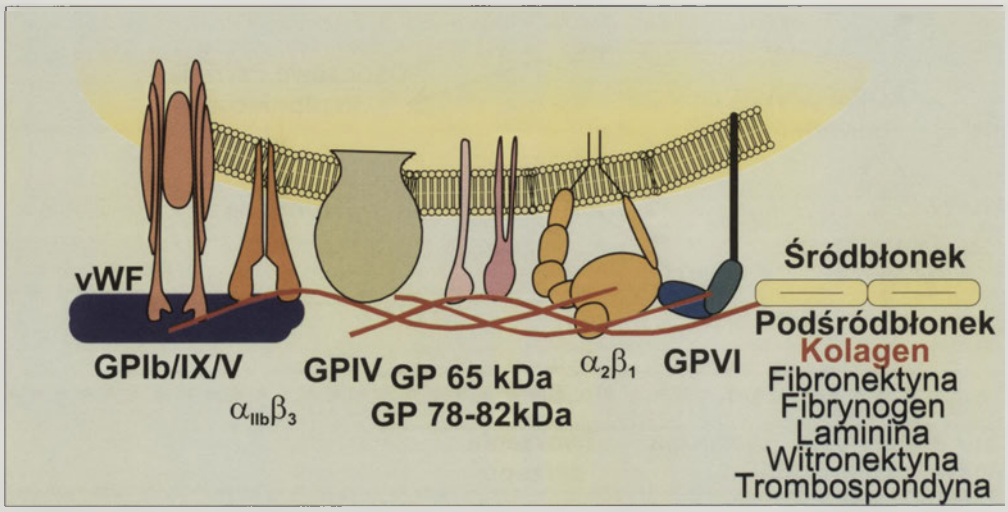
Płytki krwi zawierają w błonie plazmatycznej szereg receptorów bezpośrednio wiążących się z kolagenem, do których należą: integryna $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), GPIV, GPVI, GPV, białko o masie cząsteczkowej 65 kDa i dublet 78/82 kDa. Kompleks glikoprotein GPIb/IX/V oraz integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) należą do pośrednich receptorów kolagenu, ponieważ łączą się z kolagenem za pośrednictwem vWF (Ryc. 2). Największy udział w adhezji płytek do naczynia krwionośnego oraz w aktywacji płytek mają następujące receptory: integryna $\alpha_2\beta_1$, GPVI i GPIb/IX/V [2,6,9-14].

Płytki krwi nie przylegają do nieaktywnych komórek śródbłonka. Aktywacja komórek śródbłonka w stanach zapalnych przez m.in. cytokiny, w tym m.in. TNFα (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu) czy trombinę, powoduje adhezję płytek do śródbłonka. W adhezji tej uczestniczą kompleks GPIb/IX/V płytek łączący się z ligandem P-selektyny (ang. *P-selectin glycoprotein ligand*, PSGL) śródbłonka oraz integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ płytek, łącząca się z integryną $\alpha_v\beta_3$ i międzykomórkowym białkiem adhezyjnym (ang. *intercellular adhesion molecule*, ICAM) śródbłonka z pośrednictwem fibrynogenu, fibronektyny i vWF [8,15-16]. Adhezja leukocytów razem z płytkami do unieruchomionych płytek krwi w skrzepie może przyczyniać się do powstawania ognisk zapalnych i zmieniać przebieg prawidłowej hemostazy. Leukocyty przylegają do płytek krwi i są wychwytywane przez płytki z krążącej krwi tylko po uprzedniej aktywacji płytek, która powoduje ekspozycję P-selektyny na powierzchni płytek [17].

KOMPLEKS GLIKOPROTEIN Ib/IX/V

Kompleks GPIb/IX/V jest zbudowany z czterech transbłonowych podjednostek GPIbα, GPIbβ, GPIX i GPV, występujących w błonie płytki krwi w stosunku 2:2:2:1. Podjednostki te należą do rodziny białek bogatych w reszty leucynowe i zawierają od jednego do kilku tandemowych powtórzeń złożonych z około 24 reszt aminokwasowych bogatych w reszty leucynowe. Powtórzenia te są otoczone od N- i C- końca zachowanymi w ewolucji sekwencjami połączonymi mostkami disiarczkowymi. GPIbα jest połączona mostkiem disiarczkowym z GPIbβ od strony zewnątrzkomórkowej, blisko powierzchni błony płytki krwi. GPIbβ jest niekowalencyjnie połączona z GPIX w stosunku 1:1. GPV jest również niekowalencyjnie związana z kompleksem. W błonie płytki jest około 25000 kopii kompleksu GPIb-IX, a kopii GPV – około 12000, co sugeruje, że GPV tworzy kompleks z GPIb-IX w stosunku 1:2. GPV asocjuje z kompleksem GPIb-IX przez łańcuch GPIbα [8,12-13].

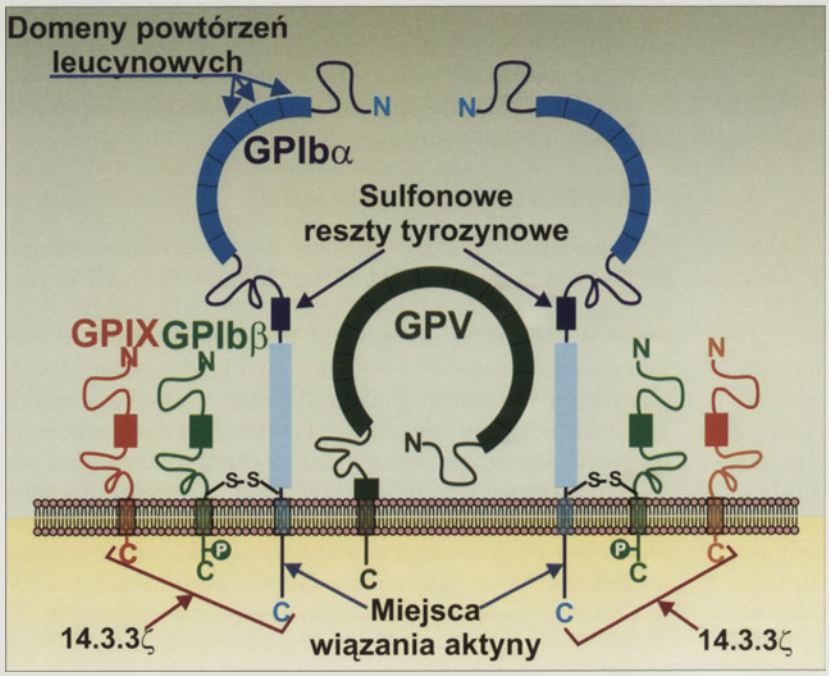
http://rcin.org.pl



Rycina 2. Receptory kolagenu płytek krwi. Płytki krwi zawierają w błonie plazmatycznej szereg receptorów bezpośrednio wiążących się z kolagenem, do których należą: integryna $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), GPIV, GPVI, białko o masie cząsteczkowej 65 kDa i dublet 78/82 kDa. Kompleks glikoprotein GPIb/IX/V oraz integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) należą do niebezpośrednich receptorów kolagenu, ponieważ łączą się z kolagenem za pośrednictwem czynnika vWF.

GPIbα jest złożona z 610 reszt aminokwasowych, a jej względna masa cząsteczkowa, wyznaczona z rozdziału w żelu poliakrylamidowym, wynosi 135 kDa, wskazując, że zawiera około 50% węglowodanów. N-końcowy fragment GPIbα ma kształt globularny i zawiera 8 tandemowych powtórzeń bogatych w reszty leucynowe. Region centralny GPIbα zawiera liniowy rdzeń sialomucynowy bogaty w reszty serynowe, treoninowe i prolinowe, połączone wiązaniami O-glikozydowymi z cukrami. Domena makroglikopeptydowa oddzielona jest od domen powtórzeń leucynowych odcinkiem zbudowanym z 19 reszt aminokwasowych. Odcinek ten jest bogaty w ujemnie naładowane reszty asparaginowe oraz glutaminowe i zawiera 3 sulfonowane reszty tyrozynowe. Cytoplazmatyczna część GPIbα zbudowana jest z 96 reszt aminokwasowych i zawiera miejsca wiązania białka wiążącego aktynę, zwanego też filaminą A, i białka adaptorowego 14.3.3 ζ [12-13]. Filamina A łączy się z GPIbα już w siateczce śródplazmatycznej bierze udział w kierowaniu białka do błony plazmatycznej [18]. Podjednostka GPIbβ (około 25 kDa) zawiera tylko jedną domenę bogatą w reszty leucynowe, domenę transbłonową i domenę cytoplazmatyczną złożoną z 34 reszt aminokwasowych, wiążącą się z białkiem adaptorowym 14.3.3 ζ. GPIX (około 22 kDa) jest zbudowana bardzo podobnie do GPIbβ, ale jej część cytoplazmatyczna jest krótsza i składa się tylko z pięciu reszt aminokwasowych. GPV zawiera 15 końcowych powtórzeń bogatych w reszty leucynowe, odcinek transbłonowy i krótki odcinek cytoplazmatyczny [8,15,19-20] (Ryc. 3).

W cząsteczce GPIbα są 3 regiony zbudowane z około 300 reszt aminokwasowych, odpowiedzialne za wiązanie czynnika vWF [19]. Jeden region występuje w obszarze GPIbα, bogatym w ujemnie naładowane reszty aminokwasowe i sulfonowane reszty tyrozynowe. Zablokowanie sulfonowania reszt tyrozynowych (poz. 276, 278 i 279) silnie hamuje zależne od botrocetyny i rystocetyny wiązanie vWF z GPIbα [21-22]. Kolejne dwa miejsca oddziaływań ustalono dzięki analizie struktury krystalicznej kompleksu N-końcowego fragmentu GPIbα i domeny A1 vWF. Drugie miejsce wiązania znajduje się od strony C-końca tandemowych powtórzeń bogatych w reszty leucynowe. Obszar drugiego miejsca wiązania, zajmujący około 1700 Å², rozciąga się od C209 do C248 i obejmuje ruchomy, elastyczny w stanie niezwiązanym motyw, zwany β- przełącznikiem. Po utworzeniu kompleksu z vWF, β-przełącznik tworzy strukturę β szpilki do włosów, wiążąc centralny łańcuch β3 domeny A1 vWF [23]. Region ten bierze udział w zmianie powinowactwa receptora ze stanu o niskim do stanu o wysokim powinowactwie wiązania vWF, równoważnym do powinowactwa występującego podczas działania wysokich gradientów prędkości krwi.



Rycina 3. Schemat budowy kompleksu GPIb/IX/V. Na schemacie zaznaczono miejsca wiązania aktyny i białka adaptorowego 14.3.3 ζ (wg [20] zmodyfikowano).

Trzeci region GPIbα wiążący vWF obejmuje region N-końcowy cząsteczki, zwany β-palcem oraz obszar zawierający trzy z ośmiu tandemowych powtórzeń bogatych w reszty leucynowe, przy czym powtórzenia 2,3,4 (L60- E128) są niezbędne dla adhezji vWF do GPIbα [24-25]. Całe to wiązanie zajmuje powierzchnię około 900 Å²

http://rcin.org.pl

i w domenie A1 vWF obejmuje jego dolną część, gdzie znajdują się fragmenty N- i C-końcowe tej domeny [26].

Łańcuch GPIbα zawiera również miejsca wiązania P-selektyny, integryny $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), trombiny, czynników XI i XII oraz kininogenu o wysokiej masie cząsteczkowej [8,27]. GPIbα, łącząc region A1 vWF, stymuluje również aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, która jest niezbędna do adhezji i agregacji płytek krwi [28].

Adhezję vWF do GPIb/XI/V w przepływie wzmacniają również oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy negatywnie naładowaną częścią GPIbα i pozytywnie naładowaną częścią domeny A1 vWF [29-30].

CZYNNIK VON WILLEBRANDA

Czynnik vWF jest magazynowany w ciałkach Weibela Palada komórek śródbłonka i jest uwalniany do krwi w postaci długich pasemek złożonych z dużych multimerów. Do takich multimerów szybko przylegają płytki krwi, które ulegają aktywacji. Masa cząsteczkowa multimerów vWF wynosi 500–20000 kDa. Monomery, o masie cząsteczkowej około 270 kDa, połączone są mostkami disiarczkowymi. Prozakrzepowe multimery vWF są szybko degradowane w warunkach fizjologicznych do mniejszych cząsteczek o słabszych właściwościach zakrzepowych, przez metaloproteazę ADAMTS 13 (ang. *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif*).

Czynnik vWF jest też magazynowany w ziarnistościach α płytek krwi i jest z nich uwalniany tylko po aktywacji płytek, co oznacza, że prawie cały vWF osocza pochodzi ze śródbłonka. Czynnik vWF uwolniony z komórek śródbłonka jest kierowany do krwi lub do białek macierzy w podśródbłonku. Czynnik vWF jest rozłożony nierównomiernie w podśródbłonku. VWF nie występuje we wszystkich rodzajach naczyń krwionośnych. Ponadto, macierz międzykomórkowa głębszych warstw naczyń krwionośnych odsłanianych podczas rozległych uszkodzeń naczynia, nie zawiera vWF. Tak więc czynnik vWF osocza, pochodzący z komórek śródbłonka, pełni ważną hemostatycznie funkcję zatrzymywania i aktywacji płytek krwi. Czynnik vWF, jeśli jest obecny w podśródbłonku, przyczynia się również do adhezji płytek krwi [1-2,12,16].

Zidentyfikowano trzy domeny A w czynniku vWF. Domeny te są homologiczne do domen I integryn, ale w odróżnieniu od nich, domena A3 nie zawiera funkcjonalnego miejsca wiązania jonów metalu MIDAS (ang. *metal ion dependent adhesion site*). Wiązanie domeny A3 vWF z kolagenem jest więc niezależne od kationów. Domena A1 zawiera miejsce wiązania GPIb, sulfatydów, heparyny i kolagenu VI. W domenie A2 nie stwierdzono jak dotąd występowania miejsc wiążących białka. W domenie tej znajduje się miejsce enzymatycznie degradowane przez proteazę ADAMTS-13, która reguluje wielkość multimetrów vWF [16,31]. Domena A3 zawiera główne miejsce wiązania kolagenów fibrylarnych typu I i III. Domena A1 vWF, po związaniu z GPIbα, ulega niewielkim zmianom konformacyjnym w trzech sąsiadujących regionach, położonych blisko fragmentów N- i C-końcowych oraz w pętli α1-β2 [16]. Badając wiązanie rekombinowanego, zmutowanego czynnika vWF z kolagenem, dowiedziono, że reszty aminokwasowe w pozycjach od 920 do 1111 domeny A3 są odpowiedzialne za to wiązanie. Mutacja następujących aminokwasów domeny A3 — D979, S1020 i H1023 hamuje całkowicie jej wiązanie z kolagenem [32-34]. Kolejne potwierdzone miejsca wiązania domeny A3 z kolagenem, w których biorą udział reszty: S1020, R1016, P981 oraz W 982 pozwoliły na ustalenie 8-o aminokwasowego cyklicznego peptydu CMTSPWRC i konsensusowego tetrapeptydu SPWR, naśladującego trójwymiarową strukturę motywu domeny A3 odpowiedzialnej za wiązanie kolagenu [35-36]. Jedyna jak dotąd poznana sekwencja kolagenu typu III, wiążąca się z czynnikiem vWF, to sekwencja RGQOGVMGF (gdzie O — oznacza hydroksyprolinę) [37].

ZMIANY KONFORMACYJNE CZYNNIKA vWF, KOMPLEKSU GPIB/IX/V I INTEGRYNY $\alpha_{IIb}\beta_3$

Nieaktywne płytki krwi podczas warunków fizjologicznego przepływu nie przylegają do czynnika vWF, który jest dostępny we krwi. Tylko unieruchomiony na kolagenie czynnik vWF może oddziaływać ze swoim receptorem na płytce krwi, którym jest kompleks GPIb/IX/V. Oddziaływania pomiędzy tym kompleksem, a czynnikiem vWF wymagają zmian konformacyjnych przynajmniej jednego z partnerów oddziaływania. Unieruchomienie czynnika vWF na odsłoniętych włóknach kolagenu wywołuje zmiany konformacji vWF, eksponujące miejsca wiążące kompleks GPIb/IX/V, co pozwala płytkom na utworzenie kontaktu z uszkodzonym naczyniem [38]. Wysoki gradient prędkości przepływającej krwi powoduje również zmiany konformacyjne czynnika vWF, udostępniając miejsca wiążące go z kolagenem i jednocześnie eksponując miejsca wiążące go z kompleksem GPIb/IX/V [15,39-42]. Pod wpływem wysokiego gradientu prędkości domena A2 czynnika vWF wiąże się z domeną A1 w konformacji aktywnej i moduluje jej oddziaływanie z GPIbα [42].

Zmiany konformacji pod wpływem wysokich gradientów prędkości zachodzą również w glikoproteinach płytek wiążących czynnik vWF — w kompleksie GPIb/IX/V i integrynie $\alpha_{IIb}\beta_3$. Zmiany te regulują funkcje tych białek. Wykazano, że kinaza Syk, α-aktynina i łańcuch ciężki miozyny ulegają dysocjacji od łańcucha β_3 integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ oraz, że fosforylacja i działanie białka adaptorowego SLP-76 ulegają zmianom w sposób zależny od, regulowanego gradientem prędkości, połączenia czynnika vWF z integryną $\alpha_{IIb}\beta_3$ [43]. Zmiany konformacyjne GPIbα i vWF zachodzą pod wpływem botrocetyny i rystocetyny, dwóch lektyn stosowanych w badaniach wiązania płytek z czynnikiem vWF [8,15,39,42,44-45]. W zmianach tych bierze udział N-końcowy odcinek receptora, przy czym region pierwszy i drugi bogaty w reszty leucynowe jest niezbędny do jego wiązania z ligandem [44]. Regulacja allosteryczna wiązania vWF z GPIbα przez botrocetynę i rystocetynę wywołuje zwiększenie powinowactwa wiązania liganda przez receptor [45]. W zmianach konformacji GPIb/IX/V i $\alpha_{IIb}\beta_3$ bierze udział izomeraza wiązań disiarczkowych, powodująca ekspozycję wolnych grup SH na powierzchni płytek podczas ich aktywacji [46-47].

http://rcin.org.pl

CHARAKTERYSTYKA WIĄZANIA GPIbα Z CZYNNIKIEM vWF

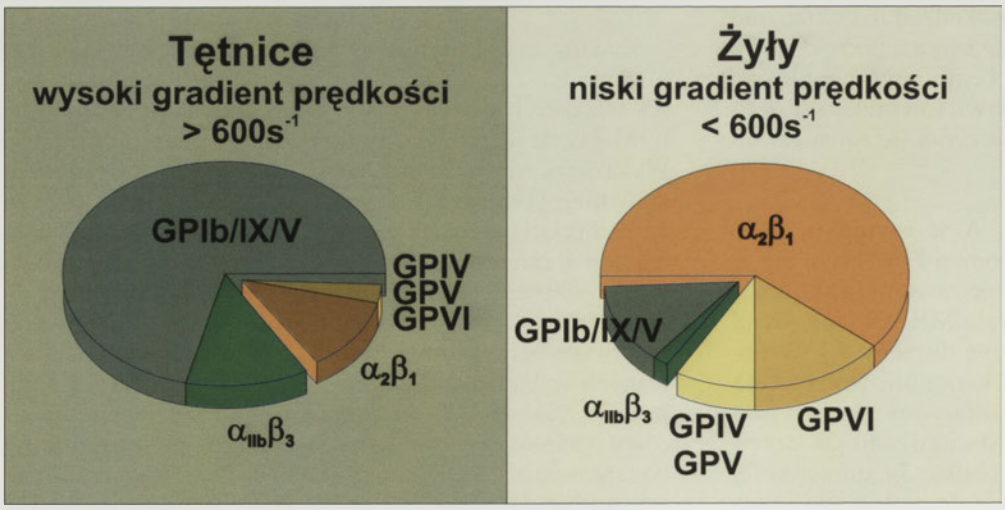
Oddziaływanie GPIbα z unieruchomionym na kolagenie vWF charakteryzuje się dużą szybkością dysocjacji, powodując przemieszczanie płytek do miejsca uszkodzenia naczynia, co obniża szybkość ich przepływu. Znaczne zwolnienie szybkości przepływu umożliwia oddziaływanie receptorów, charakteryzujących się wolniejszą kinetyką wiązania z ich ligandami, w tym m.in. integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ z vWF i GPVI lub integryny $\alpha_2\beta_1$ z kolagenem [39,48]. Przejściowy charakter początkowego wiązania się płytek z domeną A1 czynnika vWF i przemieszczanie płytek krwi na unieruchomionym vWF przypomina przemieszczanie się leukocytów na uszkodzonym śródbłonku. Płytki krwi, w przeciwieństwie do leukocytów, nie toczą się na swej powierzchni, lecz przemieszczają się ruchem skokowym, przypominającym ruch koziołkującej piłki (ang. *flipping motion)*, w kierunku przepływu. Ruch ten jest konsekwencją elipsoidalnego, spłaszczonego kształtu płytek krwi i polega na przyczepieniu płytki, jej wahadłowych wychyleniach w miejscu przyczepienia, oderwaniu od powierzchni przyczepnej i przesunięciu zgodnie z kierunkiem przepływu krwi. Po przyczepieniu się w następnym miejscu płytka znów ulega wahadłowym wychyleniom. Płytka może się przyczepić do vWF, jeśli maksymalna wartość siły radialnej działającej na nią nie przekracza 0,93 pN podczas przepływu z gradientem prędkości 73 s^{-1} i 10,2 pN podczas przepływu z gradientem prędkości 800 s^{-1}. Odwracalne wiązanie się płytki (ang. *tether bond*) z vWF tworzy się wtedy, gdy radialne siły hydrodynamiczne działające na płytkę są kompresujące, skierowane w kierunku ściany naczynia. Płytka dysocjuje od vWF, gdy siły te są dekompresujące, skierowane od ściany naczynia [41,49]. Progowy, najmniejszy gradient prędkości, potrzebny do utworzenia odwracalnego połączenia wynosi 73 s^{-1}[50]. Przyczepianie się płytek do unieruchomionego vWF zwiększa się wraz ze wzrostem gradientu prędkości [41]. Choroba von Willebranda typu płytkowego charakteryzuje się trombocytopenią i obniżeniem zawartości we krwi wysokocząsteczkowych mulimerów vWF. Jest to spowodowane mutacją G233V w obrębie pętli disiarczkowej C^{209}–C^{248} cząsteczki GpIbα, która wywołuje zwiększoną adhezję płytek do czynnika vWF. Stała dysocjacji odwracalnego wiązania zmutowanego receptora wynosi 0.67 s^{-1}, a dla niezmutowanego receptora stała ta wynosi 3,45 s^{-1} [51]. Mutacja M239, charakterystyczna również dla choroby von Willebranda typu płytkowego, występująca także w obrębie pętli disiarczkowej, powoduje zwiększenie powinowactwa wiązania GpIbα z vWF. Wymiana dwóch innych reszt aminokwasowych tego regionu na reszty walinowe, tj. wymiana K237V, zwiększała powinowactwo, natomiast wymiana Q232V obniżała powinowactwo wiązania receptora z ligandem. Mutacje te zmieniały kinetykę wiązania receptora z ligandem. Komórki z mutacją K237V w GPIbα przesuwały się po unieruchomionym vWF dużo wolniej, a komórki z mutacją Q232V dużo szybciej niż komórki z niezmutowanym receptorem. Komórki z mutacją Q232V dysocjowały 1,25 razy szybciej od liganda i tworzyły z nim trzy razy więcej połączeń w porównaniu z komórkami posiadającymi niezmutowany receptor. Komórki z mutacją K237V dysocjowały 2,2 razy wolniej i tworzyły 3 razy mniej połączeń niż komórki z niezmutowanym receptorem. Tak więc mutacje te zmieniały zarówno stałą asocjacji, jak i stałą dysocjacji wiązania [19]. Mutacje opisane dla receptora PSGL-1 neutrofilów, zmieniające kinetykę poruszania się neutrofilów po śródbłonku, zmieniały tylko stałą dysocjacji wiązania z selektynami, natomiast nie miały wpływu na stałą asocjacji wiązania, wskazując na istotne różnice kinetyki ruchu neutrofilów na śródbłonku, a płytek na unieruchomionym vWF [52].

WPŁYW SZYBKOŚCI PRZEPŁYWU KRWI NA UDZIAŁ RECEPTORÓW KOLAGENU W ADHEZJI

Udział receptorów kolagenu w adhezji do naczynia krwionośnego zależy od wielu czynników, w tym m.in. od rozmiaru jego uszkodzenia i dostępności poszczególnych białek adhezyjnych dla płytek krwi oraz od szybkości przepływu krwi [7-8,12].

Zależność udziału receptorów od szybkości przepływu krwi można przedstawić w postaci diagramu, gdzie wielkość pola powierzchni określa w przybliżeniu udział danego receptora w tym procesie (Ryc. 4).

Adhezja płytek krwi podczas przepływu krwi z wysokimi gradientami prędkości w tętnicach (>600 s^{-1}) jest inicjowana prawie wyłącznie przez oddziaływania pośrednich receptorów kolagenu, głównie kompleksu GPIb/IX/V, z unieruchomionym na kolagenie czynnikiem vWF. Udział receptorów bezpośrednich w



Rycina 4. Wpływ szybkości przepływu krwi na udział receptorów kolagenu w adhezji. Zależność udziału receptorów od szybkości przepływu krwi przedstawiono w postaci diagramu, gdzie wielkość pola powierzchni określa w przybliżeniu udział danego receptora w tym procesie. Adhezja płytek krwi podczas przepływu krwi z wysokimi gradientami prędkości w tętnicach (>600 s^{-1}) jest inicjowana wyłącznie przez oddziaływania niebezpośrednich receptorów kolagenu, głównie kompleksu GPIb/IX/V z unieruchomionym na kolagenie czynnikiem vWF. Adhezja płytek do ściany naczynia podczas działania niskich gradientów prędkości, takich jak w żyłach (<600s^{-1}), zależy głównie od oddziaływań receptorów bezpośrednich z kolagenem, tj.: integryny $\alpha_2\beta_1$, GPIV, GPV, GPVI, białek o masie cząsteczkowej 65kDa i 78/82kDa, ale i tutaj oddziaływanie kompleksu GPIb/IX/V z vWF nie jest bez znaczenia.

http://rcin.org.pl

inicjowaniu adhezji w wysokich gradientach prędkości jest dużo mniejszy [8,15,39]. Oddziaływania GPIb/IX/V z vWF są wystarczająco silne, by mogły przeciwstawić się siłom panującym podczas przepływu i spowodować, by płytki nie uległy oderwaniu od ściany naczynia [2,8,15,39,53-54]. O ważności tych oddziaływań świadczą następujące fakty: 1) Płytki krwi pacjentów z zespołem Bernarda-Souliera (deficyt GPIb/IX/V) oraz z chorobą von Willebranda typu III (ciężki), (deficyt vWF w osoczu i płytkach krwi) nie przylegają do naczynia krwionośnego podczas przepływu z gradientami prędkości >1 200 s^{-1}. Płytki te tworzą normalny skrzep podczas przepływu w niskich gradientach prędkości (<340 s^{-1}) [7-8,12]; 2) Płytki krwi pacjentów chorych na Trombastenię Glanzmanna (deficyt integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$) nie tworzą stabilnej adhezji i wykazują obniżoną szybkość wzrostu skrzepu [7].

Adhezja płytek do ściany naczynia podczas działania niskich gradientów prędkości, takich jak w żyłach (<600s^{-1}), zależy głównie od oddziaływań receptorów bezpośrednich z kolagenem, tj. integryny $\alpha_2\beta_1$, GPIV, GPV, GPVI, białek o masie cząsteczkowej 65kDa i 78/82kDa, ale i tutaj oddziaływanie kompleksu GPIb/IX/V z vWF nie jest bez znaczenia [7,12,15,39,55-56].

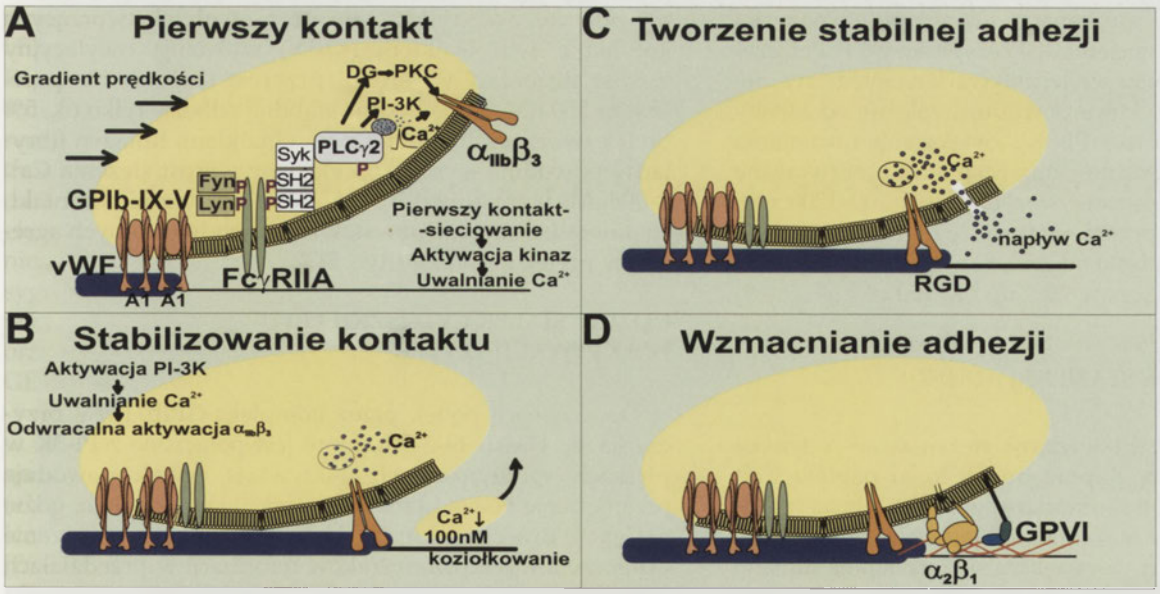
ETAPY ADHEZJI

Adhezja płytek z uszkodzoną ścianą naczynia przebiega w kilku etapach: 1) pierwszy kontakt; 2) stabilizowanie kontaktu; 3) utworzenie stabilnej adhezji; 4) wzmacnianie adhezji. Etapy 1-3 zależą przede wszystkim od oddziaływania vWF z kompleksem GPIb/IX/V, a etap 4 od oddziaływania kolagenu z jego receptorami bezpośrednimi, przede wszystkim z integryną $\alpha_2\beta_1$ i GPVI [8,15,39].

Przez wiele lat uważano, że wiązanie się vWF z GPIb/IX/V nie powoduje aktywacji płytek i ich agregacji oraz, że do aktywacji płytek niezbędne jest wiązanie się vWF z integryną $\alpha_{IIb}\beta_3$. W chwili obecnej faktem niepodważalnym jest aktywacja i agregacja płytek dzięki łączeniu się vWF tylko z GPIb/IX/V [6,8]. Świadczą o tym, m.in., selektywni agoniści GPIb/IX/V, alboagregina, lektyna z jadu żmij *Trimeresurus albolabris* i czynnik vWF z mutacją regionu RGD, uniemożliwiającą wiązanie się vWF z integryną $\alpha_{IIb}\beta_3$, którzy łączą się tylko z GPIb/IX/V i powodują aktywację płytek krwi i ich agregację. Aktywacja płytek wywołuje szereg zmian biochemicznych w płytkach z udziałem, m.in., kinaz tyrozynowych, jonów wapnia, białek cytoszkieletu, ADP i TxA_2 [6,8,39].

ETAP I. PIERWSZY KONTAKT

Połączenie GPIbα z domeną A1 czynnika vWF inicjuje natychmiastowe przesyłanie sygnału, tj. aktywację kinaz tyrozynowych i zwiększenie stężenia jonów wapnia. Aktywacja ta zachodzi dzięki sieciowaniu GPIb/IX/V przez czynnik vWF [8,15,39]. Sygnałem inicjującym aktywację jest fosforylacja reszt tyrozynowych motywu aktywującego receptora immunologicznego (ITAM, ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), znajdującego się w części cytoplazmatycznej receptora FcγRIIa lub łańcucha γ receptora Fc. Receptory te pośredniczą w przekazywaniu sygnału od GPIbα [57-61]. Brak udziału tych receptorów prowadzi do znacznego osłabienia przekazywanego sygnału [28]. Motyw ITAM zawiera sekwencje YXXL/I-X_{6-8}-YXXL/I, w których fosforylowane są dwie, zachowane w ewolucji, reszty tyrozynowe. Motyw ITAM jest najprawdopodobniej fosforylowany przez kinazy Src, Fyn i Lyn [57-59,62]. Fosforylowany motyw ITAM asocjuje z tandemowymi domenami SH2 kinazy Syk, przyciągając nieaktywną kinazę Syk z cytoplazmy i zakotwicza ją w błonie, w miejscu jej działania. Asocjacja ta powoduje autofosforylację kinazy Syk i wzrost jej



Rycina 5. Etapy adhezji płytek krwi do ściany naczynia krwionośnego. **A)** Etap pierwszy — pierwszy kontakt. Połączenie GPIbα z domeną A1 czynnika vWF inicjuje przesyłanie sygnału z udziałem kinaz tyrozynowych i jonów wapnia w płytce krwi. Sygnałem inicjującym aktywację jest fosforylacja motywu ITAM receptora FcγRIIA przez kinazy Fyn i Lyn. Fosforylowany ITAM asocjuje z tandemowymi domenami SH2 kinazy Syk, co prowadzi do jej autofosforylacji i wzrostu jej aktywności. Kinaza Syk przekazuje sygnał dalej do fosfolipazy PLCγ2, powodując wzrost jej aktywności. Fosfolipaza dostarcza drugorzędowych przenośników informacji, w tym 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP_3) i 1,2- diacyloglicerolu (DG). DG aktywuje białkową kinazę C (PKC), a IP_3 uwalnia niewielką ilość Ca^{2+}, co jest obserwowane jako jednorazowy, krótkotrwały przyrost stężenia $\alpha_{IIb}\beta_3$ w płytce krwi. Aktywacja płytek jest niewielka, płytki są słabo połączone z naczyniem i łatwo się od niego odrywają. Szybkość przemieszczania się płytek, które utworzyły pierwszy kontakt, ulega obniżeniu. **B)** Etap drugi — stabilizowanie kontaktu. Wzrost stężenia Ca^{2+} powoduje odwracalną aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, dzięki czemu łączy się ona z sekwencjami RGD czynnika vWF, co wywołuje zwiększanie uwalniania Ca^{2+}. Płytki przemieszczają się na czynniku vVW ruchem skokowym, podobnym do ruchu koziołkującej piłki. **C)** Etap trzeci — utworzenie stabilnej adhezji. Wzrost stężenia Ca^{2+} w płytce i wzrost aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ powoduje napływ Ca^{2+} do płytki krwi ze środowiska zewnętrznego, co zwiększa aktywację tej integryny i powoduje jej stabilny kontakt z czynnikiem vWF. Płytki krwi są stabilnie przymocowane do vWF. **D)** Etap czwarty — wzmacnianie adhezji. Receptory bezpośrednie kolagenu, w tym m.in. integryna $\alpha_2\beta_1$ i GPVI, mogą się połączyć ze swoim ligandem i wzmacniają kontakt płytek z uszkodzonym naczyniem.

http://rcin.org.pl

aktywności. Kinaza Syk może być również fosforylowana przez kinazy Fyn i Lyn. Syk inicjuje kaskadę przenoszenia sygnału, która kończy się aktywacją enzymów, takich jak fosfolipaza PLCγ2, dostarczająca drugorzędowych przenośników informacji w tym, m.in., 1, 4, 5-trisfosforanu inozytolu (IP_3) i 1, 2-diacyloglicerolu (DG) [6,8,15,39]. DG aktywuje białkową kinazę C (PKC, ang. *protein kinase C*), a trisfosforan inozytolu uwalnia niewielką ilość jonów wapnia z magazynów wewnątrz płytek, co jest obserwowane jako jednorazowy, krótkotrwały przyrost stężenia tych jonów. Przyrost ten jest niewystarczający do całkowitego zatrzymania płytek na czynniku vWF, ale obniża szybkość ich przemieszczania się. Płytki są bardzo słabo połączone z naczyniem i łatwo mogą się od niego oderwać, szczególnie przy dużych gradientach prędkości [48] (Ryc. 5A). W szlaku przekazywania sygnału od GPIb biorą również udział kinazy Btk, Fak, Erk1/2, Pyk2, Akt i MAP oraz białka adaptorowe SLP-76, LAT i ADAP [28,57,63-66].

ETAP 2. STABILIZOWANIE KONTAKTU

Monitorowanie wzrostu stężenia jonów wapnia co kilka sekund w pojedynczych płytkach krwi wraz z jednoczesnym obserwowaniem ich przemieszczania na czynniku vWF podczas przepływu płytek z gradientem prędkości 800 s^{-1}, doprowadziło do precyzyjnego poznania udziału uwalnianych Ca^{2+} w przemieszczaniu płytek i ich aktywacji [48,67].

Krótkotrwały wzrost stężenia Ca^{2+} w płytce o ok. 50–400 nM, spowodowany kontaktem GPIbα z domeną A1 czynnika vWF, jest wystarczający do niewielkiej i odwracalnej aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ mechanizmem *inside-out*, co pozwala jej połączyć się z sekwencjami RGD czynnika vWF. Połączenie to prowadzi do zwiększonej aktywacji tej integryny mechanizmem *outside-in*, która powoduje, zależne od kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej (PI-3K), zwiększenie uwalniania Ca^{2+} z miejsc ich magazynowania w płytce, obserwowane jako oscylacyjne zwiększanie stężenia o ok. 100–1200 nM. Na tym etapie płytki przemieszczają się na czynniku vWF. Każde oderwanie się płytki od czynnika vWF jest połączone ze spadkiem stężenia jonów Ca^{2+} do ok. 100 nM [48,68-69] (Ryc. 5 B).

ETAP 3. UTWORZENIE STABILNEJ ADHEZJI

Zależny od kinazy PI-3 wzrost stężenia Ca^{2+} i wzrost aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ powoduje z kolei napływ Ca^{2+} z środowiska zewnątrzkomórkowego, wywołując trwały, oscylacyjny wzrost stężenia tych jonów w płytce krwi. Aktywacja integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ zwiększa się i następuje stabilne zatrzymanie płytek na vWF. Tak więc, kompleks GPIb/IX/V jest odpowiedzialny za krótkotrwały, niezależny od kinazy PI-3, przyrost stężenia Ca^{2+} w płytce, spowodowany wyłącznie wypływem tych jonów z miejsc magazynowania w płytkach, co jest niezbędne dla przemieszczania płytek na czynniku vWF. Całkowite zatrzymanie płytek wymaga udziału integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ i jej stabilnego kontaktu z czynnikiem vWF. Stabilny kontakt jest wynikiem aktywacji tej integryny, wywołującej ciągły, oscylacyjny, zależny od PI-3K wzrost stężenia Ca^{2+}. Wzrost ten jest spowodowany zarówno wypływem tych jonów z miejsc magazynowania w płytce, jak i ich napływem z środowiska zewnątrzkomórkowego [48,67] (Ryc. 5C).

ETAP 4. WZMACNIANIE ADHEZJI

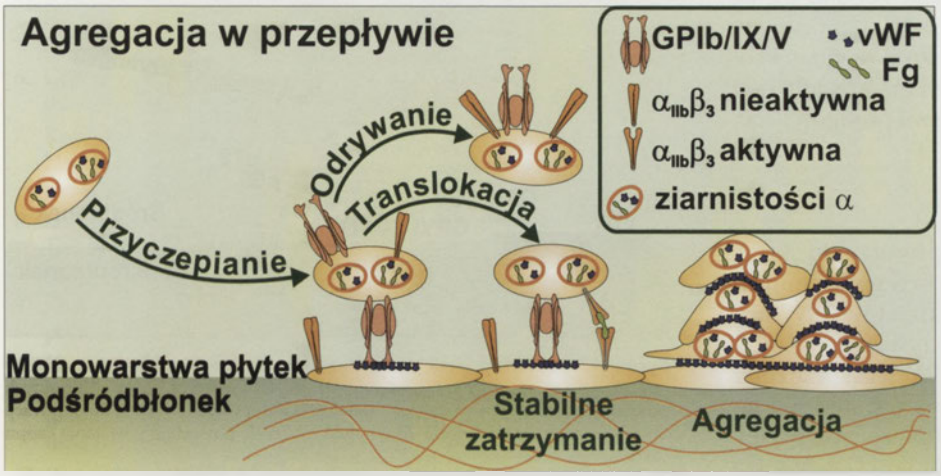
Obniżenie szybkości przemieszczania się płytek i ich zatrzymanie umożliwia kontakt receptorów bezpośrednich kolagenu – integryny $\alpha_2\beta_1$, GPVI i innych z kolagenem [5,15,39]. Integryna $\alpha_2\beta_1$ w nieaktywowanych płytkach występuje w stanie niskiego powinowactwa do kolagenu. Aktywacja tej integryny może być wywołana przez: a) związanie z kolagenem, b) receptory ADP, c) receptor GPIb i d) aktywną integrynę $\alpha_{IIb}\beta_3$ [70-73]. Szlaki sygnałowe prowadzące od integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ do integryny $\alpha_2\beta_1$ są mało poznane. GPVI nie należy do receptorów integrynowych i nie ulega aktywacji podczas wiązania ze swoimi ligandami [9].

Kolagen fibrylarny jest bardzo silnym aktywatorem płytek krwi. Kontakt płytek z kolagenem wywołuje aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, zwiększając liczbę płytek tworzących stabilną adhezję [7,15,39]. Szlaki sygnałowe prowadzące do aktywacji tej integryny przez kolagen są podobne do szlaków uruchamianych przez oddziaływania GPIbα z vWF i nie będą omawiane w tym artykule, ponieważ zostały omówione w artykule poprzednim [9]. Kolagen jest dużo silniejszym aktywatorem płytek w porównaniu z vWF. Ważnymi parametrami regulującymi wydajność adhezji i agregacji są m.in.: liczba płytek tworzących kontakt z białkiem adhezyjnym i wykazujących wzrost stężenia jonów wapnia, wielkość i rodzaj sygnału wapniowego oraz czas jego trwania. Podczas przepływu płytek przez powierzchnie pokryte vWF tylko mały procent płytek tworzących kontakt z tym białkiem (<10%) wykazuje oscylacyjny wzrost stężenia Ca^{2+}, średni przyrost stężenia nie przekracza 250 nM, co powoduje stabilną adhezję tylko ok. 5% płytek tworzących kontakt z tym białkiem. Kolagen fibrylarny powoduje wysoki, oscylacyjny wzrost stężenia Ca^{2+} (>900nM) w 90 % płytek, które utworzyły z nim kontakt, co powoduje szybkie powstawanie nieodwracalnych agregatów płytek krwi [53] (Ryc. 5D).

UDZIAŁ BIAŁEK CYTOSZKIELETU W AKTYWACJI PŁYTEK

Do aktywacji płytek przez kompleks GPIb/IX/V przyczynia się białko 14-3-3 ζ, które jest połączone z PI-3K w płytkach spoczynkowych. Aktywacja płytek powoduje przeniesienie białka i kinazy do frakcji cytoszkieletu, gdzie następuje dysocjacja kinazy. Umożliwia to jej wytwarzanie drugorzędowych przenośników informacji w przedziałach cytoszkieletu. Filamina A umożliwia transmisję sygnału od zewnątrzkomórkowego liganda do cytoszkieletu i jego reorganizację. Połączenie vWF z GPIb/IX/V inicjuje natychmiastową, regulowaną przez jony Ca^{+2}, polimeryzację filamentów F-aktyny. W procesie tym bierze udział białko regulatorowe gelsolina, która tnie filamenty aktyny, a małe pocięte kawałki stają się podstawą ich wydłużania i polimeryzacji. Fosforylacja reszty serynowej w pozycji 166 GPIbα przez kinazę A reguluje polimeryzację aktyny w odpowiedzi na stymulację płytek krwi [8].

http://rcin.org.pl



Rycina 6. Agregacja płytek w uszkodzonym naczyniu krwionośnym. Płytki krwi przylegają do uszkodzonego naczynia i ulegają aktywacji. Czynnik vWF unieruchomiony na powierzchni przylegających płytek wiąże przepływające płytki dzięki oddziaływaniom z kompleksem GPIb/IX/V. Większość płytek, które utworzyły kontakt z unieruchomionym vWF ulega oderwaniu i przeniesieniu. Niewielka liczba płytek zostaje stabilnie zatrzymana i przyczynia się do wzrostu skrzepu. Stabilny skrzep powstaje z udziałem oddziaływań integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ z czynnikiem vWF i fibrynogenu (wg [7] zmodyfikowano).

Fosforylacja i defosforylacja białek przebiega z udziałem białek cytoszkieletu, które są miejscem zakotwiczenia kinaz, co umożliwia im asocjację z partnerami oraz lokalnie zwiększa ich stężenia. O ważności reorganizacji cytoszkieletu w aktywacji płytek przez czynnik vWF i kolagen świadczy, m.in., fakt, że cytocholazyna D, całkowicie hamuje aktywację płytek tymi czynnikami, podczas gdy obniża tylko aktywację płytek trombiną i ADP. Reorganizacja cytoszkieletu reguluje zmianę kształtu, rozpłaszczanie, tworzenie lameli i filopodiów, reakcję uwalniania i agregację płytek [8,15,74]. Regulacja pomiędzy receptorami płytkowymi a cytoszkieletem jest dwukierunkowa: ligandy łączące się z receptorami reorganizują cytoszkielet, a zreorganizowany cytoszkielet umożliwia sieciowanie receptorów i ich gromadzenie się w domenach błony wzbogaconych w glikolipidy (GEMs, ang. *glycolipid-enriched membrane domains*). Domeny te są najważniejszymi miejscami, w których następuje przewodzenie sygnału z udziałem vWF i kompleksu GPIb/IX/V, ponieważ oddziaływania pomiędzy GPIb a kinazami Src i Lyn oraz aktywacja fosfolipazy PLCγ2 przebiegają wyłącznie w GEMs [15,75].

Oddziaływanie vWF z GPIb uruchamia też szlaki sygnałowe, prowadzące do aktywacji syntetazy tlenku azotu (eNOS) i zwiększenia tworzenia tlenku azotu w sposób zależny od cGMP i białkowych kinaz A i G oraz ADP i TxA_2 [76]. Znaczenie tych szlaków dla aktywacji płytek jest mało poznane.

AGREGACJA PŁYTEK W USZKODZONYM NACZYNIU KRWIONOŚNYM

Tradycyjny model agregacji płytek krwi, w którym oddziaływania integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ z fibrynogenem miały wyłączny wpływ na tworzenie połączeń pomiędzy płytkami krwi w powstającym agregacie płytkowym, pochodził z badań z zastosowaniem agregometru. W badaniach tych dodanie aktywatora (kolagen, ADP, trombina) do zawiesiny płytek poddanej ciągłemu mieszaniu, powoduje aktywację integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, przekształcając ją ze stanu nieaktywnego do stanu aktywnego, zdolnego wiązać fibrynogen [48]. Badania agregacji płytek podczas przepływu z zastosowaniem wiskozymetru wykazały, że zależne od gradientu prędkości, wiązanie czynnika vWF z GPIbα inicjuje aktywację płytek, niezależnie od dodawanych aktywatorów. Badania te stały się podstawą do wyjaśnienia mechanizmu agregacji płytek w uszkodzonym naczyniu, gdzie kontakt płytka–płytka nie zachodzi pomiędzy płytkami w zawiesinie, lecz pomiędzy warstwą płytek, która już przyległa do uszkodzonego naczynia, a płytkami krążącymi w przepływającej krwi i wychwytywanymi do powstającego skrzepu. Tak więc unieruchomione płytki przy ścianie naczynia stanowią wysoce reaktywną powierzchnię oddziaływania, wychwytującą płytki z przepływającej krwi [7].

Udział czynnika vWF i fibrynogenu w agregacji płytek i tworzeniu skrzepu został wyjaśniony dzięki zastosowaniu modeli *in vitro* i *in vivo*, dzięki którym monitorowano oddziaływania krążących płytek z uszkodzonym naczyniem lub z już przyległymi płytkami do naczynia z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz kamery video. Badania te wykazały, że fibrynogen jest najważniejszym ligandem płytek dla ich agregacji podczas przepływu w niskich gradientach prędkości, a rola czynnika vWF w tych warunkach jest dużo mniejsza [15,39]. Natomiast badania *in vitro* agregacji płytek podczas przepływu krwi w wysokim gradiencie prędkości (1800 s^{-1}) w mikrokapilarach pokrytych pojedynczą warstwą płytek unieruchomionych na kolagenie oraz *in vivo* w uszkodzonych naczyniach szczura, dostarczyły niezbitych dowodów, że oddziaływania te są inicjowane dzięki wiązaniu się GPIbα krążących płytek z czynnikiem vWF, połączonym z unieruchomionymi płytkami (Ryc. 6). Tak więc w wysokich gradientach prędkości, czynnik vWF jest głównym ligandem odpowiedzialnym za tworzenie agregatów płytkowych. Oddziaływanie integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ z vWF jest niezbędne do wywołania stabilnej adhezji [7,15,39,55]. Podczas przepływu o wysokim gradiencie prędkości (>10000s^{-1}), jaki panuje w bardzo zwężonych naczyniach serca, płytki agregują bez uprzedniej aktywacji, czyli bez udziału fibrynogenu i integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ Wysoki gradient prędkości zmienia konformację czynnika vWF, cząsteczka vWF staje się rozciągnięta i wydłużona z wyeksponowaną domeną A1, umożliwiając jej wiązanie z GPIbα, co jest wystarczające do powstawania agregatów płytkowych [40]. Zastosowanie do badań płytek krwi z deficytem czynnika vWF, zawierających mniej niż 1% tego białka, wykazało, że vWF uwolniony z płytek jest niezbędny w inicjowaniu agregacji płytek podczas przepływu. Czynnik vWF pochodzący z osocza tylko częściowo kompensuje brak vWF płytek krwi [7]. Badania te wykazały również, że agregacja płytek *in vivo* jest procesem niezwykle dynamicznym, w którym płytki z przepływającej krwi ciągle kontaktują się ze skrzepem, ule-

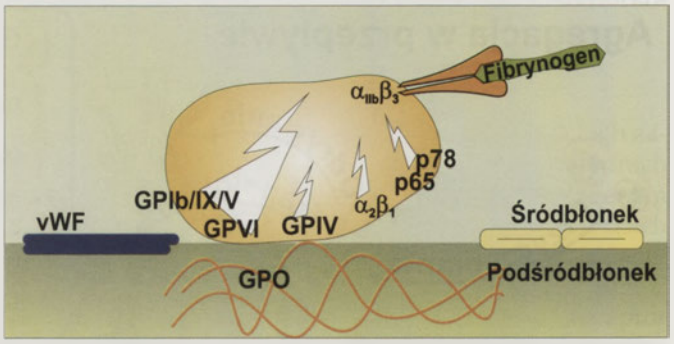
http://rcin.org.pl

gają przemieszczeniu lub oderwaniu od skrzepu, a liczba płytek przyległych stabilnie stanowi niewielki procent w stosunku do tych, które kontaktowały się ze skrzepem. Procent stabilnie przyległych płytek zależy m.in. od szybkości przepływu i tak w przepływie z gradientami prędkości 150, 600 i 1 800 s^{-1} wynosił on 45, 9 i 3 [7,16].

ADP I TXA_2

Funkcja ADP w agregacji płytek krwi i tworzeniu skrzepu jest dobrze poznana. ADP wiąże się z receptorami purynergicznymi $P2Y_1$ i $P2Y_{12}$, biorącymi udział w aktywacji płytek przez ADP i wspomagającymi aktywację wywoływaną innymi agonistami [77]. Receptor $P2Y_1$ jest sprzężony z białkiem G_q i jest odpowiedzialny za wzrost stężenia jonów wapnia, zmianę kształtu i niestabilną agregację płytek krwi. Receptor $P2Y_{12}$ jest sprzężony z białkiem G_i i cyklazą adenylanową. Receptor ten powoduje stabilną agregację płytek i potęguje uwalnianie substancji z ziarnistości płytki. $P2Y_{12}$ jest tarczą dla znanych leków przeciwzakrzepowych, w tym, m.in. tyklopidyny i klopidogrelu. Tworzenie stabilnego skrzepu na kolagenie podczas przepływu krwi z wysokim gradientem prędkości wymaga ciągłej aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, w której uczestniczy również ADP i jego receptor $P2Y_{12}$ oraz szlaki sygnałowe, w których biorą udział izoformy beta i gamma PI-3K [78]. Receptor $P2Y_{12}$ bierze również udział w aktywacji kinazy PI-3 i jej asocjacji z kinazą Src podczas aktywacji płytek wywołanej wiązaniem vWF do GPIbα [68]. Receptory $P2Y_1$ i $P2Y_{12}$ pełnią ważną i uzupełniającą się nawzajem funkcję w aktywacji płytek wywołanej wiązaniem się vWF z GPIbα i tworzenia skrzepu podczas przepływu z niskim i wysokim gradientem prędkości. Receptor $P2Y_1$ bierze udział w inicjowaniu tworzenia skrzepu, a $P2Y_{12}$ — w jego stabilizacji i wzroście [39,79].

TxA_2 aktywuje płytki krwi, wiążąc się z receptorami połączonymi z białkami G_q i $G_{12/13}$. Rola trombosanu A_2 w tworzeniu skrzepu, szczególnie podczas przepływu krwi w patologicznych warunkach wysokich gradientów prędkości, jest mało poznana. Badania agregacji płytek w wiskometrze pokazały, że hamowanie TxA_2 nie ma wpływu na agregację płytek indukowaną wysokimi siłami ścinania. Badania w przepływie laminarnym wykazały, że aspiryna, inhibitor syntezy TxA_2, nie hamuje tworzenia skrzepu podczas patologicznych gradientów prędkości (>10500 s-1), natomiast hamuje jego tworzenie w niższych gradientach prędkości. Te obserwacje częściowo mogą tłumaczyć fakt braku hamowania przez aspirynę tworzenia zakrzepów u pacjentów mających bardzo przewężone tętnice [39]. Aspiryna nie hamuje fosforylacji receptora FcγRIIa, fosforylacji Syk i fosfolipazy PLCγ2 w płytkach aktywowanych czynnikiem vWF, wskazując, że wytwarzanie TxA_2 nie jest niezbędne dla aktywacji przez vWF [60]. Aspiryna również nie hamuje adhezji i agregacji płytek krwi pod wpływem złogów miażdżycowych, podczas gdy blokada GPIbα oraz receptorów ADP hamowała ten proces [80]. Wiązanie się vWF z GPIbα w obecności botrocetyny powoduje aglutynację płytek. Proces ten zależy od TxA_2. W szlaku sygnałowym prowadzącym do wytworzenia TxA_2 biorą udział kinazy Src, Syk, PI-3K, PKC, fosfolipaza PLCγ2 i białko adaptorowe SLP-76 [81,82].



Rycina 7. Matrycowy model adhezji. Skoordynowany i prawie jednoczesny udział wielu receptorów kolagenu oddziałujących z matrycą białek adhezyjnych powoduje uruchamianie szlaków sygnałowych doprowadzających do aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$, która, wiążąc fibrynogen lub vWF, powoduje powstanie czopu płytkowego.

UWAGI KOŃCOWE — MATRYCOWY MODEL ADHEZJI

Najnowszy, matrycowy model adhezji płytek do ściany naczynia krwionośnego, wskazuje na prawie jednoczesny udział wielu receptorów oddziałujących z matrycą białek adhezyjnych, z których najważniejsze to czynnik vWF i kolagen (Ryc. 7). Receptorem inicjującym adhezję płytek do odsłoniętego kolagenu w ścianie naczynia krwionośnego jest kompleks glikoprotein GPIb/IX/V, łączący się z unieruchomionym czynnikiem vWF na kolagenie. Połączenia te są na tyle silne, że powodują zatrzymanie płytek krwi przy ścianie naczynia, aktywują płytki krwi i umożliwiają im bezpośrednie oddziaływanie z kolagenem. Receptory kolagenu płytek krwi, w tym integryna $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), GPIV, GPV, GPVI oraz białka o m.cz. 65 i 68-72 kDa, bezpośrednio łączą się z kolagenem. Każdy z tych receptorów przekazuje pewne informacje do wnętrza, ale udział GPIb/IX/V i GPVI w przekazywaniu informacji i aktywacji płytek krwi jest największy [8,15]. Przekazane informacje doprowadzają w końcowym efekcie do aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), która wiążąc fibrynogen, inicjuje tworzenie stabilnych agregatów płytkowych i czopu hemostatycznego, tamującego wypływ krwi z uszkodzonego naczynia krwionośnego. W oddziaływaniach z uszkodzonym naczyniem biorą też udział: integryna $\alpha_5\beta_1$, receptor fibronektyny, integryna $\alpha_6\beta_1$, receptor lamininy oraz białko CD36, receptor kolagenu i trombospondyny płytek krwi [83-85]. Udział tych receptorów oraz ich ligandów w adhezji, aczkolwiek słabiej poznany w porównaniu z udziałem receptorów kolagenu bezpośrednich i pośrednich w aktywacji płytek krwi, nie jest bez znaczenia dla procesu hemostazy [1,2,6,11-12,55,83-85]. Skoordynowane działanie wielu receptorów zapewnia prawidłowy przebieg tego procesu.

PIŚMIENNICTWO

1. Baruch D (2006) Platelet-vessel wall interactions. Therapie 61: 371-378
2. Jurk K, Kehrel BE (2005) Platelets: physiology and biochemistry. Semin Thromb Haemost 31: 381-392
3. Furie B, Furie BC (2005) Thrombus formation in vivo. J Clin Invest 115: 3355-3362
4. Hoffman M, Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost 85: 958-965

http://rcin.org.pl

5. Ofosu FA (2002) Review: The blood platelets as a model for regulating blood coagulation on cell surface and its consequences. Biochemistry 67: 47-55
6. Gibbins JG (2004) Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. J Cell Sci 117: 3415-3425
7. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP (2000) A revised model of platelet aggregation. J Clin Invest 105: 783-791
8. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK (2001) The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. Thromb Haemost 86: 178-188
9. Kralisz U (2003) Glikoproteina VI – receptor kolagenu aktywujący płytki krwi. Postepy Biochem 49: 26-38
10. Konstantinides S, Ware J, Marchese P, Almus-Jacobs F, Loskutoff DJ, Ruggeri ZM (2006) Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. J Thromb Haemost 4: 2014-2021
11. Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J (2000) Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? Platelets 11: 252-258
12. Yip J, Shen Y, Berndt MC, Andrews RK (2005) Primary platelet adhesion receptors. IUBMB Life 57: 103-108
13. Rivera J, Lozano ML, Corral J, Gonzales-Conejero R, Martinez C, Vicente V (2000) Platelet GPIb/IX/V complex: physiological role. J Physiol Biochem 56: 355-365
14. De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Ulrichts H, Staelens S, Feys HB, Salles I, Fontayne A, Deckmyn H (2006) Development of monoclonal antibodies that inhibit platelet adhesion or aggregation as potential antithrombotic drugs. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 6: 191-207
15. Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC (2005) Platelet GPIb-IX-V- dependent signaling. J Thromb Haemost 3: 1745-1751
16. Ruggeri ZM (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J Thromb Haemost 1: 1335-1342
17. Butler LM, Metson-Scott T, Felix J, Abhyankar A, Rainger GE, Farndale RW, Watson SP, Nash GB (2007) Sequential adhesion of platelets and leukocytes from flowing whole blood onto a collagen-coated surface: Requirement for a GPVI-binding site in collagen. Thromb Haemost 97: 814-821
18. Feng S, Lu X, Kroll MH (2005) Filamin A binding stabilizes nascent glycoprotein Ibalpha trafficking and thereby enhances its surface expression. J Biol Chem 280: 6709-6715
19. Kumar RA, Dong J, Thaggard JA, Cruz MA, Lopez JA (2003) Kinetics of GPIbα-vWF-A1 tether bond under flow: Effect of GPIbα mutations on the association and dissociation rates. Biophys J 85: 4099-4109
20. Lopez JA, Dong JF (1997) Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. Curr Opin Hematol 4: 323-329
21. Marchese P, Murata M, Mazzucato M, Pradella P, De Marco L, Ware J, Ruggeri ZM (1995) Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding. J Biol Chem 270: 9571-9578
22. Dong JF, Hyun W, Lopez JA (1995) Aggregation of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein (GP) Ib-IX complex and the requirement for tyrosine sulfation of GPIb alpha. Blood 86: 4175-4183
23. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P (2002) Structures of glycoprotein Ib alpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. Science 297: 1176-1179
24. Shen Y, Dong JF, Romo GM, Arceneaux W, Aprico A, Gardiner EE, Lopez JA, Berndt MC, Andrews RK (2002) Functional analysis of the C-terminal flanking sequence of platelet glycoprotein Ib alpha using canine-human chimeras. Blood 99: 145-150
25. Shen Y, Cranmer SL, Aprico A, Whisstock JC, Jackson SP, Berndt MC, Andrews RK (2006) Leucine-rich repeats 2-4 (Leu60-Glu128) of platelet glycoprotein Ib alpha regulate shear-dependent cell adhesion to von Willebrand factor. J Biol Chem 281: 26419-26423
26. Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J (2002) Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. J Biol Chem 277: 35657-35663
27. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC (2003) Glycoprotein Ib-IX-V. Int J Biochem Cell Biol 35: 1170-1174
28. Kasirer Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ (2004) Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. Blood 103: 3403-3411
29. Shen Y, Romo GM, Dong JF, Schade A, McIntire LV, Kenny D, Whisstock JC, Berndt MC, Lopez JA, Andrews RK (2000) Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ib alpha for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. Blood 95: 903-910
30. Dong J, Ye P, Schade AJ, Gao S, Romo GM, Turner NT, McIntire LV, Lopez JA (2001) Tyrosine sulfation of glycoprotein I(b) alpha. Role of electrostatic interactions in von Willebrand factor binding. J Biol Chem 276: 16690-16694
31. Borthakur G, Cruz MA, Dong JF, McIntire L, Li F, Lopez JA, Thiagarajan P (2003) Sulfatides inhibit platelet adhesion to von Willebrand factor in flowing blood. J Thromb Haemost 1: 1288-1295
32. Romijn RA, Westein E, Bouma B, Schiphorst ME, Sixma JJ, Lenting PJ, Huizinga EG (2003) Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. J Biol Chem 278: 15035-15039
33. Romijn RA, Bouma B, Wuyster G, Gros P, Kroon J, Sixma JJ, Huizinga EG (2001) Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. J Biol Chem 276: 9985-9991
34. Nishida N, Sumikawa H, Sakakura M, Shimba N, Takahashi H, Terasawa H, Suzuki EI, Shimada I (2003) Collagen binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment. Nat Struct Biol 10: 53-58
35. Wu D, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Meiring M, Depraeter H, Kotze HF, Deckmyn H (2002) Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of *in vivo* arterial platelet thrombus formation in baboons. Blood 99: 3623-3628
36. Vanhoorelbeke K, Depraetere H, Romijn RA, Huizinga EG, De Mayer M, Deckmyn H (2003) A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. J Biol Chem 278: 37815-37821
37. Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, Maddox B, Peachey AR, Huizinga EG, de Groot PG, Farndale RW (2006) A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. Blood 108: 3753-3756
38. Kang I, Raghavachari M, Hofmann CM, Marchant RE (2007) Surface-dependent expression in the platelet GPIb binding domain within human von Willebrand factor studied by atomic force microscopy. Thromb Res 119: 731-740
39. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S (2003) Signaling events underlying thrombus formation. J Thromb Haemost 1: 1602-1612
40. Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann, R, Federici AB, Reininger AJ (2006) Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. Blood 108: 1903-1910
41. Mody NA, Lomakin O, Doggett TA, Diacovo TG, King MR (2005) Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow. Biophys J 88: 1432-1443
42. Martin C, Moralez LD, Cruz MA (2007) Purified A2 domain of VWF binds to the active conformation of VWF and blocks the interaction with platelet GPIbalpha. J Thromb Haemost 5: 1363-1370
43. Feng S, Lu X, Resendiz JC, Kroll MH (2006) Pathological shear stress directly regulated platelet alphaIIbbeta3 signaling. Am J Physiol Cell Physiol 291: C1346-1354
44. Arya M, Lopez JA, Romo GM, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Anvari B (2002) Measurement of the binding forces between von Willebrand factor and variants of platelet glycoprotein Ibalpha using optical tweezers. Lasers Surg Med 30: 306-312
45. Miura S, Li CQ, Cao Z, Wang H, Wardell MR, Sadler JE (2000) Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein

http://rcin.org.pl

Ibalpha-(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. J Biol Chem 275: 7539-7546

46. Burgess JK, Hotchkiss KA, Suter C, Dudman NP, Szolosi J, Chesterman CN, Chong BH, Hogg PJ (2000) Physical proximity and functional association of glycoprotein 1balpha and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. J Biol Chem 275: 9758-9766

47. Essex DW, Li M (2006) Redox modification of platelet glycoproteins. Curr Drug Targets 7: 1233-1241

48. Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH, Jackson SP (2002) Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. J Biol Chem 277: 2965-2972

49. Machin M, Santomaso A, Cozzi MR, Battiston M, Mazzucato M, De Marco L, Canu P (2005) Characterization of platelet adhesion under flow using microscopic image sequence analyzis. Int J Artif Organs 28: 678-685

50. Doggett TA, Girdhar G, Lawshe A, Schmidtke DW, Laurenzi IJ, Diamond SL, Diacovo TG (2002) Selectin-like kinetics and biomechanics promote rapid platelet adhesion in flow: the GPIbα-vWF tether bond. Biophys J 83: 194-205

51. Doggett TA, Girdhar G, Lawshe A, Miller JL, Laurenzi IJ, Diamond SL, Diacovo TG (2003) Alteration in the intrinsic properties of the GPIbα-vVW tether bond define the kinetics of the platelet-type von Willebrand disease mutation, Gly233Val. Blood 102: 152-160

52. Ramachandran V, Nollert MU, Qiu H, Liu W-J, Cummings RD, Zhu C, McEver RP (1999) Tyrosine replacement in P-selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetics and mechanical properties of bonds with P- and L-selectin. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13771-13776

53. Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP (2003) Intracellular calcium communication drives thrombus growth. J Cell Biol 160: 1151-1161

54. Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, Wagner DD (2006) The role of platelet adhesion receptor GPIbalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. Proc Natl Acad Sci USA 103: 16900-16905

55. McEver RP (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. Thromb Haemost 86: 746-756

56. Chauhan AK, Kisucka J, Lamb CB, Bergmeier W, Wagner DD (2007) von Willebrand factor and factor VII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins. Blood 109: 2424-2429

57. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, Ozaki Y (2001) Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. Blood 97: 3836-3845

58. Falati S, Edmead CE, Poole AW (1999) Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor couples physically to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. Blood 94: 1648-1656

59. Cauwenberghs N, Schlammadinger A, Vauterin S, Cooper S, Deschemaeker G, Tornai I, Deckmyn H (2001) Fc-receptor dependent platelet aggregation induced by monoclonal antibodies against platelet glycoprotein Ib or von Willebrand factor. Thromb Haemost 85: 679-685

60. Canobbio I, Bertoni A, Lova P, Paganini S, Hirsch E, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M (2001) Platelet activation by von Willebrand factor requires coordinated signaling through thromboxane A_2 and FcγIIA receptor. J Biol Chem 276: 26022-26029

61. Marshall SJ, Asazuma N, Best D, Wonerow P, Salmon G, Andrews RK, Watson SP (2002) Glycoprotein IIb-IIIa-dependent aggregation by glycoprotein Ibalpha is reinforced by a Src family kinase inhibitor (PP1)-sensitive signaling pathway. Biochem J 361: 297-305

62. Ozaki Y, Qi R, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y (2000) Platelet activation mediated through membrane glycoproteins: involvement of tyrosine kinases. Semin Thromb Hemost 26: 47-51

63. Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK (2006) Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/vWF-induced signaling and GPIb-dependend thrombus formation *in vivo*. Blood 108: 2596-2603

64. Kasirer-Friede A, Moran B, Nagrampa-Orje J, Swanson K, Ruggeri ZM, Schraven B, Neel BG, Koretzky G, Shattil SJ (2007) ADAP is required for normal alphaIIbbeta3 activation by VWF/GPIb-IX-V and other agonists. Blood 109: 1018-1025

65. Canobbio I, Lova P, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M (2002) Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved in different phases of platelet activation by vWF. Thromb Haemost 87: 509-517

66. Canobbio I, Reineri S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M (2004) A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. Thromb Haemost 91: 102-110

67. Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, De Marco L, Ruggeri Z (2002) Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibα mechanoreceptor. Blood 100: 2793-2800

68. Yap CL, Anderson KE, Hughan SC, Dopheide SM, Salem HH, Jackson SP (2002) Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3). Blood 99: 151-158

69. Resendiz JC, Feng S, Ji G, Francis KA, Berndt MC, Kroll MH (2003) Purinergic P2Y12 receptor blockade inhibits shear-induced platelet phosphatidylinositol 3-kinase activation. Mol Pharmacol 63: 639-645

70. Van de Walle GR, Shoolmeester A, Iserbyt BF, Cosemans JM, Heemskerk JW, Hoylaerts MF, Nurden A, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H (2007) Activation of alphaIIbbeta3 is a sufficient but also an imperative prerequisite for activation of alpha2beta1 on platelets. Blood 109: 595-602

71. Jung SM, Moroi M (2001) Platelet collagen receptor integrin $\alpha_2\beta_1$ activation involves differential participation of ADP receptor subtypes P2Y1 and P2Y12 but not intracellular calcium change. Eur J Biochem 268: 3513-3522

72. Cruz MA, Chen J, Whitelock JL, Morales LD, Lopez JA (2005) The platelet glycoprotein Ib-von Willebrandt factor interaction activates the collagen receptor alpha2beta1 to bind collagen: activation dependent conformational change of the alpha2-I domain. Blood 105: 1986-1991

73. Emslay J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC (2000) Structural basis for collagen recognition by integrin α2β1. Cell 100: 47-56

74. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F (2003) Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gamma chain and Fc gamma RIIA. J Biol Chem 278: 32880-32891

75. Jin W, Inoue O, Tamura N, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Berndt MC, Handa M, Goto S, Ozaki Y (2007) A role for glycosphingolipid-enriched microdomains in platelet glycoprotein Ib-mediated platelet activation. J Thromb Haemost 5: 1034-1040

76. Riba R, Oberprieler NG, Roberts W, Naseem KM (2006) Von Willebrand factor activates endothelial nitric oxide synthase in blood platelets by a glycoprotein Ib-dependent mechanism. J Thromb Haemost 4: 2636-2644

77. Gachet C (2001) ADP receptors of platelets and their inhibition. Thromb Haemost 86: 222-232

78. Cosemans JM, Munnix IC, Wetzker R, Heller R, Jackson SP, Heemskerk JW (2006) Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. Blood 108: 3045-3052

79. Mazzucato M, Cozzi MR, Pradela P, Ruggeri ZM, De Marco L (2004) Distinct roles of ADP receptors in von Willebrand factor-mediated platelet signaling and activation under high flow. Blood 10: 3221-3227

80. Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandt R, Siess W (2007) Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonism, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. Thromb Haemost 97: 435-443

81. Liu J, Pestina TI, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK (2005) Botrocetin/VWF-induced signaling through GPIb-IX-V produces TxA2 in an αIIbβ3- and aggregation- independent manner. Blood 105: 2750-2756

http://rcin.org.pl

82. Liu J, Pestina TI, Berndt MC, Steward SA, Jackson CW, Gartner TK (2004) The roles of ADP and TXA_2 in botrocetin/vWF-induced aggregation of washed platelets. J Thromb Haemost 2: 2213-2222

83. Gruner S, Prostredna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C, Nieswandt B (2003) Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. Blood 102: 4021-4027

84. Kralisz U (1995) Receptory kolagenu płytek krwi. Postepy Biochem 41: 188-194

85. Kralisz U (2001) Budowa i funkcje białka CD36. Postepy Biochem 47: 307-317

Involvement of platelet collagen receptors in primary hemostasis

Urszula Kralisz✉, **Marta Stasiak**

Department of Molecular and Medical Biophysics, Medical University in Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

✉e-mail: ulakral@gmail.com

Key words: platelets, collagen, von Willebrand Factor, adhesion, activation

ABSTRACT

At sites of vassel injury, platelets adhere to various components of the subendothelial matrices (SEM). Platelets can interact with several SEM proteins, but of principal importance are collagens and von Willebrand Factor (vWF). The initial entrapment of platelets on subendothelial collagenes requires vWF which under high shear rates conditions created by rapid blood flow present in arteries binds simultaneously to collagen and the platelet glycoprotein complex GPIb/IX/V. Adhered platelets are activated by intracellular signaling pathways and resultant activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ on platelet membranes leads to platelet aggregation by its interaction with vWF or with fibrinogen. The role of GPIb/IX/V for intracellular signaling and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation has remained controversial for a long time. It was assumed that the GPIb/IX/V/vWF interaction only provides a physical force which fixes platelets to SEM, but now it is evident that the GPIb/IX/V complex mediates signaling which leads to platelet activation. This review will address the molecular mechanisms of platelet function with emphasis on the role of vWF and GPIb/IX/V complex in mediating platelet interaction with the vessel wall.

http://rcin.org.pl

Kwas γ-aminomasłowy — metabolizm i jego zaburzenia

Antoni Kowalski✉

Elżbieta Rębas

Ludmiła Żylińska

Zakład Neurochemii Molekularnej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

✉Zakład Neurochemii Molekularnej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. (042) 678 06 20 lub tel./faks (042) 678 24 65 wew. 142, e-mail: antek3000@tlen.pl

Artykuł otrzymano 25 maja 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 3 sierpnia 2007 r.

Słowa kluczowe: kwas γ-aminomasłowy, zaburzenia metabolizmu kwasu γ-aminomasłowego, dekarboksylaza glutaminianowa, aminotransferaza GABA, dehydrogenaza semialdehydobursztynianowa

Wykaz skrótów: GABA — kwas γ-aminomasłowy; GABA-T — aminotransferaza GABA; GAD — dekarboksylaza glutaminianowa; SSADH — dehydrogenaza semialdehydobursztynianowa; GHB — kwas γ-hydroksymasłowy; GHBDH — dehydrogenaza γ-hydroksymaślanowa (reduktaza semialdehydobursztynianowa)

Podziękowanie: Praca została zrealizowana w ramach tematu badawczego nr 503-60862, sfinansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi

STRESZCZENIE

Kwas γ-aminomasłowy (GABA) jest głównym hamującym neuroprzekaźnikiem ośrodkowego układu nerwowego. Przebieg metabolizmu GABA jest zależny od aktywności trzech enzymów: dekarboksylazy glutaminianowej, aminotransferazy GABA i dehydrogenazy semialdehydobursztynianowej. Obniżenie aktywności tych enzymów może być przyczyną wielu chorób neurologicznych, takich jak zespół uogólnionej sztywności, zespół przewlekłego zmęczenia, stany lękowe i napadowe. Artykuł jest przeglądem najważniejszych zagadnień związanych z metabolizmem GABA i jego zaburzeniami.

WPROWADZENIE

Kwas γ-aminomasłowy jest niebiałkowym aminokwasem, pełniącym w ośrodkowym układzie nerwowym funkcję głównego neuroprzekaźnika hamującego. W największym stężeniu występuje w układzie pozapiramidowym oraz w podwzgórzu. Stężenie GABA w mózgu waha się od 10μM do 1mM w szczelinie synaptycznej. W większości dojrzałych neuronów, działając na specyficzne receptory, GABA powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej (hamowanie postsynaptyczne), a także reguluje uwalnianie neuroprzekaźników w synapsach (hamowanie presynaptyczne) [1]. Synteza GABA z glutaminianu jest procesem powiązanym z cyklem Krebsa. Przebieg metabolizmu GABA, w literaturze anglojęzycznej nazywanego *GABA-shunt*, jest zależny od trzech enzymów: dekarboksylazy glutaminianowej, aminotransferazy γ-aminomaślanowej i dehydrogenazy semialdehydobursztynianowej. Znajomość etapów przekształcania GABA, katalizowanych przez te enzymy, ma znaczenie dla zrozumienia genezy wielu chorób neurologicznych.

ROLA DEKARBOKSYLAZY GLUTAMINIANOWEJ

OD α-OKSOGLUTARANU DO GABA

Głównym prekursorem kwasu γ-aminomasłowego jest najważniejszy mózgowy pobudzający neuroprzekaźnik — glutaminian. Jego synteza zachodzi w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową (EC 1.4.1.2) i polega na włączaniu jonu NH_4^+ do α-oksoglutaranu, pochodzącego z cyklu Krebsa. Odwracalność tej reakcji umożliwia uzyskiwanie energii z glutaminianu, jednak proces ten nie jest korzystny ze względu na produkt uboczny — toksyczny dla organizmu amoniak. Sposobem na włączenie glutaminianu do cyklu kwasów trójkarboksylowych, eliminującym powstawanie amoniaku, jest mechanizm *GABA-shunt*, którego pierwszym etapem jest synteza γ-aminomaślanu na drodze dekarboksylacji glutaminianu. Reakcja ta katalizowana jest przez dekarboksylazę glutaminianową (EC 4.1.1.15), a stężenie GABA w komórkach jest wyraźnie zależne od aktywności tego enzymu [1]. W GABAergicznych neuronach stwierdzono występowanie dwóch izoform GAD, będących produktami różnych genów. Pierwsza z nich, o masie cząsteczkowej 65 kDa (GAD_{65}), związana jest głównie z aksonalnym regionem neuronu. Druga, o masie cząsteczkowej 67 kDa (GAD_{67}), rozmieszczona jest w komórce równomiernie, choć występuje w mniejszej ilości niż GAD_{65}. Występowanie tych dwóch form może być związane z obecnością przedziałów w neuronie GABAergicznym, w których zachodzi metabolizm glutaminianu [2]. Ponadto wykazano, że synteza GABA i cykl Krebsa mogą zachodzić z różną intensywnością. Pod tym względem neuronalne mitochondria wykazują zróżnicowanie. W jednych stosunkowo duża produkcja GABA odbywa się kosztem intensywności przemian związanych z cyklem Krebsa, natomiast w pozostałych obserwuje się tendencję odwrotną [3].

DEKARBOKSYLAZA GLUTAMINIANOWA A UKŁAD GLUTAMINERGICZNY

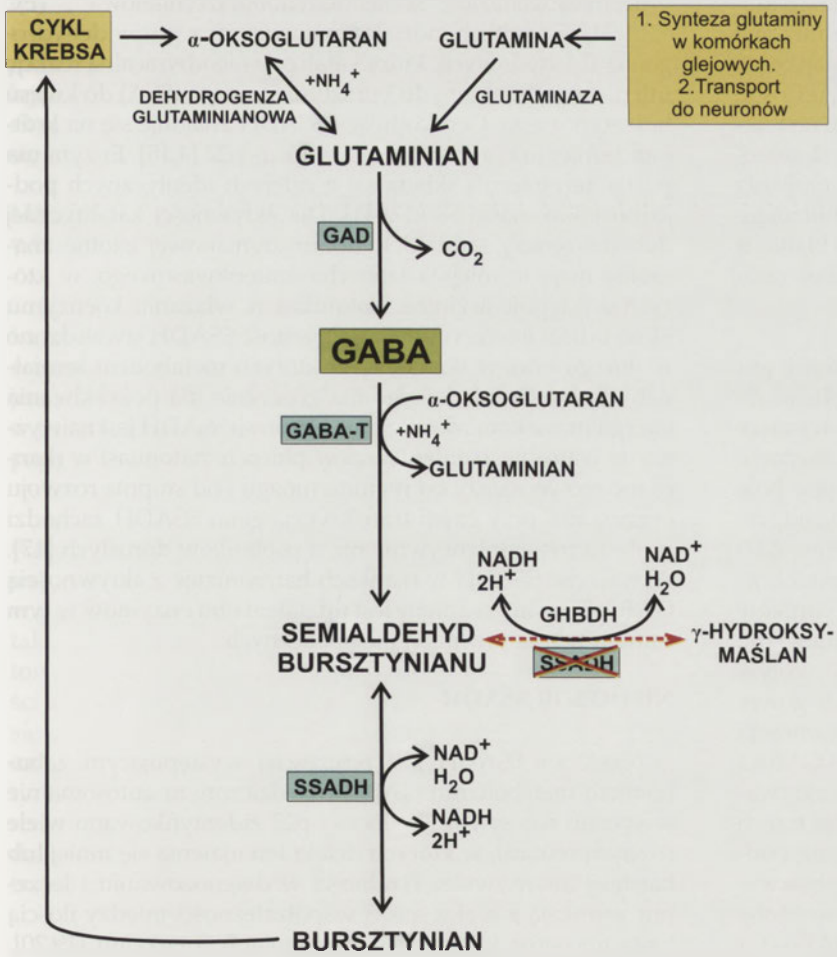
W obrębie układu nerwowego synteza GABA nie zachodzi wyłącznie w neuronach GABAergicznych tworzących układ hamujący. Wykazano bowiem, że

http://rcin.org.pl

glutaminergiczne komórki ziarniste hipokampa posiadają zdolność do przekazywania sygnału hamującego, za czym zdaje się przemawiać obecność GAD oraz wzrost ekspresji GAD_{67}, jaki obserwuje się po napadach drgawkowych, związanych często ze zwiększonym uwalnianiem glutaminianu do szczeliny synaptycznej. Obecność w układzie glutaminergicznym aminotransferazy GABA (przekształcającej GABA w semialdehyd bursztynianu) jest mniej zaskakująca, ze względu na jej dość powszechną obecność w organizmie i związek z transaminacją β-alaniny. Trudno jednak w związku z hipotezą o hamującym potencjale neuronów pobudzających wyjaśnić brak transporterów GABA, których występowanie opisano jedynie dla neuronów GABAergicznych i astrocytów. Z pewnością można jedynie powiedzieć o zachodzeniu syntezy GABA w neuronach glutaminergicznych [2].

GLUTAMINA JAKO PREKURSOR GABA

Rolę prekursora γ-aminomaślanu może odgrywać także glutamina, syntetyzowana w komórkach glejowych, a następnie transportowana do neuronów. Z kolei GABA transportowany jest do komórek glejowych, gdzie przekształcany jest z powrotem w glutaminę [4]. Należy w tym miejscu wspomnieć o roli glutaminazy (EC 3.5.1.2). Enzym ten, zlokalizowany po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrium, katalizuje reakcję hydrolizy glutaminy do glutaminianu. Zadaniem enzymu jest także uwolnienie powstałego glutaminianu do macierzy mitochondrialnej, co tłumaczy lokalizację glutaminazy także po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony. Produktem ubocznym hydrolizy glutaminy jest amoniak. Jego pozytywna rola, np. w nerkach, polega na utrzymaniu równowagi pH, jednak w mózgu konieczne jest usunięcie nadmiaru toksycznego NH_4^+ [5]. Zachodzi to poprzez wspomnianą wcześniej reakcję syntezy glutaminianu z α-oksoglutaranu. W ten sposób synteza GABA odbywa się przez dwa niezależne, choć zbiegające się szlaki. Wykorzystując metodę spektroskopii ^{13}C NMR, wykazano w hodowlach GABAergicznych neuronów kory mózgowej, że intensywność syntezy GABA jest niezależna od tego, czy prekursorem jest glutamina, czy glutaminian [2,6]. Schemat metabolizmu GABA przedstawia rycina 1.



Rycina 1. Schemat metabolizmu GABA. Czerwoną przerywaną strzałką zaznaczono reakcję przebiegającą przy niedoborze dehydrogenazy semialdehydobursztynianowej. Objaśnienia skrótów: GABA - kwas γ-aminomasłowy; GABA-T - aminotransferaza GABA; GAD - dekarboksylaza glutaminianowa; SSADH - dehydrogenaza semialdehydobursztynianowa; GHBDH – dehydrogenaza γ-hydroksymaślanowa (reduktaza semialdehydobursztynianowa).

GAD I CHOROBY NEUROLOGICZNE

Znane są zaburzenia funkcjonowania dekarboksylazy glutaminianowej mające podłoże immunologiczne. Obecność przeciwciał anty-GAD ma prawdopodobnie pewien wpływ na niszczenie komórek trzustkowej wyspy Langerhansa w cukrzycy, jednak przypadkiem lepiej obrazującym skutki obniżonej aktywności GAD jest tzw. zespół uogólnionej sztywności (SPS, *Stiff Person Syndrome*), opisany po raz pierwszy w 1956 roku przez Moerscha i Woltmana [7,8]. Ta rzadka choroba ośrodkowego układu nerwowego charakteryzuje się sztywnością mięśni oraz nieregularnie występującymi, bolesnymi skurczami pojawiającymi się w sytuacjach stresowych lub wywołanymi bodźcami słuchowymi. U około 60% pacjentów z zespołem SPS stwierdzono wysokie stężenie przeciwciał specyficznych dla GAD_{65} i GAD_{67} [9,10]. Za pomocą spektroskopii NMR wykazano skutki ich obecności. W mózgach pacjentów chorych na SPS, w rejonach kory ruchowej i w płacie potylicznym stwierdza się obniżony poziom GABA. Stan pacjentów poprawia się w wyniku działania leków redukujących katabolizm GABA, takich jak Vigabatrin, oraz zwiększających powinowactwo GABA do specyficznych receptorów, np. diazepam [10]. Pojawiają się również hipotezy na temat związku przeciwciał anty-GAD ze skroniową epilepsją oporną na działanie leków [7,9]. Otwartą kwestią pozostaje w jaki sposób dochodzi do powstawania tych przeciwciał [11].

ROLA AMINOTRANSFERAZY GABA

Kwas γ-aminomasłowy jest najważniejszym hamującym neuroprzekaźnikiem występującym w mózgu, dlatego konieczne jest zachowanie jego zrównoważonego poziomu w komórce. Główną drogą katabolizmu GABA jest transaminacja z α-oksoglutaranem, katalizowana przez mitochondrialny enzym, aminotransfe-

http://rcin.org.pl

razę γ-aminomaślanową (EC 2.6.1.19) [12]. Białko to składa się z dwóch jednakowych podjednostek o masie 55kDa [1]. Aktywna forma aminotransferazy związana jest z cząsteczką fosforanu pirydoksalu [13]. W wyniku wspomnianej reakcji powstaje semialdehyd bursztynianu, a α-oksoglutaran przekształcany jest w glutaminian. Aktywność aminotransferazy GABA ma duże znaczenie dla regulacji stężenia obu neuroprzekaźników oraz dla utrzymania równowagi pomiędzy nimi.

GABA-T wykazuje zachowawczą strukturę pierwszorzędową u różnych gatunków ssaków. Aminotransferaza człowieka wyróżnia się stopniem wrażliwości na inhibitor stosowany w leczeniu zaburzeń konwulsyjnych – Vigabatrin [13]. Wyniki badań przeprowadzonych u ssaków pozwalają przypuszczać, że gen kodujący GABA-T występuje w jednej kopii, a sugerowane występowanie co najmniej dwóch wariantów GABA-T jest wynikiem różnicowego cięcia i składania mRNA lub modyfikacji potranslacyjnych [13,14].

ZESPÓŁ NIEDOBORU AMINOTRANSFERAZY GABA

Niedobór aminotransferazy GABA, skutkujący zwiększeniem poziomu GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym, jest rzadką, recesywnie dziedziczoną chorobą. Do najczęściej obserwowanych objawów należą, m.in., stany napadowe, opóźnienie rozwoju psychoruchowego oraz zaburzenia procesów związanych z odżywianiem. Badania mające na celu porównanie sekwencji genu kodującego GABA-T osób zdrowych i rodziny pacjenta przejawiającego obniżoną aktywność białka, pozwoliły określić jedną z mutacji odpowiedzialnych za ten stan. Kluczową rolę dla funkcjonowania enzymu zdają się odgrywać reszty argininy, stabilizujące wiązanie fosforanu pirydoksalu. W zmutowanym białku u badanego pacjenta i jego ojca stwierdzono natomiast podstawienie argininy 220 resztą lizyny [14].

Z niedoborem GABA-T prawdopodobnie związany jest tzw. zespół przewlekłego zmęczenia (CFS, ang. *chronic fatigue syndrome*) [15]. Najczęstsze jego objawy, to trwające przez przynajmniej sześć miesięcy ogólne wyczerpanie organizmu, zaburzenia funkcji poznawczych, ciągłe bóle głowy i mięśni [16]. Pewną rolę w patogenezie mogą odgrywać zakażenia wirusowe, bowiem nasilenie objawów CFS obserwuje się często po przebyciu choroby grypopodobnej [15]. Przebieg choroby jest zmienny i poznanie czynników wywołujących tę chorobę wymaga dalszych badań [16]. Wśród wielu hipotez, jedną z sugerowanych jest wpływ kwasu γ-aminomasłowego. W moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów dotkniętych obniżoną aktywnością GABA-T stwierdza się występowanie dużych ilości GABA i jego strukturalnego analogu, β-alaniny, zdolnej do aktywacji receptora $GABA_A$. U czterech spośród trzydziestu trzech chorych poddanych badaniom stwierdzono znacznie podwyższony poziom β-alaniny. Potwierdzenie tych obserwacji na większej grupie chorych na zespół CFS pozwoliłoby przyjąć wspomnianą hipotezę. Za powiązaniem GABA-T z takimi objawami jak zmęczenie, zaburzenia pamięci, zawroty i bóle głowy przemawia fakt, że są to najczęściej spotykane skutki uboczne działania leków przeciwpadaczkowych, takich jak Vigabatrin (inhibitor GABA-T) oraz benzodiazepiny stymulujące receptory $GABA_A$ [15].

GABA-T W LECZENIU CHORÓB NEUROLOGICZNYCH

Leczenie pewnych chorób neurologicznych, takich jak epilepsja, choroba Parkinsona, Alzheimera, czy pląsawica Huntingtona, polega między innymi na inaktywacji GABA-T, prowadzącej do zwiększenia stężenia GABA w mózgu. Niezdolność małych, hydrofilowych cząsteczek GABA do przekraczania bariery krew-mózg jest powodem, dla którego sam neuroprzekaźnik nie może być stosowany w leczeniu. Poza wspomnianym Vigabatrinem, stosowanym w leczeniu epilepsji, do inhibitorów GABA-T należy 4-hydroksybenzaldehyd, a także, co potwierdzono niedawno, 4-akryloilofenol. Dwa ostatnie związki charakteryzują się strukturą podobną do semialdehydu bursztynianowego i α-oksoglutaranu, przy czym grupę karboksylową zastępuje grupa fenolowa. Ustalono, że wykorzystanie grupy fenolowej do projektowania inhibitorów aminotransferazy GABA, skutkuje powstaniem cząsteczek, które w porównaniu z Vigabatrinem łatwiej przekraczają barierę krew-mózg. Kontynuacja tego kierunku badań w znacznym stopniu może przyczynić się do zwiększenia skuteczności terapii [17].

DEHYDROGENAZA SEMIALDEHYDOBURSZTYNIANOWA

Dehydrogenaza semialdehydobursztynianowa (EC 1.2.1.24) jest mitochondrialnym enzymem z grupy dehydrogenaz aldehydowych, który katalizuje nieodwracalną reakcję utlenienia semialdehydu bursztynianowego (SSA) do kwasu bursztynowego. Gen kodujący SSADH znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 6, w locus p22 [4,18]. Enzym ma postać tetrameru i składa się z czterech identycznych podjednostek o masie 58 kDa [1]. Dla aktywności katalitycznej dehydrogenazy semialdehydobursztynianowej istotne znaczenie mają te miejsca łańcucha aminokwasowego, w których występuje arginina, natomiast w wiązaniu koenzymu biorą udział lizyna i cysteina. Obecność SSADH stwierdzono w mózgu oraz w tkankach, w których metabolizm semialdehydu bursztynianowego ma znaczenie dla pozyskiwania energii przez komórkę. Poziom ekspresji SSADH jest najwyższy w wątrobie, najniższy zaś w płucach, natomiast w tkance mózgowej zależy od regionu mózgu i od stopnia rozwoju organizmu, przy czym transkrypcja genu SSADH zachodzi u płodu mniej intensywnie niż u osobników dorosłych [17]. Aktywność SSADH w tkankach harmonizuje z aktywnością GABA-T, co uzasadnione jest udziałem obu enzymów w tym samym szlaku przemian metabolicznych

NIEDOBÓR SSADH

Niedobór SSADH jest najczęściej występującym zaburzeniem metabolizmu GABA, dziedziczonym autosomalnie w sposób recesywny. W locus 6p22 zidentyfikowano wiele różnych mutacji, w których defekt ten ujawnia się mniej lub bardziej intensywnie. Trudności w diagnozowaniu i leczeniu wynikają z braku ścisłej współzależności między ilością i siłą objawów klinicznych, a aktywnością enzymu [19,20]. Na poziomie biochemicznym niedobór SSADH przejawia się nadmiernym gromadzeniem kwasu γ-hydroksymasłowego (GHB) we krwi, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym. Jest to wynikiem ujawniającego się wtedy działania reduktazy semialdehydobursztynianowej (nazywanej również dehy-

http://rcin.org.pl

drogenazą γ-hydroksymaślanową (EC 1.1.1.61). W zdrowym mózgu zawartość GHB stanowi mniej niż 1% stężenia GABA. Wzrost stężenia tego związku przy niedoborze SSADH jest nawet trzydziestokrotny w porównaniu ze zdrowymi tkankami. Dwu-, trzykrotnie wzrasta również poziom GABA powstającego z nadmiaru semialdehydu bursztynianowego w odwracalnej reakcji katalizowanej przez GABA-T [19]. Reakcja przekształcania SSA do γ-hydroksymaślanu jest odwracalna dzięki aktywności dehydrogenazy GHB, zaś utlenienie γ-hydroksymaślanu jest główną drogą jego degradacji [4,19].

Spośród klinicznych objawów niedoboru dehydrogenazy semialdehydobursztynianowej i nadmiernego stężenia GHB najczęściej występującymi, są: zaburzenia snu, koncentracji, nadpobudliwość, obniżone napięcie mięśniowe, zaburzenia obsesyjno-kompulsywne (nerwica natręctw), stany lękowe i napadowe [4,21]. U połowy pacjentów występują uogólnione napady toniczno-kloniczne i napady nieświadomości [4]. Częstym objawem spotykanymi u dzieci jest ataksja, a także zaburzenia mowy i opóźnienie umysłowe [19]. Leczenie skutków niedoboru SSADH przy użyciu inhibitora aminotransferazy GABA, Vigabatrinu, nie przynosi znaczących efektów, choć istnieją doniesienia o jego skuteczności w odniesieniu do pewnych objawów, przy zastosowaniu małej dawki (25 mg/kg). Pozytywne skutki w leczeniu stanów lękowych i agresji uzyskano, stosując benzodiazepiny, natomiast kwas walproinowy może być stosowany do zahamowania aktywności napadowej. Brak jak dotąd zadowalających informacji na temat w pełni efektywnego leczenia skutków niedoboru SSADH i nadmiernego gromadzenia się kwasu γ-hydroksymasłowego [20].

MECHANIZM DZIAŁANIA KWASU γ-HYDROKSYMASŁOWEGO

Kwas γ-hydroksymasłowy może pełnić funkcję neuroprzekaźnika lub neuromodulatora i w warunkach fizjologicznych występuje w mózgu w stężeniu 1-4 μM. Od 1960 r. stosowany jest w anestezjologii, a w latach 70 poznano jego skuteczność w leczeniu narkolepsji. W latach 90. zyskał złą sławę, stając się popularnym narkotykiem, zwanym „pigułką gwałtu" [22].

Niedawne badania wykazały, że mechanizm przekazywania sygnału przez kwas γ-hydroksymasłowy związany jest z dwoma różnymi receptorami. Potwierdzono występowanie specyficznego metabotropowego receptora GHBR, a także agonistyczne działanie GHB na metabotropowy receptor specyficzny dla GABA ($GABA_B$) [19]. GABA oraz agoniści receptora $GABA_B$ nie wykazują zdolności do wiązania się ze specyficznym receptorem dla γ-hydroksymaślanu, co uznano za fakt wyjaśniający wcześniejsze wątpliwości dotyczące istnienia dwóch różnych receptorów. Wiadomo, że receptor $GABA_B$ obecny jest u człowieka w momencie urodzenia, podczas gdy receptor GHB pojawia się dopiero w trzecim tygodniu życia [19,23].

Wydaje się, że w celu ustalenia skutecznej terapii poszukiwania należałoby skupić wokół związków działających antagonistycznie na receptory GHB. Doświadczenia na myszach pozbawionych genu kodującego SSADH, a także na osobnikach zdrowych, którym podawano śmiertelne dawki kwasu γ-hydroksymasłowego potwierdzają, że GHB działa na dwa rodzaje receptorów w neuronach. Podawanie antagonistów receptora $GABA_B$ (np. SCH 50911 oraz CGP35348) pozwoliło zmniejszyć śmiertelność badanych zwierząt, choć działanie ochronne antagonisty okazało się być niepełnym, co wskazuje na istnienie specyficznego dla GHB receptora. Te wyniki, zdaniem autorów, pozwalają na wysunięcie przypuszczenia, że antagoniści receptora $GABA_B$ mogą mieć skuteczne działanie terapeutyczne w przypadku zatruć kwasem γ-aminomasłowym [24]. Pozytywne efekty uzyskiwano również, stosując związek NCS382, będący antagonistą receptora GHB [22].

Badania przeprowadzone w ostatnich latach przyniosły dość szczegółowy obraz mechanizmów działania GHB. Istnieje hipoteza, według której nasilenie objawów niedoboru SSADH może być spowodowane nie tylko bezpośrednim działaniem GHB na receptory, lecz może następować wskutek przekształcenia części GHB w GABA. Sugeruje się również, że GHB wpływa na uwalnianie GABA lub na zwiększenie liczby receptorów $GABA_B$ na powierzchni neuronu, gwałtownie intensyfikując transport powstałego w komórce białka receptorowego [10]. Z drugiej strony, u myszy z deficytem SSADH zaobserwowano nieprawidłowości w działaniu $GABA_B$ sugerujące, że nadmierne gromadzenie GHB, prowadząc do hiperstymulacji receptora $GABA_B$, skutkuje jego degradacją. U mutantów $SSADH^{-/-}$ zachodzić mogą również potranslacyjne modyfikacje receptora $GABA_B$, zmieniające jego właściwe funkcjonowanie [19]. Toksyczność kwasu γ-hydroksymasłowego wydaje się być wyraźnie związana z oddziaływaniem na receptor $GABA_B$, choć potrzebna jest głębsza weryfikacja sugerowanych hipotez.

Dodatkową interesującą własnością kwasu γ-hydroksymasłowego jest zdolność do regulacji systemu dopaminergicznego. Wykazano, że zmniejszone uwalnianie dopaminy w synapsach jest skutkiem krótkotrwałego działania GHB, zaś długotrwały wpływ GHB na organizm zaznacza się zwiększoną ekspresją genu kodującego dopaminowe receptory D1 i D2. Zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych po podaniu GHB zaobserwowano spadek aktywności ruchowej. W zmniejszonym uwalnianiu dopaminy przy wysokim stężeniu GHB pośredniczy również receptor $GABA_B$, a przeciwdziałanie temu polega na podawaniu jego antagonistów [22].

UWAGI KOŃCOWE

Utrzymanie właściwego stężenia GABA w neuronach i równowagi pomiędzy nim a głównym pobudzającym neuroprzekaźnikiem, jakim jest glutaminian, ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Omówione tu przypadki obejmują zaburzenia działania enzymów katalizujących metabolizm kwasu γ-aminomasłowego, choć nie są to wszystkie choroby, których etiologia związana jest z tym neuroprzekaźnikiem. Niektóre mogą być także spowodowane niewłaściwym funkcjonowaniem receptorów GABAergicznych w synapsach. Mutacje, prowadzące do powstawania zmienionych strukturalnie i funkcjonalnie podjednostek receptora $GABA_A$, mają związek z występującą najczęściej u dzieci epilepsją z napadami nieświadomości, mogą być też przyczyną zespołów lękowych [10]. Nieprawidłowości w działaniu transporterów przechwytujących nadmiar wydzielonych neuroprzekaź-

http://rcin.org.pl

ników ze szczeliny synaptycznej i w ten sposób regulujących ich aktywność, również mogą leżeć u podłoża niektórych chorób [25]. W schizofrenii, poza redukcją aktywności białka GAD_{67} w pewnych regionach mózgu, obserwuje się obniżoną ekspresję białka transporterowego GAT-1 oraz nadekspresję receptora $GABA_A$ w neuronach glutaminianergicznych, a co za tym idzie zwiększoną jego obecność na postsynaptycznych błonach tych neuronów [26].

Ten zapewne niepełny i uproszczony zarys metabolizmu $GABA_A$ i odchyleń od jego właściwego przebiegu powinien wskazywać, jak istotne dla ustalenia skutecznych terapii chorób neurologicznych jest dokładniejsze jego poznanie.

PIŚMIENNICTWO

1. Lachowicz L, Podkul T, Żylińska L (1999) Struktura i funkcje receptora $GABA_A$. Postępy Biol Kom 26: 359-373
2. Waagepetersen HS, Sonnewald U., Schousboe A (1999) The GABA Paradox: Multiple role as metabolite, neurotransmitter and neurodifferentiative agent. J Neurochem 73: 1335-1342
3. Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A (1998) Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. J Cereb Blood Flow Metab 18: 231-237
4. Pearl PL, Capp PK, Novotny EJ, Gibson KM (2005) Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults. Clin Biochem 38: 1051-1058
5. Kvamme E, Roberg B, Torgner IA (2000) Glutamine transport in brain mitochondria. Neurochem Int 37: 131-138
6. Westergaard N, Sonnewald U, Petersem SB, Schousboe A (1995) Glutamate and glutamine metabolism in cultured GABAergic neurons studied by ^{13}C NMR spectroscopy may indicate compartmentation and mitochondrial heterogeneity. Neurosci Lett 185: 24-28
7. Kwan P, Graeme JS, Kelly K, Butler E, Brodie MJ (2000) Glutamic acid decarboxylase in controlled and uncontrolled epilepsy: a pilot study. Epilepsy Res 42: 191-195
8. Burns TM (2005) A step forward for stiff-person syndrome. Lancet 365: 1365-1367
9. Giometto B, Nicolao P, Macucci M, Tavolato B, Foxon R, Bottazzo GF (1998) Temporal-lobe epilepsy associated with glutamic-acid-decarboxylase autoantibodies. Lancet 352: 457
10. Wong CGT, Bottiglieri T, Snead OC (2003) GABA, γ-hydroxybutrytic acid, and neurological disease. Ann Neurol 54: S3-12
11. Ueno H (2000) Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. J Mol Catal 10: 67-79
12. Storici P, De Biase D, Bossa F, Bruno S, Mozarelli A, Peneff C, Silverman RB, Schrimer T (2004) Structures of gamma-aminobutritic acid (GABA) aminotransferase, a pirydoxal 5'-phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with gamma-ethynyl-BABA and with antiepilepsy drug vigabatrin. J Biol Chem 279: 363-373
13. Jeon SG, Bahn JH, Jang JS, Jang SH, Lee BR, Lee KS, Park J, Kang TC, Won MH, Kim HB, Kwo OS, Cho SW, Choi SY (2001) Molecular cloning and functional expression of bovine brain GABA transaminase. Mol Cells 12: 91-96
14. Medina-Kauwe LK, Nyhan WL, Gibson KM, Tobin AJ (1998) Identification of a familial mutation associated with GABA-transaminase deficiency disease. Neurobiol Dis 5: 89-96
15. Hannestad Ulf, Theodorsson E, Evengard B (2007) β-alanine and γ-aminobutrytic acid in chronic fatigue syndrome. Clin Chim Acta 376: 23-29
16. Prins JB, van der Meer JMW, Bleijenberg G (2006) Chronic fatigue syndrome. Lancet 367: 346-355
17. Tao YH, Xu HB, Yang XL (2006) Inactivation of GABA transaminase by 4-acryloylphenol. Bioorg Med Chem Lett 16: 3719-3722
18. Kang JH, Park YB, Huh TL, Lee WH, Choi MS, Kwon OS (2005) High-level expression and characterization of the recombinant enzyme, and tissue distribution of human succinic semialdehyde dehydrogenase. Protein Expr Purif 44: 16-22
19. Buzzi A, Wu Y, Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Cortez MA, Liu CC, Shen LQ, Gibson KM, Snead OC 3rd (2006) Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: $GABA_B$ receptor-mediated function. Brain Res 1090: 15-22
20. Gordon N (2004) Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADH) (4-hydroxybutyric aciduria, gamma-hydroxybutyric aciduria). Eur J Paediatr Neurol 8: 261-265
21. Jansen EE, Verhoeven NM, Jakobs C, Schulze A, Senephansiri H, Gupta M, Snead OC, Gibson KM (2006) Increased guanidino species in murine and human succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. Biochim Biophys Acta 1762: 494-498
22. Wong CG, Gibson KM, Snead OC 3rd (2004) From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. Trends Pharmacol Sci 25: 29-34
23. Crunelli V, Emri Z, Leresche N (2005) Unravelling the brain targets of γ-hydroxybutritic acid. Curr Opin Pharmacol 6: 44-52
24. Carai MA, Colombo G, Gessa GL (2004) Protection by the $GABA_B$ receptor antagonist, SCH 50911, of gamma-hydroxybutyric acid-induced mortality in mice. Eur J Pharmacol 503: 77-80
25. Soudijn W, Wijngaarden I (2000) The GABA transporter and its inhibitors. Curr Med Chem 7: 1063-1079
26. Morrison PD, Murray RM (2005) Schizophrenia. Curr Biol 15: 980-984

Gamma-aminobutyric acid — metabolism and its disorders

Antoni Kowalski✉, Elżbieta Rębas, Ludmiła Żylińska

Department of Molecular Neurochemistry, Chair of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

✉e-mail: antek3000@tlen.pl

Key words: gamma-aminobutyric acid, disorders of gamma- aminobutyric acid metabolism, glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase

ABSTRACT

Gamma-aminobutyric acid is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABA metabolism is dependent on the activity of three enzymes: glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase and succinic semialdehyde dehydrogenase. Decreased activity of these enzymes may cause many neurological syndromes, such as stiff-person syndrome, chronic fatigue syndrome, anxiety disorders and seizures. This article is a review of most important problems related to an impairment of GABA metabolism.

http://rcin.org.pl

Gen *MDR1* (*ABCB1*) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABC: znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów

Mariusz Panczyk✉

Aleksandra Sałagacka

Marek Mirowski✉

Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny, Łódź

✉Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny, ul. Muszyńskiego 1, 90-151, Łódź; tel./faks (042) 677 91 30, e-mail: mario-pan@wp.pl; mirowski@ich.pharm.am.lodz.pl

Artykuł otrzymano 13 kwietnia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 10 maja 2007 r.

Słowa kluczowe: transportery ABC, gen *MDR1*, glikoproteina P, lekooporność

Wykaz skrótów: ABC (ang. *ATP-binding cassette*) – kaseta wiążąca ATP; *MDR1* (ang. *multidrug resistance gene 1*) – gen kodujący białko oporności wielolekowej; NBD (ang. *nucleotide binding domain*) – domena wiążąca nukleotydy; P-gp – glikoproteina P; SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczych nukleotydów; TMD (ang. *transmembrane domain*) – domena transbłonowa

Podziękowanie: Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych (P05F 02628 i N N 405 3416 33) oraz z badań statutowych UM w Łodzi (503-3015-2)

STRESZCZENIE

Glikoproteina P (P-gp) jest transporterem błonowym, należącym do nadrodziny białek ABC. Białko to funkcjonuje jako ATP-zależna pompa, która usuwa lipofilowe cząsteczki do środowiska zewnątrzkomórkowego. P-gp została odkryta w komórkach chomiczego raka jajnika (CHO), gdzie powodowała oporność na leki przeciwnowotworowe. Fizjologicznie występuje, m.in., w organach wydzielniczych i współtworzy bariery tkankowe. P-gp transportuje wiele strukturalnie różniących się leków, w tym szereg leków przeciwnowotworowych. Na poziom P-gp w komórce mogą wpływać czynniki środowiskowe oraz mutacje zlokalizowane w genie *MDR1* kodującym to białko. Istnienie niezrównoważonego sprzężenia między polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu *MDR1* wynika ze współdziedziczenia tych SNPs w ramach jednego haplotypu. Polimorfizm genu *MDR1* może mieć wpływ na biodostępność leków będących substratami P-gp, a tym samym decydować o skuteczności farmakoterapii. Ponadto, P-gp pełni funkcję ochronną przed kancerogenami zawartymi w żywności lub wydalanymi z moczem. Zamiana aktywności i/lub syntezy P-gp może być czynnikiem etiologicznym chorób nowotworowych.

WPROWADZENIE – BIAŁKA TRANSPORTUJĄCE LEKI

Biodostępność oraz osiągnięcie odpowiedniego stężenia leku w pobliżu miejsca jego uchwytu jest wypadkową poziomu syntezy i aktywności enzymów metabolizujących leki oraz białek błonowych odpowiedzialnych za ich transport. Wieloletnie badania wskazują na znaczący udział aktywnych pomp błonowych w absorpcji, dystrybucji i eliminacji bardzo dużej grupy leków stale stosowanych w codziennej praktyce klinicznej [1].

Transportery błonowe należą do ważnej grupy białek odpowiedzialnych za regulację przepływu różnych substancji, zarówno endogennych, jak i ksenobiotyków między komórką a jej otoczeniem. Tylko niewielka grupa spośród wszystkich znanych białek transportowych związana jest z transportem leków. Są one zlokalizowane w obrębie takich narządów, jak: jelito [2], wątroba [3], nerki [4], łożysko [5] i mózg [6], a więc w tych miejscach, które są kluczowe dla dystrybucji i eliminacji leków z organizmu. Obszerna charakterystyka transporterów oraz informacje o ich udziale w przenoszeniu leków i substancji endogennych są dostępne na stronie: http://www.med.rug.nl/mdl/links/links_transporters.htm (Tab. 1) [1].

NADRODZINA TRANSPORTERÓW ABC

Najważniejszą i najlepiej poznaną grupą transporterów leków są białka nadrodziny ABC. Białka te uzyskują w procesie hydrolizy ATP energię, którą wykorzystują do przenoszenia różnych cząsteczek przez błony cytoplazmatyczne. Podstawą klasyfikacji tych protein jest sekwencja i organizacja domen wiążących ATP, zwanych domenami NBD (ang. *nucleotide binding domain*). Domeny te zawierają w swojej budowie charakterystyczne motywy Walkera A i B, oddzielone polipeptydowym fragmentem długości 90–120 reszt aminokwasowych. Dodatkowo, białka nadrodziny ABC zawierają motyw Walkera C, zwany regionem podpisu (ang. *signature region*), poprzedzający motyw Walkera B (Ryc. 1) [7].

Typowy transporter ABC posiada dwie domeny NBD i dwie domeny transbłonowe TMD (ang. *transmembrane domain*). W budowie domeny TMD możemy wyróżnić od 6 do 11 α-helikalnych fragmentów odpowiedzialnych za specyficzność substratową transportera. Liczba TMD i NBD może być różna dla poszczególnych transporterów

Rycina 1. Budowa domeny NBD, elementu wiążącego nukleotydy w transporterach nadrodziny ABC. Najczęściej spotykane reszty aminokwasów podano powyżej diagramu.

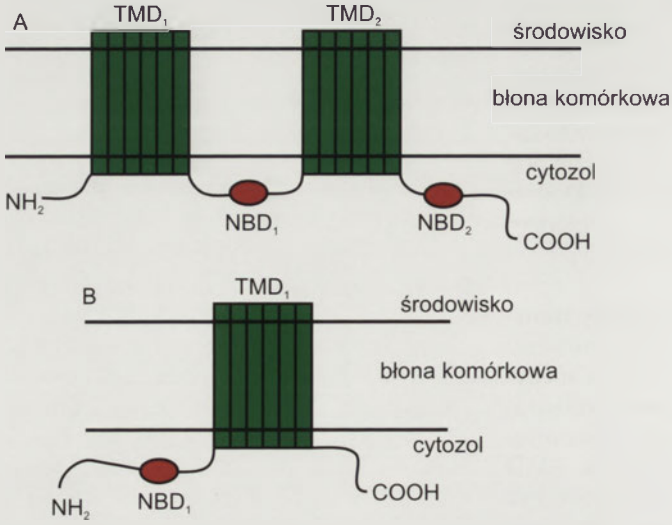
http://rcin.org.pl

Tabela 1. Rodziny białek biorących udział w transporcie leków.

Rodzina	Transportery	Funkcja
ABC (ang. *ATP-binding cassette family*)	ABCB1 (MDR1) ABCC1 (MRP1) ABCC2 (MRP2) ABCC3 (MRP3) ABCC4 (MRP4) ABCC5 (MRP5) ABCC6 (MRP6) ABCG2 (BCRP)	białka posiadające domenę wiążącą ATP, ATP-zależne pompy, białka transportujące aniony i obojętne cząsteczki lipofilowe
OAT (ang. *organic anion transporter family*)	OAT1 OAT2 OAT3 OAT4	białka transportujące aniony organiczne
OCT (ang. *organic cation transporter family*)	OCT1 OCT2 OCT3 OCTN1 OCTN2	białka transportujące kationy organiczne
OATP (ang. *organic anion transporting polypeptide family*)	OATP-A OATP-B OATP-C OATP-D OATP-E OATP-F OATP8	polipeptydowe transportery przenoszące aniony organiczne, pompy zależne od jonów sodowych
PepT (ang. *peptide transporter family*)	PeptT1 PeptT2	białka transportujące peptydy

ABC. Opisano transportery składające się z dwóch domen TMD i dwóch domen NBD (Ryc. 2A). Są to funkcjonalnie kompetentne transportery (np. MDR1). Opisano również transportery, które zawierają tylko jedną domenę TMD i jedną domenę NBD (Ryc. 2B), tzw. hemitransportery (półtransportery) (np. białko BCRP). Ten typ transporterów zyskuje aktywność dopiero po utworzeniu homo- lub heterodimeru. Istnieją również transportery o budowie zredukowanej (zawierają pojedynczy TMD lub NBD przy zachowaniu podwójnej drugiej domeny) oraz transportery rozbudowane, np. białka rodziny MRP [7].

Rola białek transportowych ABC nie została dotąd w pełni poznana, wykazano jednak ich udział w pobieraniu substancji odżywczych, takich jak: węglowodany, aminokwasy, witaminy czy jony metali u bakterii. Postuluje się również udział tych białek w utrzymaniu homeostazy komórkowej poprzez uczestniczenie w metabolizmie ksenobiotyków oraz udział w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych [8-10].



Rycina 2. Struktura białek transportowych: P-gp o budowie pełnego transportera (A), BCRP o budowie półtransportera (B).

Ludzkie geny kodujące białka transportowe ABC zostały sklasyfikowane przez Human Genome Organization (HUGO) (Tab. 2) [11]. Szczegółowy opis oraz przyjęte nazewnictwo genów i białek tej rodziny można znaleźć na stronie: http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm

Szereg genów nadrodziny *ABC* zostało odkrytych i opisanych przy okazji poszukiwania genetycznych przyczyn chorób. Niektóre mutacje w tych genach są letalne lub znacznie skracają czas życia. Jedną z lepiej poznanych chorób jest mukowiscydoza, wywołana mutacją genu *CFTR*, kodującego białko pełniące funkcję transportera jonów chlorkowych (Tab. 3) [12].

Komórki eksponowane na działanie związków toksycznych wykształcają mechanizmy obronne oparte na transporcie przez ATP-zależne pompy błonowe MDR1, MRP1 czy BCRP (Tab. 4). Są one szczególnie widoczne w liniach komórkowych różnych typów nowotworów, które wykazują oporność krzyżową na wiele cytostatyków. Zjawisku temu towarzyszy nasilona ekspresja genów kodujących te białka [13].

Trzy główne białka transportowe (MDR1, MRP1, BCRP) są bezpośrednią przyczyną obserwowanej w praktyce klinicznej oporności wielolekowej. Odpowiadają one za transport wielu, strukturalnie i funkcjonalnie odmiennych cytostatyków, takich jak: mitoksantron, topotekan czy metotreksat [13].

Eksperymenty z selektywnymi inhibitorami pomp błonowych zaangażowanych w oporność wielolekową wykazały, że w wielu powszechnie występujących guzach nowotworowych obserwuje się znaczną syntezę tych białek [14]. Wydaje się więc, że zastosowanie inhibitorów jako modulatorów odpowiedzi na chemioterapię powinno zwiększyć cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych, będących substratami transporterów ABC.

W komórkach rakowych (piersi, jajnika, jelita grubego i białaczkach) poddanych działaniu antracykliny, etopozydu czy kamptotecyny zaobserwowano indukcję MRP1 (Tab. 4). Wykazano istnienie związku pomiędzy ekspresją *MRP1* a wynikami leczenia tych nowotworów [15-19].

W liniach komórkowych raka wątroby [20] i transfekowanych liniach komórek nerek HEK-293 [21] odnotowano obecność transportera o podobnym do MRP1 spektrum substratowym (antracykliny, alkaloidy *Vinca*, kamptotecyna i

http://rcin.org.pl

Tabela 2. Lista genów *ABC* człowieka, ich lokalizacja chromosomowa oraz funkcja białek.

Nazwa	Nazwa alternatywna	Lokalizacja chromosomowa	Funkcja
ABCA1	*ABC1*	9q31.1	transport cholesterolu do HDL
ABCA2	*ABC2*	9q34.3	oporność lekowa
ABCA3	*ABC3, ABCC*	16p13.3	wydzielanie surfaktantu
ABCA4	*ABCR*	1p21.3	transport retinalu
ABCA5		17q24.3	brak danych
ABCA6		17q24.3	brak danych
ABCA7		19p13.3	brak danych
ABCA8		17q24.3	brak danych
ABCA9		17q24.3	brak danych
ABCA10		17q24.3	brak danych
ABCA12		2q34	brak danych
ABCA13		7p12.3	brak danych
ABCB1	*MDR1, PGY1*	7q21.12	oporność wielolekowa
ABCB2	*TAP1*	6p21.3	transport peptydów
ABCB3	*TAP2*	6p21.3	transport peptydów
ABCB4	*MDR3, PGY3*	7q21.12	transport fosfolipidów
ABCB5		7q21.1	brak danych
ABCB6	*MTABC3*	2q35	transport żelaza
ABCB7	*ABC7*	Xq21-q22	transport hemu
ABCB8	*MABC1*	7q36.1	transport hemu
ABCB9		12q24.31	brak danych
ABCB10	*MTBC2*	1q42.13	brak danych
ABCB11	*SPGP*	2q24.3	transport soli żółciowych
ABCC1	*MRP1*	16p13.12	oporność lekowa
ABCC2	*MRP2*	10q24.2	transport organicznych anionów
ABCC3	*MRP3*	17q21.33	oporność lekowa
ABCC4	*MRP4*	13q32.1	transport jądrowy
ABCC5	*MRP5*	3q27.1	transport jądrowy
ABCC6	*MRP6*	16p13.12	brak danych
CFTR	*ABCC7*	7q31.31	chlorkowy kanał jonowy
ABCC8	*SUR*	11p15.1	receptor sulfonylomocznika
ABCC9	*SUR2*	12p12.1	regulator pompy potasowej
ABCC10	*MRP7*	6p21.1	brak danych
ABCC11		16q12.1	brak danych
ABCC12		16q12.1	brak danych
ABCD1	*ALD*	Xq28	regulator transportu VLCFA
ABCD2	*ALDL1, ALDR*	12q11	brak danych
ABCD3	*PXMP1, PMP70*	1p22.1	brak danych
ABCD4	*PMP69, P70R*	14q24.3	brak danych
ABCE1	*OABP, RNS41*	4q31.31	białko wiążące poli-A
ABCF1	ABC50	6p21.1	brak danych
ABCF2		7q36.1	brak danych
ABCF3		3q27.1	brak danych
ABCG1	*ABC8, White*	21q22.3	transport cholesterolu
ABCG2	*ABCP, MXR, BCRP*	4q22	oporność wielolekowa
ABCG4	*White 2*	11q23	brak danych
ABCG5	*White 3*	2p21	transport steroli
ABCG8		2p21	transport steroli

epipodofilotoksyny) (Tab. 4). Jakkolwiek MRP2 zmniejsza stężenie wymienionych leków wewnątrz komórki, to nie zanotowano nadekspresji *MRP2* w liniach komórkowych opornych na te cytostatyki. Podstawowa różnica między MRP1 a MRP2 jest związana z transportem i opornością na *cis*-platynę. Zaobserwowano 4-6 razy wyższą ekspresję *MRP2* w opornej na *cis*-platynę linii komórkowej KB raka szyi i głowy przy równoczesnym zmniejszeniu wewnątrzkomórkowego stężenia *cis*-platyny [22].

Na udział białka MRP3 w oporności na etopozyd i tenipozyd (epipodofilotoksyny) wskazują badania na opornej linii komórkowej transfekowanej genem kodującym to białko. W przeciwieństwie do MRP1 i MRP2, MRP3 nie wykazuje specyficzności substratowej dla metabolitów leków sprzężonych z glutationem [23].

Fizjologiczną funkcją białek MRP4 i MRP5 jest transport cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) [24]. Analiza transfekowanych linii komórkowych NIH3T3 wskazuje na udział tych transporterów w oporności na cytostatyki z grupy analogów nukleotydów (6-merkaptopuryna, 6-tioguanina) [25]. W badaniach transfekowanej linii LLC-PK1 wykazano, że MRP8 jest związany z transportem analogów purynowych, np. PMEA, jak i pochodnych pirymidynowych, np. 5-fluorouracyl [26]. Wstępne wyniki badań nad transfekowanymi liniami CHO sugerują udział MRP6 w transporcie etopozydu i tenipozydu. Zaobserwowano również małą oporność w stosunku do antracyklin i *cis*-platyny [27].

Doyle i wsp. opisali w 1998 roku w linii komórkowej raka piersi MCF-7 nowy półtransporter z nadrodziny ABC – BCRP (ABCG2) [28]. Zaobserwowano również obecność tego transportera w liniach nowotworowych wyselekcjonowanych doksorubicyną z dodatkiem inhibitora (werapamil). Wysoką ekspresję *BCRP* (*ABCG2*) stwierdzono także w opornych na mitoksantron komórkach S1-M1-80 ludzkiego raka jelita grubego [29] oraz w łożysku [30]. Spektrum substratowe BCRP jest bardzo szerokie i obejmuje główne leki przeciwnowotworowe, co sugeruje jego zaangażowanie w rozwój lekooporności komórek rakowych [31].

Należy pamiętać, że białka nadrodziny ABC nie są jedyną przyczyną niepowodzenia farmakoterapii przeciwnowotworowej. Jednak zastosowanie modulatorów czynności tych transporterów pozwoli być może na zwiększenie liczby chorych pozytywnie odpowiadających na chemioterapię i przyczyni się do wydłużenia czasu przeżycia pacjentów.

GEN *MDR1* (*ABCB1*) I KONTROLA JEGO TRANSKRYPCJI

Lokalizację chromosomową genów *MDR1* i *MDR2* (obecnie *MDR3*) ustalił w 1986 roku Fojo i wsp., wykorzystując technikę hybrydyzacji DNA. Geny *MDR1* (*ABCB1*) i *MDR3* (*ABCB4*) człowieka są położone blisko siebie na chromosomie 7q21.12 [32]. W przeciwieństwie do P-gp kodowanej przez gen *MDR1*, białko MDR3 funkcjonuje jako flipaza (ang. *phosfolipid-translocating P-type ATP-ase*), transportująca fosfolipidy, i jego funkcja nie jest związana z wystąpieniem zjawiska oporności wielolekowej. U gryzoni wyróżniono trzy geny: *mdr1a, mdr1b i mdr1c*. U myszy geny te tworzą klaster zlokalizowany na 5 chromosomie, natomiast u szczura znajduje się w regionie 4q11.12. Oba produkty białkowe u

http://rcin.org.pl

Tabela 3. Choroby związane ze zmianami w genach *ABC*.

Gen	Choroba	Podłoże molekularne (numer OMIM)*
ABCA1	choroba wyspy Tanger (α-lipoproteinemia)	600046
ABCA4	zwyrodnienie plamki żółtej (AMD)	248200
ABCB2	zespół nagich limfocytów (BLS)	170260
ABCB3	ziarniniakowatość Wegnera	170261
ABCB4	postępująca rodzinna cholestaza	171060
ABCB11	wewnątrzwątrobowa (PFIC)	603201
ABCB7	dziedziczna niedokrwistość syderoblastyczna (XLSA/A)	300135
ABCC2	żółtaczka Dubin-Johnson (DJS)	601107
ABCC6	*Pseudoxanthoma Elasticum* (GSS)	603234
ABCC7	mukowiscydoza (CF)	602421
ABCC8	rodzinna hipoapolipoproteinemia	600509
ABCD1	adrenoleukodystrofia (ALD)	300100
ABCG5	sitosterolemia	605459
ABCG8		605460

AMD – ang. *agerelated macular degeneration*; BLS – ang. *bare lymphocyte syndrome*; PFIC – ang. *progressive familial intrahepatic cholestasis*; XLSA/A – ang. *X-linked sideroblastic anemia and ataxia*; DJS – ang. *Dubin-Johnson syndrome*; GSS – ang. *Gronblad-Strandberg Syndrome*; CF – ang. *cystic fibrosis*; ALD – ang. *Adrenoleucodystrophy*; *baza OMIM dostępna pod adresem: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim

gryzoni, mdr1a i mdr1b pełnią funkcję analogiczną do P-gp człowieka, natomiast białko mdr1c odpowiada funkcjonalnie transporterowi MDR3 człowieka [33].

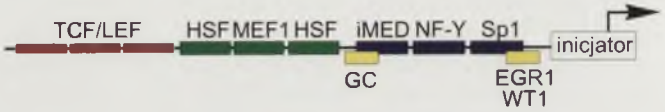
Gen *MDR1* składa się z 28 eksonów, których wielkość zawiera się w granicach od 49 do 587 pz, natomiast cDNA ma długość 4.5 kz. *MDR1* należy do grupy genów, które nie posiadają kasety TATA (ang. *TATA box*) w obrębie proksymalnej części regionu promotorowego. Podstawowa kontrola ekspresji tych genów jest związana z obecnością sekwencji inicjatora (Inr), który obejmuje miejsce startu transkrypcji (+1) i prawdopodobnie odpowiada za utworzenie preinicjującego kompleksu polimerazy RNA II (RNA Pol II). Pierwsze badania *in vitro* dotyczące Inr promotora *MDR1* wykazały, że sekwencja -132 do +82 jest wystarczająca do kontroli ekspresji oraz, że delecja poniżej pozycji +5 znacznie zmniejsza ilość transkryptu. Ponadto, badania *in vivo* dowiodły, że sekwencja od -6 do +11 jest wystarczająca dla zainicjowania procesu transkrypcji [34].

Podobnie jak inne geny pozbawione sekwencji $TATA_{box}$, promotor *MDR1* zawiera odwróconą sekwencję CCAAT (pozycja od -82 do -73) [35] oraz wyspy bogate w CG (pozycja od -56 do -43), które oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi rodziny Sp [36]. Analiza transfekowanych linii komórkowych dowodzi istotnego znaczenia obu tych pozycji w regulacji transkrypcji *MDR1*. Opisano również inny region bogaty w wyspy CG w pozycji od -110 do -103, który oddziałuje z nieznanym kompleksem białkowym [37], oraz region iMED1 (ang. *multiple start site element downstream 1*), którego sekwencja pokrywa się w części z wyżej opisaną (-110 do -103). Ponadto, region iMED1 jest zaangażowany w aktywację genu *MDR1* w komórkach z fenotypem lekooporności (Ryc. 3) [38].

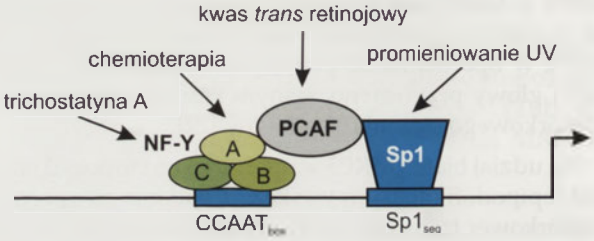
Białko MEF1 (ang. *MDR1 promoter-enhancing factor 1*) o masie 130 kDa jest prawdopodobnie zaangażowane w mechanizm nadekspresji *MDR1* w lekoopornych liniach komórkowych HL-60 i MCF-7/ADR [39]. W sąsiedztwie regionu bogatego w wyspy CG znajdują się również miejsca wiązania czynników EGR-1 (ang. *early growth response 1*) i WT-1 (ang. *Wilm's tumor suppresor protein*). Czynnik WT-1 działa hamująco na transkrypcję *MDR1*, podczas gdy EGR-1 działa jako induktor ekspresji w sytuacji narażenia na chemiczny czynnik aktywujący [40]. W pozycji -1813 do -275 opisano sekwencję mająca powinowactwo do kompleksu transkrypcyjnego TCF/LEF (ang. *T cell factor/lymphoid enhancer factor*). Jednym z koaktywatorów tego kompleksu jest β-katenina, której akumulację notuje się u pacjentów z mutacjami w genie supresorowym *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*). Można więc przypuszczać, że istnieje związek między obecnością mutacji genu *APC* a nadekspresją *MDR1* w rakach jelita grubego [41].

Na ekspresję genu *MDR1* wpływają takie czynniki środowiskowe, jak: cytostatyki, szok termiczny, metale ciężkie, promieniowanie UV i X [42]. W regionie promotorowym (-178 do -152 oraz -99 do -66) zidentyfikowano sekwencje HSE (ang. *heat shock element*) wiążące HSF (ang. *heat shock factor*). W pozycji -315 do -285 wykazano obecność miejsca wiązania czynnika HSF1. W sytuacji narażenia na takie czynniki stresowe, jak: promieniowanie UV, kwas *trans* retinowy czy chemioterapeutyki, z sekwencją tą oddziałują również inne czynniki transkrypcyjne zaangażowane w kontrolę ekspresji *MDR1* (Ryc. 4) [38].

Liczne leki i hormony steroidowe mogą indukować ekspresję *MDR1* [43]. Wzrost poziomu ekspresji genu kodującego P-gp odnotowano pod wpływem ryfampicyny. Dowiedziono, że po zastosowaniu induktora wzrasta poziom

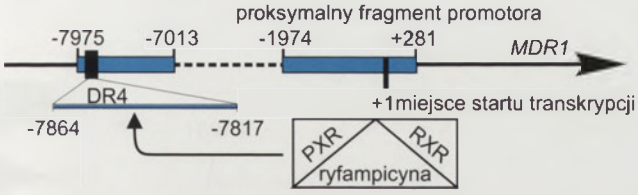


Rycina 3. Elementy budowy promotora i sekwencje wiążące czynniki mające wpływ na regulację transkrypcji *MDR1*.



Rycina 4. Sekwencja promotorowa zaangażowana w kontrolę ekspresji *MDR1* w sytuacji narażenia na czynniki środowiskowe. *Sp1* – ang. *specificity protein 1*; *PCAF* – ang. *associated factor 65 alpha*; *NF-Y* – ang. *nuclear transcription factor Y*.

http://rcin.org.pl



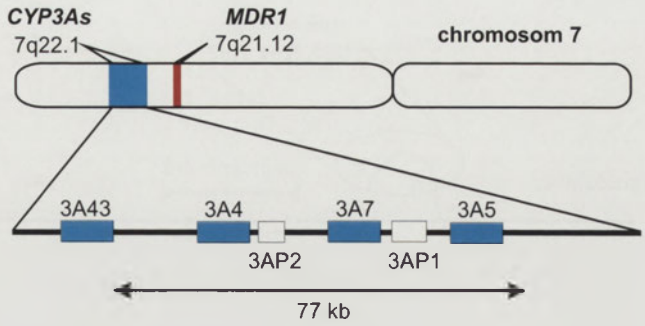
Rycina 5. Miejsce indukcji przez ryfampicynę transkrypcji genu *MDR1*.

transkrypcji, co wiąże się ze wzrostem ilości mRNA [44]. W badaniach na linii komórek raka jelita grubego człowieka LS174T ustalono, że indukcja transkrypcji *MDR1* pod wpływem ryfampicyny odbywa się w wyniku wiązania cząsteczki leku z receptorem PXR (ang. *pregnane X receptor*) w cytosolu komórki. Powstały kompleks, po przejściu do jądra, wiąże się z RXRα (ang. *retinoid X receptor* α) i następnie oddziałuje z motywem DR4 zlokalizowanym w pozycji -7864 do -7817 promotora *MDR1* (Ryc. 5) [45].

Wiele leków będących substratami dla P-gp jest również metabolizowanych przez izoenzymy cytochromu P-450, a w szczególności CYP3A4. Częściowe pokrywanie się spektrum substratowego P-gp i CYP3A4 idzie w parze ze wspólną lokalizacją genów *MDR1* i *CYP3A4* na chromosomie 7q21.12 i 7q22.1 (Ryc. 6). Wskazuje się również na wspólną regulację ekspresji obu genów i koordynację procesów w takich narządach, jak wątroba i jelito, zaangażowanych w ochronę organizmu przed toksycznym działaniem ksenobiotyków, leków czy toksyn zawartych w żywności [46].

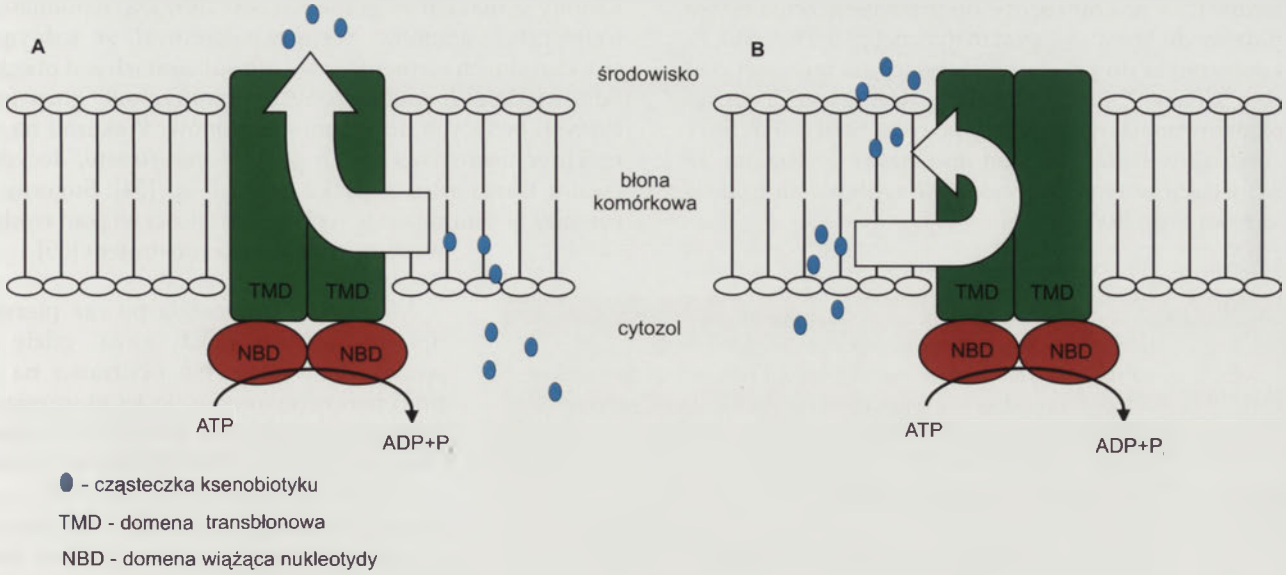
BUDOWA I FUNKCJA GLIKOPROTEINY P

Glikoproteina-P (P-gp, MDR1) należy do nadrodziny białek błonowych ABC. Została po raz pierwszy opisana w 1976 roku w kulturach komórkowych z fenotypem lekooporności [47]. P-gp ma masę 170kDa i jest ufosforylowanym i uglikozylowanym białkiem zawierającym 1280



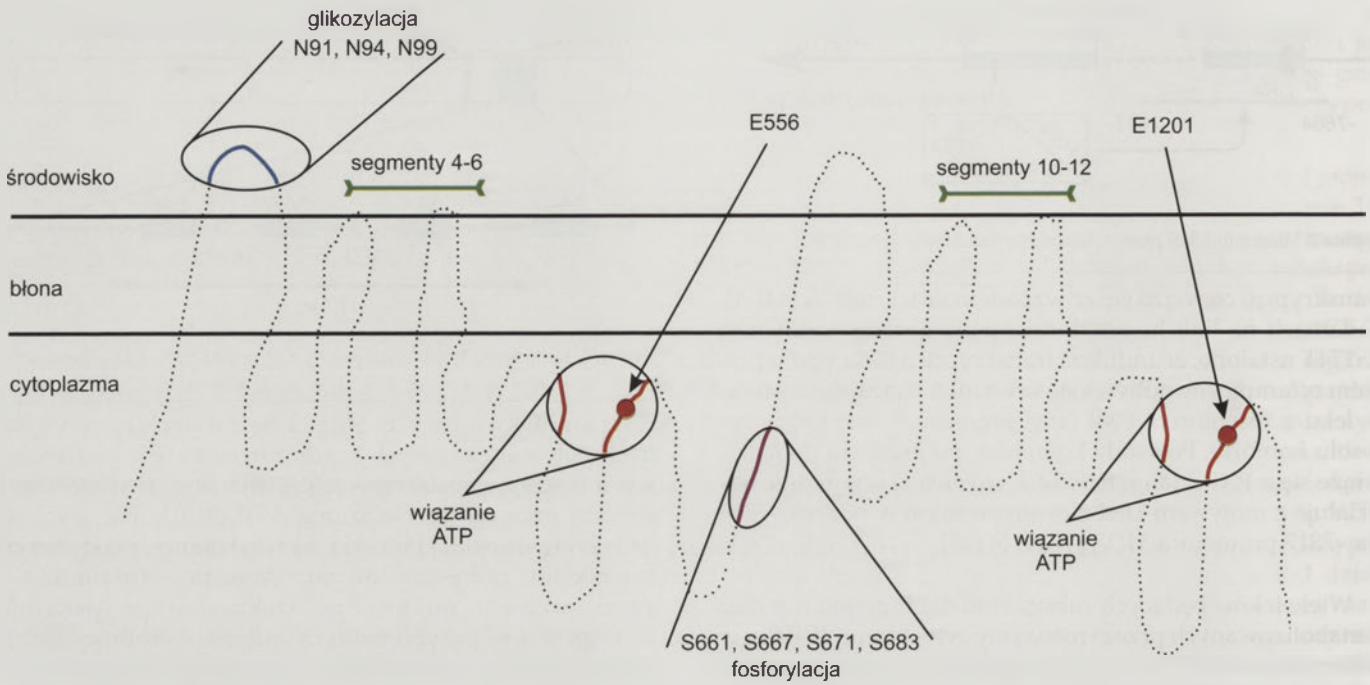
Rycina 6. Genomowa lokalizacja genów *CYP3As* oraz genu *MDR1* na chromosomie 7.

reszt aminokwasowych. Składa się z dwóch homologicznych połówek, z których każda zawiera sześć hydrofobowych domen transbłonowych (TMD, ang. *transmembrane domain*) oraz miejsce wiązania ATP (NBD, ang. *nucleotide binding domain*). Połówki są rozdzielone elastycznym łącznikiem polipeptydowym. Analiza strukturalna z zastosowaniem mikroskopu elektronowego pokazała, że P-gp jest w przybliżeniu cylindrem o średnicy ok. 10 nm i wysokości max 8 nm. Ponieważ grubość bariery lipidowej to ok. 4 nm, dlatego połowa cząsteczki jest osadzona wewnątrz błony. P-gp ma centralnie umieszczony duży otwór o średnicy 5 nm. Tworzy on hydrofilową przestrzeń wewnątrz błony, która jest otwarta w części zewnątrzkomórkowej i zamknięta w części zwróconej do cytoplazmy komórkowej [48]. Wykazano również, że P-gp wyrzuca swoje substraty zanim znajdą się one w cytoplazmie, co sugeruje, że P-gp działa jak „odkurzacz" molekularny, który wykrywa i przenosi swoje substraty z przestrzeni lipidowej błony na zewnątrz komórki (Ryc. 7A). W innym modelu zakłada się, że P-gp działa jak flipaza, która przenosi substraty z wewnętrznej warstwy lipidowej do zewnętrznej warstwy błony, skąd substrat sam dyfunduje na zewnątrz (Ryc. 7B) [9].



Rycina 7. Różne koncepcje funkcjonowania P-gp: „odkurzacz molekularny" (A), flipaza (B).

http://rcin.org.pl



Rycina 8. Hipotetyczny model 2-D ludzkiej glikoproteiny P, wskazano miejsca glikozylacji i fosforylacji. W miejscu wiązania ATP zaznaczono region Walkera B, zlokalizowany w domenie NBD.

Analiza mutacyjna oraz analiza z użyciem znakowanych analogów substratów sugeruje, że połówki P-gp tworzą funkcjonalny transporter. Miejsca wiązania substratów zlokalizowane są na domenach TMD w segmentach od 4 do 6 i od 10 do 12. Miejsca wiązania i hydrolizy ATP, znajdujące się na domenach NBD, zlokalizowane są w części cytosolowej transportera (Ryc. 8). Hydroliza ATP nie zachodzi równocześnie na obu domenach – stechiometria tej reakcji to 1 mol ATP na 1 mol P-gp [49]. P-gp jest uglikozylowane w trzech pozycjach: N91, N94 i N99, które są zlokalizowane w pierwszej pętli znajdującej się pozakomórkowo (Ryc. 8). Jednakże uglikozylowanie P-gp nie jest związane z funkcją transportową, ale jest niezbędne do przemieszczenia białka z cytoplazmy do błony cytoplazmatycznej [50]. Ponadto, P-gp jest substratem do procesu fosforylacji zachodzącej pod wpływem kinazy A i C. Fosforylacja dotyczy czterech seryn zlokalizowanych na łączniku, pozycje: S661, S667, S671 i S683. Jednak w badaniach nad mutantami wykazano, że brak fosforylacji w tych pozycjach nie wpływa na funkcję transportową P-gp (Ryc. 8) [51].

Zachowany w ewolucji motyw Walkera B, który jest obecny we wszystkich białkach transportowych nadrodziny ABC, bierze bezpośredni udział w wiązaniu i hydrolizie ATP. Miejsca E556 i E1201 są krytyczne w procesie hydrolizy ATP, która zachodzi w celu przywrócenia cząsteczce P-gp stanu początkowego, jest to bowiem hydroliza zachodząca po procesie transportu substratu (Ryc. 9) [52]. Dodatkowo, pozycje te mogą brać udział w procesie transmisji sygnału między domenami wiążącymi substrat a regionem podpisu (domena Walkera C) [53].

P-gp transportuje substancje hydrofobowe, obojętne lub kationy o masach w granicach 300-2000 Da, natomiast nie transportuje anionów. Seelig zasugerował, że jednym ze strukturalnych elementów w tych substratach jest obecność odpowiednio rozmieszczonych przestrzennie grup funkcyjnych będących donorami elektronów. Wskazali na trzy możliwe ustawienia takich grup w przestrzeni, decydujących o transporcie związku przez P-gp [54]. Sugeruje się również w tym procesie wpływ siły i ilości wiązań wodorowych między P-gp a substratem [55].

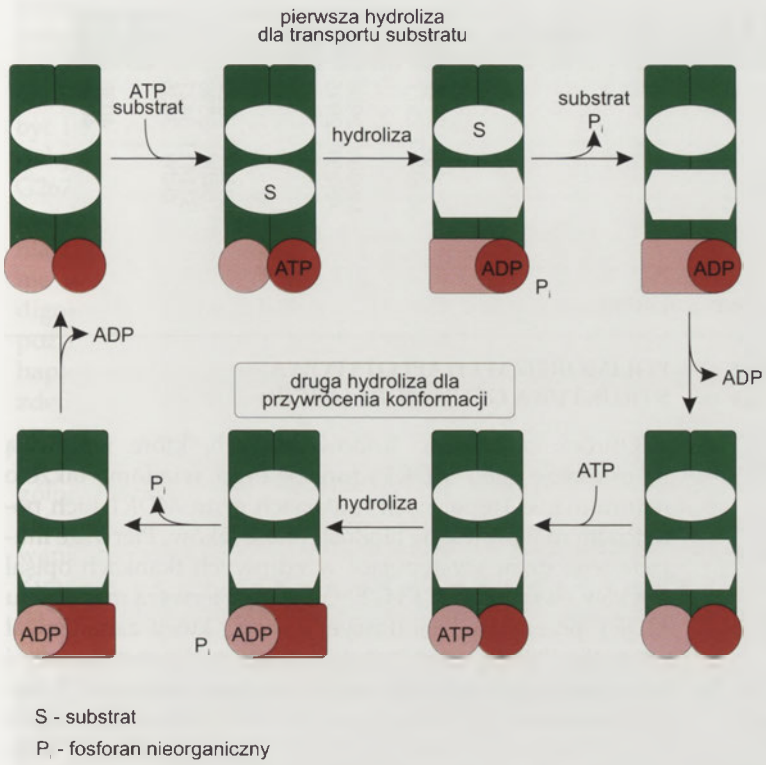
Tabela 4. Transportery ABC związane z lekoopornością.

Transporter ABC	Fenotyp oporności na cytostatyki
MDR1	wiele różnych cytostatyków (oporność wielolekowa)
MRP1	antracykliny, alkaloidy *Vinca*, etopozyd, kamtotecyna, metotreksat
MRP2	antracykliny, alkaloidy *Vinca*, etopozyd, kamtotecyna, metotreksat, *cis*-platyna
MRP3	etopozyd, metotreksat
MRP4	6-merkaptopuryna, metotreksat
MRP5	6-merkaptopuryna, PMEA
MRP6	antracykliny, etopozyd, *cis*-platyna, PMEA
MRP8	5-fluorouracyl, zalcitabina, PMEA
BCRP	wiele różnych cytostatyków (oporność wielolekowa)

9-(2-fosfonylometoksyetyl)adenina (PMEA)

Mimo że P-gp została po raz pierwszy opisana w komórkach guza, gdzie powodowała wystąpienie oporności na leki przeciwnowotworowe, to jej ekspresja jest obserwowana także w zdrowych tkankach. Obecność tego białka wykryto w wątrobie (nabłonek kanalików hepatocytów i apikalne powierzchnie kanałów żółciowych), enterocytach, korze nerek (bariera krew-mocz), centralnym systemie nerwowym (barierę krew-mózg) [56], dodatkowo — bariera krew-jądro [57] i łożysko (bariera

http://rcin.org.pl



Rycina 9. Schemat cyklu przemian zachodzących na P-gp podczas transportu substratu i hydrolizy ATP.

płód-matka) [58]. W końcu mRNA dla *MDR1* znaleziono w niektórych liniach limfocytów: $CD56^+$, $CD8^+$, $CD4^+$, $CD15^+$, $CD19^+$ i $CD14^+$ [59].

Tkankowe rozmieszczenie P-gp daje ważną wskazówkę dotyczącą jej funkcji. W większości tkanek jest ona zlokalizowana na apikalnej powierzchni komórek zwróconych do światła przewodów żółciowych, światła jelita czy światła naczyń. Taka lokalizacja sugeruje, że P-gp wyrzuca swoje substraty do przestrzeni pozakomórkowych. P-gp może więc pełnić istotną funkcję jako naturalna ochrona komórek przed związkami toksycznymi. P-gp jelitowa zmniejsza absorpcję toksyn z pożywienia, podczas gdy nerkowa i wątrobowa P-gp pośredniczy w eliminacji tych toksyn z moczem i żółcią. Ponadto, synteza P-gp w barierach krew-mózg i krew-jądro zmniejsza przechodzenie tych substancji do mózgu i jąder. P-gp jest zdolna transportować hormony kortykosteroidowe: kortyzol, kortykosteron oraz aldosteron i przypuszczalnie pośredniczy w sekrecji steroidów z tych tkanek [60]. Możliwe funkcje P-gp to również m.in.: transport lipidów, wpływ na poziom regulatorów komórkowych oraz wpływ na apoptozę i różnicowanie komórek [61].

Badania nad ekspresją genu kodującego P-gp w liniach komórkowych (Caco-2, L-MDR1), jak również u myszy knock-out pozbawionych genu *MDR1* dały możliwość zbadania udziału tego białka w transporcie leków [50,62]. P-gp transportuje wiele strukturalnie różnych leków hydrofobowych i amfipatycznych w tym szereg leków przeciwnowotworowych, leków nasercowych, inhibitorów proteazy HIV, beta-blokerów i leków przeciwhistaminowych [63,64]. Myszy pozbawione genu dla P-gp (knock-out *mdra1*) miały 35 razy wyższe stężenie digoksyny (substratu P-gp) w mózgu i 2 razy wyższe w osoczu niż zwierzęta z grupy kontrolnej [65]. Ponadto, w grupie kontrolnej 16% podanej dożylnie dawki było wydalane w ciągu pierwszych 90 minut. Dla porównania tylko 2% podanej dawki było wydalane przez myszy z grupy badanej (knock-out *mdra1*) [66].

JELITOWA GLIKOPROTEINA-P A BIODOSTĘPNOŚĆ I ODDZIAŁYWANIA LEKOWE

W badaniach na zwierzętach zaobserwowano całkowite zablokowanie jelitowego wydzielania digoksyny przy równoczesnym podaniu inhibitora P-gp PSC-833 [67]. Digoksyna jest substratem P-gp i znacząca jej ilość nie jest metabolizowana u ludzi. Obserwuje się wiele jej oddziaływań, co skutkuje wzrostem stężenia digoksyny w osoczu krwi. Na przykład oddziaływania pomiędzy digoksyną a chininą doprowadzają do 2 i 3-krotnego wzrostu stężenia digoksyny w osoczu oraz wzrostu jej toksyczności. Badania farmakokinetyczne dowodzą, że zwiększa się absorpcja, a zmniejsza wydalanie nerkowe i wątrobowe digoksyny podawanej równocześnie z chininą [68]. Tak więc hamowanie P-gp transportera digoksyny jest głównym mechanizmem oddziaływania pomiędzy chininą a digoksyną. W późniejszych pracach potwierdzono, że niskie stężenia chininy prowadzą do wzrostu stężenia digoksyny w osoczu u zwierząt z ekspresją genu *mdra1*. Efektu takiego nie obserwowano u myszy pozbawionych tego genu [69]. Wzrost stężenia digoksyny obserwowana nie tylko u pacjentów podczas podawania chininy, ale także podczas równoczesnej terapii werapamilem, propafenonem, cyklosporyną, intrakonazolem i amiodaronem (uznane inhibitory P-gp). Wiele z tych leków jest również znanych z oddziaływania z P-gp.

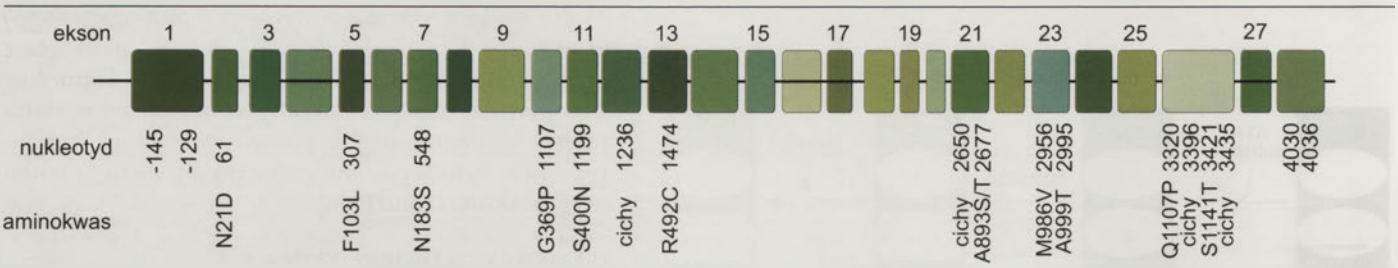
Oprócz obserwowanego wzrostu stężenia digoksyny w osoczu Schuetz i wsp. w badaniach na linii komórkowej ludzkiego raka okrężnicy udokumentowali zmniejszenie jej stężenia przy równoczesnym podawaniu ryfampicyny [70]. Ryfampicyna istotnie zmniejsza AUC (ang. *area under curve*) dla doustnego podania digoksyny i indukuje 3,5-krotny wzrost jelitowej P-gp. Ponadto, AUC dla doustnego podania był ujemnie zależny od ilości P-gp jelitowej, wskazując, że jest ona odpowiedzialna za stężenie digoksyny w osoczu [71].

Tabela 5. Znane leki przeciwnowotworowe będące substratami dla glikoproteiny-P (na podstawie [1]).

Nazwa cytostatyku
Actinomycina D
Daunorubicyna
Docetaxel
Doksorubicyna
Etopozyt
Imatinib
Irinotecan
Mitomycyna C
Mitoksantron
Paklitaxel
Tenipozyd
Topotekan
Winblastyna
Winkrystyna

Wprowadzenie inhibitorów proteazy HIV było ważnym krokiem w leczeniu zakażeń wywołanych tym wirusem. Wkrótce stwierdzono, że indinavir, nelfinavir, saquinavir i ritonavir są substratami P-gp [72]. Wpływ jelitowego P-gp na biodostępność inhibitorów proteazy HIV

http://rcin.org.pl



Rycina 10. Lokalizacja najczęściej występujących eksonowych polimorfizmów SNPs genu *MDR1*.

badano w eksperymencie, w którym myszom (knock-out *mdra1*) oraz zwierzętom kontrolnym podawano te leki dożylnie i doustnie. Po podaniu dożylnym indinaviru, nelfinaviru i saquinaviru stężenie w osoczu nie różniło się w obu grupach. Jednakże po doustnym podaniu tych leków stężenie w osoczu było 2 do 5-krotnie wyższe u myszy pozbawionych genu dla P-gp w porównaniu z grupą kontrolną. Podsumowując oba doświadczenia, można powiedzieć, że jelitowa P-gp odgrywa istotną rolę w ograniczeniu biodostępności inhibitorów proteazy HIV [1].

Biorąc pod uwagę dostępne dane na temat udziału P-gp w biodostępności i dystrybucji leków w organizmie, można przypuszczać, że transporter ten ma bezpośredni współudział w skuteczności terapii z zastosowaniem leków będących jego substratem, w tym leków cytostatycznych (Tab. 5).

Tabela 6. Częstość występowania w populacji kaukaskiej wariantów allelicznych genu *MDR1* związanych ze zmianą reszty aminokwasowej w obrębie P-gp.

Pozycja	Allel	Aminokwas	Częstość występowania alleli	Piśmiennictwo
61	A G	21 Asn 21 Asp	88,8% 11,2%	[75]
266	T C	89 Met 89 Thr	99,5% 0,5%	[*]
307	T C	103 Phe 103 Leu	99,9% 0,1%	[74]
1199	G A	400 Ser 400 Asn	94,5% 5,5%	[74]
1985	T G	662 Leu 662 Arg	99,5% 0,5%	[*]
2485	A G	829 Ile 829 Val	99,2% 0,8%	[*]
2547	A G	849 Ile 849 Met	99,5% 0,5%	[*]
2677	G T A	893 Ala 893 Ser 893 Thr	60,1% 39,9% 0,0%	badania własne niepublikowane
2995	G A	999 Ala 999 Thr	94,5% 5,5%	[73]
3320	A C	1107 Gln 1107 Pro	99,8% 0,2%	[75]
3421	T A	1141 Ser 1141 Thr	99,8% 0,2%	[89]
3767	C A	1256 Thr 1256 Lys	99,5% 0,5%	[*]

[*] www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html

POLIMORFIZM I HAPLOTYPOWA STRUKTURA GENU *MDR1* (*ABCB1*)

Oprócz czynników środowiskowych, które wpływają na ekspresję genu *MDR1* i funkcję P-gp, wiadomo także o naturalnie występujących mutacjach genu *MDR1* i ich potencjalnym wpływie na biodostępność leków. Pierwsze mutacje tego genu występujące w zdrowych tkankach opisał Mickley i wsp. (G2677T i G2995A) [73]. Pierwszą mapę genu *MDR1* przedstawił Hoffmeyer i wsp., który zanalizował wszystkie 28 eksonów łącznie z sekwencją promotorową i intronami w zdrowej populacji kaukaskiej. Oznaczył 15 mutacji punktowych (SNPs), z czego 6 SNPs zlokalizowanych było w regionach kodujących [74]. Później Cascorbi i wsp. przedstawili wyniki badań 461 osobowej populacji ochotników z Niemiec i określili częstość występowania poprzednio opisanych mutacji oraz dodatkowych, wcześniej nieopisanych [75]. Dotąd opisano ponad 50 SNPs i 3 polimorfizmy insercja/delecja (Tab. 6 i Ryc. 10).

Tylko jeden dotychczas opisany polimorfizm jest związany ze zmianą ekspresji genu kodującego P-gp, jest nim cicha mutacja w eksonie 26 w pozycji C3435T. Dowiedziono jednoznacznie, że istnieje związek pomiędzy tym polimorfizmem a zmianą funkcji transportera. Homozygoty TT mają znacznie niższy poziom ekspresji genu kodującego P-gp w jelicie cienkim w porównaniu z pozostałą populacją [74]. Tą samą zależność między genotypem a ekspresją genu kodującego P-gp znaleziono w nerkach [76]. Zmniejszeniu ilości jelitowego P-gp towarzyszy zwiększenie stężenia substratu dla P-gp (digoksyna) w osoczu krwi w porównaniu z osobami z genotypem typu dzikiego CC [74]. W końcu wykazano, że transport aktywny rodaminy 123, będącej substratem dla P-gp z komórek $CD56^+$ (ang. *natural killer*), jest słabszy u zdrowych osób z genotypem TT niż u osób z genotypem CC. Ponadto, pokazano mniejszy poziom mRNA dla genu *MDR1* w przypadkach z genotypem TT w porównaniu z CT i CC [77]. Polimorfizm C3435T występuje stosunkowo często w populacji kaukaskiej odpowiednio: 20,8% (CC), 50,5% (CT) i 28,6% (TT) [75].

Istnieje kilka hipotez dotyczących wpływu polimorfizmu cichego w pozycji C3435T na fenotypowo ujawniające się cechy i predyspozycje. Jedna z nich zakłada, że synonimiczny triplet kodujący izoleucynę może wpływać na efektywność translacji [78]. Inni autorzy sugerują, że allelo-specyficzne różnice w strukturze II-rzędowej RNA mogą wpływać na proces cięcia i składania (ang. *splicing*) lub kontrolę i regulację procesu translacji [79]. Jest także prawdopodob-

http://rcin.org.pl

ne, że niektóre SNPs zwiększają stabilność mRNA, czego konsekwencją może być zwiększenie syntezy białka [80]. Jednakże molekularny mechanizm wpływu polimorfizmu C3435T genu *MDR1* na funkcję P-gp nie jest do końca wyjaśniony. Najbardziej prawdopodobną hipotezą wydaje się być istnienie niezrównoważonego sprzężenia (LD) między cichymi polimorfizmami C1236T i C3435T a SNP w pozycji G2677T/A, co wiąże się ze współdziedziczeniem (kosegregacja) tych trzech SNP w ramach jednego haplotypu. Badania z analizą haplotypową wskazały na istotne jej znaczenie w przewidywaniu farmakokinetyki substratów P-gp: digoksyny [81] i cyklosporyny [82]. Analiza haplotypowa pozwala na dokładniejszą ocenę wpływu kilku SNP danego haplobloku, nawet jeśli nie wszystkie SNPs w nim zostały zdefiniowane i włączone bezpośrednio do analizy. Jest to szczególnie istotne dla SNPs zlokalizowanych w regionach promotorowych danego genu, gdyż mogą one mieć szczególne znaczenie funkcjonalne. Liczne dane naukowe wskazują na znaczne różnice populacyjne w częstości występowania różnych wariantów haplotypowych genu *MDR1* [46]. Zimprich i wsp., badając haplotypy genu *MDR1* w opornej na leczenie padaczce skroniowej, wykazali, że kombinacja C_{1236}-G_{2677}-C_{3435} wiąże się z niepowodzeniem leczenia, co wskazuje, że stopień oporności może być modulowany przez P-gp. Haplotyp C_{1236}-G_{2677}-C_{3435} zawierający allel C_{3435} może być związany z lekoopornością [83]. Haplotyp T_{1236}-T_{2677}-T_{3435} jest związany z niewielkim wzrostem ryzyka wystąpienia lekoopornej postaci choroby Crohna, przy czym analiza osobnych SNP nie dała takich wyników [84]. Dlatego też analizy haplotypowe uważane są za lepsze i bardziej kompleksowe, pozwalają ocenić wpływ różnych wariantów polimorficznych i dają pełniejszy obraz niż analiza pojedynczych determinantów genetycznych [85].

W zdrowej łódzkiej populacji stwierdzono dominację trzech haplotypów: C_{1236}-T_{2677}-T_{3435} i T_{1236}-G_{2677}-C_{3435} oraz C_{1236}-G_{2677}-C_{3435}, natomiast w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego z tego samego regionu dominowały dwa haplotypy: C_{1236}-G_{2677}-C_{3435} i T_{1236}-T_{2677}-T_{3435} [badania własne, niepublikowane]. Haplotypom T_{1236}-G_{2677}-C_{3435} oraz C_{1236}-G_{2677}-C_{3435} odpowiadała duża ich częstość występowania w zdrowej populacji japońskiej [86]. Porównanie częstości występowania poszczególnych haplotypów w grupie z rakiem jelita grubego w przebadanej populacji łódzkiej i populacji japońskiej wskazuje także na podobieństwo w częstości występowania głównych haplotypów: C_{1236}-G_{2677}-C_{3435} i T_{1236}-T_{2677}-T_{3435}. W populacji afrykańskiej rzadko występuje natomiast haplotyp T_{1236}-GT_{2677}-CT_{3435}, ale często występuje kombinacja C_{1236}-GG_{2677}-CC_{3435} [87]. Liczba obserwowanych kombinacji haplotypów z trzech najczęściej występujących polimorfizmów *MDR1* wykazuje różnice międzypopulacyjne [88].

POLIMORFIZM GENU *MDR1* (*ABCB1*) A RYZYKO ROZWOJU CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Etiologia ostrych chorób jelit, takich jak wrzody i stany zapalne okrężnicy, nie jest całkowicie znana. Wskazuje się na prawdopodobny udział mikroflory jelitowej w patogenezie zapaleń jelita poprzez zakłócenie funkcji komórek nabłonka jelit, co może przyczyniać się do rozwoju stanów zapalnych i owrzodzeń. Fizjologiczna rola jelitowego P-gp być może polega na ochronie komórek przed niekorzystnym wpływem toksyn bakteryjnych [90]. Ta hipoteza jest poparta pracami Panwala i wsp., którzy pokazali, że myszy (knock-out *mdra1*) są podatne na rozwój ostrych spontanicznych owrzodzeń okrężnicy w obecności specyficznych patogenów. Ponadto, leczenie tych myszy poprzez doustne podawanie antybiotyków zapobiegało rozwojowi choroby [91]. Obecnie próbuje się wyjaśnić, czy niska ekspresja genu kodującego P-gp u osób z genotypem TT_{3435} jest związana z większą podatnością na rozwój stanów zapalnych i owrzodzeń okrężnicy.

P-gp obecna jest w nabłonku proksymalnym nefronu [57]. Pośredniczy w wydzielaniu swoich substratów (np. digoksyny) do moczu. Podobnie do ochronnej roli komórek ściany jelit i bariery krew-mózg, P-gp nerkowa jest prawdopodobnie odpowiedzialna za mechanizm obronny przeciwko toksycznym związkom zawartym w moczu pierwotnym poprzez zapobiegawczą sekrecję. W ten sposób osoby z obniżoną ekspresją nerkowej P-gp mogą być potencjalnie narażone na wyższe stężenie związków toksycznych i powinny być bardziej podatne na ich szkodliwe efekty.

Istotnie są dane, które wskazują, że polimorfizm C3435T jest związany ze zmniejszoną ekspresją genu kodującego P-gp nerkowej [76]. W normalnych tkankach nerek ilościowa immunohistochemia ujawnia niższą ekspresję genu kodującego P-gp w przypadku homozygoty TT niż u pacjentów homozygotycznych typu dzikiego. Ponadto, genotyp TT_{3435} wydaje się być czynnikiem ryzyka rozwoju guzów nerek. U pacjentów z rakiem nerek częstość występowania genotypu TT_{3435} była znacznie wyższa w porównaniu z populacją ludzi zdrowych [76]. W ten sposób wyniki tych badań są w zgodzie z hipotezą, że osoby z niską ekspresją genu kodującego P-gp nerkowej są bardziej podatne na wewnątrzkomórkową akumulację związków kancerogennych. Jednakże należy podkreślić, że stopień ekspresji P-gp nie jest jedynym czynnikiem predysponującym do rozwoju guzów nerek. Na przykład Longuemaux i wsp. podali dowody na to, że obecność mutacji w kilku enzymach metabolizujących ksenobiotyki (CYP1A1, GSTs, NAT2) jest także związana ze wzrostem ryzyka rozwoju guzów nerek [92].

Yacyshyn i wsp. sugerują, że ekspresja genu *MDR1* w limfocytach w grupie osób z wrzodziejącym zapaleniem jelit (UC) jest niższa w porównaniu z grupą osób z chorobą Crohna, jak również w porównaniu z grupą osób zdrowych [93]. Takie wyniki pozwalają przypuszczać, że etiologia UC jest w jakimś stopniu związana z ekspresją genu *MDR1*. Jednym z czynników predysponujących do rozwoju raka jelita grubego jest UC, tak więc poziom ekspresji *MDR1* może również mieć związek z kancerogenezą raków jelita grubego [94]. Ponadto, w badaniach nad ekspresją genu kodującego *MDR1* w różnych typach raka jelita grubego wykazano, że typy o niskim stopniu zróżnicowania (duża złośliwość) charakteryzują się niższą ekspresją genu kodującego P-gp w porównaniu z typami raka o wyższym stopniu zróżnicowania [84]. Częściej można też odnotować występowanie allela zmutowanego T_{3435} w grupie osób z rakiem jelita grubego [84,95], natomiast obecność allela T_{1236} wiąże się z mniejszym ryzykiem zachorowania oraz z lepszym rokowaniem [badania własne, niepublikowane]. Genotyp TT_{3435} wiąże się ze

http://rcin.org.pl

zwiększonym ryzykiem rozwoju ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), podczas gdy genotyp CC_{3435} daje odwrotną relację [96]. Ewentualna rola allela C_{3435} w skróceniu czasu życia pacjentów chorych na raka jelita grubego poddanych chemioterapii, jak i tendencja do częstszego jego występowania u ludzi młodych i z przerzutami do węzłów chłonnych może się wiązać z gorszym prognozowaniem. Udział tego allela w często występującym haplotypie związanym z lekoopornością w padaczce skroniowej (C_{1236}-G_{2677}-C_{3435}), może sugerować współudział pozostałych miejsc polimorficznych tego haplotypu w ujawnieniu fenotypowych cech lekooporności [badania własne, niepublikowane].

Zmieniona ekspresja genu kodującego P-gp współgra z gorszym prognozowaniem w przebiegu neuroblastomy, mięsaka i ostrej białaczki mieloblastycznej (AML) [17,97] oraz wiąże się z krótszym czasem wolnym od choroby [98]. Obecność P-gp w zewnętrznej tkance guza (rak jelita grubego) sprzyja zajęciu naczyń krwionośnych i występowaniu przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych [99]. Niektóre badania wskazują na występowanie różnic w poziomie ekspresji genu kodującego P-gp między tkanką guza a otaczającymi go tkankami, co zaobserwowano w przypadku raka nerek i jelita grubego [100,101]. Zmienność ta jest obserwowana również w trakcie procesu kancerogenezy, co stwierdzono metodą immunohistochemiczną [102].

PODSUMOWANIE

Wykazano, że substancje kancerogenne, jak i leki przeciwnowotworowe należą do substratów P-gp. Udowodniono, że poziom ekspresji *MDR1* w komórkach nowotworowych wiąże się z opornością wielolekową. Ponadto, potencjalnie kancerogenne substancje, będące substratami dla P-gp, mogą wpływać na zmiany zachodzące w zdrowych tkankach, prowadząc z czasem do transformacji nowotworowej tych komórek. Zarówno struktura haplotypowa oraz polimorfizmy w obrębie genu kodującego P-gp, jak i różne czynniki środowiskowe mogą wiązać się ze zmianą ekspresji i aktywności P-gp.

PIŚMIENNICTWO

1. Fromm FM, Eichelbaum M (2002) The Pharmacogenomics of Human P-Glycoprotein W: Lucino J, Ma-Li W. (red) Pharmacogenomics. The Search for Individualized Therapies. Wiley-Vch Verlag GmbH, Weinheim, Germany, str. 159-178
2. Suzuki H, Sugiyama Y (2000) Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. Eur J Pharm Sci 12: 3-12
3. Keppler D, Konig J (2000) Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. Semin Liver Dis 20: 265-272
4. Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. J Pharm Sci 90: 397-421
5. Ganapathy V, Prasad PD, Ganapathy ME, Leibach FH (2000) Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. J Pharmacol Exp Ther 294: 413-420
6. Tamai I, Tsuji A (2000) Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. J Pharm Sci 89: 1371-1388
7. Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res 42: 1007-1017
8. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346: 362-365
9. Bartosz G (1998) Transportery ABC w komórkach człowieka. Postepy Biochem 44: 136-150
10. Jamroziak K, Młynarski W, Robak T (2001) Znaczenie białek transportowych nadrodziny ABC w oporności na leczenie ostrej białaczki szpikowej. Acta Haematol Pol 32: 131-145
11. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B (2004) The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Curr Drug Deliv 1: 27-42
12. Collins FS (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 256: 774-779
13. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer 2: 48-58
14. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cell Mol Life Sci 58: 931-959
15. Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, Kinukawa N, Nakano H, Kuwano M, Tsuneyoshi M (2002) ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 8: 3767-3775
16. Sauerbrey A, Voigt A, Wittig S, Hafer R, Zintl F (2002) Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma 43: 875-879
17. van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, Prins A, Meijerink JP, Vossebeld PJ, van der Holt B, Pieters R, Sonneveld P (2002) Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). Leukemia 16: 833-839
18. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. Clin Cancer Res 9: 827-836
19. Zurita AJ, Diestra JE, Condom E, Garcia Del Muro X, Scheffer GL, Scheper RJ, Perez J, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA (2003) Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. Br J Cancer 88: 879-886
20. Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, Uchiumi T, Wada M, Akiyama S, Ono M, Kuwano M (1997) A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. Cancer Res 57: 5475-5479
21. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. Mol Pharmacol 55: 929-937
22. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. Cancer Res 56: 4124-4129
23. Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH, Borst P (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). J Biol Chem 276: 46400-46407
24. van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. J Am Soc Nephrol 13: 595-603
25. Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD (2000) Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. J Natl Cancer Inst 92: 1934-1940
26. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Kruh GD (2003) MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2′,3′-dideoxycytidine and 9′-(2′-phosphonylmethoxyethyl)adenine. J Biol Chem 278: 29509-29514

http://rcin.org.pl

27. Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). Cancer Res 62: 6172-6177

28. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 95: 15665-15670

29. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. Cancer Res 59: 8-13

30. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. Cancer Res 58: 5337-5339

31. Jamroziak K, Kowalczyk M, Robak T (2002) Białko oporności raka piersi ABCG2 (BCRP/MXr/ABCP) - nowy transporter z nadrodziny ABC związany z opornością wielolekową. Acta Haematol Pol 33: 403-416

32. Fojo A, Lebo R, Shimizu N, Chin J, Roninson, IB, Merlino GT, Gottesman M, Pastan I (1986) Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. Somat. Cell Molec. Genet 12: 415-420

33. Sakurai A, Tamura A, Onishi Y, Ishikawa T (2005) Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCG2: therapeutic implications. Expert Opin Pharmacother 6: 2455-2473

34. Cornwell MM (1990) The human multidrug resistance gene: sequences upstream and downstream of the initiation site influence transcription. Cell Growth Differ 1: 607-615

35. Goldsmith ME, Madden MJ, Morrow CS, Cowan KH (1993) A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. J Biol Chem 268: 5856-5860

36. Sundseth R, MacDonald G, Ting J, King AC (1997) DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter. Mol Pharmaco 51: 963-971

37. Cornwell MM, Smith DE (1993) SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity. J Biol Chem 268: 19505-19511

38. Scotto KW, Johnson RA (2001) Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. Mol Interv 1: 117-125

39. Ogretmen B, Safa AR (2000) Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line. Biochemistry 39: 194-204

40. McCoy C, McGee SB, Cornwell MM (1999) The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. Cell Growth Differ 10: 377-386

41. Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, Ochiai A, Hirohashi S (2000) Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. Cancer Res 60: 4761-4766

42. Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. Clin Cancer Res 5: 3352-3356

43. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. J Clin Invest 104: 147-153

44. Seree E, Villard PH, Hever A, Guigal N, Puyoou F, Charvet B, Point-Scomma H, Lechevalier E, Lacarelle B, Barra Y (1998) Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: evidence for an inverse regulation in adrenals. Biochem Biophys Res Commun 252: 392-395

45. Geick A, Eichelbaum M, Burk O (2001) Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J Biol Chem 276: 14581-14587

46. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther 75: 13-33

47. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 455: 152-162

48. Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. J Biol Chem 272: 10685-10694

49. Hrycyna CA (2001) Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. Semin Cell Dev Biol 12: 247-256

50. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4028-4033

51. Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Licht T, Cardarelli CO, Pastan I, Gottesman MM (1996) Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. J Biol Chem 271: 1708-1716

52. Sauna ZE, Muller M, Peng XH, Ambudkar SV (2002) Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1). Biochemistry 41: 13989-4000

53. Bohm A, Diez J, Diederichs K, Welte W, Boos W (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of Escherichia coli: implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. J Biol Chem 277: 3708-3717

54. Seelig A (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. Eur J Biochem 251: 252-261

55. Ecker G, Huber M, Schmid D, Chiba P (1999) The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. Mol Pharmacol 56: 791-796

56. Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, Snyder AZ, Finch RA, Sartorelli AC, Piwnica-Worms D (1999) Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3900-3905

57. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci USA 86: 695-698

58. MacFarland A, Abramovich DR, Ewen SW, Pearson CK (1994) Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. Histochem J 26: 417-423

59. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. Blood 83: 2451-2458

60. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. J Biol Chem 267: 24248-24252

61. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ (2000) Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? Trends Biochem Sci 25: 1-6

62. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP (1994) Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 77: 491-502

63. Cavet ME, West M, Simmons NL (1996) Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Br J Pharmacol 118: 1389-1396

64. Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) Transport of digoxin by human P-glyco-

http://rcin.org.pl

protein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). J Pharmacol Exp Ther 263: 840-845

65. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. J Clin Invest 96: 1698-1705

66. Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J, Borst P, Schinkel AH (1996) Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein. Br J Pharmacol 119: 1038-1044

67. Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, Beijnen JH, Borst P, Schinkel AH (1997) Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833. J Clin Invest 100: 2430-2436

68. de Lannoy IA, Silverman M (1992) The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. Biochem Biophys Res Commun 189: 551-557

69. Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Roden DM (1999) Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. Circulation 99: 552-557

70. Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD (1996) Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. Mol Pharmacol 49: 311-318

71. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK (2002) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. J Clin Invest 110: 571

72. Alsenz J, Steffen H, Alex R (1998) Active apical secretory efflux of the HIV protease inhibitors saquinavir and ritonavir in Caco-2 cell monolayers. Pharm Res 15: 423-428

73. Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, Bates SE, Fojo T (1998) Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. Blood 91: 1749-1756

74. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 3473-3478

75. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I (2001) Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clin Pharmacol Ther 69: 169-174

76. Siegsmund M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H (2002) Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. J Am Soc Nephrol 13: 1847-1854

77. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2001) The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. Pharmacogenetics 11: 293-298

78. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD (2003) Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. Drug Resist Updat 6: 71-84

79. Shen LX, Basilion JP, Stanton VP Jr (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7871-7876

80. Frittitta L, Ercolino T, Bozzali M, Argiolas A, Graci S, Santagati MG, Spampinato D, Di Paola R, Cisternino C, Tassi V, Vigneri R, Pizzuti A, Trischitta V (2001) A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. Diabetes 50: 1952-1955

81. Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I, Roots I (2002) Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. Clin Pharmacol Ther 72: 584-594

82. Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ (2003) Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. Pharmacogenetics 13: 89-95

83. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, Plumer S, Baumgartner C, Mannhalter C (2004) Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. Neurology 63: 1087-1089

84. Potocnik U, Ravnik-Glavac M, Golouh R, Glavac D (2002) Naturally occurring mutations and functional polymorphisms in multidrug resistance 1 gene: correlation with microsatellite instability and lymphoid infiltration in colorectal cancers. J Med Genet 39: 340-346

85. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH (2003) Haplotype analysis in population genetics and association studies. Pharmacogenomics 4: 171-178

86. Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, Kroetz DL, Yamada T, Omatsu H, Koyama T, Okamura N, Miki I, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M, Okumura K (2006) MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. Drug Metab Pharmacokinet 21: 126-132

87. Taniguchi S, Mochida Y, Uchiumi T, Tahira T, Hayashi K, Takagi K, Shimada M, Maehara Y, Kuwano H, Kono S, Nakano H, Kuwano M, Wada M (2003) Genetic polymorphism at the 5' regulatory region of multidrug resistance 1 (MDR1) and its association with interindividual variation of expression level in the colon. Mol Cancer Ther 2: 1351-1359

88. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, Lee CG (2002) Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. Pharmacogenetics 12: 437-450

89. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M (2001) Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. Lancet 358: 383-384

90. Hermiston ML, Gordon JI (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. Science 270: 1203-1207

91. Panwala CM, Jones JC, Viney JL (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. J Immunol 161: 5733-5744

92. Longuemaux S, Delomenie C, Gallou C, Mejean A, Vincent-Viry M, Bouvier R, Droz D, Krishnamoorthy R, Galteau MM, Junien C, Beroud C, Dupret JM (1999) Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes. Cancer Res 59: 2903-2908

93. Yacyshyn B, Maksymowych W, Bowen-Yacyshyn MB (1999) Differences in P-glycoprotein-170 expression and activity between Crohn's disease and ulcerative colitis. Hum Immunol 60: 677-687

94. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV (2004) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287: G7-17

95. Humeny A, Rodel F, Rodel C, Sauer R, Fuzesi L, Becker C, Efferth T (2003) MDR1 single nucleotide polymorphism C3435T in normal colorectal tissue and colorectal carcinomas detected by MALDI-TOF mass spectrometry. Anticancer Res 23: 2735-2740

96. Jamroziak K, Młynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J, Robak T (2004) Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol 72: 314-321

97. Chan HS, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V (1991) P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. N Engl J Med 325: 1608-1614

http://rcin.org.pl

98. Ho GT, Moodie FM, Satsangi J (2003) Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? Gut 52: 759-766

99. Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusens LF, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB (1991) Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. Cancer Res 51: 2720-2726

100. Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, Bougaran J, Validire P, Thiounn N, Poupon MF, Fourme E, Chevillard S (2002) Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome. Anticancer Res 22: 121-128

101. Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. Clin Cancer Res 6: 2401-2407

102. Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, Scheper RJ (1999) Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. J Clin Pathol 52: 450-454

MDR1 (*ABCB1*) gene encoding glycoprotein P (P-gp), a member of ABC transporter superfamily: consequences for therapy and progression of neoplastic diseases

Mariusz Panczyk✉, Aleksandra Sałagacka, Marek Mirowski✉

Molecular Biology and Pharmacogenomics Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Lodz, 1 Muszyńskiego St., 90-151, Lodz, Poland

✉e-mail: mario-pan@wp.pl; mirowski@ich.pharm.am.lodz.pl

Key words: ABC transporter, *MDR1* gene, glycoprotein P, drug resistance

ABSTRACT

Glycoprotein P (P-gp) is a membrane protein belonging to the ABC transporter superfamily. As ATP-dependent pump it extrudes lipophilic particles out of the cell. P-gp was discovered in Chinese hamster ovary cells (CHO) where causing resistance to anticancer drugs. In a physiological state it is present in secretory organs and contribute to tissue barriers. P-gp transports wide variety of structurally diverse compounds including many anticancer drugs. Both environmental factors and mutations of the *MDR1* gene may influence P-gp synthesis level. Linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *MDR1* gene results from joint inheritance of these SNPs comprised in one haplotype. *MDR1* polymorphism could affect the bioavailability of drugs which are P-gp substrates and thus influence the effectiveness of pharamacotherapy. Furthermore, P-gp protects organism against cancerogenic and toxic substances contained in the food and urine. A change in P-gp expression level or its activity is a putative cause of neoplastic disorders.

http://rcin.org.pl

Tranferazy glutationowe — bioaktywacja S-koniugatów glutationu z udziałem β-liazy

Maria Sokołowska-Jeżewicz

Agata Kryczyk

Paulina Dudzik

Lidia Włodek

Katedra Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Katedra Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; tel.: (012) 422 74 00, e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl

Artykuł otrzymano 10 maja 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 21 sierpnia 2007 r.

Słowa kluczowe: transferazy glutationowe, S-koniugaty glutationu i cysteiny, β-liaza, aktywacja S-koniugatów, pofałdowanie tioredoksynowe

Wykaz skrótów: CDNB — 1-chloro-2,4-dinitrobenzen; CysSR — S-koniugat cysteiny; 15d-PGJ$_2$ — 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandyna J$_2$; DCA — kwas dichlorooctowy; DP — dipeptydaza cysteinyloglicynowa; Δ^5-AD — Δ^5-androsten-3,17-dion; Δ^5-PD — Δ^5-pregnen-3,17-dion; FAAH — hydrolaza 4-fumaryloacetonu; FLAP — białko aktywujące lipooksygenazę; FMO — monooksydaza zależna od flawin; γGT — gammaglutamylotranspeptydaza; GSH — glutation; GSR — tioeter (S-koniugat glutationu); 4HNE — 4 hydroksynonenal; JNK— kinaza Jun; LTA$_4$, LTB$_4$, LTC$_4$ — leukotrieny A$_4$, B$_4$, C$_4$; LTC$_4$; S — syntaza leukotrienu C$_4$; MAPEG — mikrosomalne transferazy glutationowe; NFκB — czynnik jądrowy κB; PGS1 — syntaza prostaglandyny E$_2$ PGE$_2$, PGH$_2$ — prostaglandyny E$_2$, H$_2$; PPARγ — (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*); PRXVI — peroksyredoksyna; RFT — reaktywne formy tlenu; STG — transferazy glutationowe

STRESZCZENIE

Transferazy glutationowe (STG) katalizują atak nukleofilowy glutationu na elektrofilowe centrum drugiego substratu o charakterze hydrofobowym. Prowadzi to do utworzenia S-koniugatów glutationu (tioeterów) usuwanych następnie z organizmu w postaci kwasów merkapturowych. W niektórych reakcjach glutation może również pełnić funkcję kofaktora, który ułatwia przekształcenie cząsteczki hydrofobowego substratu i zostaje uwolniony po zmianie jej struktury. Transferazy glutationowe uczestniczą w procesach koniugacji, redukcji, izomeryzacji, biosyntezy hormonów płciowych oraz prostaglandyn i leukotrienów, w degradacji związków aromatycznych oraz przekazywaniu sygnałów. Rola tych enzymów polega głównie na zwiększeniu nukleofilowości glutationu poprzez odpowiednie ustawienie i związanie cząsteczki GSH w centrum aktywnym, a następnie jego aktywację z udziałem reszt aminokwasowych o charakterze katalitycznym. Istnieją również tzw. ligandyny — transferazy glutationowe, które mogą wiązać hydrofobowe niesubstratowe ligandy, przyczyniając się do ich sekwestracji. Dominującą rolą jaką odgrywają STG jest detoksykacja ksenobiotyków usuwanych z organizmu w postaci tioeterów, które jednakże w pewnych warunkach mogą ulegać bioaktywacji pod wpływem β-liazy do związków tworzących addukty tkankowe. Zarówno w warunkach aktywacji tioeterów pod wpływem β-liazy, jak i w przebiegu procesu nowotworowego, któremu często towarzyszy wzmożona synteza STG, zahamowanie aktywności transferaz mogłoby mieć znaczenie terapeutyczne.

WPROWADZENIE

Transferazy glutationowe EC, 2.5.1.18 (STG) katalizują atak nukleofilowy glutationu — γ-glutamylo-cysteinyloglicyny (GSH) na kosubstrat zawierający reaktywne centrum elektrofilowe (RX), w wyniku czego powstaje polarny S-koniugat — GSR (1)

$$GSH + R\text{-}X \rightarrow GSR + HX \qquad (1)$$

Rozpuszczalne transferazy glutationowe są dimerami zbudowanymi z dwóch podjednostek o masie około 26 KDa, tworzącymi hydrofobowe białko o masie ok. 50 kDa. Każda podjednostka posiada miejsce katalityczne złożone z N-końcowej domeny wiążącej GSH (domena I — miejsce G) oraz C-końcowej domeny wiążącej substrat o charakterze hydrofobowym (domena II — miejsce H). Pomiędzy domenami znajduje się krótki łańcuch polipeptydowy o zmiennej strukturze, zawierający 5–10 reszt aminokwasowych. Domena I jest złożona z α helis oraz struktur typu harmonijka β, natomiast domena II jest prawie wyłącznie α-helikalna. Region wiążący GSH stanowi ok. 1/3 białka i wykazuje strukturę charakterystyczną dla tioredoksyny z topologią βαβαββα (struktura typu harmonijka β znajduje się pomiędzy dwoma α helisami). Zachowany w ewolucji motyw ββα jest odpowiedzialny za rozpoznanie γ-glutamylowej części tripeptydu, przy czym poprzedzająca go reszta cis-proliny stabilizuje pofałdowanie całej domeny. Dimery STG posiadają oś symetrii dwukrotnej [1,2].

Transferazy glutationowe pełnią ważną funkcję w procesach: biosyntezy prostaglandyn, leukotrienów, testosteronu i progesteronu, degradacji związków aromatycznych, przekazywaniu sygnałów, a także sekwestracji niesubstratowych ligandów. Jednakże najważniejszą ich funkcją wydaje się być udział w detoksykacji szerokiego spektrum związków elektrofilowych, kancerogenów i innych ksenobiotyków o właściwościach genotoksycznych i cytotoksycznych. Należą do nich związki alkilujące i utleniające, jak: epoksydy, reaktywne alkeny, α, β-nienasycone aldehydy, chinony i nadtlenki organiczne [3,4]. Aktywacja ekspresji genów kodujących STG następuje podczas stresu oksydacyjnego, a białka te uczestniczą w inaktywacji i usuwaniu zarówno produktów pośrednich, jak i końcowych stresu [5,6].

http://rcin.org.pl

RODZAJE TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

RODZINY

Enzymy rozpuszczalne należą do dwóch rodzin — cytosolowej i mitochondrialnej, które wykazują pewne podobieństwa strukturalne. Trzecia rodzina, obejmująca enzymy mikrosomalne (niektórzy autorzy wyodrębniają 2 rodziny enzymów mikrosomalnych) połączone z błoną i związane z metabolizmem glutationu i eikozanoidów (MAPEG), charakteryzuje się zupełnie odmienną strukturą. Odrębną grupę (czwartą) tworzy rodzina fosfomycynowo-glioksalowa [3,7].

KLASY

Transferazy glutationowe zostały podzielone na klasy w oparciu o pewne cechy charakterystyczne, jak: punkt izoelektryczny, sekwencja aminokwasów w rejonie N-końcowym, właściwości inhibitorów, specyficzność względem substratu i przeciwciał. Na podstawie punktu izoelektrycznego wyłoniono początkowo 3 klasy cytosolowych STG — α, μ i π określane jako zasadowa, prawie neutralna i kwaśna [8].

Obecnie poznano i opisano osiem klas rozpuszczalnych STG występujących u ssaków: cytosolowe — alpha (STGA), mu (STGM), pi (STGP), theta (STGT) , omega (STGO), zeta (STGZ), sigma (STGS); mitochondrialne — kappa (STGK) i co najmniej trzy związane z błonami — MSTG1, MSTG2, MSTG3, przy czym aktywność STGT i STGZ stwierdzono zarówno u roślin, jak i u zwierząt. Wśród roślin i owadów zidentyfikowano ponadto STG klasy: beta, delta, epsilon, lambda, phi (STGF), tau (STGU) i u, spośród których najliczniej są reprezentowane STGU i STGF [3,8,9]. Ostatnio do rodziny STG zaklasyfikowano również glutaredoksynę 2, Ure2p oraz wewnątrzkomórkowy kanał chlorkowy [2]. Niektóre z cytosolowych STG: STGA1, STGM3, STGO1, STGP1, STGT1 wykazują genetyczny polimorfizm, z czym wiąże się zwiększona wrażliwość na kancerogenezę [8,10]. Nomenklatura STG, oprócz przynależności do odpowiedniej klasy, obejmuje typ podjednostek (np. STGM1-1 oznacza enzym klasy mu utworzony z dwóch podjednostek typu 1, STGM1-2 z podjednostek typu 1 i 2, a STGM1a-1b oznacza hybryd utworzony z alleli 1a i 1b [1].

STRUKTURA TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

Cytosolowe transferazy glutationowe są zbudowane z dwóch podjednostek o długości 199-244 reszt aminokwasowych. Występują przeważnie w postaci homo- i heterodimerów utworzonych jednakże wyłącznie z podjednostek należących do enzymów tej samej klasy, głównie w obrębie klas alpha i mu [1,3]. W tkankach szczurów stwierdzono również obecność homo- i heterotrimerów [8]. Rozpuszczalne transferazy glutationowe charakteryzują się podobieństwem strukturalnym, wskazującym na pochodzenie od wspólnego „przodka" — tioredoksyny/glutaredoksyny. Pofałdowanie cytosolowych transferaz ukształtowało się w wyniku ewolucyjnego przyłączenia całkowicie helikalnej domeny C-końcowej do N-końcowej domeny tioredoksynowej. Natomiast w przypadku mitochondrialnej STGK domena helikalna została wbudowana do tioredoksynowego rdzenia [3]. Porównanie sekwencji wszystkich STG o znanych strukturach wskazuje, że tylko nieznaczna część łańcucha polipeptydowego (mniej niż 5%, co odpowiada 5–6 resztom aminokwasowym) jest ściśle zachowana w ewolucji, w tym reszty w pozycjach 60 i 80 [10,11]. W większości transferaz glutationowych występuje motyw ASNAI/TRAIL, tj. Ser-Asp-Ala-Ile-Leu/Thr-Arg-Ala-Ile-Leu (w helisie α-3 domeny I), który obejmuje reszty znajdujące się w miejscu G. Chociaż we wszystkich STG cząsteczka glutationu jest stabilizowana przez sieć wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych, oddziaływanie tylko z jedną z reszt — Asp w helisie α-4 domeny II jest wspólne dla wszystkich struktur [10]. Dla stabilności wszystkich rozpuszczalnych STG istotne znaczenie posiada zachowana w ewolucji struktura (motyw II), utworzona przez helisę 6 i poprzedzającą ją pętlę. W zagięciu pętli znajduje się reszta Gly146, której substytucja powoduje zerwanie sieci wiązań wodorowych utworzonych z resztami otaczających ją aminokwasów, co prowadzi do destabilizacji motywu II, a w konsekwencji — całego białka [11]. Rozpuszczalne STG posiadają 2 zachowane w ewolucji motywy w domenie N-końcowej helisy α6 — kasetę (S/T)XXD, (S-seryna, T-treonina, D-asparagina) na początku helisy oraz hydrofobowy motyw klamry. Struktury te uczestniczą w formowaniu helisy, spełniając krytyczną funkcję w procesie fałdowania i stabilizacji białek. Hydrofobowy motyw klamry przyspiesza reaktywację enzymu, tworząc wewnątrz domeny sieć wiązań wodorowych [12].

W stabilizacji dimerycznej struktury cytosolowych STG uczestniczą oddziaływania pomiędzy domeną G jednej podjednostki i domeną H drugiej podjednostki [1]. Istnieją dwa rodzaje płaszczyzn oddziaływań pomiędzy podjednostkami: 1. o charakterze hydrofobowym i topografii zakrzywionej 2. o charakterze hydrofilowym i strukturze płaskiej. W grupie pierwszej występuje tzw. "motyw zamka i klucza", utrzymujący obie podjednostki razem na obu końcach dimerycznej *interface* i zapewniający właściwą konformację miejsca aktywnego. Motyw klucza, nie występujący w STG klasy: beta, delta, kappa, sigma, tau oraz theta, jest skompensowany oddziaływaniem elektrostatycznym pomiędzy podjednostkami [10]. W centrum aktywnym enzymów cytosolowych znajdują się głównie reszty tyrozyny (z wyjątkiem STGT-seryna i STGO-cysteina). Grupa OH tyrozyny tworzy wiązanie wodorowe z siarką grupy SH glutationu (**2**), co powoduje obniżenie pKa kompleksu E-GSH [1].

$$\text{E-O-H} + \text{GSH} \rightarrow \text{E-O-H}\text{------}^{-}\text{SG} + \text{H}^{+} \qquad (2)$$

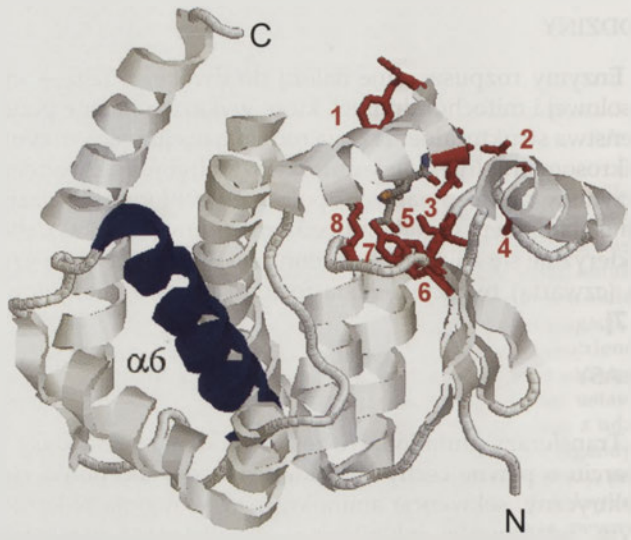
TRANSFERAZY GLUTATIONOWE KLASY ALPHA (STGA), MU (STGM) I PI (STGP)

STG wykazują ponad 60% identyczności w obrębie klasy, natomiast mniej niż 30% pomiędzy klasami [10]. Enzymy klasy alpha, mu i pi są najbardziej zbliżone strukturalnie, jednakże różnią się nieco wzajemną orientacją domen G i H tak, że powierzchnie podjednostek różnych klas nie są całkowicie zgodne [1]. Białka te często występują w tych samych tkankach. Aktywność STGP1, obok

http://rcin.org.pl

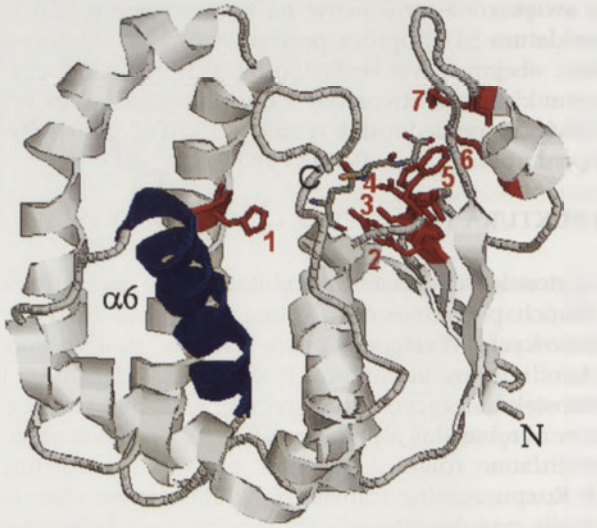
STGA1 i STGA2, stwierdzono w mitochondriach wątroby człowieka (względna zawartość podjednostek wyraża się zależnością: STGA1> STGA2 > STGP1[6]. Analiza sekwencji STG wskazuje, że geny prekursorowe cytosolowych enzymów klasy alpha, mu i pi prawdopodobnie wywodzą się z genu klasy theta (STGT) i powstały przez jego duplikację, natomiast prekursorem STGT jest prawdopodobnie mitochondrialna STGK [3]. Konsekwencją tego jest ogólne podobieństwo strukturalne enzymów tych trzech klas, również w typie oddziaływań pomiędzy podjednostkami połączonymi na zasadzie „zamka i klucza". W oddziaływaniach tych rolę klucza odgrywają reszty fenyloalaniny, występujące w domenie G w pozycjach odpowiednio: 47 (STGP), 52 (STGA) i 56 (STGM), które „wchodzą" do hydrofobowego zamka domeny H sąsiedniego monomeru. Motyw „zamka i klucza" zapewnia również odpowiednią konformację miejsca aktywnego [1,10]. STG klasy alpha, mu i pi wykazują znaczne podobieństwo strukturalne w domenie wiążącej glutation. Różnice występują natomiast w domenie C-końcowej, która w przypadku STGA posiada dodatkową, ruchliwą α-helisę (helisę 9), blokującą dostęp do centrum aktywnego enzymu [13,14], natomiast STGM charakteryzują się obecnością dodatkowej pętli o rozpiętości 33-43 reszt aminokwasowych (pomiędzy α2 i β2) [10]. W STGA pełna lokalizacja helisy 9 oraz całej domeny C następuje dopiero po związaniu ligandów miejsca G i H, które pośredniczą w powstawaniu wiązań czwartorzędowych pomiędzy domeną C-końcową a resztą białka, co przyczynia się do stabilizacji struktury enzymu [13,15]. Ważną rolę w fałdowaniu i stabilizacji STGA (Ryc. 1) odgrywa zachowany w ewolucji motyw N-końcowy helisy 9 (ang. *N-capping motif*), którego uszkodzenie zwiększa dynamikę regionu C, podobnie jak jonizacja katalitycznej reszty Tyr 9 [15,16]. Funkcję katalityczną w STGM pełni reszta Tyr 6, natomiast w STGP — Tyr 7. Zastąpienie reszty tyrozyny fenyloalaniną obniża katalityczną aktywność tych enzymów [17-19]. W deprotonizacji i aktywacji grupy -SH glutationu w STGA uczestniczy dodatkowo reszta Arg15. Podobną rolę odgrywa wiązanie wodorowe pomiędzy grupą -OH reszty Thr13 i elektronami Π reszty Tyr6, które zwiększa moc wiązania wodorowego stabilizującego tiolan w STGM1-1 u szczura oraz reszty Tyr108 w hSTGP1-1 [20,21]. Do enzymów klasy alpha i mu należy 6 odrębnych podjednostek, przy czym obecność STGM 1-5 oraz STGA 1-4 stwierdzono u człowieka. Natomiast enzym klasy pi zawiera tylko jedno białko [10].

Zarówno pewne izoformy STG klasy alpha — STGA1-3, jak i STGM 1,2,4 i 5 wykazują wysoką homologię (85–91% identyczności). Porównanie ich struktury (w obrębie tej samej klasy) wskazuje na istnienie silnie zachowanego w ewolucji miejsca wiążącego GSH oraz miejsca wiążącego substrat hydrofobowy, wykazującego niewielkie różnice sekwencyjne, które jednakże w znacznym stopniu wpływają na specyficzność substratową [20,22]. Analiza porównawcza centrum aktywnego STGA1-1 (Ryc. 1) i STGA3-3 wykazała, że tylko dwie reszty (w pozycji 12 i 208) przyczyniają się do ich zróżnicowanej aktywności względem Δ^5-AD [23]. Przykładem mogą być również 2 izoformy STGM — STGM1-1 (Ryc. 2) oraz STGM4-4, które wykazują różnice strukturalne jedynie w obrębie reszt 106-108. Reszta His107 w STGM1-1 warunkuje zwiększoną efektywność



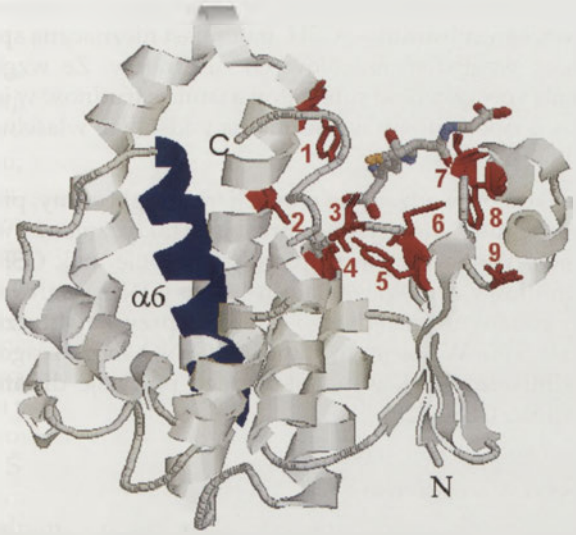
Rycina 1. Struktura S-transferazy glutationowej hSTGA1-1 w kompleksie z glutationem (Protein Date Base: 1PKW, za zgodą prof. Aceto i prof. Svenberga). Strukturę wykonano w programie Protein Explorer, format pdr. Rysunek przedstawia elementy struktury drugorzędowej monomeru z zaznaczeniem helisy 6 (granat). W centrum aktywnym enzymu zaznaczono reszty aminokwasów: 1 — **Phe 222**, 2 — **Arg 45**, 3 — **Ile 219**, 4 — **Met 51**, 5 — **Val 55**, 6 — **cisPro** 56, 7 — **Tyr 9**, 8 — **Arg 15**.

w katalizowaniu nukleofilowych reakcji substytucji w pierścieniu aromatycznym w porównaniu z STGM4-4, która w pozycji 107 zawiera serynę. His107 nie uczestniczy bezpośrednio w wiązaniu substratu, obniża natomiast pK dla GSH, zwiększając tym samym jego nukleofilowość istotną dla katalizy reakcji substytucji nukleofilowej w pierścieniu aromatycznym [20]. Struktura STGM4-4 wykazuje także znaczne podobieństwo do STGP świni. Lokalizacja miejsca wiążącego GSH jest zbliżona w obu enzymach, przy czym



Rycina 2. Struktura S-transferazy glutationowej hSTGM1-1 w kompleksie z glutationem (Protein Date Base : 1XW6, za zgodą prof. Irvinga Listowsky). Strukturę wykonano w programie Protein Explorer, format psd. Rysunek przedstawia elementy struktury drugorzędowej monomeru z zaznaczeniem helisy 6 (granat). W centrum aktywnym enzymu zaznaczono reszty aminokwasów: 1 — **His 107**, 2 — **Tyr 6**, 3 — **Leu 59**, 4 — **Asn 58**, 5 — **Trp 7**, 6 — **Lys 49**, 7 — **Arg 42**.

http://rcin.org.pl

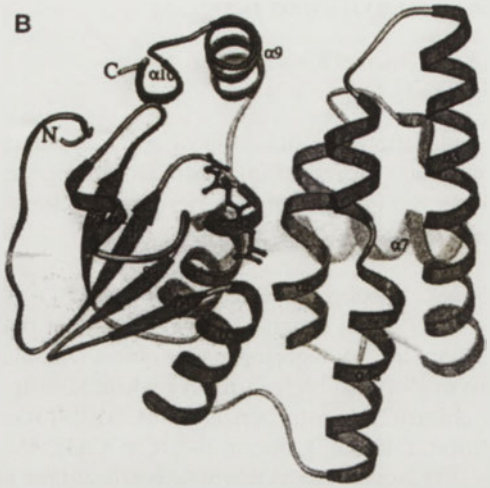


Rycina 3. Struktura S-transferazy glutationowej hSTGP1-1 w kompleksie z glutationem (Protein Date Base : 5GSS, za zgodą prof. Aaron Oakley). Strukturę wykonano w programie Protein Explorer, format psd. Rysunek przedstawia elementy struktury drugorzędowej monomeru z zaznaczeniem helisy 6 (granat). W centrum aktywnym enzymu zaznaczono reszty aminokwasów: 1 – **Tyr 108**, 2 – **Cys 101**, 3 – **Val 10**, 4 – **Arg 13**, 5 – **Tyr 7**, 6 – **Phe 8**, 7 – **Val 35**, 8 – **Trp 38**, 9 – **Cys 47**.

w wiązaniu GSH w STGM-4 uczestniczą dodatkowe reszty aminokwasów znajdujące się w pozycjach 38-48. Wiele reszt aminokwasowych występujących w miejscu G jest wspólnych dla obu enzymów (Tyr7, Arg13, Lys 42, Leu50, Pro51 i Gln62) [18]. Natomiast STGP1-1 człowieka (Ryc. 3) wykazuje ok. 32% identyczności sekwencyjnej względem STGA1-1 [11].

TRANSFERAZY GLUTATIONOWE KLASY OMEGA – STGO

Interesującą grupę stanowią STG klasy omega występujące w większości tkanek człowieka. W odróżnieniu od typowych transferaz glutationowych, charakteryzujących się znacznym powinowactwem względem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), STGO posiadają znikome powinowactwo do tego substratu. Wykazują natomiast charakterystyczne dla glutaredoksyn aktywności: transferazy tiolowej zależnej od glutationu oraz reduktazy dehydroaskorbinianowej, które nie występują u innych STG. Pomimo podobieństwa strukturalnego do innych transferaz (pofałdowanie), STGO wyróżniają się N-końcowym wydłużeniem obejmującym 19-20 reszt aminokwasowych, które nie występuje w żadnej z pierwotnie opisanych S-transferaz glutationowych. Wydłużenie to stanowiło podstawę zaklasyfikowania do STGO również wielu sekwencji białkowych niescharakteryzowanych jasno jako STG, w tym białka szoku termicznego soi oraz białka błonowe drożdży[24]. Komórki *Saccharomyces cerevisiae* posiadają 3 izoformy S-tranferaz klasy omega, wykazujące aktywność glutaredoksyny: lokowaną w peroksysomach STGO-1 oraz cytosolowe STGO-2 i STGO-3. STGO-1 ma znaczenie w regulacji redoksowej białka – β-liazy cystationinowej występującej w peroksysomach [25,26]. Powszechność ekspresji genu kodującego STGO 1 kontrastuje z innymi STG, charakteryzującymi się specyficznością tkankową, co



Rycina 4. Struktura S-transferazy glutationowej hSTGO1-1 w kompleksie z glutationem. Przedruk z pracy „ Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutatione transferases". J Biol Chem 275: 24798-24806, za zgodą prof. Philip Board.

wskazuje na fundamentalną rolę STGO1 w metabolizmie tkankowym. STGO1-1 posiada domenę N-końcową zbliżoną do tioredoksyny oraz α-helikalną domenę C-końcową. Domena N-końcowa jest złożona z czterech struktur typu harmonijka β zakończonych na jednym końcu dwoma α-helisami, a po drugiej stronie przez strukturę 3_{10}-helikalną (Ryc. 4). C-końcowe wydłużenie jest połączone z N-końcową domeną za pomocą kilku wiązań wodorowych, tworząc ciągłą powierzchnię z N-końcowym wydłużeniem. STGO1-1 posiada w centrum aktywnym resztę cysteiny 32, która tworzy wiązanie disulfidowe z glutationem. Forma tiolanowa Cys32 prawdopodobnie powstaje wskutek oddziaływania -SH cysteiny z dodatnim dipolem helisy α-1, przy czym Pro33 zapewnia odpowiednie ustawienie Cys32. Brak reszt tyrozyny lub seryny w centrum aktywnym STGO1-1, które obniżają pKa glutationu, ułatwiając tym samym atak nukleofilowy na drugi substrat, może uniemożliwiać katalizowanie reakcji koniugacji. STGO może natomiast przeciwdziałać powstawaniu adduktów białek komórkowych z GSH i resztą cysteiny, poprzez redukcję tych związków z udziałem reszty cysteiny 32 [24]. Największe podobieństwo sekwencji aminokwasowej do STGO1-1 wykazują STG klasy zeta – STGZ.

MIKROSOMALNE TRANSFERAZY GLUTATIONOWE – MAPEG

W oparciu o podobieństwo strukturalne (sekwencyjne) enzymy MAPEG podzielono na cztery grupy, w obrębie których białka wykazują ponad 20% identyczności. [3]

Grupa I zawiera: syntazę leukotrienu C_4 – LTC_4S, białko aktywujące lipooksygenazę (FLAP) i transferazę glutationową MSTG2. W grupie II znajduje się MSTG3. W grupie III znajdują się białka z *Escherichia coli* i *Vibrio cholera*, zbliżone do mikrosomalnych STG. Grupa IV obejmuje MSTG1 i syntazę prostaglandyny E_2 – PGES1. Enzymy grupy I występują w postaci monomerów lub bardziej złożonych agregatów (dimerów i trimerów), natomiast grupy IV głównie w postaci homotrimerów. Białko FLAP i LTC_4S mogą również tworzyć heterodimery i heterotrimery [27].

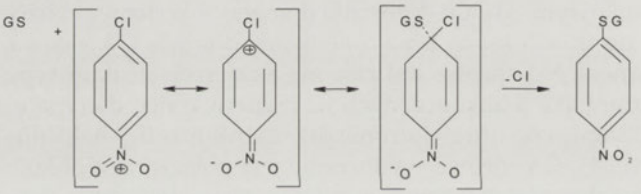
http://rcin.org.pl

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

BIOLOGICZNE FUNKCJE TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

Transferazy glutationowe uczestniczą w następujących procesach: koniugacji (sprzęgania), redukcji, izomeryzacji związków nienasyconych, syntezie hormonów sterydowych, syntezie prostaglandyn oraz tiolizie [3].

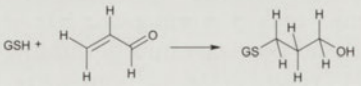
Cechy wspólne. W obrębie trzech pierwszych rodzin transferaz glutationowych można zauważyć pewne podobieństwo funkcjonalne, polegające na zdolności katalizowania (w różnym stopniu) tych samych reakcji: koniugacji glutationu z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB) (**3**) oraz redukcji wodoronadtlenku kumenu – (CuOOH). W tej ostatniej reakcji STG wykazują aktywność peroksydazy glutationowej [3]. W przypadku STGO1-1 aktywność względem CDNB jest bardzo niska, lecz mierzalna [24]. Według innych źródeł żadna z izoform STGO nie wykazuje aktywności względem tego substratu [25].



(3)

Reakcja 3. Reakcja sprzęgania p-chloronitrobenzenu z glutationem (addycja-eliminacja).

Reakcje koniugacji. Mechanizm reakcji katalizowanych przez transferazy glutationowe jest oparty na nukleofilowym ataku GSH na niepolarne związki zawierające elektrofilowy atom węgla (**3** i **4**), siarki (**5**) i azotu (**6**) [28]. Reakcje te należą do procesów addycji oraz addycji-eliminacji.

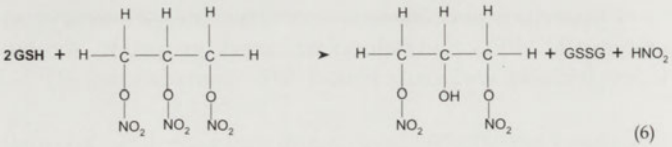


(4)

Reakcja 4. Reakcja koniugacji akroleiny z glutationem.

$$GSH + CH_3CH_2SCN \rightarrow CH_3CH_2SSG + HCN \quad (5)$$

Reakcja 5. Reakcja sprzęgania tiocyjanianu etylu z glutationem.



(6)

Reakcja 6. Reakcja sprzęgania i redukcji nitrogliceryny.

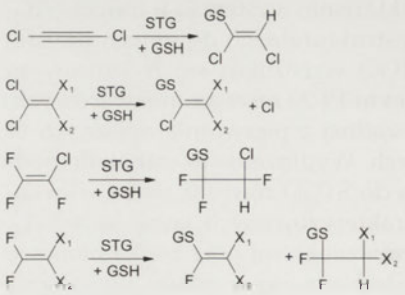
Działanie transferaz polega głównie na zwiększeniu nukleofilowości związanego z enzymem glutationu, co w znacznym stopniu ułatwia jego atak na elektrofilowe centrum drugiego substratu [1,29]. Potwierdzeniem nukleofilowego charakteru reakcji może być spostrzeżenie, że podstawnik odciągający elektrony (np. grupa $-NO_2$ w pozycji -orto lub -para względem chlorowca) ułatwia reakcje z GSH wskutek efektu rezonansu (**3**) [29]. Transferazy glutationowe wykazują specyficzność w stosunku do kinetycznie pierwszego substratu – GSH, natomiast nieznaczną specyficzność względem nietiolowych substratów. Ze względu na małą specyficzność substratową istnieje trudność w identyfikacji izoenzymów wyłącznie na podstawie właściwości katalitycznych.

Reakcja prowadząca do redukcji trinitrogliceryny, przedstawiona tutaj sumarycznie, przebiega faktycznie w dwóch etapach. W pierwszym etapie (**7**) następuje atak GSH na elektrofilowy azot wiązania estrowego (ONO_2) z utworzeniem produktu pośredniego [$GSNO_2$] przy katalitycznym udziale STG. W kolejnym etapie (**8**) $GSNO_2$ może reagować z nadmiarem GSH, w wyniku czego powstaje disiarczek glutationu GSSG [29]:

$$GSH + RONO_2 \rightarrow [GSNO_2] + ROH \quad (7)$$

$$[GSNO_2] + GSH \rightarrow GSSG + HNO_2 \quad (8)$$

Reakcje sprzęgania chlorowcopochodnych alkenów z GSH. Reakcje koniugacji z dichlorowcoalkenami i dichloroacetylenem, katalizowane przez STG, należą do procesów substytucji winylowej i są przykładem reakcji addycji oraz addycji-eliminacji [30]. Generalnie 1,2-dichloroalkiny uczestniczą w reakcjach addycji (**9**), 1,1-dichloroalkeny w procesie addycji-eliminacji z utworzeniem S-koniugatów 1-chloroalkenylo-glutationowych (**10**), natomiast koniugacja glutationu do 1,1-difluoroalkenów jest przykładem zarówno reakcji addycji, jak i addycji-eliminacji (**12**). W tym ostatnim procesie następuje stereoselektywny atak nukleofilowy GSH na ugrupowanie 1,1-difluorometylenowe związany z przesunięciem elektronów π w kierunku elektroujemnych atomów fluoru oraz utworzeniem struktur mezomerycznych z udziałem fluoru przekazującego z powrotem elektrony do układu π [30]. Również w reakcji z 1-chloro1,2,2 trifluoroetenem mikrosomalna STG wykazuje wysoką stereoselektywność względem grupy 1,1-difluorometylenowej, co prowadzi do utworzenia nowego chirałnego centrum 2S (**11**). Stereoselektywności nie wykazuje natomiast cytosolowa STG. Koniugacja toksycznego trichloroetenu z GSH prowadzi do powstania 2 izomerów (E) lub (Z)-S-1,2–dichlorowinyloglutationu lub S-2,2-dichlorowinyloglutationu. Oba stereoizomery, jak również ich pochodne cysteinowe pojawiają się w moczu zwierząt, którym podawano trichloroeten w postaci merkapturanów.



Reakcje 9–12. Reakcje sprzęgania chlorowcopochodnych alkenów z GSH (opis w tekście).

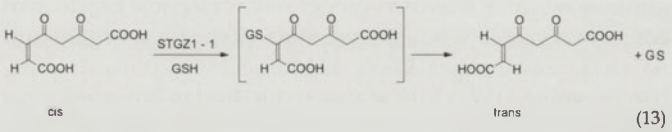
Reakcje redukcji. Wspomniane już STG klasy omega – STGO1, STGO2 i STGO3 wykazują aktywność jako reduktazy dehydroaskorbinianowe oraz reduktazy kwasu monometyloarsenowego oraz dimetyloarsenowego [25].

http://rcin.org.pl

Wykazano, że delecja reszty E155 powoduje 2 do 3-krotny wzrost aktywności STGO1 względem wszystkich substratów i wiąże się z, trudnym do wyjaśnienia, wzrostem wydzielania arsenu [31]. Dla większości przeprowadzonych reakcji STGO2-2 wykazuje aktywność katalityczną zbliżoną do STGO1-1. Wyjątek stanowi redukcja dehydroaskorbinianu, przebiegająca głównie z udziałem STGO2-2 (enzym ten przejawia 70-100 razy wyższą aktywność od STGO1-1). Wiąże się z tym możliwość recyklingu askorbinianu, dzięki czemu STGO2-2 może chronić przed skutkami stresu oksydacyjnego [31]. Analiza mutacji punktowych STGO2 wskazuje , że dla aktywności glutaredoksynowej tego enzymu istotna jest obecność tylko jednej z 3 reszt cysteinowych w pozycji 46. Sugeruje to, że STGO2 działa poprzez mechanizm monotiolowy [25]. Jedyną znaczącą aktywnością zaobserwowaną w przypadku STGO 1-1 jest zdolność działania jako S-transferaza tiołowa zależna od glutationu. Niezwykle ważną rolą jaką może odgrywać STGO1-1 jest zdolność do odnawiania funkcji enzymów poprzez redukcję mieszanych disiarczków białek komórkowych z GSH [24].

W odróżnieniu od enzymów eukariotycznych stosunkowo niewiele uwagi poświęcono dotychczas bakteryjnym STG, które z reguły nie wykazują aktywności względem klasycznych substratów. Niektóre z nich uczestniczą w procesach redukcyjnych, np. w redukcyjnym rozszczepieniu wiązań eterowych w eterach β-arylowych lub redukcyjnej dechloracji w metabolizmie pentachlorofenolu [32]. Główna ich rola polega jednakże na detoksyfikacji epoksydów, w której uczestniczą białka oporności na fosfomycynę oraz białko produkowane przez *Rhodococcus* sp., które bierze udział w degradacji izoprenu [2].

Reakcje izomeryzacji. Badania przeprowadzone na różnych związkach nienasyconych wykazujących podobieństwo strukturalne, jak kwas maleinowy, maleiloacetooctan oraz maleiloaceton, wykazały, że nie w każdym przypadku istnieje możliwość przeprowadzenia ich izomeryzacji *cis/trans* przy katalitycznym udziale transferaz glutationowych. Warunkiem przebiegu takiej reakcji jest hydrofobowy charakter drugiego substratu, co umożliwia wiązanie do hydrofobowego centrum aktywnego enzymu [28]. Kwas maleinowy, który ulega przemianie do kwasu fumarowego w obecności samego glutationu, nie jest ani substratem ani inhibitorem STG. Przyczyną tego jest prawdopodobnie obecność drugiej grupy karboksylowej, zwiększająca hydrofilowość cząsteczek tego związku. Zablokowanie jednej z grup poprzez estryfikację (maleiloaceton) przywraca natomiast zdolność substratu do tworzenia kompleksu z enzymem [28]. W przypadku maleiloacetooctanu utworzenie kompleksu enzym-substrat, pomimo obecności 2 zjonizowanych grup karboksylowych, jest możliwe dzięki obecności długiego fragmentu hydrofobowego cząsteczki. W izomeryzacji *cis/trans* maleiloacetooctanu do 4-fumaryloacetooctanu oraz maleiloacetonu do fumaryloacetonu uczestniczy STGZ1-1 (**13**). W reakcji tej STGZ1-1 pełni bardziej funkcję tioltransferazy niż izomerazy, natomiast GSH funkcję kofaktora. Po utworzeniu glutationylowego adduktu z olefiną jako akceptorem następuje regeneracja GSH, której towarzyszy utworzenie bardziej stabilnego izomeru trans [28,33]. Należy wspomnieć, że również sam glutation może katalizować przemianę maleiloacetooctanu do 4-fumaryloacetooctanu, a więc deficyt STGz wydaje się być znaczący wyłącznie w warunkach obniżenia poziomu GSH, np. pod wpływem paracetamolu [34].



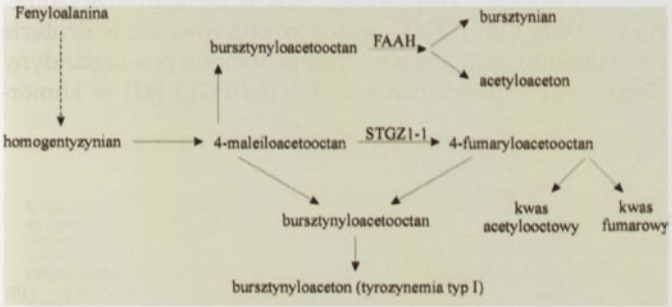
(13)

Reakcja 13. Reakcja izomeryzacji maleiloacetooctanu (*cis*) do fumaryloacetooctanu (*trans*) z udziałem STGZ.

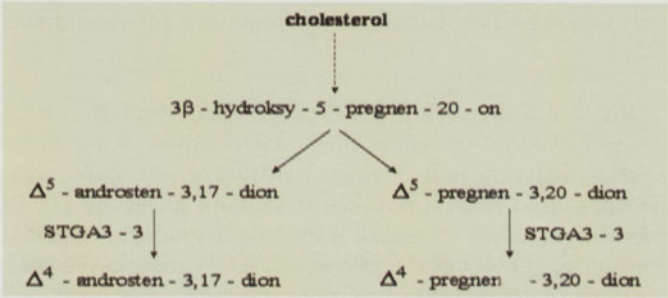
Produkt tej reakcji, 4-fumaryloacetooctan, jest silnie elektrofilowy i indukuje oksydacyjne uszkodzenia poprzez reakcje z grupami -SH. Deficyt STGZ1-1 powoduje akumulację maleiloacetooctanu, którego toksyczność jest zbliżona do 4-fumaryloacetooctanu [34].

Izomeryzacja maleiloacetooctanu stanowi również etap pośredni procesu degradacji fenyloalaniny i tyrozyny do kwasu acetylooctowego i fumarowego.

Reakcje degradacji. Dotychczas sądzono, że brak aktywności STGZ1-1, przy niezmienionej aktywności hydrolazy 4-fumaryloacetooctanu (FAAH), nie prowadzi do powstawania bursztynyloacetonu, gdyż bursztynyloacetooctan jest również efektywnie degradowany przez hydrolazę fumaryloacetooctanową (Schemat 1). Natomiast w warunkach deficytu FAAH maleiloacetooctan i 4-fumaryloacetooctan mogą być redukowane do bursztynyloacetooctanu i dekarboksylowane do toksycznego bursztynyloacetonu, markera dziedzicznej tyrozynemii typu I, choroby atakującej wątrobę, nerki oraz nerwy obwodowe [34,35]. Jednakże wykazano, że dieta znacznie wzbogacona o fenyloalaninę u myszy-mutantów pozbawionych STGZ1-1 prowadzi do utraty wagi, a nawet śmierci w wyniku dysfunkcji nerek i wątroby. Natomiast zmutowane zwierzęta hodowane na standardowej diecie laboratoryjnej pozostawały zdrowe pomimo obecności w moczu bursztynyloacetonu i fumarylo-



Schemat 1. Degradacja fenyloalaniny z udziałem STGZ1-1.



Schemat 2. Synteza hormonów steroidowych z udziałem STGA3-3.

http://rcin.org.pl

acetooctanu. Świadczy to o pozakomórkowym (bez udziału FAAH) metabolizmie fenyloalaniny oraz izomeryzacji maleiloacetooctanu bez udziału STGZ. Obserwacje te wskazują na szczególne znaczenie STGZ w metabolizmie fenyloalaniny w warunkach wysokiego poziomu tego związku w pożywieniu (przekraczającego zdolności detoksykacyjne organizmu) [34]. Chociaż genetyczny deficyt STGZ1-1 jest bardzo rzadki, deficyt ten może być indukowany farmakologicznie, np. z udziałem kwasu dichlorooctowego (DCA). Transferazy klasy zeta katalizują również biotransformację toksycznych α-chlorowcokwasów, tj. kwasu dichlorooctowego, chlorofluorooctowego, 2-chlorowcopropanowych oraz kwasu 2,2-dichloropropanowego [36,37]. Szczególne znaczenie posiada biotransformacja, będącego markerem kwasicy mleczanowej, kwasu dichlorooctowego do kwasu glioksalowego. Kwas dichlorooctowy występuje często jako zanieczyszczenie wody pitnej. Stała ekspozycja organizmu na wodę zawierającą kwas dichlorooctowy powoduje zahamowanie STGZ. Odbywa się to na drodze kowalencyjnej modyfikacji reszty Cys16 w centrum aktywnym enzymu przez produkt pośredni utworzony z glutationu i kwasu dichlorooctowego [37,38]. Aktywność STGZ wykazuje również dehalogenaza tetrachlorohydrohinonu, pełniąca równocześnie funkcję izomerazy maleiloacetonu [39]. Mechanizm jej działania polega na ketonizacji deprotonowanego substratu z utworzeniem 2,3,5,6-tetrachloro-4-hydroksycykloheksa-2,4-dionu, a następnie 1,4-eliminacji HCL, w wyniku czego powstaje trichlorobenzochinon, który ulega sprzęganiu z GSH i kolejno dekompozycji do mieszaniny produktów [39].

Reakcje syntezy steroidów. Izomeryzacja jest również ważnym etapem w procesie syntezy hormonów sterydowych. Związki te powstają na drodze metabolizmu cholesterolu, który przebiega wielostopniowo, poprzez szereg produktów pośrednich. Jednym z najważniejszych jest 3-β-hydroxy-5-pregnen-20-on, który może być utleniony do Δ^5-androsten-3,17-dionu (Δ^5-AD) lub alternatywnie do Δ^5-pregnen-3,20-dionu (Δ^5-PD) (Schemat 2). W kolejnym etapie — izomeryzacji Δ^5-ketosteroidów do Δ^4-ketosteroidów, bezpośrednich prekursorów odpowiednio testosteronu i progesteronu uczestniczą STG klasy alfa, głównie STGA3-3 [22]. Reakcję zapoczątkowuje przyłączenie protonu ze steroidu do tiolanu — GS^-, z kolei grupa -OH reszty tyrozyny przekazuje proton ponownie do steroidu [23]. Katalityczna wydajność (kcat/Km) STGA3-3 względem Δ^5-AD jest jedną z najwyższych, jaką wykazują transferazy glutationowe, co wskazuje na fizjologiczne znaczenie tego związku, jednocześnie jest 5-krotnie wyższa od efektywności STGA1-1 i 1000-krotnie od STG2-2. Co ciekawe, STGA3-3 w procesie izomeryzacji 3-keto-steroidów wykazuje wydajność 230 razy wyższą od wydajności dehydrogenazy 3-β-steroidowej [22].

Reakcje tiolizy. Tioliza jest procesem degradacji wiązania estrowego z udziałem niskocząsteczkowych i związanych z białkami tioli. Przykładem tiolizy jest wspomniana uprzednio reakcja redukcji triazotanu gliceryny (**7**). W pierwszym etapie tej reakcji następuje degradacja wiązania estrowego $-O-NO_2$ pod wpływem GSH. W przypadku octanu p-nitrofenylu (**14**) tioliza, przeprowadzona w obecności różnych transferaz glutationowych pochodzących z wątroby szczura, w każdym przypadku prowadzi do utworzenia p-nitrofenolu i estru tiolowego [28].

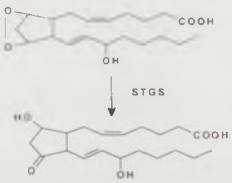
$$\underset{\text{Octan p-nitrofenylu}}{GSH + CH_3{-}(CO){-}O{-}C_6H_5NO_2} \rightarrow \underset{}{GS{-}CO{-}CH_3} + \underset{\text{p-nitrofenol}}{HO{-}C_6H_5NO_2} \quad (14)$$

STG katalizują również tiolizę trimetylooctanu p-nitrofenylu. Reakcja ta, z uwagi na powolny przebieg pozwala na detekcję kompleksu enzymatycznego z trimetylooctanem.

Reakcje syntezy eikozanoidów. Szczególną grupę stanowią mikrosomalne transferazy glutationowe MAPEG, z których znaczna część uczestniczy w syntezie hormonów eikozanoidowych, tj. prostaglandyn, prostacyklin, leukotrienów i tromboksanów, których bezpośrednim prekursorem jest kwas arachidonowy.

Synteza leukotrienów (LT) i prostaglandyn (PG). Leukotrieny odgrywają ważną rolę w inicjacji i rozwoju odpowiedzi zapalnej komórki, patogenezie astmy oraz aktywacji komórek układu immunologicznego i hematopoetycznego. Synteza leukotrienów wymaga obecności kompleksu funkcjonalnych białek na zewnętrznej powłoce jądra i siateczki śródplazmatycznej, tj. fosfolipazy A_2, 5-lipooksygenazy, integralnego białka aktywującego lipooksygenazę (FLAP) oraz syntazy leukotrienów (LTC_4S), która wykazuje wysoką homologię z białkiem FLAP [27]. W warunkach aktywacji komórek zapalnych 5-lipooksygenaza ulega przeniesieniu do powłoki jądrowej, gdzie przekształca kwas arachidonowy do niestabilnego epoksydu — leukotrienu A_4 (LTA_4) [40]. W dalszym etapie następuje synteza leukotrienu C_4 na drodze koniugacji LTA_4 z GSH, a następnie izomeryzacji przy katalitycznym udziale LTC_4S skoniugowanej z białkiem FLAP. Rolę syntazy leukotrienu C_4 mogą również odgrywać dwie mikrosomalne transferazy glutationowe: MSTGT2 i MSTGT3 wykazujące wysoką homologię z białkiem FLAP, które nie posiada właściwości katalitycznych, natomiast wiąże arachidonian, ułatwiając jego biotransformację do leukotrienu A_4. Homodimery i homotrimery FLAP są prawdopodobnie odpowiedzialne za wytworzenie puli LTA_4 zdolnej zarówno do biotransformacji do LTC_4, jak i LTB_4 [27]. Stwierdzono, że MSTG2 i MSTG3 człowieka mogą uczestniczyć zarówno w procesie detoksykacji ksenobiotyków, jak i syntezie leukotrienu LTC_4. Natomiast LTC_4S i PGES1 pełnią wyłącznie funkcje odpowiednio: syntazy leukotrienu C_4 i syntazy prostaglandyny E_2 (PGE_2), która powstaje w procesie GSH-zależnej izomeryzacji PGH_2. Oba enzymy katalizują przy tym koniugację substratów z GSH [3].

Kolejnym przykładem jest występująca u kręgowców cytosolowa STG klasy sigma, katalizująca zależną od GSH syntezę hematopoetycznej prostaglandyny D_2 na drodze izomeryzacji PGH_2 (**15**) [41]. Uczestniczy ona również w syntezie prostanoidów serii J, w tym cyklopentanonu prostaglandyny 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$ prostaglandyny J_2 (15d-PGJ_2) [41] w komór-



(15)

Reakcja 15. Synteza prostaglandyny PGD_2 na drodze izomeryzacji PGH_2 z udziałem STGS.

http://rcin.org.pl

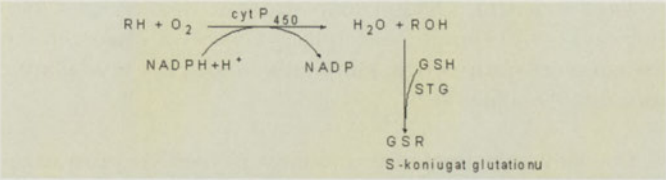
kach tucznych i innych komórkach układu immunologicznego. Koniugacja prostaglandyn i prostanoidów z GSH ułatwia ich eliminację z udziałem transporterów MRP1 i MRP3 (białek związanych z opornością wielolekową).

Ligandyny. W większości przeprowadzanych reakcji, transferazy glutationowe reagują specyficznie z GSH, a następnie wiążą w odpowiednim miejscu drugi substrat o charakterze hydrofobowym, posiadający jednocześnie centrum elektrofilowe wrażliwe na nukleofilowy atak GS^-.

Istnieje jednakże szereg związków, które nie są substratami STG (co wykazano metodą spektroskopii fluorescencyjnej oraz dichroizmu kołowego), a mimo to wykazują powinowactwo do transferaz glutationowych. W tym przypadku nie stwierdzono zależności pomiędzy, stanowiącym miarę wiązania substratu, wygaszaniem wewnętrznej fluorescencji białek (STG), a aktywnością wiązanego ligandu. Nadmiar substancji nie powodował również zablokowania enzymu, co wskazuje na jej wiązanie w miejscu odmiennym niż centrum katalityczne. Transferazy glutationowe wiążące substraty, takie jak np. maleinian i bromosulfoftaleina nazwano ligandynami. Hydrofilowe niesubstratowe ligandy mogą być związane z enzymem zarówno kowalencyjnie, jak i niekowalencyjnie. Nie wiadomo natomiast czy substancje te nie reagują z GSH wskutek niezdolności do wiązania się w miejscu H, czy też w wyniku odpychającego działania jonu tiolanowego [28]. Ligandyny uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie oraz sekwestracji ligandów. Funkcje ligandyn pełnią STG klasy alpha (helisa 9 regionu C-końcowego) oraz liczne STG pochodzenia roślinnego [9,15].

BIOLOGICZNE ZNACZENIE TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

Cytosolowe STG wykazują przeważnie działanie ochronne w przeciwieństwie do mikrosomalnych o charakterze prozapalnym. Enzymy te uczestniczą w detoksykacji ksenobiotyków, usuwaniu produktów stresu oksydacyjnego oraz modulacji ścieżek transdukcji sygnałów, prowadzących do namnażania komórek lub apoptozy [3]. STG klasy pi mogą być stosowane jako markery białkowe procesu detoksykacyjnego specyficznych tkanek [8].



Schemat 3. Detoksykacja: faza 1 i 2.

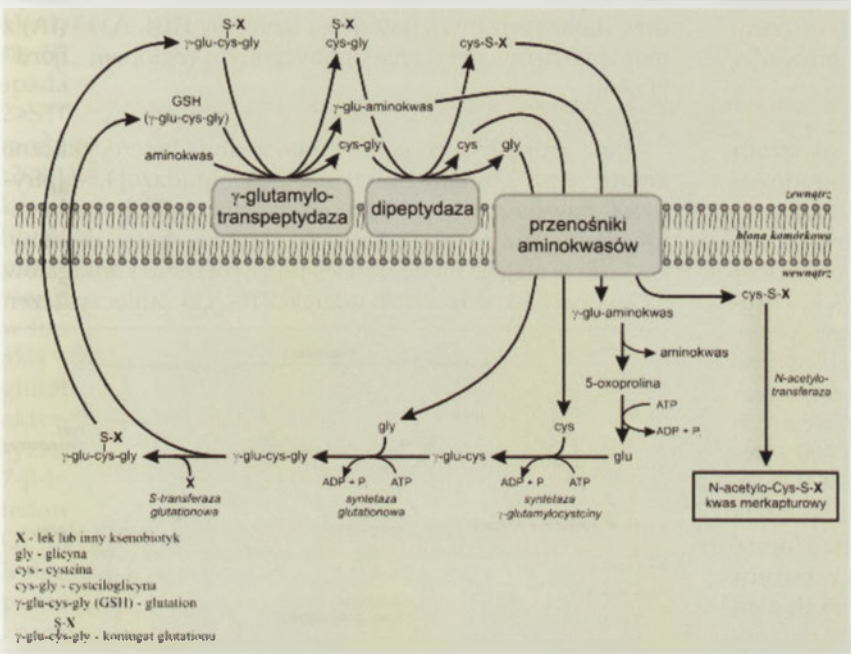
DETOKSYKACJA KSENOBIOTYKÓW

Proces detoksykacji obejmuje cztery fazy.

Faza pierwsza. Pierwszym etapem procesu detoksykacji jest mikrosomalna transformacja cząsteczek ksenobiotyków, która następuje głównie w komórkach wątroby z udziałem cytochromu P450. Prowadzi to do zwiększenia polarności metabolizowanych związków, co ułatwia i podwyższa zdolność usuwania toksycznych metabolitów z ustroju ludzkiego i zwierzęcego.

Faza druga. W fazie drugiej następuje sprzęganie, zmodyfikowanych wskutek mikrosomalnego metabolizmu, związków z kwasem siarkowym, glukuronowym, z pewnymi aminokwasami lub peptydami, np. z glutationem, przy katalitycznym udziale odpowiednich enzymów: sulfotransferazy, glukuronozylotransferazy i transferazy glutationowej (STG) (Schemat 3).

Faza trzecia. W trzeciej fazie detoksykacji S-koniugaty glutationu (GSR), podobnie jak sam glutation — L-γ-glutamylo-L-cysteinyloglicyna (GSH) ulegają biodegradacji w tzw. cyklu γ-glutamylowym Meistera (Schemat 4). Proces ten jest poprzedzony ich przeniesieniem z udziałem transbłonowych przenośników — białek związanych z opornością wielolekową (MRP) i ich homologów. Cykl γ-glutamylowy obejmuje dwustopniowy proces biosyntezy glutationu w cytosolu z udziałem syntetaz γ-glutamylocysteinowej i glutationowej oraz biodegradację GSH i GSR z udziałem enzymów transbłonowych: γ-glutamylotranspeptydazy (γGT) i dipeptydazy cysteinyloglicynowej (DP) (Schemat 4). Biodegradacja odbywa się głównie w nerkach, z uwagi na znacznie wyższą aktywność γGT niż w innych narządach. W przypadku S-koniugatów glutationu pod wpływem γGT następuje usunięcie reszty glutaminianowej i glicynowej, w wyniku czego powstaje S-koniugat cysteiny (CysSR) [42].



Schemat 4. Cykl γ-glutamylowy Meisnera.

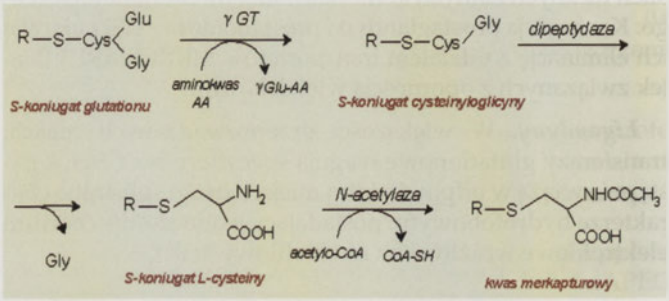
http://rcin.org.pl

Faza czwarta. Ostatni etap procesu detoksykacji ksenobiotyków obejmuje N-acetylację Cys-SR z utworzeniem kwasu merkapturowego, który łatwo może być wydalany z moczem (Schemat 5).

Powstawanie tioeterów cysteiny (Cys-S-X), prowadzące zazwyczaj do nietoksycznego kwasu merkapturowego, wiąże się jednakże z niebezpieczeństwem wynikającym z możliwości przebiegu konkurencyjnej reakcji — β-eliminacji, której produktami są pirogronian, amoniak i reaktywne tiole (RS). Alternatywnie mogą również powstawać kwasy sulfenowe, które w reakcji z tiolami białkowymi tworzą mieszane disiarczki, przyczyniając się do zahamowania funkcji białek. S-koniugaty cysteiny mogą także ulegać transaminacji i oksydacji do S-koniugatów kwasu pirogronowego (Schemat 6) [42]. Natomiast w obecności monooksydazy zależnej od flawin FMO i cytochromu P450 mogą powstawać toksyczne sulfoksydy [30]. Nerki, w których natężenie procesu biodegradacji S-koniugatów z udziałem γGT jest szczególnie wysokie, oprócz aktywności β-liazy, wykazują aktywność N-deacetylazy, która może przeciwdziałać skutkom detoksykacji, przekształcając powstające w wątrobie merkapturany ponownie do S-koniugatów cysteiny, substratów β-liazy [43]. O skuteczności procesu detoksykacji decydować więc będzie z jednej strony równowaga pomiędzy N-acetylacją a β-eliminacją, z drugiej natomiast — pomiędzy N-acetylacją a deacetylacją. Wysokie stężenie merkapturanów w moczu może być wykładnikiem prawidłowego przebiegu procesu biodegradacji ksenobiotyków, prowadzącego ostatecznie do ich detoksykacji. S-koniugaty cysteiny mogą również ulegać transaminacji lub utlenianiu do odpowiednich S-koniugatów 3-merkaptopirogronianowych.

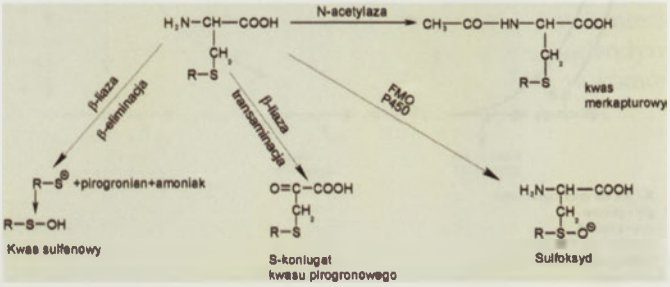
Ciekawą grupę związków stanowią S-koniugaty cysteiny z chlorowcoalkenami. Związki te mogą ulegać transaminacji i β-eliminacji przy katalitycznym udziale β-liazy do aktywnych produktów pośrednich. W procesie β-eliminacji powstają aktywne tiolany, pirogronian i amoniak. Również oksydacja siarki w haloalkenowych S-koniugatach cysteiny i odpowiadających im kwasów merkapturowych prowadzi do bioaktywacji tych związków [30].

Egzogenne substraty STG obejmują szerokie spektrum substancji, w tym zanieczyszczenia przemysłowe i środowiskowe, środki owadobójcze — pestycydy i herbicydy, kancerogeny, a także leki. Szczególne zagrożenie dla zdrowia stanowią wszechobecne (w dymie papierosowym, spalinach) wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jak: chryzen, benzochryzen, fenantren, benzofenantren, benzopiren, dibenzatracen metabolizowane do toksycznych epoksydów diolowych [3,44]. Epoksydy diolowe, produkty utleniania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (PAH) z udziałem monooksydaz zależnych od P450 i hydrolaz epoksydowych, wykazują właściwości rakotwórcze. W detoksykacji tych związków, oprócz STGA1-1, STGA2-2 i STGM1-1, znaczącą rolę odgrywa hSTGP1-1. Istnieją 4 formy STGP1-1, które różnią się resztami aminokwasów w pozycji 104 i 113 i wykazują zróżnicowaną aktywność względem epoksydów diolowych, pochodnych PAH. Najbardziej rozpowszechniony z alleli hSTGP1-1(I104,A113) charakteryzuje się zarazem największą efektywnością w przeciwdziałaniu toksyczności epoksydów diolowych wywodzących się z antibenzochryzenu i benzofenantrenu. Natomiast allele STGP1-1(V104,A113) i (V104,V113), są bardziej aktywne w detoksykacji (+)-antibenzopirenu niż izoenzymy zawierające resztę izoleucyny w pozycji 104. Sundberg i wsp. ostatnio potwierdzili większą efektywność alleli zawierających resztę waliny w pozycji 104 w procesie koniugacji z większością PAH w tym antibenzopirenem. Wynika z tego, że osobniki — homozygoty dla V104, A113 lub V104,V113 powinny być mniej zagrożone kancerogennym działaniem PAH, co nie znajduje potwierdzenia w rzeczywistości. Wskazuje to na rolę innych węglowodorów aromatycznych, jak benzochryzen i benzofenatren, w procesie nowotworzenia. Warianty VA i VV odgrywają rolę w detoksykacji epoksydów diolowych regionu *„bay"* (+)-antibenzopirenu, (±)-antichryzenu i racemicznego (±)-antibenzochryzenu, natomiast izoformy I104, A113 uczestniczą w detoksykacji regionu *„fjord'* (±)-antibenzochryzenu i benzofenantrenu. Ponieważ epoksydy diolowe regionu *'fjord"* są znacznie bardziej mutageniczne i kancerogenne niż regionu *„bay"*, detoksykacja tego regionu przez wariant IA transferazy glutationowej klasy pi może być decydująca dla przeciwdziałania toksyczności (±)-antibenzochryzenu i benzofenantrenu. [45]. Podsumowując, izoformy V104, A113 (VA) oraz V104,V113 (VV) uczestniczą w koniugacji GSH z planarnym regionem *„bay"* epoksydów diolowych PAH, natomiast izoformy I104, A113 (IA) z nieplanarnym i sterycznie ograniczonym regionem „fjord" [45,46].



Schemat 5. Przemiany tioeterów cysteiny prowadzące do powstawania kwasów merkapturowych.

Inną grupę kancerogenów reprezentują heterocykliczne aminy, np. 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-*b*]pirydyna, powstające w procesie gotowania produktów bogatobiałkowych i przekształcane do aktywnych metabolitów. Związki te ulegają biodegradacji po utworzeniu koniugatów z GSH przy katalitycznym udziale STG. Do zanieczyszczeń



Schemat 6. Przemiany tioeterów cysteiny z udziałem β-liazy, FMO i P450.

http://rcin.org.pl

środowiskowych, usuwanych przez STG należą również: akroleina, atrazyna, DDT, nieorganiczne arseniany, lindan, tridifan i wiele innych [3].

Endogenne substraty STG. Inną doniosłą funkcją jaką spełniają STG jest ochrona przed bioaktywnymi produktami stresu oksydacyjnego, utworzonymi z udziałem reaktywnych form tlenu (RFT) w procesie peroksydacji lipidów błonowych. Procesy peroksydacji prowadzą do powstawania wysoce niestabilnych wodoronadtlenków lipidów, które z kolei ulegają biodegradacji do epoksyaldehydów, 2-alkenali, 4-hydroksy-2-alkenali i ketoaldehydów. Związki te, o charakterze elektrofilowym, są często genotoksyczne. Szczególnie wysoki poziom RFT znajduje się w bezpośrednim otoczeniu mitochondriów. Mitochondrialne STG posiadają zdolność detoksykacji produktów pośrednich stresu oksydacyjnego poprzez redukcję wodoronadtlenków oraz α, β-nienasyconych aldehydów [6]. W usuwaniu 4-hydroksy-2-nonenalu i innych alkenali w znacznym stopniu uczestniczy STGA4-4 [6,44]. Natomiast hSTGP1-1 oprócz inaktywacji α, β-nienasyconych aldehydów uczestniczy w detoksykacji zasadowych propenali i wodoronadtlenków [6]. W mitochondriach ludzkiej wątroby stwierdzono znaczącą aktywność STGA1, STGA2 oraz STGP1 [6]. Co ciekawe, specyficzna aktywność mitochondrialnej STG względem 4-hydroksy-2-nonenalu jest znacznie wyższa od cytosolowej [6]. Wskazuje to na rolę tego enzymu w przeciwdziałaniu uszkodzeniom mitochondriów podczas stresu oksydacyjnego.

AKTYWNOŚĆ PEROKSYDAZOWA TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH

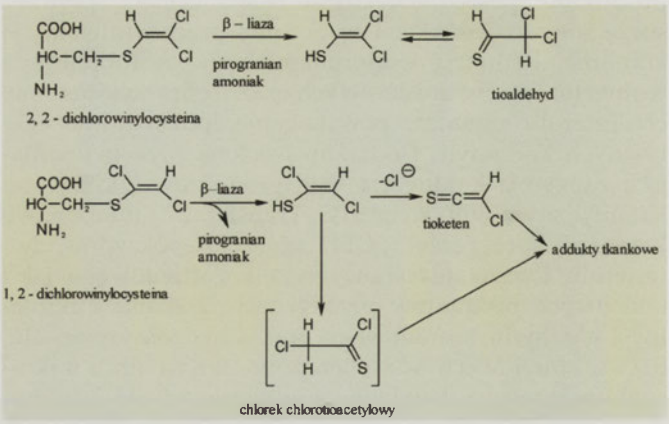
Aktywność peroksydazowa jaką wykazują izoenzymy STG pozwala na redukcję wodoronadtlenków fosfolipidów, wolnych kwasów tłuszczowych i cholesterolu wewnątrz błon komórkowych (bez wcześniejszego działania fosfolipazy C), zapobiegając w ten sposób powstawaniu elektrofilowych produktów pośrednich stresu oksydacyjnego [47]. Najwyższą aktywnością peroksydazową względem 1-palmitoilo-2-(13-hydroperoxy-cis-9, trans-11-oktadienoilo)-1-3-fosfatydylocholiny charakteryzują się STGA, STGM oraz STGT, przy czym aktywność ta spada w szeregu STGA1-1>STGT1-1>STGM1-1>STGA2-2>STGA4-4. Stwierdzono, że mutacje, które powodują modyfikacje miejsca hydrofobowego w STGA1-1 — Met208Ala lub Arg15Lys, obniżają k_{cat} dla wodoronadtlenków fosfolipidów [48]. Ochrona przed peroksydacją lipidów może mieć znaczenie dla procesu konserwacji produktów spożywczych (mięsa, tłuszczów). Co ciekawe, podczas przechowywania próbek tych produktów w formie zamrożonej zaobserwowano stopniowy wzrost aktywności peroksydazy glutationowej oraz transferazy glutationowej [49]. STG klasy alpha wykazują również aktywność peroksydazową, skierowaną przeciwko toksyczności wodoronadtlenków steroidowych, np. 7-α i 7-β-hydroperoksycholest-5-en-3-β-ol-u, podobnie jak selenowa peroksydaza glutationowa (Se-GP). Jednakże Se-GP może katalizować redukcję wodoronadtlenków cholesterolu występujących w znacznie niższych stężeniach, ponieważ powinowactwo Se-GP do tych substratów jest znacznie wyższe niż STGA [50]. Fizjologiczne znaczenie STGA polega zarówno na uczestnictwie w detoksykacji produktów pośrednich stresu oksydacyjnego poprzez sprzęganie z GSH, jak i w obronie przeciwutleniającej komórek. Redukcja wodoronadtlenków fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych oraz wodoronadtlenków cholesterolu ogranicza powstawanie epoksydów i reaktywnych karbonyli. Dodatkową osłonę przeciwutleniającą zapewnia koniugacja tych produktów z GSH pod katalitycznym wpływem STG. Transferazy glutationowe katalizują sprzęganie z GSH zarówno epoksydów cholesterolu, kwasu stearynowego i eikozatrienowego, jak i końcowych produktów peroksydacji: 2-alkenali akroleiny i aldehydu krotonowego oraz 4-hydroksynonenalu. STGA, której obecność stwierdzono we wnętrzu mikrosomówczłowieka, katalizuje koniugację z GSH 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazolu oraz genotoksycznych α,β-nienasyconych aldehydów, m.in. 4-hydroksy-2-nonenalu. Wykazuje również aktywność peroksydazową względem wodoronadtlenków wolnych kwasów tłuszczowych i fosfatydylocholiny, ale nie względem samego nadtlenku wodoru [51]. Mikrosomalne STG mogą również przeciwdziałać skutkom stresu oksydacyjnego w sposób pośredni, poprzez reaktywację peroksyredoksyny (PrxVI) — enzymu katalizującego redukcję nadtlenku wodoru oraz wodoronadtlenków lipidowych. Redukcja tych substratów powoduje utlenienie Cys47 w PrxVI do kwasu sulfenowego, co prowadzi do zahamowania aktywności enzymu. Reaktywacja peroksyredoksyny następuje poprzez heterodimeryzację tego enzymu z STGP zawierającym związany GSH, a nastepnie glutationylację, prowadzącą do powstawania mieszanych disiarczków. Ostatnim etapem tego procesu jest redukcja mieszanego disiarczku z udziałem GSH, w wyniku czego następuje regeneracja -SH w miejscu aktywnym PrxVI. [5,52].

STG odgrywają również ważną rolę w detoksykacji epoksydów powstających w procesie utleniania chlorowcopochodnych alkenów przy katalitycznym udziale cytochromu P450 lub oksygenaz produkowanych przez mikroorganizmy. Epoksydy wywodzące się z chlorowcopochodnych etenu, jak również produkty ich transformacji (chlorki acetylowe) mogą tworzyć addukty z makrocząsteczkami komórkowymi, przyczyniając się do ich kowalencyjnej modyfikacji. Natomiast koniugacja GSH z epoksydami, np. z 1,2-dichloroepoksyetanem, przy katalitycznym udziale STG, prowadzi do otwarcia ich pierścienia. Powstają przy tym niestabilne produkty przejściowe, które ulegają spontanicznej dekompozycji do glioksalu [53].

NIEKORZYSTNY EFEKT BIODEGRADACJI KSENOBIOTYKÓW

Terapii przeciwnowotworowej często towarzyszy nadekspresja STG, będąca czynnikiem rozwoju nabytej oporności w stosunku do leków przeciwnowotworowych. Wiele chemoterapeutycznych czynników, jak: adriamycyna, chlorambucil, cisplatyna, cyklofosfamid, kwas metakrylowy, mitozantron, pochodne nitrozomocznika i inne tworzy koniugaty z glutationem w procesie katalizowanym przez STG i jest degradowanych oraz usuwanych z organizmu. Prowadzi to do zmniejszenia ich terapeutycznego działania, a tym samym skuteczności [3]. Innym niekorzystnym zjawiskiem towarzyszącym koniugacji ksenobiotyków z GSH może być ich bioaktywacja.

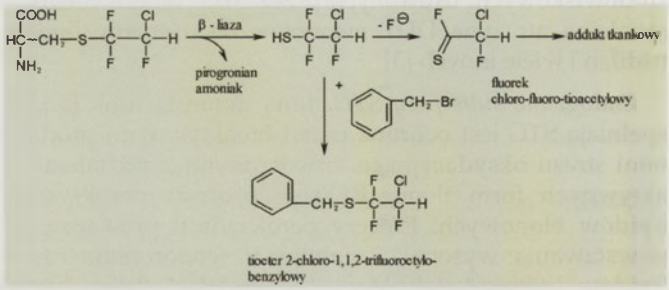
http://rcin.org.pl



Schemat 7. Bioaktywacja dichlorowinylocysteiny z udziałem β-liazy.

BIOAKTYWACJA S-KONIUGATÓW GLUTATIONU

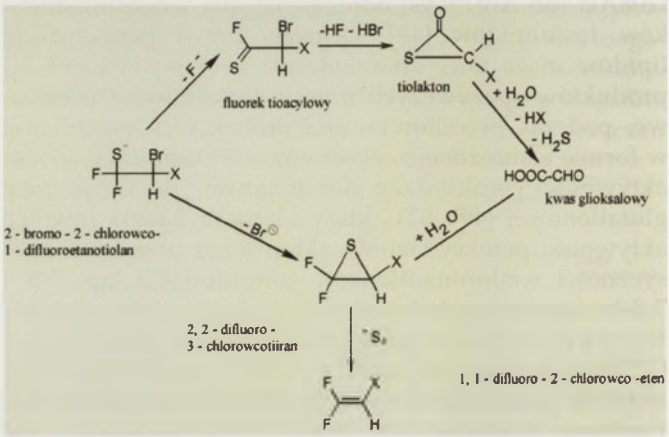
Do związków łatwo ulegających procesowi bioaktywacji należą chlorowcopochodne alkanów i alkenów, powszechnie używanych w przemyśle jako solwenty, środki owado- i grzybobójcze oraz produkty pośrednie dla syntezy organicznej. Poza bioaktywacją pod wpływem cytochromu P450 mogą one ulegać biotransformacji w reakcji sprzęgania z glutationem, która przebiega tym łatwiej, iż atom węgla połączony z odciągającym elektrony chlorowcem staje się centrum elektrofilowym podatnym na atak nukleofilowych grup GS^- [53]. S-koniugaty glutationu, powstające głównie w wątrobie, ulegają przeniesieniu do nerek, gdzie z udziałem γ-glutamylotranspeptydazy następuje ich hydroliza do tioeterów cysteiny. Toksyczność S-koniugatów cysteiny z chlorowcoalkenami jest rezultatem transaminacji i β-eliminacji przy katalitycznym udziale β-liazy. W reakcji tej powstają tiolany, pirogronin i amoniak. Niestabilne tiolany przekształcane są następnie w elektrofilowe czynniki tioacetylujące, których obecność prowadzi do ekspresji toksyczności. Tiolany utworzone z udziałem β-liazy mogą ulegać tautomeryzacji do formy tioacetylowej lub eliminacji do tioketenów (Schemat 7). Reasumując, w wyniku sprzęgania chlorowcopochodnych alkenów z GSH mogą powstawać w nerkach z udziałem β-liazy reaktywne tioketeny (z S-koniugatów pochodzących od chloroalkenów), tioacetylochlorowcopochodne (z S-koniugatów wywodzących się od fluoroalkenów nie zawierających bromku), tiirany i tiolaktony (z S-koniugatów pochodnych fluoroalkenów, zawierających bromek) [30]. Powstawanie tych bioaktywnych metabolitów może wyjaśniać rakotwórcze i toksyczne względem nerek działanie, m.in. trichloroetenu i tetrachloroetenu. Koniugacja toksycznego trichloroetenu z GSH prowadzi do utworzenia dwóch izomerów (E) lub (Z)-S-(1,2-dichlorowinyloglutationu) lub S-(2,2-dichlorowinyloglutationu). Tioacylujące pochodne produktów β-eliminacji S-koniugatów cysteiny z 1,1-dichloroalkenami oraz 1,1-difluoroalkenami reagują z tkankowymi makrocząsteczkami (głównie z połączoną z białkami resztą lizyny) z utworzeniem kowalencyjnie związanych adduktów. Wykazano, że S-(2,2-dichlorowinylo)-L-cysteina przejawia mniejszą nefrotoksyczność niż S-(1,2-dichlorowinylo)-L-cysteina z uwagi na znacznie wolniejszą aktywację pod wpływem β-liazy oraz możliwość tautomeryzacji powstającego z jej udziałem tiolanu do nietoksycznego tioaldehydu [30,54].



Schemat 8. Bioaktywacja S-koniugatów cysteiny z 1,1,2-trifluoro-2-chloro-etanem pod wpływem β-liazy.

Ponadto, produkty pośrednie β-eliminacji S-koniugatów cysteinowych chlorowcopochodnych alkenów mogą wchodzić w reakcje z innymi ksenobiotykami, przyczyniając się do wzrostu toksyczności. Przykładem może być 2-chloro-1,1,2-trifluoroetanotiolan wyłapywany przez bromek benzylu z utworzeniem tioeteru 2-chloro-1,1,2-trifluoroetylobenzylowego (Schemat 8), który jest substratem dla cytochromu P450 i wykazuje cytotoksyczność w izolowanych hepatocytach [30].

Liczne doniesienia wskazują na nefrotoksyczność i cytotoksyczność S-koniugatów cysteinowych wywodzących się zarówno z fluoroalkenów, jak i chloroalkenów, przy czym te ostatnie wykazują również mutageniczność. Wskazuje to na powstawanie z ich udziałem dodatkowych produktów pośrednich, którymi okazały się **tioketeny** (utworzone w drodze eliminacji jonu chlorkowego z tiolanów), które mogą reagować z DNA. Jednakże również fluoroalkeny, zawierające w swej cząsteczce atomy bromu, mogą być mutagenne wskutek metabolizmu z udziałem β-liazy do reaktywnych produktów pośrednich — tiiranów. Produktami pośrednimi metabolizmu fluoroalkenów mogą być α-tiololaktony lub tiirany (Schemat 9). Powstawanie reaktywnych produktów pośrednich — tiiranów jest korzystniejsze energetycznie, co wydaje się przeczyć powstawaniu formy α-tiolaktonowej [55]. Ostatnio wykazano, że tiirany powstają również z S-koniugatów cysteiny z fluoropochodnymi alkenów, nie zawierającymi bromu, np. w procesie metabolizmu 2-chloro-1,1,2-trifluoroetanotiolanu oraz 2,2-dichloro-1,1-difluoroetanotiolanu [30].



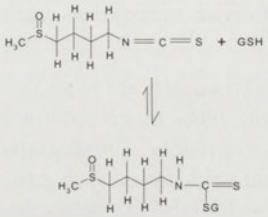
Schemat 9. Przemiany tiolanów — produktów β-eliminacji tioeterów do związków mutagennych.

http://rcin.org.pl

Procesem alternatywnym do β-eliminacji jest sulfoksydacja. S-koniugaty kwasów merkapturowych: N-acetylo-S-(1,2-dichlorowinylo)-L-cysteina, N-acetylo-S-(2,2-dichlorowinylo)-L-cysteina, N-acetylo-S-(1,2,2-trichlorowinylo)-L-cysteina i inne ulegają sulfoksydacji przy katalitycznym udziale cytochromu P450. Proces ten może więc hamować detoksykację chlorowcopochodnych alkenów. Ponadto, utworzone w tym procesie sulfoksydy są bardziej cytotoksyczne w koże nerki niż odpowiadające im koniugaty kwasów merkapturowych, gdyż reagują one z makrocząsteczkami komórkowymi. Cytotoksyczność wykazują również S-koniugaty cysteinylo-glicynowe. Jej zahamowanie może nastąpić pod wpływem dipeptydaz. Pierwszymi objawami cytotoksyczności wywołanej obecnością S-koniugatów (S-1,2-dichlorowinylocysteiny i S-(1,2,3,4,4-pentachlorobutadienylocysteiny) są: zahamowanie oddychania komórkowego i obniżenie stężenia ATP, wskazujące na dysfunkcję mitochondriów. Towarzyszą temu zmiany potencjału błony mitochondrialnej, prowadzące do zmian przepuszczalności oraz spadek poziomu GSH w mitochondriach. W komórkach inkubowanych z S-koniugatami stwierdzono poza tym wzrost stężenia disiarczków glutationu. Powstawaniu kowalencyjnych adduktów S-(1,2-dichlorowinylo)-L-cysteiny towarzyszy wzrost peroksydacji lipidów, zwiększona synteza HSP70 i śmierć komórki. S-(1,2-dichlorowinylo)-L-cysteina powoduje również anemię aplastyczną oraz nekrozę nabłonka kanalików nerkowych u zwierząt. W bioaktywacji S-koniugatów cysteiny mogą uczestniczyć również transaminazy. Transaminacja S-(1,2-dichlorowinylo)-D-cysteiny prowadzi do kwasu S-(1,2-dichlorowinylo)-3-merkaptopirogronowego, który z kolei może ulegać transaminacji do nefrotoksycznego koniugatu L-cysteiny (S-1,2-dichlorowinylo-L-cysteiny), będącego substratem β-liazy [30]. Związek ten może indukować stres oksydacyjny, a w konsekwencji — aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB. S-koniugaty cysteiny i glutationu wykazują znacznie mniejszą toksyczność u ludzi niż u zwierząt z uwagi na niższą aktywność β-liazy w nerkach człowieka. Równocześnie potencjalne rakotwórcze działanie trichloroetenu i tetrachloroetenu, pomimo pojawienia się w moczu zwierząt S-koniugatów kwasów merkapturowych, nie zostało jednoznacznie potwierdzone [30].

Odrębnym problemem, związanym z detoksykacją ksenobiotyków z udziałem STG, może być obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia GSH. Koniugacja allylo-, benzylo-, fenetylo-izotiocyjanianów oraz sulforafanu (izotiocyjanianu 4-metylosulfinylobutylu) z GSH prowadzi do powstania tiokarbamianów, które po opuszczeniu komórki ulegają ponownemu przekształceniu do pochodnych izotiocyjanianów, uwalniając jednocześnie GSH [3]. Izotiocyjaniany mogą być wielokrotnie transportowane do wnętrza komórki i sprzęgane z wewnątrzkomórkowym GSH (**16**), przyczyniając się do stopniowej deplecji tego ważnego przeciwutleniacza, a jednocześnie obniżając możliwość detoksykacji innych ksenobiotyków.

Z drugiej strony, izotiocyjaniany (sulfurafan) i flawonoidy (apigenina) mogą modyfikować, poprzez różne ścieżki transdukcji sygnałów, ekspresję genów enzymów związanych z drugą fazą detoksykacji: transferaz glutationowych i



(16)

Reakcja 16. Reakcja sprzęgania sulforafanu z GSH.

UDP-glukuronyłotransferaz (STGA1 i UTGA1). W ekspresji genu kodującego STGA1 uczestniczą NFκB oraz kinaza fosfatydyloinozytolu 3, indukowane zarówno przez apigeninę, jak i sulforafan [56]. Indukcja enzymów związanych z procesem detoksykacji ksenobiotyków może przyczynić się do przeciwnowotworowego działania izotiocyjanianów (m.in. zahamowanie wzrostu przedklinicznych guzów). Obniżenie poziomu grup tiolowych w komórkach w następstwie koniugacji izotiocyjanianów z GSH może bowiem prowadzić do wybuchu tlenowego, a w konsekwencji — do aktywacji kaspaz i indukcji apoptozy [57].

UDZIAŁ TRANSFERAZ GLUTATIONOWYCH W PROCESIE PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW

Transferazy glutationowe odgrywają ważną rolę w modulowaniu przekazywania sygnałów lub apoptozy, poprzez oddziaływanie z białkami indukowanymi przez stres. Enzymy te selektywnie rozpoznają pewne sekwencje białek wykazujących wysoką homologię z czynnikiem martwicy nowotworów (TNF), z czynnikiem zasocjowanym z TRAF4, z C-końcową domeną kinazy Jun oraz z receptorem MRGX3, zasocjowanym z białkiem G. Oddziaływania tego rodzaju stwierdzono w przypadku STGA1-1, STGP1-1 i STGM2-2 [58].

Transferazy glutationowe klasy pi mogą być również endogennymi inhibitorami kinazy Jun (JNK). W fizjologicznych warunkach aktywność JNK jest bardzo niska, pomimo ciągłej stymulacji przez czynniki wzrostu i endogenne reaktywne formy tlenu, ponieważ JNK jest zasocjowana z monomeryczną formą STGP, prawdopodobnie w centrum aktywnym enzymu. Podczas stresu oksydacyjnego następuje zmniejszenie oddziaływania STGP-JNK wskutek dimeryzacji (multimeryzacji) enzymu. Powstające wówczas mostki disiarczkowe pomiędzy podjednostkami stwarzają ograniczenia steryczne, utrudniające wiązanie kinazy. Uwolnienie JNK prowadzi do fosforylacji c-jun, a w konsekwencji — do aktywacji enzymów uczestniczących w usuwaniu skutków stresu, w tym STGP. Wskazuje to na istnienie bezpośredniego systemu regulacji aktywności kinazy jun przez STGP. Istnieje hipoteza, że komórki raka, wykazujące nadmierną syntezę STGP, unikają w ten sposób apoptozy, w której pośredniczy JNK [59]. Ciągła aktywacja kinazy Jun w komórkach jest warunkiem przebiegu apoptozy indukowanej przez różne stymulatory, w tym 4-hydroksynonenal (4-HNE). 4-HNE powoduje aktywację JNK, która wiąże się do N-końcowego regionu c-jun i fosforyluje 2 miejsca wewnątrz domeny aktywacyjnej tego czynnika transkrypcyjnego. C-jun z kolei tworzy kompleks z miejscem AP-1 promotora wielu genów, w konsekwencji czego następuje aktywacja kaspazy-3 i apoptoza. Wykazano, że cytotoksyczności 4-hydroksynonenalu można przeciwdziałać poprzez

http://rcin.org.pl

transfekcję komórek z mSTGA4, ponieważ enzym ten wiąże 4-HNE [60].

Ponieważ eikozanoidy działają jako cząsteczki sygnałowe, modulowanie ich poziomu przez STG może również wpływać na proces przekazywania sygnałów. Prostaglandyny cyklopentanowe w odróżnieniu od klasycznych prostaglandyn: PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ nie oddziałują poprzez receptory związane z białkiem G. 15d-PGJ_2, metabolit PGD_2 jest ligandem aktywującym PPARγ (z ang. *peroxisome proliferator-activated receptor* γ). Ten czynnik transkrypcyjny jest krytyczny dla różnicowania adipocytów. Koniugacja 15d-PGJ_2 z GSH może zmniejszyć ekspresję genów aktywowaną oddziaływaniem tego prostanoidu z PPARγ [61].

Transkrypcja wielu genów kodujących białka chroniące komórkę przed kancerogenami i utleniaczami pozostaje pod kontrolą rejonu regulatorowego DNA – ARE (ang. *antioxidant response element*). Wzrost ekspresji tych genów powoduje zahamowanie rozwoju nowotworu. Różne substancje chemiczne, będące pośrednimi induktorami ARE, powodują odszczepienie Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*) połączonego z białkiem Keap1. Wolny Nrf2 migruje z cytoplazmy do jądra, gdzie łączy się z rejonem ARE, powodując wzrost transkrypcji enzymów detoksykacyjnych i białek o działaniu przeciwutleniającym [62]. 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandyna J_2 łączy się z resztą cysteiny białka Keap1 zasocjowanego z cytoszkieletem, co uniemożliwia jego oddziaływanie na jądrowy czynnik Nrf2 i ułatwia jego dysocjację. Sprzęgniecie 15d-PGJ_2 z GSH powoduje utratę zdolności tej prostaglandyny do modyfikacji Keap1, a tym samym zmniejsza ilość Nrf2 przedostającego się do jądra.

UWAGI KOŃCOWE

Transferazy glutationowe (STG) uczestniczą w metabolizmie kancerogenów, leków, zanieczyszczeń środowiskowych, metabolitów przemysłowych, środków ochrony roślin, produktów pośrednich stresu oksydacyjnego i wielu innych związków. Równocześnie pod wpływem proutleniaczy, a także w przebiegu procesu nowotworowego następuje aktywacja transkrypcji genów kodujących STG. Enzymy te pełnią zatem przeciwstawne funkcje: z jednej strony uczestniczą w detoksykacji ksenobiotyków, z drugiej natomiast zmniejszają terapeutyczne działanie leków, poprzez koniugację z glutationem i usuwanie utworzonych pod ich katalitycznym wpływem tioeterów, co może mieć szczególne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Dlatego poznanie ich budowy oraz mechanizmu działania może pozwolić na modulowanie ich funkcji, ponieważ nawet niewielkie zmiany strukturalne mogą znacznie zmienić powinowactwo STG do określonych substratów. Poważnym problemem dla toksykologów może być aktywacja zarówno utworzonych S-koniugatów, jak produktów ich N-acetylacji pod wpływem β-liazy, enzymu, którego najwyższą aktywność zaobserwowano w nerkach. Powstające w tym procesie tiolany mogą być przekształcone do toksycznych czynników tioacylujących, tiiranów lub mutagenicznych tioketenów. Zarówno w warunkach aktywacji tioeterów pod wpływem β-liazy, jak i w przebiegu procesu nowotworowego zahamowanie aktywności S-transferaz mogłoby więc mieć znaczenie terapeutyczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Armstrong R N (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chem Res Toxicol 10: 2-18
2. Nathaniel C, Wallace LA, Burke J, Dirr HW (2003) The role of an evolutionarily conserved cis-proline in the thioredoxin-like domain of human class Alpha glutathione transferase A1-1. Biochem J 372: 241-246
3. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 51-88
4. Mannervik B, Berhane K, Castro VM, Olin B, Ridderstrom M, Vignani R, Kozarich JW, Ringborg U (1990) Glutathione-linked enzymes in normal and tumor cells and their role in resistance against genotoxic agents. Princess Takamatsu Symp 21: 253-262
5. Morozova N, Khrapko K, Panee J, Liu W, Harney JW, Berry MJ (2007) Glutathione depletion in hippocampal cells increases levels of H and L ferritin and glutathione S-transferase mRNAs. Genes to cells 12: 561-567
6. Gallagher EP, Gardner JL, Barber DS (2006) Several glutathione S-transferase isoenzymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria. Biochem Pharmacol 71: 1619-1628
7. Pearson WR (2005) Phylogenies of glutathione transferase families (2005) Methods Enzymol 401: 186-204
8. Thyagaraju K, Hemavathi B, Vasundhara K, Rao AD, Devi KN (2005) Comparative study on glutathione transferases of rat brain and testis under the stress of phenobarbitol and β-methylcholanthrene. J Zhejiang Univ Sci 6B: 759-769
9. Moons A (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). Vitam Horm 72: 155-202
10. Sheehan D, Meade G, Foley FM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classivication of non-mammalian members of an ancient superfamily. Biochem J 360: 1-16
11. Kong GKW, Polekhina G, McKinstry WJ, Parker MW, Dragani B, Aceto A, Paludi D, Principe DR, Mannervik B, Stenberg G (2003) Contribution of glycine 146 to a conserved folding module affecting stability and refolding of human glutathione transferase P1-1. J Biol Chem 278: 1291-1302
12. Cocco R, Stenberg G, Dragani B, Principe DR, Paludi D, Mannervik B, Aceto A (2001) The folding and stability of human alpha class glutathione transferase A1-1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif. J Biol Chem 276: 32177-32183
13. Alves CS, Kuhnert DC, Sayed Y, Dirr HW (2006) The intersubunit lock- and- key motif in human glutathione transferase A1-1: role of the key residues Met^{51} and Phe^{52} in function and dimer stability. Biochem J 393: 523-528
14. Sinning I, Kleywegt GJ, Cowan SW, Reinemer P, Dirr HW, Huber R, Gilliland GL, Armstrong RN, Ji X, Board PG, Olin B, Mannervik B, Jones TA (1993) Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and comparison with Mu and Pi class enzymes. J Mol Biol 232: 192-212
15. Kuhnert DC, Sayed Y , Mosebi S, Sayed M, Stell T, Dirr HW (2005) Tertiary interactions stabilise the C-terminal region of human glutathione transferase A1-1: a crystalographic and calorimetric study. J Mol Biol 349: 825-838
16. Dirr HW, Little T, Kuhnert DC, Sayed Y (2005) A conserved N-capping motif contributes significantly to the stabilization and dynamics of the C-terminal region of class alpha glutathione S-transferases. J Biol Chem 280: 19480-19487
17. Ji X, Tordova M, O'Donnell R, Parson JF, Hayden JB, Gilliand GL, Zimniak P (1997) Stucture and function of the xenobiotic substrate- binding site and location of a potential non-substarate- binding site in a class pi glutathione S-transferase. Biochemistry 36: 9690-9702

http://rcin.org.pl

18. Penington CJ, Rule GS (1992) Mapping the substrate-binding site of a human class mu glutathione transferase using nuclear magnetic resonance spektroscopy. Biochemistry 31: 2912-2920

19. Wang RW, Newton DJ, Huskey SE, McKeever BM, Pickett CB, Lu AY (1992) Site directed mutagenesis of glutathione S-transferase Ya,Ya. Important role of tyrosine 9 and aspartic acid in catalysis. J Biol Chem 267: 19866-19871

20. Patskovsky YV, Patskovska LN, Listowsky I (1999) Functions of His 107 in the catalytic mechanism of human glutathione S-transferase hGSTM1a-1a. Biochemistry 38: 1193-1202

21. Oakley AJ, Lo Bello M, Battistoni A, Ricci G, Rossjohn J, Villar HO, Parker MW (1997) The structures of human glutathione S-transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution. J Mol Biol 274: 84-100

22. Johansson HS, Mannervik B (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. J Biol Chem 276: 33061-33065

23. Gu Y, Guo J, Pal A, Pann SS, Zimniak P, Singh SV, Ji X (2004) Crystal structure of human glutathione S-transferase A3-3 and mechanistic implications for its high steroid isomerase activity. Biochemistry 43: 15673-15679

24. Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrunyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J (2000) Identification, characterization and crystal structure of the omega class glutathione transferases. J Biol Chem 275: 24798-24806

25. Garcera A, Barreto L, Piedrafita L, Tamarit J, Herrero E (2006) Saccharomyces cerevisiae cells have three omega class glutathione transferases acting as 1-Cys thiol. Biochem J 398: 187-196

26. Barreto L, Garcera A, Jansson K, Sunnerhagen P, Harrero E (2006) A peroxisomal glutathione transferase of Saccharomyces cerevisiae is functionally related to sulfur amino acid metabolism. Eukaryot Cell 5: 1748-1759

27. Mandal AK, Skoch J, Bacskai BJ, Hyman BT, Christmas P, Miller D, Yamin TD, Xu S, Wisniewski D, Evans JF, Soberman RJ (2004) The membrane organization of leukotriene synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 101: 6587-6592

28. Keen JH, Jakoby WB (1978) Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. J Biol Chem 253: 5654-5657

29. Keen JH, Habig WH, Jakoby WB (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. J Biol Chem 251: 6183-6188

30. Anders MW, Dekant W (1998) Glutathione- dependent bioactivation of haloalkenes. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38: 501-537

31. Schmuck EM, Board PG, Whitbread AK, Tetlow N, Cavanaugh JA, Blackburn AC, Masoumi A (2005) Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age –at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Pharmacogenet Genomics 15: 493-501

32. McCarthy DL, Navarrete S, Willett WS, Babbitt PC, Copley SD (1996) Exploration of the relationship between tetrachlorohydroquinone and the glutathione S-transferases. Biochemistry 35: 14634-14642

33. Seltzer S. (1973) Purfirication and properties of maleylacetone cis-trans isomerase from vibrio 01. J Biol Chem 248: 215-222

34. Fernández-Cañon J M, Baetscher MW, Finegold M, Burlingame T, Gibson KM, Grompe M (2002) Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ) — deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism. Mol Cell Biology 22: 4943-4951

35. Fernández-Cañon JM, Peñalva MA (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. J Biol Chem 273: 329-337

36. Board PG, Anders MW (2005) Human glutathione transferase zeta. Methods Enzymol. 401: 61-77

37. Lantum HBM, Lieber DC, Board PG, Anders MW (2002) Alkylation and inactivation of human glutathione transferase zeta (hGSTZ1-1) by maleylacetone and fumarylacetone. Chem Res Toxicol 15: 707-716

38. Schultz IR, Merdink JL, Gonzales-Leon A, Bull RJ (2002) Dichloroacetate toxicokinetics and disruption of tyrosine catabolism In B6C3F1 mice: dose –response relationships and age as modyfying factor. Toxicology 173: 229-247

39. Kiefer PM Jr, Copley SD (2002) Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrahlorohydroquinone dehalogenase. Biochemistry 41: 1315-1322

40. Swartz J, Hallin E, Shi Y, Söderström M, Hammarström S (2006) Identification of regions of leukotriene C4 synthase which direct the enzyme to its nuclear envelope localization. J Cell Biochem 98: 1517-1527

41. Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O (1997) Clonning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. Cell 90: 1085-1095

42. Włodek L (2003) Glutation. Antyoksydacyjne i detoksykacyjne właściwości, biologiczna i farmakologiczna regulacja biosyntezy, W: Włodek Lidia (red) Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, str. 117-119, 128-131

43. Włodek L, Iciek M (2003) Cysteina. Metabolizm, biologiczna rola i przyczyna toksyczności, W: Włodek L (red) Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, str. 45-47

44. Coles BF, Kadlubar FF (2005) Human alpha class glutathione S- transferases: genetic polymorphism, expression and susceptibillity to disease. Methods Enzymol 401: 9-42

45. Hu X, Srivastava SK, Pal A, Awasthi YC, Zimniak P, Sinh SV (1998) Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenantrene and benzo[g]chrysene. Cancer Res 58: 5340-5343

46. Pal A, Desai DH, Amin S, Srivastava SK, Hu X, Herzog C, Zimniak P, Singh SV (2000) Location of the epoxide function determines specificity of the allelic variants of human glutathione transferase pi toward benzo[c]chrysene diol epoxide isomers. Febs Lett 468: 163-166

47. Yang Y, Sharma R, Zimniak P, Awasthi YC (2002) Role of alpha class glutatione S-transferases as antioxidant enzymes in rodent tissues. Toxicol Appl Pharmacol 182: 105-115

48. Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G (1998) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. Biochem J 332: 97-100

49. Nair MB, Latha MS (2005) Glutathione antioxidant status of frozen meat samples. J Environ Biol 26: 681-685

50. Hiratsuka A, Yamane H, Yamazaki S, Ozawa N, Watabe T (1997) Subunit Ya-specific glutathione peroxidase activity toward cholesterol 7-hydroperoxides of glutathione S-transferases in cytosols from rat liver rand skin. J Biol Chem 272: 4763-4769

51. Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, Reddy CC (2004) Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. Arch Biochem Biophys 424: 72-80

52. Ralat LA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF (2006) Direct evidence for formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. Biochemistry 45: 360-372

53. van Hyclama Vlieg JET, Janssen DB (2001) Formation and detoxification of reactive intermediates in the metabolism of chlorinated ethenes. J Biotechnol 85: 81-102.

54. Commandeur JN, Boogaard PJ, Mulder GJ, Vermeulen NP (1991) Mutagencity and cytotoxicity of two regioisomeric mercapturic acids and cysteine S-conjugates of trichloroethylene. Arch Toxicol 65: 373-380

55. Luu NC, Iyer RA, Anders MW, Ridge DP (2000) Bioactivation mechanisms of haloalkene cysteine s-conjugates modeled by gas-phase, ion-molecule reactions. Chem Res Toxicol 13: 610-615

56. Švehliková V, Shuran W, Jakubiková J, Williamson G, Mitchen R, Bao Y (2004) Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in Caco-2 cells. Carcinogenesis 25: 1629-1637

http://rcin.org.pl

57. Xu K, Thornalley PJ (2001) Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells *in vitro*. Biochem Pharmacol 61: 165-177

58. Edelat M, Persson MA, Mannervik B (2003) Selective recognition of peptide sequences by glutathione transferases: a possible mechanism for modulation of cellular stress-induced signaling pathways. Biol Chem 384: 645-651

59. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ze'ev R (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. EMBO J 18: 1321-1334

60. Cheng Ji-Z, Singhal SS, Sharma A, Saini M, Yang Y, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC (2001) Transfecton of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. Arch Biochem Biophys 392: 197-207

61. Powis G, Mustacich D, Coon A (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. Free Rad Biol Med. 29: 312-322

62. Hang Y, Gordon GB (2004) A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nfr2-ARE signaling pathway. Mol Cancer Ther 3: 885-893

Glutatione transferases — structure and functions. β-lyase-dependent bioactivation of cysteine S-conjugates

Maria Sokołowska-Jeżewicz, Agata Kryczyk, Paulina Dudzik, Lidia Włodek✉

Jagiellonian University, Medical College, Faculty of Medicine, Chair of Medical Biochemistry, 7 Kopernika St., 31-034 Kraków, Poland

✉e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl

Key words: β-lyase-dependent bioactivation of cysteine S-conjugates, cysteine S-conjugates, glutathione, glutathione S-conjugates, glutathione S-transferases, thiredoxin fold

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) catalyze nucleophilic attack of glutathione on electrophilic center of the second substrate, hydrophobic in character. It leads to the formation of glutathione S-conjugates (thioethers), which are subsequently eliminated from the organism as mercapturic acids. However, in some reactions, glutathione can also fulfills the role of a cofactor, facilitating transformation of a hydrophobic substrate molecule, and released after the structure has been changed. Glutathione transferases participate in the processes of conjugation, reduction, isomerization, synthesis of sex hormones, prostaglangins and leukotrienes, degradation of aromatic compounds and signal transduction. The role of these enzymes consists principally in increasing glutathione nucleophilicity by its appropriate positioning and binding in active center, and its following activation by catalytic amino acid residues. There are also so-called ligandins, i.e. glutathione transferases which can bind hydrophobic, non-substrate ligands, thereby contributing to their sequestration. GSTs play a dominating role in detoxification of xenobiotics eliminated from the body in the form of thioethers, which however, under certain conditions, can be bioactivated in β-liase-catalyzed reaction to form compounds capable of forming tissue adducts. Inhibition of S-transferase activity can have therapeutic significance both when thioethers are activated by β-liase and during carcinogenesis, which is often accompanied by overexpression of GSTs.

http://rcin.org.pl

Wpływ modyfikacji białek komórkowych przez *O*-GlcNAc na proces przekazywania sygnału

Anna Krześlak[✉]

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

[✉]Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: (042) 635 44 89, e-mail: chadar@interia.pl

Artykuł otrzymano 16 kwietnia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 18 lipca 2007 r.

Słowa kluczowe: *O*-GlcNAc, fosforylacja, przekazywanie sygnału, transkrypcja

Wykaz skrótów: mOGT (ang. *mitochondrial OGT*) — izoforma OGT o mitochondrialnej lokalizacji; NCOAT (ang. *nuclear cytoplasmic O-GlcNAase and acetyltransferase*) — β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza wykazująca także aktywność acetylotransferazy; ncOGT (ang. *nucleocytoplasmic OGT*) — izoforma OGT o jądrowo-cytoplazmatycznej lokalizacji; *O*-GlcNAc — *N*-acetyloglukozamina przyłączona do polipeptydu wiązaniem *O*-glikozydowym; OGT — β-*N*-acetyloglukozaminylotransferaza UDP-*N*-acetyloglukozamina: białko (*O*-GlcNAc transferaza); PUGNAc — [O-(2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozylideno)amino-*N*-fenylokarbaminian]; sOGT (ang. *short OGT*) — krótka izoforma OGT

Podziękowania: Autorka pragnie podziękować Pani prof. dr hab. Annie Lipińskiej za cenne uwagi w trakcie pisania niniejszego artykułu. Praca została wykonana w ramach działalności statutowej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

STRESZCZENIE

Glikozylacja, polegająca na przyłączeniu pojedynczych reszt β-*N*-acetylo-D-glukozaminy do reszt seryny lub treoniny polipeptydu wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-GlcNAc), jest powszechną modyfikacją białek jądrowych i cytoplazmatycznych. Wśród zidentyfikowanych do tej pory prawie 200 białek posiadających reszty *O*-GlcNAc, wyróżnić można, między innymi, czynniki transkrypcyjne, białka uczestniczące w przekazywaniu sygnału i enzymy szeregu procesów metabolicznych. Białka modyfikowane przez *O*-GlcNAc mogą być także fosforylowane. W niektórych przypadkach reszty *O*-GlcNAc i fosforanowe zajmują zamiennie dokładnie te same miejsca. Sugeruje się więc, że zamiast prostej regulacji tylko przez fosforylację, w przekazywanie sygnału włączony jest mechanizm bardziej złożonej regulacji, uwzględniający także glikozylację białek. Niniejsza praca przedstawia aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji enzymów zaangażowanych w modyfikację białek komórkowych przez *O*-GlcNAc oraz roli tej modyfikacji w regulacji procesu przekazywania sygnału i transkrypcji.

WPROWADZENIE

Glikozylacja, polegająca na przyłączeniu pojedynczych reszt β-*N*-acetylo-D-glukozaminy do reszt seryny lub treoniny polipeptydu wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-GlcNAc), jest powszechną modyfikacją białek komórkowych [1-3]. Odkrycie tej formy glikozylacji białek, którego dokonano w 1984 roku w laboratorium Harta [4], stało się ważnym wydarzeniem w dziedzinie glikobiologii, ponieważ zasadniczo zmieniło poglądy na rolę glikozylacji w komórce. Do tej pory uważano, że glikozylowane białka występują wyłącznie w siateczce śródplazmatycznej i na powierzchni komórki, tymczasem wiele białek jądrowych i cytoplazmatycznych posiada pojedyncze reszty β-*N*-acetylo-D-glukozaminy. Białka zawierające reszty *O*-GlcNAc wykryto u wszystkich badanych do tej pory wyższych *Eukaryota* oraz u wirusów. Nie stwierdzono natomiast tej modyfikacji u *Prokaryota* [5]. Występowanie tego rodzaju glikozylacji u niższych *Eukaryota*, na przykład u drożdży, jest kontrowersyjne, ponieważ u organizmów tych białka modyfikowane są także przez reszty α-GlcNAc, a wiele technik stosowanych obecnie w badaniach *O*-glikozylacji nie pozwala na rozróżnienie czy reszta *N*-acetyloglukozaminy przyłączona jest wiązaniem α czy β [5] .

O-glikozylowane białka wewnątrzkomórkowe są bardzo różne zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Obecnie zidentyfikowano około 200 białek komórkowych, w przypadku których potwierdzono występowanie reszt *O*-GlcNAc [2]. Można wśród nich wyróżnić: białka cytoszkieletu, jądrowych kompleksów porowych, chromatyny, polimerazę RNA klasy II i jej czynniki transkrypcyjne, protoonkogeny, supresory nowotworów, jądrowe receptory hormonów, fosfatazy, kinazy, enzymy zaangażowane w procesy metaboliczne i wiele innych [6]. Glikozylacja, polegająca na przyłączeniu reszt *O*-GlcNAc, jest modyfikacją wykazującą cechy predestynujące ją do odgrywania roli w przekazywaniu sygnału w komórce [1,2,5]. Właściwości tej modyfikacji pod wieloma względami bardziej przypominają fosforylację niż typowe *N*- i *O*-glikozylacje. Po pierwsze, w przeciwieństwie do klasycznych typów glikozylacji z raczej statycznymi łańcuchami sacharydowymi, modyfikacja białek przez *O*-GlcNAc charakteryzuje się niezwykłą dynamiką. Okres połowicznego zaniku reszt cukrowych jest bardzo krótki w porównaniu z tym samym czasem dla polipeptydu. Po drugie, stopień *O*-glikozylacji białek jądrowych i cytoplazmatycznych zmienia się pod wpływem czynników środowiska zewnętrznego, np. w odpowiedzi na stymulację insuliną, zmianę stężenia glukozy, podwyższoną temperaturę, stres osmotyczny i oksydacyjny [7]. Aktywacja limfocytów T myszy przez mitogen — konkanawalinę A powoduje szybką zmianę stopnia glikozylacji białek jądrowych i cytoplazmatycznych [2]. Podobnie w przypadku neutrofilów, obserwowano przejściowy wzrost ilości reszt *O*-GlcNAc w białkach komórkowych w odpowiedzi na działanie czynników chemotaktycznych [8]. Wprowadzanie

http://rcin.org.pl

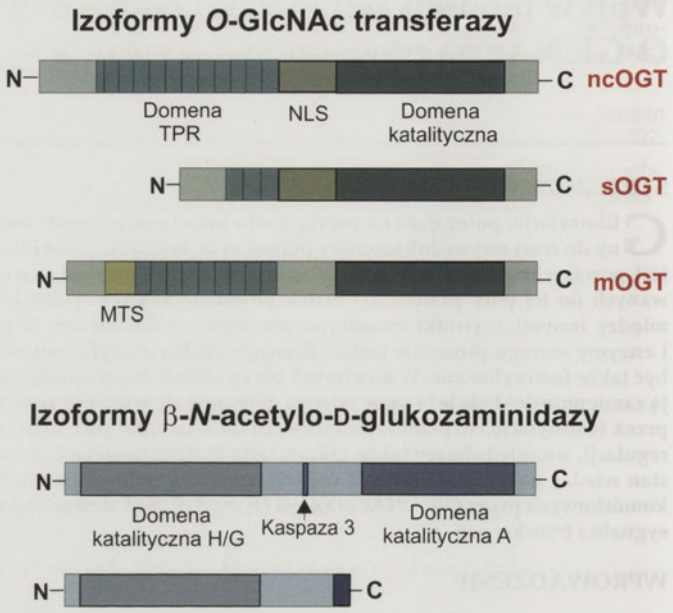
i usuwanie reszt *O*-GlcNAc w przypadku wielu białek zależy również od fazy cyklu komórkowego [9].

ENZYMY PRZYŁĄCZAJĄCE I USUWAJĄCE RESZTY *O*-GlcNAc

O-GlcNAc TRANSFERAZA

β-*N*-acetyloglukozaminylotransferaza UDP-*N*-acetyloglukozamina: białko (*O*-GlcNAc transferaza, OGT) jest jedynym enzymem odpowiedzialnym za katalityczne przyłączenie β-*N*-acetylo-D-glukozaminy do grupy hydroksylowej reszty seryny lub treoniny białka [10]. Jego obecność stwierdzono we wszystkich badanych do tej pory organizmach wielokomórkowych zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Nie stwierdzono natomiast występowania *O*-GlcNAc transferazy u *Prokaryota* i drożdży [11,12]. Największą ekspresją genu kodującego *O*-GlcNAc transferazę charakteryzuje się mózg i trzustka [11,12].

Kiedy po raz pierwszy otrzymano oczyszczoną *O*-GlcNAc transferazę z komórek wątroby szczura, okazało się, że enzym ten jest heterotrimerem składającym się z 2 podjednostek α o masie cząsteczkowej 110 kDa i jednej β o masie cząsteczkowej 78 kDa [10]. Późniejsze badania wykazały jednak, że podjednostka 110 kDa występuje we wszystkich tkankach w postaci homotrimeru, natomiast podjednostka 78 kDa wykrywana jest tylko w nerkach, mięśniach i wątrobie [2]. Przeciwciała wytworzone przeciwko podjednostce α reagują także z podjednostką 78 kDa, co mogłoby oznaczać, że jest ona fragmentem większej podjednostki, powstałym w wyniku jej proteolizy [10]. Najnowsze badania z laboratorium Hanovera sugerują jednak, że u ssaków istnieją trzy izoformy *O*-GlcNAc transferazy, będące efektem alternatywnego składania mRNA. Dwie z nich, tj. ncOGT (ang. *nucleocytoplasmic OGT*) i sOGT (ang. *short OGT*), odpowiadające podjednostkom 110 kDa i 78 kDa, mają jądrowo-cytoplazmatyczną lokalizację, a trzecia — mOGT (ang. *mitochondrial OGT*) — występuje w mitochondriach [13-15]. Podjednostka 110 kDa składa się z trzech części: N-końcowej domeny, zawierającej wiele tandemowo ułożonych powtórzeń motywów TPR (ang. *tetratricopeptide repeats*), katalitycznej domeny C-końcowej oraz fragmentu łączącego te dwie domeny, stanowiącego sekwencję lokalizacji jądrowej [11,12] (Ryc. 1). Domena N-końcowa, która u człowieka zawiera 11,5 powtórzeń TPR, a u *Caenorhabditis elegans* — 13, odpowiada za oddziaływania między OGT a jej białkowymi substratami [10,16,17]. Dwie pozostałe izoformy *O*-GlcNAc transferazy posiadają taką samą domenę katalityczną, ale różnią się liczbą powtórzeń TPR w N-końcowej części enzymu, co wpływa na specyficzność względem substratów białkowych. Mitochondrialna izoforma OGT o masie cząsteczkowej 103 kDa zawiera w domenie N-końcowej 9 powtórzeń TPR, które są poprzedzone krótką sekwencją decydującą o jej lokalizacji [13]. sOGT zawiera trzy motywy TPR. W laboratorium Hanovera [15] badano specyficzność poszczególnych izoform OGT względem różnych białek komórkowych. Okazało się, że niektóre białka, np. Nup62 (ang. *nucleoporin 62 kDa*) i kinaza kazeinowa II, są glikozylowane zarówno przez ncOGT, jak i mOGT. Z kolei β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza i białko tau ulegają modyfikacji tylko w wyniku



Rycina 1. Strukturalna organizacja izoform *O*-GlcNAc transferazy i β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy. Domena TPR — domena zawierająca powtórzenia TPR (ang. *tetratricopeptide repeats*; motywy sekwencyjne zawierające układ czterech, a następnie trzech zachowanych w ewolucji aminokwasów); NLS (ang. *nuclear localization sequence*; sekwencje lokalizacji jądrowej); MTS (ang. *mitochondrial targeting sequence*; sekwencja warunkująca lokalizację mitochondrialną); Domena katalityczna H/G — domena o aktywności hialuronidazy i *N*-acetyloglukozaminidazy; Domena katalityczna A — domena o aktywności acetylotransferazy.

działania ncOGT, a kinaza yes tylko — mOGT. sOGT nie powodowała modyfikacji żadnego z badanych białek, chociaż jej katalityczna domena była aktywna [15].

Domena C-końcowa *O*-GlcNAc transferazy, zawierająca miejsca aktywne enzymu, była początkowo uważana za unikatową, ponieważ nie stwierdzono homologii do żadnego znanego białka. Później jednak, dzięki technice modelowania molekularnego, wykazano, że domena ta ma pewne strukturalne cechy, które upodabniają ją do białek należących do nadrodziny fosforylazy glikogenu [18]. Modele cząsteczkowe wykazują, że C-koniec *O*-GlcNAc transferazy tworzy fałdę, składającą się z dwóch domen przypominających domeny Rossmanna. W czwartej helisie drugiej domeny występują cztery zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe o charakterze kwaśnym, które prawdopodobnie odpowiadają za wiązanie urydynodifosfo-*N*-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc) [18].

UDP-GlcNAc jest kluczowym donorem reszt *N*-acetyloglukozaminy dla *O*-GlcNAc transferazy. Aktywność enzymu względem peptydowych substratów wzrasta wraz ze stężeniem UDP-GlcNAc. Badania kinetyki reakcji z wykorzystaniem jako substratu peptydów otrzymanych ze znanego białka modyfikowanego przez *O*-GlcNAc — polimerazy RNA klasy II, wykazały, że enzym praktycznie nie ulega wysyceniu nawet przy bardzo wysokich stężeniach UDP-GlcNAc, znacznie przekraczających zakres fizjologiczny [10]. Natomiast niska wartość Km (~ 500 nM) daje *O*-GlcNAc transferazie przewagę w rywalizacji z transporterami przenoszącymi UDP-GlcNAc z cytosolu do światła siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Fakt, że aktywność OGT względem białek jest zależna od poziomu

http://rcin.org.pl

UDP-GlcNAc, który z kolei zmienia się pod wpływem różnych czynników zewnątrzkomórkowych, a szczególnie stężenia substratów energetycznych, czyni ten enzym dobrym kandydatem do pełnienia funkcji czynnika pośredniczącego w przekazywaniu sygnału białkom uczestniczącym w regulacji procesów metabolicznych.

O-GlcNAc transferaza ulega potranslacyjnym modyfikacjom, takim jak fosforylacja tyrozyny oraz automodyfikacji, czyli *O*-glikozylacji [10]. Nie wiadomo dokładnie jaki jest wpływ tych modyfikacji na aktywność enzymu. Ostatnie badania sugerują, że fosforylacja tyrozyny aktywuje OGT [2].

O-GlcNAc transferaza jest kodowana przez pojedynczy gen zlokalizowany u człowieka i myszy w chromosomie X (u człowieka region q13) [14,19]. Badania dotyczące inaktywacji genu tego enzymu dowiodły, że jest on niezbędny do życia i utrata funkcji OGT prowadzi do śmierci embrionów myszy [19]. Z kolei knock-out genu *O*-GlcNAc transferazy u myszy ograniczony tylko do neuronów powodował, że nowo narodzone zwierzęta były znacznie mniejsze od swoich normalnych rówieśników i nie rozwijały odpowiednich zdolności lokomocyjnych. Zwierzęta te były słabo odżywione i zwykle umierały przed upływem 10. dnia życia [20]. Badania mózgu i rdzenia kręgowego tych zwierząt wykazały wzrost ilości związanego z mikrotubulami białka tau i jego hiperfosforylację [20].

B-*N*-ACETYLO-D-GLUKOZAMINIDAZA

Podobnie jak w przypadku OGT, oczyszczono, sklonowano i scharakteryzowano enzym usuwający reszty *O*-GlcNAc z białek jądrowych i cytoplazmatycznych, czyli β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazę [21,22]. Obecność β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy stwierdzono we wszystkich badanych dotychczas tkankach. Największą ekspresją tego enzymu charakteryzują się: mózg, łożysko i trzustka [6]. Początkowo β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza została określona jako heksozaminidaza C ze względu na swoją jądrowo-cytoplazmatyczną lokalizację, optymalne pH bliskie obojętnemu i specyficzność względem reszt GlcNAc, a nie *N*-acetylogalaktozaminy (GalNAc) [10]. W przeciwieństwie do niej optymalne pH dla działania lizosomowych heksozaminidaz (A i B) jest bardziej kwasowe, są one zlokalizowane wyłącznie w lizosomach i wykazują aktywność zarówno względem reszt GlcNAc, jak i GalNAc.

Gen β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy zlokalizowany jest u człowieka w chromosomie 10 (10q24) [21]. Sekwencja sklonowanej β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy została zidentyfikowana jako sekwencja odpowiadająca antygenowi 5, ulegającemu ekspresji w komórkach oponiaka (*MGEA5* — ang. *meningioma expressed antigen 5*) i powodującemu odpowiedź immunologiczną u pacjentów [10]. Stwierdzono istnienie dwóch wariantów β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy o różnej wielkości, które powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA. Gen dla enzymu składa się z 16 eksonów. W przypadku krótkiego wariantu enzymu, miejsce 5' wycinania intronu 10 jest ignorowane, co daje dłuższy ekson 10 zawierający fragment intronu. W obrębie dalszych sekwencji intronowych znajdują się alternatywny kodon stop i alternatywne miejsce dla poliadenylacji [22]. Konsekwencją takiego składania mRNA dla β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy jest występowanie dwóch form enzymu: dłuższej — składającej się z 916 aminokwasów, która podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS wędruje w postaci pasma o masie cząsteczkowej 130 kDa, i krótszej o masie 75 kDa, zbudowanej z 677 aminokwasów [10,21,22].

β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza wykazuje słabą aktywność hialuronidazy oraz aktywność heksozaminidazy, które związane są z N-końcową częścią enzymu [23,24]. Okazało się, że kluczowe znaczenie dla aktywności heksozaminidazowej mają reszty Asp174 i Asp175 [25]. Porównanie sekwencji β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy z różnymi acetylotransferazami wykazało homologię jej C-końcowej domeny do rodziny acetylotransferaz GNAT (GNAT — ang. *GCN5-related family of acetyltransferases*) [10]. Ostatnio w laboratorium Kudlowa [23] udowodniono, że β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza działa jak acetylotransferaza histonów i ta aktywność związana jest z C-końcową domeną enzymu. Tak więc β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza okazała się być białkiem o podwójnej funkcji, wykazującym dwie różne aktywności enzymatyczne. W związku z tym Kudlow i współpracownicy zaproponowali zmianę nazwy enzymu na NCOAT (ang. *nuclear cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyltransferase*). Na NCOAT działa kaspaza 3, która odcina C-końcowy fragment o masie 65 kDa. Nie ma to jednak wpływu ani na heksozaminidazową, ani acetylotransferazową aktywność enzymu [23].

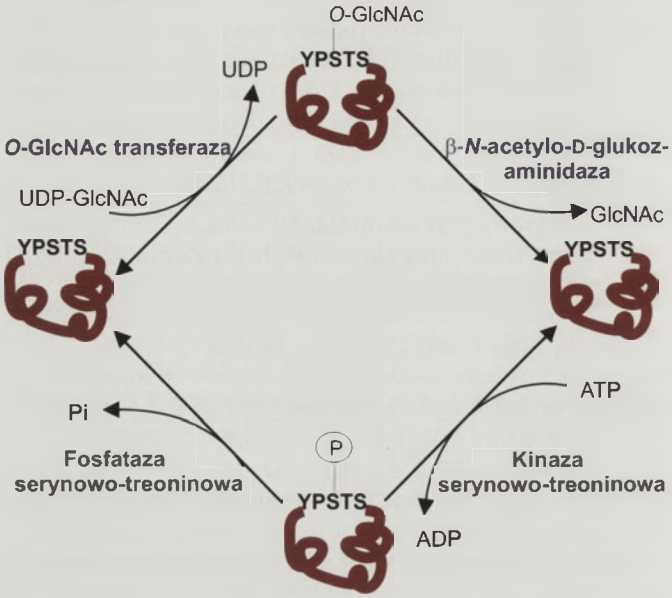
Przez długi czas uważano, że krótki wariant enzymu, pozbawiony jednej trzeciej długości polipeptydu od C-końca, nie wykazuje aktywności enzymatycznej. Jednak ostatnie badania *in vitro* aktywności obu form wysoce oczyszczonego enzymu z wykorzystaniem syntetycznego, bardzo czułego substratu, potwierdziły heksozaminidazową aktywność krótkiego wariantu enzymu. W innym doświadczeniu z kolei wykazano, że inkubacja lizatu komórek HeLa i HT-29 z oczyszczonym krótkim wariantem enzymu, powodowała wyraźne obniżenie stopnia *O*-glikozylacji białek [26].

Najpowszechniej stosowanym do tej pory inhibitorem aktywności heksozaminidazowej enzymu jest PUGNAc [*O*-(2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozylideno)amino-*N*-fenylokarbaminian]. Ten nietoksyczny związek jest często wykorzystywany w badaniach *O*-glikozylacji białek przez *N*-acetyloglukozaminę, ponieważ jego dodanie do hodowli komórek prowadzi do akumulacji reszt *O*-GlcNAc w białkach jądrowych i cytoplazmatycznych [27]. Znanym inhibitorem enzymu jest także analog *O*-GlcNAc — streptozotocyna [3]. Związek ten powszechnie stosowany jest do wywołania cukrzycy u zwierząt doświadczalnych oraz w chemioterapii nowotworów układu nerwowego i dokrewnego [3].

O-GLIKOZYLACJA A FOSFORYLACJA

Wszystkie zidentyfikowane do tej pory białka modyfikowane przez *O*-GlcNAc są fosfoproteinami. Szczegółowe badania wykazały, że reszty *O*-GlcNAc znajdują się na ogół w miejscach, które są rozpoznawane przez kinazy białkowe [5]. W niektórych przypadkach reszty *O*-GlcNAc i fosforanowe

http://rcin.org.pl

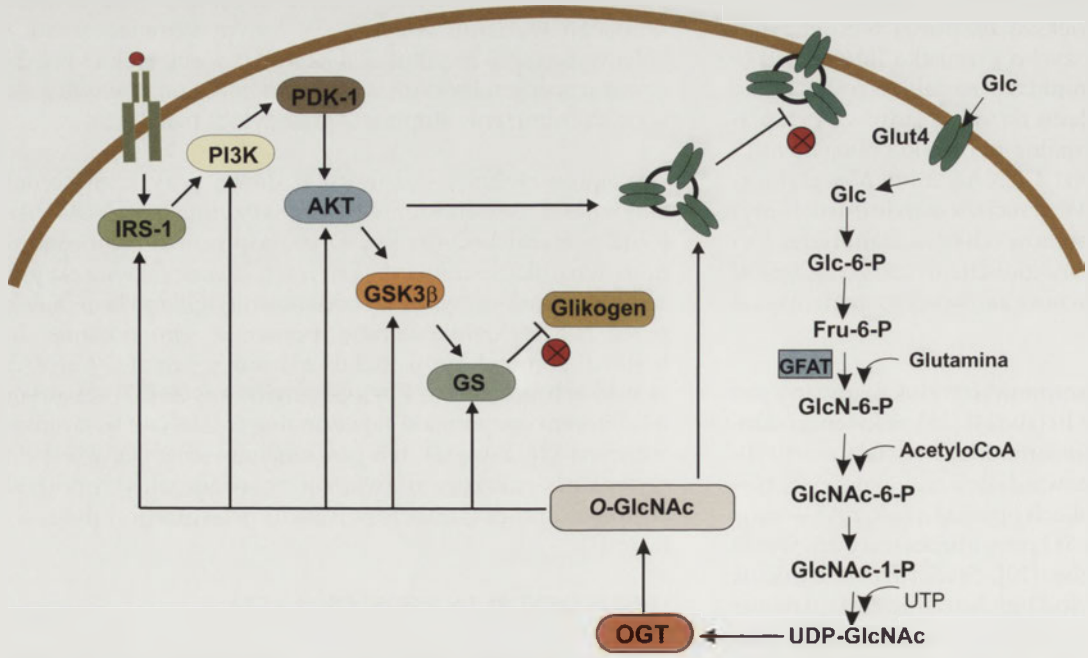


Rycina 2. Hipoteza „yin-yang" – zależność pomiędzy *O*-glikozylacją a fosforylacją.

zajmują zamiennie dokładnie te same miejsca. Taka sytuacja dotyczy na przykład reszty Thr58 białka c-myc [28] czy reszty Ser16 receptora β estrogenów myszy [29]. Reszty tych aminokwasów mogą występować w formie niemodyfikowanej, fosforylowanej lub glikozylowanej. Wydaje się więc, że *O*-glikozylacja i fosforylacja są modyfikacjami wzajemnie się wykluczającymi, chociaż w pewnych przypadkach miejsca fosforylacji i glikozylacji nie pokrywają się i są oddalone od siebie o kilka reszt aminokwasowych, jak np. w kinazie kazeinowej II czy czynniku wrażliwości na surowicę krwi SRF (ang. *serum response factor*) [6]. Wzajemną zależność pomiędzy *O*-glikozylacją a fosforylacją zaobserwowano nie tylko w odniesieniu do indywidualnych białek, ale także na poziomie całej komórki. Traktowanie komórek inhibitorami fosfataz (kwas okadaikowy) i aktywatorami kinaz (estry forbolu) prowadziło do obniżenia stopnia *O*-glikozylacji wielu białek komórkowych [5]. I odwrotnie – inhibitory kinaz, takie jak staurosporyna, powodują wzrost stopnia *O*-glikozylacji białek. Dane te pozwoliły na wysunięcie hipotezy „yin-yang", która zakłada współzawodnictwo pomiędzy resztami *O*-GlcNAc a fosforanowymi o dostępne miejsca wiązania do białka [5]. Istnieje więc możliwość, że zamiast prostej regulacji tylko poprzez fosforylację, w przekazywanie sygnału włączony jest mechanizm bardziej złożonej regulacji, uwzględniający także glikozylację białek. Hipoteza „yin-yang" zakłada występowanie następujących po sobie procesów deglikozylacji/fosforylacji oraz defosforyalacji/glikozylacji, odpowiednio zmieniających właściwości białka (Ryc. 2). Fakt, że *O*-GlcNAc transferaza tworzy stabilny i aktywny kompleks z katalityczną podjednostką fosfatazy PP1 (ang. *protein phosphatase 1*) wydaje się stanowić doskonałe potwierdzenie tej hipotezy [30].

O-GlcNAc A PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU INSULINY

Istnieje wiele doniesień sugerujących związek pomiędzy zmianami stopnia *O*-glikozylacji białek komórkowych a cukrzycą typu II [31,32]. Znakiem szczególnym tego typu cukrzycy jest hiperglikemia połączona z opornością na insulinę, czyli niezdolnością komórek do wychwytywania glukozy pod wpływem insuliny [1,32]. Ostatnio uważa się, że w oporności na insulinę dużą rolę może odgrywać szlak biosyntezy heksozamin (Ryc. 3), którego końcowym produktem jest przede wszystkim UDP-*N*-acetyloglukozamina (UDP-GlcNAc), będąca substratem dla *O*-GlcNAc transferazy [32]. Chociaż normalnie szlak biosyntezy heksozamin reprezentuje tylko około 2-5% całego metabolizmu glukozy, w warunkach jej zwiększonego stężenia we krwi odsetek ten może być znacznie większy [31,33]. Wzrost poziomu zewnątrzkomórkowej glukozy może powodować podwyższenie *O*-glikozylacji pewnych białek komórkowych, a to z kolei przyczynia się do oporności na insulinę. Faktycznie, wielu badaczy wykazało wzrost stopnia *O*-glikozylacji białek w liniach komórkowych lub u zwierząt doświadczalnych w warunkach działania wysokich stężeń glukozy lub gukozaminy



Rycina 3. Schemat przedstawiający szlak biosyntezy heksozamin i wpływ modyfikacji białek przez *O*-GlcNAc na przekazywanie sygnału insuliny. Kluczowym produktem szlaku heksozamin jest UDP-*N*-acetyloglukozamina, stanowiąca substrat dla *O*-GlcNAc transferazy. Wzrost *O*-glikozylacji szeregu białek komórkowych, m.in. IRS1, AKT i Glut4, przyczynia się do ograniczenia przeniesienia transportera glukozy do błony komórkowej, w rezultacie czego zahamowany jest stymulowany przez insulinę transport glukozy do komórki. *O*-glikozylacja syntazy glikogenowej (GS) i kinazy syntazy glikogenowej β (GSKβ) zaburza także syntezę glikogenu. GFAT (ang. *glutamine: fructose-6-phosphate-amido-transferase*; amidotransferaza glutamina : fruktozo-6-fosforan).

http://rcin.org.pl

[34-37]. Z kolei wzmożona synteza *O*-GlcNAc transferazy w tkance tłuszczowej oraz mięśniach szkieletowych i sercu transgenicznych myszy powodowały insulinooporność i zwiększenie stężenia leptyny w surowicy [38]. Natomiast u szczurów z genetycznie uwarunkowaną cukrzycą lub zwierząt, u których była ona indukowana iniekcją streptozotocyny, stwierdzono podwyższoną ekspresję *O*-GlcNAc transferazy w rogówce [39], trzustce [40] i mięśniach gładkich aorty [41]. Powyższony stopień *O*-glikozylacji białek komórek trzustki i wysp Langerhansa u szczurów Goto-Kakizaki, stanowiących zwierzęcy model cukrzycy typu II, powodował obniżenie sekrecji insuliny [42].

Uważa się, że insulinooporność związana jest z zahamowaniem pewnych etapów szlaku insuliny. Pierwszym zdarzeniem w drodze przekazywania sygnału inicjowanego przez związanie insuliny z receptorem, który ma aktywność kinazy tyrozynowej, jest fosforylacja białek IRS-1 i IRS-2 (ang. *insulin receptor substrate*). Fosforylacja tyrozyny tych białek umożliwia ich związanie z domeną SH2 regulatorowej podjednostki p85 3-kinazy fosfatydyloinozytolu, która poprzez aktywację katalitycznej podjednostki p110, przekształca fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforan do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PIP_3). W połączeniu z PDK1 (ang. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), PIP_3 przyczynia się do aktywacji kolejnych efektorów, np. kinazy białkowej B (AKT/PKB) i kinazy białkowej C, które kontrolują różne metaboliczne procesy, włączając w to przeniesienie transportera glukozy 4 (Glut4) do błony komórkowej w mięśniach i adipocytach, syntezę glikogenu w mięśniach, adipocytach i wątrobie oraz syntezę lipidów w wątrobie [43].

Zwiększenie liczby reszt *O*-GlcNAc zakłóca dynamiczną równowagę pomiędzy fosforylacją a *O*-glikozylacją, prowadząc do zaburzeń szlaku przekazywania sygnału insuliny. Okazało się, że niektóre białka tego szlaku, tj. IRS-1, IRS-2, AKT i Glut4, są modyfikowane przez *O*-GlcNAc [32, 44-47]. Nie wiadomo jednak do końca, *O*-glikozylacja których białek ma podstawowe znaczenie w zahamowaniu przekazywania sygnału insuliny i prowadzi do insulinooporności. Vosseller i wsp. [48] wykazali, że zwiększenie liczby reszt *O*-GlcNAc w białkach komórkowych w wyniku traktowania adipocytów 3T3-L1 inhibitorem β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy — PUGNAc, powoduje insulinooporność związaną z defektem aktywacji kinazy AKT, wynikającym z obniżenia jej fosforylacji. Zakłócenie przekazywania sygnału insulinowego ogranicza zdolność komórki do pobierania glukozy w wyniku zredukowanego przeniesienia Glut4 do błony komórkowej [32]. Ponieważ zarówno Glut4 [46], jak i wiele białek w pęcherzykach transportujących Glut4 posiada reszty *O*-GlcNAc [37], nie jest jasne czy redukcja przeniesienia transportera glukozy jest spowodowana blokowaniem przez *O*-GlcNAc fosforylacji Glut4, aktywacji AKT czy *O*-glikozylacją białek pęcherzyków uczestniczących w transporcie [2].

Od *O*-glkozylacji uzależniony jest także metabolizm glikogenu. Stwierdzono, że syntaza glikogenu jest modyfikowana przez reszty *O*-GlcNAc w adipocytach 3T3-L1 [49]. *O*-glikozylacja tego enzymu, zwiększona w odpowiedzi na wysokie stężenie glukozy i glukozaminy, którymi traktowane były komórki, wpływała na obniżenie jego aktywności. Podwyższenie ilości *O*-GlcNAc w syntazie glikogenu powoduje, że jest ona oporna na stymulowaną przez isnulinę aktywację przez białkową fosfatazę 1 (PP1, ang. *protein phosphatase 1*) [49]. Reszty *O*-GlcNAc w syntazie glikogenu prawdopodobnie przeszkadzają w oddziaływaniu z PP1 lub innymi białkami niezbędnymi do jej aktywacji. Badania roli modyfikacji białek przez *O*-GlcNAc i fosforylacji w regulowaniu aktywności syntazy glikogenu u myszy, u których wywołano objawy cukrzycy przez podawanie streptozotocyny, potwierdziły, że wzrost liczby reszt *O*-GlcNAc zależny był od obniżenia aktywności syntazy glikogenowej, a usunięcie tych reszt przez β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazę ułatwia aktywację enzymu przez białkową fosfatazę 1 [50]. Co interesujące, kinaza 3β syntazy glikogenu (GSK3β) jest substratem dla OGT i jej glikozylacja może wpływać na aktywność względem tego enzymu [16,48].

Wykazano związek pomiędzy modyfikacją białek przez *O*-GlcNAc a towarzyszącymi cukrzycy komplikacjami, takimi jak np. choroba wieńcowa [51]. Clark i wsp. [52] stwierdzili, że poddanie kardiomiocytów szczura działaniu wysokiego stężenia glukozy powoduje zaburzenie w transporcie wapnia, co było związane z redukcją poziomu mRNA i białka Ca^{2+}ATPazy siateczki śródplazmatycznej SERCA2a (ang. *sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}ATPase*). Transport wapnia i ekspresja *SERCA2a* były przywrócone do normalnego stanu po wprowadzeniu do komórek adenowirusowego wektora zawierającego gen β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy. Tak więc nadprodukcja enzymu, który usuwa *O*-GlcNAc, powoduje odwrócenie efektu wywołanego przez ekspozycje komórek na wysokie stężenie glukozy. Podobne rezultaty uzyskano w przypadku myszy z cukrzycą indukowaną streptozotocyną. Zwierzęta te wykazywały podwyższoną *O*-glikozylację białek komórkowych i zakłóconą funkcję serca, ale wprowadzenie wektora z genem β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy powodowało wyraźną poprawę w przepływie wewnątrzkomórkowego wapnia, jego gromadzenie w siateczce śródplazmatycznej i poprawę kurczliwości, tj. skrócenie czasu skurczu [53]. Wysokie stężenie glukozy we krwi negatywnie wpływa na ściany naczyń krwionośnych. Częściowo jest to spowodowane hamowaniem endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS), która hamuje agregację płytek i proliferację mięśni gładkich naczyń, redukuje przepuszczalność naczyń i utlenianie lipoprotein o małej gęstości [54]. Wykazano, że wzrost przepływu glukozy przez szlak biosyntezy heksozamin zwiększa glikozylację eNOS. Normalnie eNOS jest aktywowana poprzez fosforylację reszty seryny 1177 przez AKT. W warunkach wysokiego stężenia glukozy fosforylacja tej reszty ulega obniżeniu [54].

Skłonność do zapadania na cukrzycę typu II wydaje się być genetycznie uwarunkowana, aczkolwiek ujawnienie się fenotypu jest modulowane przez wiele dodatkowych czynników, na przykład dietę, ćwiczenia i wiek [32]. Ostatnio często sugeruje się powiązanie między cukrzycą a ekspresją genu kodującego β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazę. Prawidłowa funkcja i ekspresja tego enzymu jest ważna dla odpowiedzi komórki na stężenie glukozy. Tak więc gen kodujący β-*N*-acetylo-D-glukominidazę — *MGEA5* wydaje się być jednym z genów, których defekt może być związany z prawdopodobieństwem wystąpienia cukrzycy. Przeprowa-

http://rcin.org.pl

dzone ostatnio badania genetyczne w grupie Amerykanów meksykańskiego pochodzenia chorych na cukrzycę typu II i ich rodzin, ujawniły zależność pomiędzy cukrzycą a występowaniem rzadkiego allelu związanego z polimorfizmem SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) w intronie 10 *MGEA5*. Ponieważ intron ten zawiera alternatywny kodon stop jest możliwe, że zmiany w obrębie tego intronu powodują obniżenie ekspresji długiej formy enzymu [55].

O-GlcNAc A CHEMOTAKSJA LEUKOCYTÓW

Neutrofile odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu na zakażenia bakteryjne i uszkodzenie tkanek. Efektywność tych komórek w niszczeniu dronoustrojów przez fagocytozę jest uzależniona od możliwości ich migracji w kierunku ogniska zapalnego pod wpływem działania różnych czynników. Chemotaksja wiąże się z uruchomieniem wewnątrzkomórkowej sieci przekazywania sygnału obejmującej działanie czynników, takich jak: 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, małe białka wiążące GTP z rodziny Rho i kinazy białek aktywowanych mitogenem (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinase*). Ostatnio Kneass i Marchase [8] stwierdzili, że *O*-glikozylacja może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na ruchliwość leukocytów. Neutrofile wykazują szybką zmianę stopnia *O*-glikozylacji pod wpływem działania peptydu formylometionylo-leucyno-fenyloalaniny (fMLF), który jest znanym agonistą tych komórek [8]. Preinkubacja komórek z glukozaminą, będącą substratem szlaku biosyntezy heksozamin, powoduje wzrost stężenia UDP-GlcNAc i *O*-glikozylacji białek oraz dodatkowo wzmacnia efekt działania fMLF podczas indukcji chemotaksji. Podobnie zastosowanie inhibitora β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy — PUGNAc wpływało pozytywnie na indukowaną chemoatraktantem ruchliwość komórek [8]. fMLF wiąże się z receptorami na powierzchni komórek, które uruchamiają za pośrednictwem białek adaptorowych i małych białek G, należących do nadrodziny białek wiążących GTP, kaskadę przekazywania sygnału obejmującą kolejno kinazy MKKK (ang. *MAPK kinase kinase*), MKK (ang. *MAPK kinase*) i MAPK. Stwierdzono, że wzrost *O*-glikozylacji wywołany inkubacją komórek z glukozaminą lub PUGNAc harmonizował ze wzrostem ilości połączonego z GTP, czyli aktywnego białka Rac. Podobnie zwiększenie *O*-glikozylacji skojarzone było ze wzrostem aktywności kinaz MAP (MAPK) — p38 i p44/42, które z kolei wynikało z aktywacji znajdujących się wyżej w kaskadzie przekazywania sygnału kinaz MAPK: MKK3/6 i MEK1/2. Nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób kinazy MAPK pośredniczą w regulacji chemotaksji. Stwierdzono jednak, że farmakologiczne zahamowanie aktywności p38 i p44/42 obniża zdolność komórek do chemotaksji. Związane jest to prawdopodobnie z regulacją specyficznego dla leukocytów białka 1, łączącego się z aktyną, oraz małego białka szoku termicznego HSP27 (ang. *heat shock protein*), modulującego polimeryzację aktyny. Oba białka włączone są w regulację szkieletu aktynowego i migrację komórek [56].

O-GlcNAc A STRES KOMÓRKOWY

Stres uruchamia mechanizmy przekazywania sygnału w komórce, w wyniku czego dochodzi do syntezy lub aktywacji określonych białek, których zadaniem jest osłabienie skutków działania czynnika stresogennego poprzez przeciwdziałanie sygnałom promującym śmierć komórki. Zachara i wsp. [7] wykazali, że różne formy stresu (termiczny, oksydacyjny, etanolowy, osmotyczny) powodują wzrost stopnia glikozylacji białek w różnych typach komórek. Wiadomo, że w wielu komórkach w odpowiedzi na stres dochodzi do wzmożenia procesu transportu glukozy do komórki. Część tej glukozy jest wykorzystywana do wytworzenia UDP-GlcNAc na drodze biosyntezy heksozamin. Tak więc zwiększenie stopnia *O*-glikozylacji białek w odpowiedzi na stres komórkowy może być konsekwencją wzrostu stężenia substratu dla *O*-GlcNAc transferazy. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań, w których wykazano, że stres oksydacyjny aktywuje drogę biosyntezy heksozamin [57], a zahamowanie tego szlaku powoduje zniesienie pozytywnego wpływu glukozy na ochronę pewnych komórek przed skutkami stresu [58].

W komórkach poddanych stresowi termicznemu przez inkubację w temperaturze 45°C, stwierdzono podwyższony stopień *O*-glikozylacji białek oraz zwiększoną aktywność *O*-GlcNAc transferazy [7]. Z kolei zwiększenie ilości reszt *O*-GlcNAc przez zastosowanie PUGNAc lub nadprodukcję OGT po wprowadzeniu wektora zawierającego gen tego enzymu, powodowało zwiększenie termotolerancji komórek. I odwrotnie, obniżenie poziomu *O*-glikozylacji przez zastosowanie metody wyciszenia genu *O*-GlcNAc transferazy poprzez interferencję RNA, powodowało, że komórki były bardziej wrażliwe na stres termiczny. Nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób modyfikacja białek przez *O*-GlcNAc zabezpiecza komórki przed skutkami stresu termicznego. Stwierdzono jednak, że białko szoku termicznego HSP70 jest lektyną, rozpoznającą reszty *O*-GlcNAc [59]. Sugeruje się więc, że reszty *O*-GlcNAc mogą ułatwiać pewnym białkom związanie z HSP70 w czasie stresu. Co więcej, modyfikacja samych białek szoku termicznego przez *O*-GlcNAc może regulować ich funkcję lub lokalizację. Reszty *O*-GlcNAc wykazano do tej pory w kilku z nich, np. HSP70, HSC70, HSP90 oraz HSP27 [6,7]. Niewykluczone jest także, że rola *O*-GlcNAc polega na stabilizowaniu struktury białek, jak ma to miejsce w przypadku klasycznych typów glikozylacji lub, alternatywnie, na przeciwdziałaniu agregacji zdenaturowanych białek [7].

O-GlcNAc A CYKL KOMÓRKOWY

Na cykl komórkowy wyższych *Eukaryota* składają się cztery następujące po sobie fazy: G_1, w której dochodzi do wzrostu masy komórki i przygotowania do syntezy DNA, S — podczas której następuje powielenie materiału genetycznego przez replikację DNA, G_2 — to okres, kiedy komórka przygotowuje się do podziału, syntetyzując białka budujące wrzeciono podziałowe i cykliny mitotyczne oraz M — czyli etap podziału komórki macierzystej na dwie potomne, składający się z kariokinezy i cytokinezy. Po podziale komórki wchodzą ponownie w fazę G_1 i cykl się powtarza albo pozostają w stanie spoczynku, czyli fazie G_0. Postęp cyklu komórkowego, czyli przejście komórki z jednej fazy do drugiej, zależy od wielu białek i wzajemnych relacji między nimi. Cykliny, których poziom zmienia się podczas kolejnych faz cyklu komórkowego, oddziałują z kinazami CDK (ang. *cyclin dependent kinases*) i tworzą kompleksy odpowiadające za

http://rcin.org.pl

fosforylację białek efektorowych, którymi mogą być pewne czynniki transkrypcyjne regulujące cykl komórkowy, jak pRb czy p53. Tworzeniu tych kompleksów przeciwdziałają małe białka nazywane inhibitorami kinaz zależnych od cyklin (CDKI, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor*) jak $p21^{Waf1/Cip1}$ i $p27^{Kip1}$ [60].

Coraz więcej danych sugeruje, że modyfikacja białek przez *O*-GlcNAc może być jednym z mechanizmów regulacji wzrostu komórek i ich podziału. *O*-glikozylacja odgrywa kluczową rolę w modulowaniu funkcji białek wpływających na postęp cyklu komórkowego. Delecja genu *O*-GlcNAc transferazy wiąże się z zatrzymaniem wzrostu i zwiększeniem syntezy inhibitora cyklin p27 w embrionalnych fibroblastach myszy [20], jak również zmniejszeniem ich żywotności [19]. Z kolei wyniki badań dotyczących *Xenopus laevis* wykazują defekty cyklu komórkowego w przypadku oocytów poddanych mikroiniekcji β-galaktozylotransferazy — enzymu, który modyfikuje końcowe reszty *O*-GlcNAc i uniemożliwia ich usuwanie [61]. Osłonięcie reszt *O*-GlcNAc przez galaktozę powoduje zaburzenia przejścia pomiędzy fazą M i S.

Ostatnio w laboratorium Harta [9] przeprowadzono wnikliwe badania wpływu zmiany stopnia glikozylacji, powodowanej przez czynniki farmakologiczne lub genetyczne, na cykl komórkowy w różnych liniach komórkowych. Stwierdzono, że komórki HeLa i 3T3-L1 poddane działaniu PUGNAc wykazywały znacznie wolniejszy postęp cyklu komórkowego w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Spowolnienie cyklu komórkowego, wywołane przez PUGNAc, wiązało się przede wszystkim z opóźnionym przejściem z fazy G_2 do M. Z kolei zmniejszenie ilości *O*-GlcNAc, przez zastosowanie inhibitora amidotransferazy glutamina: fruktozo-6 fosforan, enzymu kontrolującego szybkość szlaku biosyntezy heksozamin, powodowało zatrzymanie komórek 3T3-L1 na etapie przejścia z fazy G_0 do G_1, a komórek HeLa w fazie G_1. Natomiast, gdy zmniejszenie *O*-glikozylacji następuje po tym, jak komórki przejdą etap kontrolny w fazie G_1, faza S ulega przyśpieszeniu i komórki łatwiej przechodzą z fazy G_2 do M. Sugeruje się, że postęp cyklu komórkowego uzależniony jest od dostępności substancji odżywczych. Kiedy komórka ma niedostateczną ilość substratów energetycznych, poziom glikozylacji obniża się i komórka nie wchodzi w fazę G_1, ale pozostaje w spoczynku. Szczególnie wrażliwe na niedobór substancji odżywczych są komórki w fazie G_1, ponieważ wtedy właśnie odbywa się przygotowanie do replikacji i podziału [9].

Nadprodukcja zarówno *O*-GlcNAc transferazy, jak i β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy powoduje zaburzenia cyklu komórkowego. Chociaż mechanizmy tych zaburzeń wydają się różne to w przypadku zwiększonej syntezy obu enzymów dochodzi do zmian w fosforylacji białek, szczególnie pRb, opóźnienia przejścia przez fazę M oraz zakłócenia normalnej syntezy cyklin. Dodatkowo, komórki z nadekspresją genu kodującego OGT wykazują także defekty w cytokinezie, prowadzące do poliploidalności. Wykazano, że podczas fazy M *O*-GlcNAc transferaza lokalizuje się w obrębie wrzeciona kariokinetycznego. Sugeruje się, że enzym ten może powodować przyłączenie reszt *O*-GlcNAc do specyficznych białek wrzeciona lub też stanowić kotwicę dla innych białek poprzez oddziaływania, w które zaangażowana jest jej domena z powtórzeniami TPR. Takimi białkami mogą być pewne fosfatazy. Wiadomo na przykład, że OGT oddziałuje z białkową fosfatazą PP1α, która jest aktywna podczas fazy M [9].

WPŁYW *O*-GLIKOZYLACJI NA PROCES TRANSKRYPCJI

Włączenie kaskady przekazywania sygnału prowadzi do potranslacyjnych modyfikacji różnych białek, w tym czynników transkrypcyjnych selektywnie regulujących ekspresję określonych genów. Występowanie reszt *O*-GlcNAc stwierdzono na kilku białkach związanych z chromatyną i szeregu czynnikach transkrypcyjnych, m.in.: Sp1 [62,63], p53 [64,65], c-Myc [28], YY1 [66], Oct-2 [67], Stat5 [68], CREB [69] i MafA [70]. Modyfikacja czynników transkrypcyjnych przez reszty *O*-GlcNAc może wpływać na ich stabilność, wewnątrzkomórkową lokalizację, aktywność oraz oddziaływania z innymi białkami kompleksów transkrypcyjnych lub DNA. Uważa się, że zachowanie równowagi pomiędzy *O*-glikozylacją a fosforylacją ma kluczowe znaczenie dla aktywności czynników transkrypcyjnych i ich zdolności do regulowania ekspresji genów.

Jednym z najczęściej badanych, w aspekcie *O*-glikozylacji, czynników transkrypcyjnych jest Sp1 (ang. *specific protein 1*). Stwierdzono, że *O*-glikozylacja Sp1 jest modulowana w odpowiedzi na zmieniający się poziom zewnątrzkomórkowej glukozy i stymulację insuliną [62,63]. Majumdar i wsp. [63] sugerują, że insulina stymuluje biosyntezę Sp1 i aktywuje OGT, która glikozyluje ten czynnik przez co staje się on bardziej stabilny. Wczesne badania z laboratorium Kudlowa wykazały, że istnieje zależność pomiędzy stopniem glikozylacji Sp1 a jego opornością na degradację przez proteasomy. Późniejsze prace sugerują jednak, że degradacja Sp1 nie zależy od stopnia jego glikozylacji, ale od glikozylacji białek samych proteasomów [71]. Modyfikacja przez reszty *O*-GlcNAc ATPazy Rpt2, wchodzącej w skład kompleksu 19S proteasomów, powoduje akumulację w komórkach czynnika Sp1 oraz innych białek [71,72]. Bezpośredni wzrost stabilności białka po modyfikacji przez *O*-GlcNAc obserwowany był natomiast w przypadku p53. *O*-glikozylacja reszty Ser149, stabilizuje p53 przez uniemożliwienie ubikwitylacji, a w konsekwencji zależnej od ubikwityny proteolizy [65].

O-glikozylacja jest włączona w przeniesienie Sp1 do jądra komórkowego [62,63,73]. Wykazano, że jądra komórkowe, a szczególnie jądrowe kompleksy porowe, są bogate w *O*-glikozylowane białka, a wiele białek posiadających reszty *O*-GlcNAc krąży pomiędzy jądrem a cytoplazmą [5]. Duverger i wsp. [74] zaproponowali interesującą hipotezę udziału reszt cukrowych, w tym *N*-acetyloglukozaminy, w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, jako niepeptydowych sygnałów lokalizacji jądrowej. Majumdar i wsp. [63] sugerują, że glikozylowany Sp1 może szybko przemieszczać się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z sekwencjami bogatymi w GC promotora genu dla kalmoduliny. Zależne od reszt cukrowych przeniesienie Sp1 i białka alpha4 do jądra, wykazano w komórkach białaczkowych szczura Nb2 [73]. Białko alpha 4, podobnie jak Sp1, nie posiada sekwencji lokalizacji jądrowej. Oba białka są jednak *O*-glikozylowane, a w komórkach stymulowanych prolaktyną stopień ich

http://rcin.org.pl

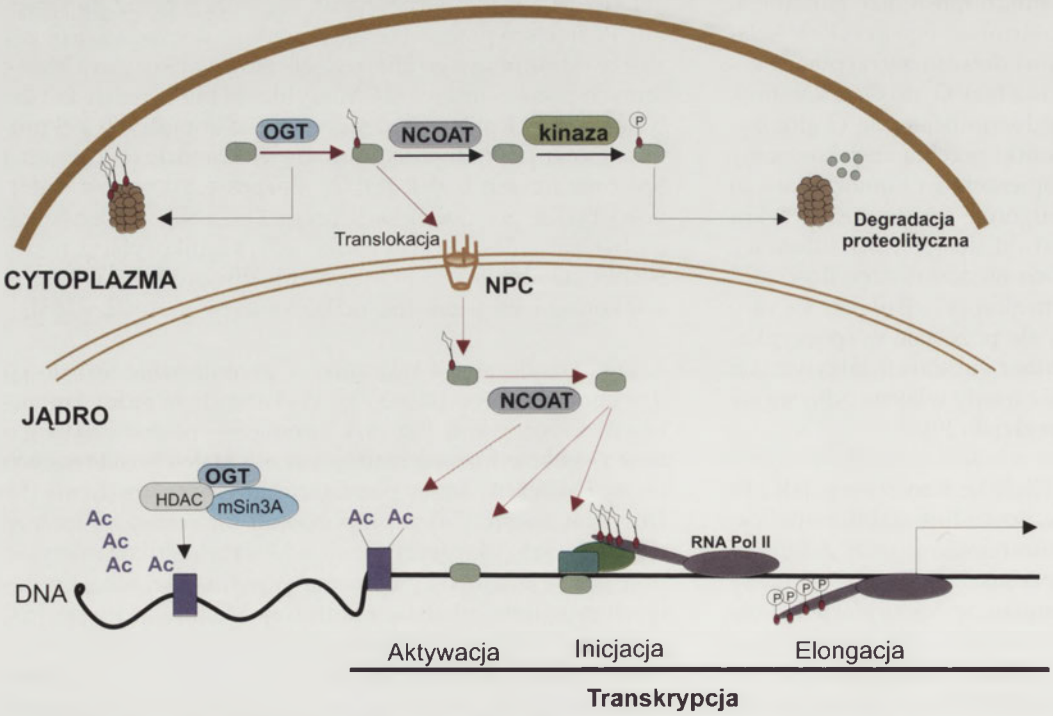
glikozylacji znacznie wzrasta. Obniżenie ekspresji genu *O*-GlcNAc transferazy o 50% przez wyciszenie metodą interferencji RNA powoduje częściową redystrybucję tych białek do cytosolu. W jądrze komórkowym po związaniu z DNA, Sp1 jest częściowo lub całkowicie deglikozylowany, a następnie fosforylowany. Fosforylacja Sp1 sprawia, że jest on bardziej aktywny i promuje transkrypcję docelowego genu (Ryc. 4) [63].

Przyłączanie reszt *O*-GlcNAc do czynników transkrypcyjnych może być mechanizmem regulującym ich powinowactwo do DNA lub innych białek. *O*-glikozylacja C-końcowej domeny p53 z komórek człowieka linii EB-1 ułatwia przyłączenie p53 do DNA, ponieważ maskuje zasadowy region C-końcowej części białka, normalnie hamujący wiązanie [64]. Natomiast *O*-glikozylacja bogatej w glutaminę domeny Sp1 uniemożliwia oddziaływanie tego czynnika z transkrypcyjnym kompleksem TFIID [75] i wydaje się redukować transkrypcyjną aktywność czynnika Sp1 [76].

Wysokie zewnątrzkomórkowe stężenie glukozy stymuluje *O*-glikozylację YY1, czynnika transkrypcyjnego o strukturze palca cynkowego, który wpływa na ekspresję wielu genów komórkowych [66]. YY1 może działać jako aktywator lub represor w zależności od miejsc wiążących w obrębie promotora, stężenia i obecności innych czynników komórkowych. YY1 po związaniu z białkiem retinoblastoma (pRb) nie jest zdolny do wiązania się z DNA. *O*-glikozylacja czynnika YY1 powoduje jego dysocjację od pRb i związanie z promotorem, co prowadzi do represji lub aktywacji genu [66].

Białka Stat są przekaźnikami sygnału i aktywatorami transkrypcji. Pośredniczą one w odpowiedzi komórki na działanie cytokin, hormonów i czynników wzrostu. Po połączeniu tych ligandów ze swoistymi receptorami na powierzchni komórki, białka Stat są aktywowane przez fosforylację tyrozyny i mogą tworzyć dimery. Dimery ulegają przeniesieniu do jądra komórkowego, wiążą się ze specyficznymi sekwencjami promotorowymi i indukują transkrypcję danego genu. Gewinner i wsp. [68] stwierdzili, że czynnik Stat5a po indukcji komórek cytokinami jest modyfikowany przez *O*-GlcNAc. Ta modyfikacja występowała tylko na czynniku Stat5a, lokalizującym się w jądrze komórkowym. Zastąpienie, modyfikowanej przez *O*-GlcNAc, treoniny w pozycji 92 alaniną uniemożliwia transaktywację promotora genu docelowego. Wiązanie Stat5a z DNA nie jest jednak zakłócone. Utrata funkcji wiąże się raczej z faktem, że zmutowany Stat5a nie oddziałuje z koaktywatorem transkrypcji CBP (ang. *CREB binding protein*), który jest konieczny dla transkrypcji genów za pośrednictwem Stat5a. Natomiast modyfikacja samego białka CREB (ang. *cyclic AMP-response element binding protein*) przez reszty *O*-GlcNAc uniemożliwia oddziaływanie tego czynnika transkrypcyjnego z TAFII 130 i hamuje jego transkrypcyjną aktywność [69].

Tak więc modyfikacja czynników transkrypcyjnych przez reszty *O*-GlcNAc wydaje się znacząco wpływać na tworzenie kompleksów transkrypcyjnych, powodujących aktywację lub represję transkrypcji w zależności od systemu. Co interesujące, wykazano również, że duża katalityczna podjednostka polimerazy RNA klasy II może być *O*-glikozylowana w swojej C-końcowej domenie (CTD) [77]. Ta sama domena może być także fosforylowana. Reszty cukrowe nie są wykrywane w ufosforylowanej formie enzymu, a więc fosforylacja i *O*-glikozylacja CTD polimerazy RNA klasy II są modyfikacjami wzajemnie się wykluczającymi. Sugeruje się, że polimeraza RNA klasy II występuje w trzech formach: enzym niezmodyfikowany, fosforylowany i glikozylowany. Zróżnicowane modyfikacje CTD wpływają na regulację ekspresji genów transkrybowanych przez polimerazę RNA klasy II. *O*-GlcNAc transferaza może być także składnikiem kompleksu regulującego transkrypcję. Yang i wsp. [78] stwiedzili, że OGT oddziałuje z kompleksem deace-



Rycina 4. Schemat przedstawiający wpływ modyfikacji białek przez *O*-GlcNAc na proces transkrypcji. *O*-glikozylacja pewnych czynników transkrypcyjnych w cytosolu może zwiększać ich oporność na degradację proteolityczną oraz ułatwiać ich przeniesienie do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym następuje usunięcie reszt *O*-GlcNAc, dzięki czemu czynnik transkrypcyjny może oddziaływać z innymi elementami kompleksów transkrypcyjnych. *O*-glikozylowana forma polimerazy RNA klasy II wchodzi w skład kompleksu inicjacji, a po deglikozylacji jest fosforylowana i uczestniczy w elongacji transkrypcji. Dwufunkcyjny enzym NCOAT ułatwia transkrypcję, powodując deglikozylację czynników transkrypcyjnych i acetylację histonów. *O*-GlcNAc transferaza (OGT) jest składnikiem kompleksu hamującego transkrypcję. HDAC (ang. *histon deacetylases; deacetylazy histonów*)

http://rcin.org.pl

tylaz histonów przez związanie z korepresorem mSin3A i współuczestniczy w zahamowaniu transkrypcji przez *O*-glikozylację czynników transkrypcyjnych i/lub polimerazy RNA klasy II. Iyer i wsp. [79] sugerują, że białko oddziałujące z *O*-GlcNAc transferazą, czyli OIP-106 (ang. *OGT-interacting protein*), odpowiada za dostarczenie *O*-GlcNAc transferazy do miejsc transkrypcji. Badania ko-immunoprecypitacji potwierdziły występowanie *in vivo* kompleksu RNA polimeraza klasy II-OIP106-OGT. Uważa się, że OGT i OIP106 mogą stanowić nowe składniki kompleksu preinicjacji. Interesujące jest również to, że enzym usuwający reszty *O*-GlcNAc, czyli β-*N*-acetylo-D-glukozaminidaza, ma aktywność acetylotransferazy histonów. Sugeruje się więc, że enzym ten, wchodząc w skład transkrypcyjnych kompleksów, reguluje ekspresję genów przez deglikozylację czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA oraz przez acetylację histonów [79].

UWAGI KOŃCOWE

Modyfikacja białek przez *O*-GlcNAc odgrywa istotną rolę w szybkiej odpowiedzi komórki na zmiany warunków środowiska zewnętrznego i stymulację przez różne czynniki. Badania wskazują, że podczas reakcji komórki na stymulację decydujące znaczenie ma jej stan energetyczny. Wrażliwość *O*-GlcNAc transferazy na stężenia UDP-GlcNAc pozwala na szybką zmianę stopnia glikozylacji białek w odpowiedzi na zmieniające się stężenie substratów energetycznych. *O*-glikozylacja, jako sensor metaboliczny, może wpływać na syntezę, lokalizację i aktywność białek zaangażowanych w regulację różnych procesów komórkowych.

Wiele poglądów dotyczących mechanizmu przekazywania sygnału w komórce i procesu transkrypcji ukształtowało się przed wykryciem *O*-GlcNAc lub w okresie, kiedy nie było jeszcze dostatecznie rozwiniętych narzędzi do badania tego typu modyfikacji. Ostatnie lata przyniosły jednak znaczny rozwój metod analizy *O*-glikozylacji. Dostępność specyficznych względem reszt *O*-GlcNAc przeciwciał, sklonowanie i scharakteryzowanie OGT i β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy, możliwość nadekspresji obu enzymów w badanych komórkach lub ich farmakologicznej i genetycznej inaktywacji oraz wykorzystanie technik spektrometrii masowej do określenia miejsc przyłączania reszt *O*-GlcNAc do badanych białek, pozwoliły na lepsze zrozumienie funkcji tej modyfikacji w komórce. Zwiększająca się liczba dowodów sugerujących zaangażowanie glikozylacji w regulację odpowiedzi komórki na zewnątrzkomórkową stymulację i jej wzajemne relacje z fosforylacją, zmuszają do ponownego przyjrzenia się procesom przekazywania sygnału, transkrypcji i cyklu komórkowego pod kątem udziału w nich modyfikacji białek przez *O*-GlcNAc.

Jednak pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w badaniach tej modyfikacji w ciągu ich ponad dwudziestoletniej historii, wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Przede wszystkim niewystarczająca jest wiedza dotycząca tego, w jaki sposób odbywa się regulacja ekspresji i aktywności *O*-GlcNAc transferazy i β-*N*-acetylo-D-glukozaminidazy. Przyszłe badania skoncentrują się zapewne na określeniu dokładnego udziału zaburzeń *O*-glikozylacji w patologii chorób, takich jak cukrzyca, nowotwory i choroby neurozwyrodnieniowe.

PIŚMIENNICTWO

1. Wells L, Hart GW (2003) *O*-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. FEBS Lett 546: 154-158
2. Slawson C, Housley MP, Hart GW (2006) *O*-GlcNAc cycling: How a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. J Cell Biochem 97: 71-83
3. Kudlow JE (2006) Post-translational modification by *O*-GlcNAc: another way to change protein function. J Cell Biochem 98: 1062-1075
4. Torres CR, Hart GW (1984) Topography and polipeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for *O*-linked GlcNAc. J Biol Chem 259: 3308-3317
5. Zachara NE, Hart GW (2002) The emerging significance of *O*-GlcNAc in cellular regulation. Chem Rev 102: 431-438
6. Whelan SA, Hart GW (2003) Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. Circ Res 93: 1047-1058
7. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004) Dynamic *O*-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. J Biol Chem 279: 30133-30142
8. Kneass ZT, Marchase RB (2004) Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated *O*-GlcNAc. J Biol Chem 279: 45759-45765
9. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW (2005) Perturbations in *O*-linked β-*N*-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. J Biol Chem 280: 32944-32956
10. Iyer SP, Hart GW (2003) Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of *O*-GlcNAc cycling. Biochemistry 42: 2493-2499
11. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. J Biol Chem 272: 9308-9315
12. Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA (1997) *O*-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. J Biol Chem 272: 9316-9324
13. Love DC, Kochran J, Cathey RL, Shin S-H, Hanover JA (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of *O*-linked GlcNAc transferase. J Cell Sci 116: 647-654
14. Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of *O*-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. Arch Biochem Biophys 409: 287-297
15. Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2006) Recombinant *O*-GlcNAc transferase isoforms: identification of *O*-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. Glycobiology 16: 415-421
16. Kreppel LK, Hart GW (1999) Regulation of a cytosolic and nuclear *O*-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. J Biol Chem 274: 32015-32022
17. Iyer SP, Hart GW (2003) Roles of the tetratricopeptide repeat domain in *O*-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. J Biol Chem 278: 24608-24616
18. Wrabl JO, Grishin NV (2001) Homology between *O*-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. J Mol Biol 314: 365-374
19. Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2000) The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. Proc Natl Acad Sci USA 97: 5735-5735
20. O'Donnell, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004) *Ogt*-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requsite modification

http://rcin.org.pl

in somatic cell function and embryo viability. Mol Cell Biol 24: 1680-1690

21. Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW (2001) Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Clonning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. J Biol Chem 276: 9838-9845

22. Comtesse N, Maldener E, Meese E (2001) Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and beta N-acetyloglucosaminidase. Biochem Biophys Res Commun 283: 634-640

23. Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE (2004) Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable *O*-GlcNAcase and HAT activities. J Biol Chem 279: 53665-53673

24. Toleman C, Paterson AJ, Kudlow JE (2006) Location and characterization of the *O*-GlcNAcase active site. Biochim Biophys Acta 1760: 829-839

25. Cetinbas N, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R, Vocadlo DJ (2006) Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human *O*-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. Biochemistry 45: 3835-3844

26. Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA (2006) Enzymatic characterization of *O*-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. Carbohydr Res 341: 971-982

27. Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA (1998) Modulation of *O*-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide *O*-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. J Biol Chem 273: 3611-3617

28. Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002) Dynamic interplay between O-glycosylation and *O*-phosphorylation of nucleoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. J Biol Chem 277: 19229-19235

29. Chen YX, Du JT, Zhou LX, Liu XH, Zhao YF, Nakanishi H, Li YM (2006) Alternative *O*-GlcNAcylation/*O*-phosphorylation of Ser16 induce different conformational disturbances to the N terminus of murine estrogen receptor beta. Chem Biol 13: 937-944

30. Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW (2004) *O*-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. J Biol Chem 279: 38466-38470

31. Akimoto Y, Hart GW, Hirano H, Kawakami H (2005) *O*-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetes. Med Mol Morphol 38: 84-91

32. Buse MG (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. Am J Physiol Endocrinol Metab 290: 1-8

33. Wells L, Vosseller K, Hart GW (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin-resistance. Cell Mol Life Sci 60: 222-228

34. Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG (2003) High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: 424-434

35. Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM (1999) Elevated *O*-linked *N*-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. Arch Biochem Biophys 362: 38-45

36. Han I, Oh ES, Kudlow JE (2000) Responsiveness of the state of *O*-linked *N*-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration. Biochem J 1: 109-114

37. Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM (2002) Enhanced *O*-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in Glut1 overexpressing muscles. Am J Physiol Endocrinol Metab 283: 241-250

38. McClain DA, Lubas W, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ , Love DC, Hanover JA (2002) Altered glycan dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. Proc Natl Acad Sci USA 99: 10695-10699

39. Akimoto Y, Kawakami H, Yamamoto K, Munetomo E, Hida T, Hirano H (2003) Elevated expression of *O*-GlcNAc-modified proteins and *O*-GlcNAc transferase in corneas of diabetic Goto-Kakizaki rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 3802-3809

40. Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H, Hart GW (2000) Increased *O*-GlcNAc transferase in pancreas of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 43: 1239-1247

41. Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H, Hart GW (2001) Hyperglycemia and the *O*-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: Elevated expression and altered patterns of *O*-GlcNAcylation. Arch Biochem Biophys 389: 166-175

42. Akimoto Y, Hart GW, Wells, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nagamatsu S, Hirano H, Kawakami H (2006) Elevation of the post-translatonal modification of proteins by *O*-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. Glycobiology 17: 127-140

43. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML (2005) Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/AKT): actions and defects in obesity and type II diabetes. Exp Biol Med 230: 593-605

44. Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Jarvinen H (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine *in vivo* induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. Diabetes 48: 1562-1571

45. Federici M, Menghim R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitic oxide synthase is impaired by *O*-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. Circulation 106: 466-472

46. Park SY, Ryu J, Lee W (2005) *O*-GlcNAc modification on IRS-1 and AKT2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. Exp Mol Med 37: 220-229

47. Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN (2006) Akt1 is dynamically modified with *O*-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. FEBS Lett 580: 3051-3058

48. Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by *O*-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA 99: 5313-5318

49. Parker G, Lund KC, Taylor RP, McClain DA (2003) Insulin resistance of glycogen synthase mediated by *O*-linked N-acetylglucosamine. J Biol Chem 278: 10022-10027

50. Parker G, Taylor R, Jones D, McClain D (2004) Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of *O*-linked *N*-acetylglucosamine. J Biol Chem 279: 20636-20642

51. Jones SP (2005) A bittersweet modification: *O*-GlcNAc and cardiac dysfunction. Circ Res 13: 925-926

52. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003) Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear *O*-GlcNAcylation. J Biol Chem 278: 44230-44237

53. Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillman WH (2005) Adenovirus-mediated overexpression of *O*-GlcNAcase improves contractile function in diabetic heart. Circ Res 96: 1006-1013

54. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by post-translational modification at the Akt site. J Clin Invest 108: 1341-1348

55. Lehman DM, Fu D-J, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Goring HH, Duggirata R, Balangero J, Konrad RJ, Stern MP (2005) A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding *O*-GlcNAc-selective *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. Diabetes 54: 1214-1221

56. Kneass ZT, Marchase RB (2005) Protein *O*-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. J Biol Chem 280: 14579-14585

57. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldgerg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial su-

http://rcin.org.pl

peroxide overproduction activates hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. Proc Natl Acad Sci USA 97: 12222-12226

58. Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB (2002) Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. Diabetes 51: 3461-3467

59. Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC (2001) Identification of *N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat shock proteins. Biochem J 360: 179-188

60. Masson E, Lagarde M, Wiernsperger N, El Bawab S (2006) Hyperglycemia and glucosamine-induced mesangial cell cycle arrest and hypertrophy: common or independent mechanisms? IUBMB Life 58: 381-388

61. Fang B, Miller MW (2001) Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked *N*-acetyl-D-glucosamine: A potential role for *O*-GlcNAc during cell division. Exp Cell Res 263: 243-253

62. Majumdar G, Harmon A, Candelaria R, Martinez-Hernandez A, Raghow R, Solomon SS (2003) *O*-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. Am J Physiol Endocrinol Metab 285: 584-591

63. Majumdar G, Wrigh J, Markowitz P, Martinez-Hernandez A, Raghow R, Solomon SS (2004) Insulin stimulates and diabetes inhibits *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase and *O*-glycosylation of Sp1. Diabetes 53: 3184-3192

64. Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for *O*-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. Oncogene 12: 921-930

65. Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW (2006) Modification of p53 with *O*-linked *N*-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. Nat Cell Biol 8: 1074-1083

66. Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bavhvarov D, Usheva A (2003) YY1 is regulated by *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation). J Biol Chem 278: 14046-14052

67. Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Rafik SM, Shakoori AR, Din N (2006) Oct-2 DNA binding transcription factor: functional consequences of phosphorylation and glycosylation. Nucleic Acids Res 34: 175-184

68. Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, Groner B (2004) The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. J Biol Chem 279: 3563-3572

69. Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC (2003) Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. J Am Chem Soc 125: 6612-6613

70. Vanderford NL, Andrali SA, Özcan S (2006) Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. J Biol Chem 282: 1577-1584

71. Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE (2003) *O*-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. Cell 115: 715-725

72. Liu K, Paterson AJ, Zhang F, McAndrew J, Fukuchi K-I, Wyss JM, Pemg L, Hu Y, Kudlow JE (2004) Accumulation of protein *O*-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high *O*-GlcNAc metabolism. J Neurochem 89: 1044-1055

73. Dauphinee SM, Ma M, Too CKL (2005) Role of *O*-linked β-*N*-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of Alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. J Cell Biochem 96: 579-588

74. Duverger E, Roche A-C, Monsigny M (1996) *N*-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. Glycobiology 6: 381-386

75. Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE (1997) *O*-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. Mol Cell Biol 17: 6472-6480

76. Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE (2001) *O*-linkage of *N*-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6611-6616

77. Comer FI, Hart GW (2001) Reciprocity between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. Biochemistry 40: 7845-7852

78. Yang X, Zhang F, Kudlow JE (2002) Recruitment of *O*-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein *O*-GlcNAcylation to transcriptional repression. Cell 110: 69-80

79. Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW (2003) Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with *O*-GlcNAc transferase. J Biol Chem 278: 5399-5409

Role of *O*-GlcNAc modification of cellular proteins in signal transduction

Anna Krześlak✉

Department of Cytobiochemistry, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

✉e-mail: chadar@interia.pl

Key words: *O*-GlcNAc, phosphorylation, signal transduction, transcription

ABSTRACT

Glycosylation, consisting in incorporation of single β-*N*-acetyl-D-glucosamine residues attached by *O*-linkage to serine or threonine residues, is a common modification of cytoplasmic and nuclear proteins. Up to now about 200 proteins modified by *O*-GlcNAc have been identified including transcription factors, signaling components and metabolic enzymes. *O*-GlcNAc modified proteins can be also phosphorylated. In some cases *O*-GlcNAc and *O*-phosphate alternatively occupy the same sites. It has been suggested, that in signal transduction, instead of simple regulation by phosphorylation, more complex mechanism including glycosylation, is involved. Presented work focus on the structure and function of enzymes involved in *O*-GlcNAc modification and the role of this modification in regulating signal transduction and transcription.

http://rcin.org.pl

Proces translacji zachodzący niezależnie od obecności kapu na końcu 5′ eukariotycznych mRNA

Leszek Błaszczyk

Mariola Dutkiewicz

Jerzy Ciesiołka

Pracownia Chemii i Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Pracownia Chemii i Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel.: (061) 852 85 03, e-mail: ciesiolk@ibch.poznan.pl

Artykuł otrzymano 30 marca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 17 lipca 2007 r.

Słowa kluczowe: inicjacja translacji, mRNA, IRES, ITAF, rybosom

Wykaz skrótów: IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*) — wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem; ITAF (ang. *IRES Trans-Acting Factors*) — czynniki wiążące się z IRES *in trans*; kap — 7-metyloguanozyna połączona z pierwszym nukleotydem RNA wiązaniem 5′-5′-trifosforanowym; R — reszty purynowe; UTR (ang. *UnTranslated Region*) — region nieulegający translacji

Podziękowania: Przygotowanie artykułu zostało dofinansowane ze środków budżetowych na naukę jako projekt badawczy nr 2 P04A 051 28. Autorzy dziękują współpracownikom z Zespołu Biochemii RNA za cenne uwagi podczas jego przygotowywania

STRESZCZENIE

Eukariotyczne mRNA posiadają na końcu 5′ strukturę kapu, która odgrywa ważną rolę podczas inicjacji procesu translacji, przebiegającej według tzw. mechanizmu skaningowego. W alternatywnym sposobie translacji aktywny rybosom tworzy się bez udziału kapu, dzięki obecności w regionie niekodującym 5′ mRNA odcinka sekwencji, który zwany jest wewnętrznym miejscem oddziaływania z rybosomem, IRES. Jest to fragment mRNA przyjmujący specyficzną strukturę drugo- i trzeciorzędową, do którego przyłącza się podjednostka rybosomalna 40S oraz wybrane czynniki białkowe i utworzony zostaje kompleks inicjacyjny, a następnie aktywny translacyjnie rybosom 80S. Okazuje się, że w komórce eukariotycznej zależna od IRES translacja niektórych mRNA umożliwia syntezę wybranych białek w warunkach, gdy proces translacji zależny od kapu jest zahamowany lub zachodzi na silnie obniżonym poziomie. Jak przedstawiono w niniejszym opracowaniu, alternatywna droga inicjacji translacji dotyczy białek o kluczowym znaczeniu dla cyklu komórkowego, apoptozy, odpowiedzi komórki na warunki stresowe, a także procesu nowotworzenia.

WPROWADZENIE

Proces translacji, podczas którego zachodzi przepisywanie informacji zawartej w mRNA na łańcuch polipeptydowy białka, jest końcowym etapem ekspresji genów [1]. Prowadzi on do powstania proteomu, czyli pełnego zestawu białek, jaki posiada komórka w danych warunkach. Podczas translacji dochodzi do skoordynowanej współpracy ponad stu makrocząsteczek: rybosomów, mRNA, tRNA, czynników translacyjnych i enzymów aktywujących. Po poznaniu pełnej sekwencji genomu człowieka [2] okazało się, że tylko ok. 2% to sekwencje kodujące białka. Z drugiej strony, aparat translacyjny stanowi 30% suchej masy komórki, a rRNA wchodzący w skład rybosomów stanowi aż 80% komórkowego RNA. Regulacja ekspresji genów kodujących białka zachodzi podczas wszystkich etapów rozwoju komórki, począwszy od różnicowania się, poprzez zdolność do funkcjonowania w zmiennych warunkach środowiska, aż po proces apoptozy. Najważniejszymi etapami, na których zachodzi regulacja ilości powstających białek, są etapy transkrypcji i translacji. W szczególności regulacja na poziomie translacji umożliwia komórce bardzo szybką odpowiedź na zmiany wywołane np. stresem komórkowym bądź działaniem czynników pro- lub antyapoptotycznych. Biorąc pod uwagę fakt, że znaczący okres czasu wymagany jest do syntezy mRNA, jego dojrzewania i eksportu do cytoplazmy, regulacja na poziomie jego translacji jest w tych przypadkach szczególnie korzystna dla komórki.

Proces translacji złożony jest z trzech etapów: inicjacji, elongacji i terminacji [1]. Choć na każdym z nich dochodzi do regulacji ilości powstającego białka, to przede wszystkim regulowany jest etap inicjacji, gdy powstaje kompleks rybosom-mRNA i wybierany jest kodon startowy, od którego rozpoczyna się synteza. Sądzi się, że etap ten limituje efektywność translacji. Z tego względu, kontrola na etapie inicjacji jest bardziej efektywna niż regulacja na etapach późniejszych, związana z koniecznością usuwania z komórki nieukończonych łańcuchów polipeptydowych [1]. Sądzi się także, że jednym ze sposobów działania mikroRNA w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów może być hamowanie inicjacji translacji mRNA z równoczesnym zwiększeniem szybkości jego deadenylacji [3].

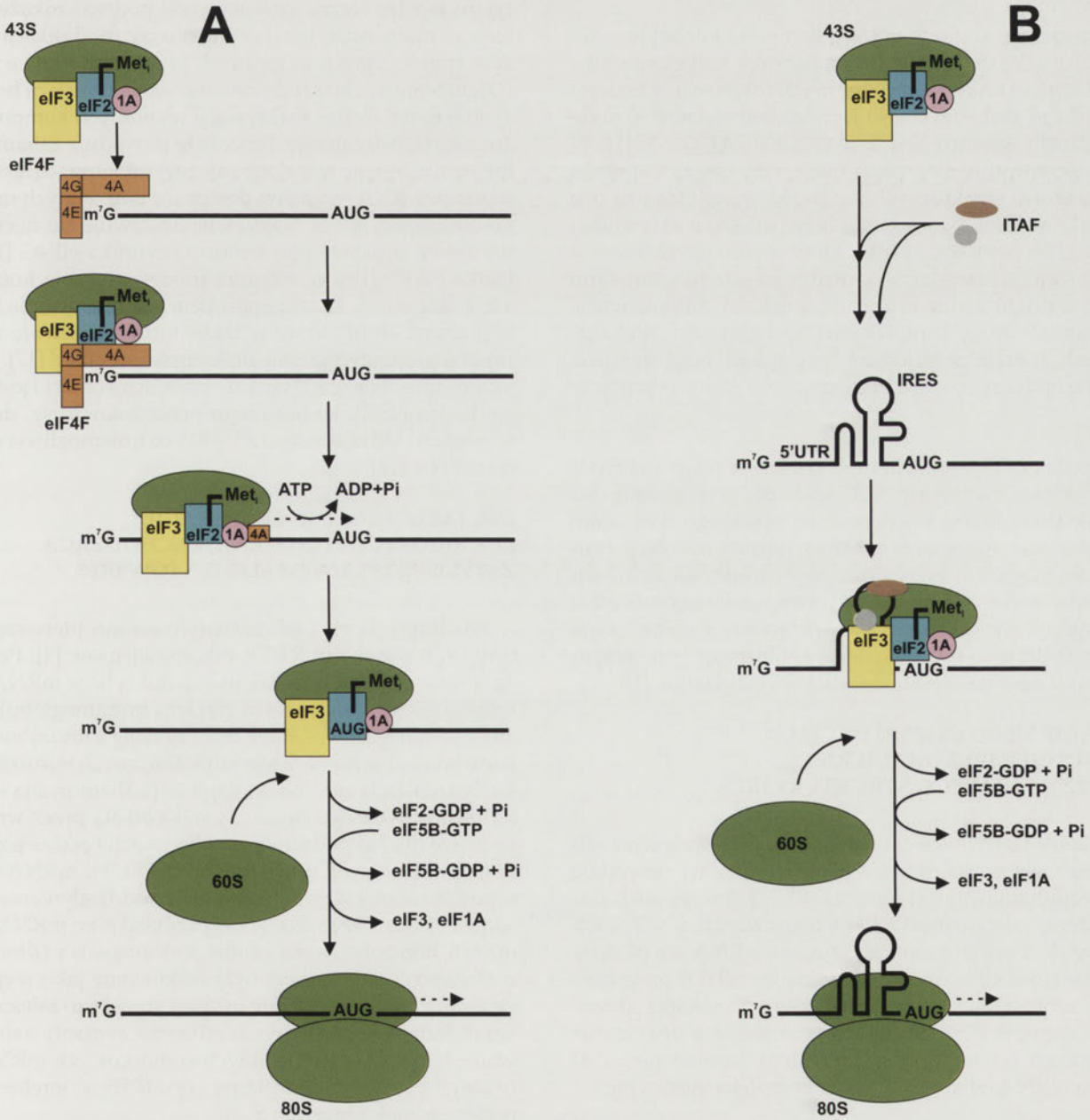
Wszystkie eukariotyczne mRNA zawierają na końcu 5′ strukturę kapu (ang. *cap*), którego obecność silnie stymuluje inicjację translacji. Przy udziale czynników białkowych dochodzi do związania podjednostki rybosomalnej 40S do końca 5′ mRNA posiadającego kap, następnie do przesuwania się utworzonego kompleksu aż do kodonu inicjującego, w obrębie którego przyłącza się podjednostka 60S i tworzy się aktywny translacyjnie rybosom. W ten sposób przebiega proces inicjacji translacji, który zależny jest od obec-

http://rcin.org.pl

ności kapu na końcu 5′ mRNA, noszący nazwę mechanizmu skaningowego [1]. W alternatywnym sposobie translacji, według tzw. mechanizmu inicjacji wewnętrznej [4], aktywny rybosom tworzy się bez udziału kapu, dzięki obecności w regionie niekodującym 5′ mRNA odcinka sekwencji, który zwany jest wewnętrznym miejscem oddziaływania z rybosomem (IRES, ang. *Internal Ribosome Entry Site*). Jest to fragment mRNA, przyjmujący określoną strukturę drugo- i trzeciorzędową, do którego przyłącza się podjednostka rybosomalna 40S oraz wybrane czynniki białkowe i utworzony zostaje kompleks inicjacyjny, a następnie aktywny rybosom 80S. Sekwencje o takich właściwościach zidentyfikowano w szeregu wirusowych RNA [5-7]. W podobny sposób, niezależny od kapu, może zachodzić również translacja niektórych mRNA w komórkach eukariotycznych [8]. Jak przedstawiono w niniejszym opracowaniu, alternatywna droga inicjacji translacji dotyczy białek o kluczowym znaczeniu dla cyklu komórkowego, apoptozy, odpowiedzi komórki na warunki stresowe, a także procesu nowotworzenia.

INICJACJA PROCESU TRANSLACJI U EUKARIONTÓW ZALEŻNA OD OBECNOŚCI KAPU NA KOŃCU 5′ mRNA

W komórkach eukariotycznych pierwszym etapem inicjacji translacji jest utworzenie kompleksu inicjacyjnego 43S, w skład którego wchodzą: mała podjednostka rybosomalna 40S, kompleks eIF2-GTP-Met-tRNA$_i^{Met}$ oraz czynnik eIF3 (Ryc. 1A) [1]. Po złożeniu kompleksu 43S, łączy się on ze strukturą kapu obecną na końcu 5′ mRNA, składającą



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie procesu inicjacji translacji. A — Inicjacja translacji zależna od struktury kapu, gdy po uformowaniu kompleksu inicjacyjnego następuje skanowanie regionu niekodującego 5′ mRNA do momentu napotkania kodonu start — AUG. Szczegółowy opis w tekście. B — Inicjacja translacji zależna od struktury IRES, polegająca na wiązaniu się podjednostki rybosomalnej 40S do regionu niekodującego 5′ w pobliżu kodonu inicjującego z udziałem niektórych kanonicznych czynników inicjacyjnych oraz specyficznych czynników ITAF.

http://rcin.org.pl

się z 7-metyloguanozyny połączonej z pierwszym transkrybowanym nukleotydem wiązaniem 5'-5'-trifosforanowym. Sądzi się, że kap wpływa na stabilność cząsteczki mRNA, chroniąc jej koniec 5' przed degradacją oraz pełni stymulującą funkcję w procesie składania pre-mRNA. Wiązanie 43S do kapu zachodzi dzięki obecności kompleksu eIF4F, składającego się z trzech czynników białkowych: eIF4A (posiada aktywność ATP-zależnej helikazy), eIF4E (białko wiążące się z kapem) oraz eIF4G (tworzy połączenie między eIF4E a PABP oraz wiąże eIF3 i eIF4A). Na wiązanie kompleksu 43S do mRNA ma również wpływ odcinek poliadenylowy znajdujący się na końcu 3' mRNA. W oddziaływaniu tym bierze udział białko PABP, które wiąże się do sekwencji poli (A) i oddziałuje z czynnikiem eIF4G, wymuszając takie zagięcie cząsteczki mRNA, że jej koniec 3' znajduje się w bliskim sąsiedztwie miejsca inicjacji translacji [1].

Po związaniu końca 5' mRNA, kompleks inicjacyjny skanuje cząsteczkę do momentu, aż napotka kodon startowy AUG. U organizmów eukariotycznych rozpoznanie kodonu inicjacyjnego zachodzi dzięki jego umiejscowieniu w obrębie zgodnej sekwencji Kozak 5'-GCCRCC**AUG**G-3' [1]. W trakcie skanowania, kompleks inicjacyjny często napotyka drugorzędowe struktury RNA. Zwykle rozplatane są one dzięki aktywności dwóch czynników: eIF4A, o aktywności ATP-zależnej helikazy, i eIF4B, który stymuluje aktywność eIF4A. Usuwają one wiązania między zasadami azotowymi w obrębie drugorzędowych struktur mRNA, odblokowując w ten sposób drogę kompleksowi inicjacyjnemu. Wykazano jednak, że stabilne struktury typu spinki mogą stanowić przeszkodę dla rybosomu i uniemożliwić dalsze skanowanie [1].

Z chwilą umieszczenia kompleksu 43S w regionie zawierającym kodon inicjacyjny AUG zachodzi przyłączenie dużej podjednostki 60S i utworzenie kompletnego rybosomu, co jest jednocześnie ostatnim etapem inicjacji translacji. Proces ten wymaga hydrolizy GTP, co prowadzi do dysocjacji czynników inicjacyjnych. Bierze w tym udział czynnik eIF5, który hydrolizuje GTP oraz eIF6, połączony z niezwiązaną dużą podjednostką rybosomalną, zapobiegając tym samym jej łączeniu się z małą podjednostką w cytoplazmie [1].

ODKRYCIE MECHANIZMU INICJACJI TRANSLACJI WIRUSOWYCH RNA WYKORZYSTUJĄCEGO STRUKTURY IRES

Pod koniec lat 80-tych zauważono, że zakażenie wirusem polio, należącym do rodziny pikornawirusów, powoduje specyficzne hamowanie translacji mRNA komórek gospodarza, podczas gdy wirusowy RNA ulega translacji w sposób wydajny [4]. Potwierdzono, że wirusowy RNA nie posiada struktury kapu na końcu 5', a jego region 5'UTR przyjmuje wysoce zorganizowaną strukturę drugo- i trzeciorzędową, tworząc element IRES. Struktura ta umożliwia utworzenie kompletnego rybosomu z wyłączeniem mechanizmu skanowania mRNA od końca 5' przez kompleks inicjacyjny.

Od czasu odkrycia zależnej od IRES translacji u pikornawirusów, mechanizm ten został także opisany u innych wirusów RNA o polarności dodatniej, takich jak wirus zapalenia wątroby typu C, (HCV, ang. *Hepatitis C Virus*) [9], następnie u retrowirusów [10], a nawet wśród wirusów DNA, np. u wirusa herpes powiązanego z mięsakiem Kaposiego (KSHV, ang. *Kaposi's Sarcoma – associated Herpes Virus*) [11].

Struktura IRES umożliwia wiązanie kompleksu 43S do wirusowego RNA bez obecności kompleksu eIF4F na drodze przynajmniej trzech głównych mechanizmów: dzięki oddziaływaniom eIF4G i eIF4A z odpowiednimi domenami strukturalnymi IRES (wirus EMCV) [12], poprzez bezpośrednie oddziaływanie z IRES, stabilizowane przez wiązanie czynnika eIF3 (wirus HCV) [13], a także wiązanie kompletnego rybosomu bez obecności jakichkolwiek czynników translacyjnych i tRNA (wirus CrPV) [14].

Strategia translacji wirusów poprzez wewnętrzną inicjację ma bardzo ważne konsekwencje podczas zakażenia, ponieważ mechanizm ten daje możliwość modyfikacji czynników translacyjnych używanych przez komórkowe mRNA. Dzięki temu dochodzi do zahamowania translacji białek gospodarza na drodze inaktywacji wybranych komponentów aparatu translacyjnego. Procesy te powodują zahamowanie lub spowolnienie translacji zależnej od kapu, dzięki czemu wirusowy RNA ma pełny dostęp do potrzebnych mu czynników inicjacyjnych. Najczęściej obserwuje się cięcie przez wirusowe proteazy obu izoform czynnika eIF4G [15] oraz białka PABP [16], co zaburza proces wiązania kompleksu 43S przez eIF4E. Innym sposobem jest hamowanie fosforylacji białek 4E-BP, które w takiej formie wiążą się z eIF4E, zapobiegając utworzeniu się kompleksu eIF4F [17]. Jeszcze innym sposobem zatrzymania translacji komórki jest wiązanie białka NSP3, kodowanego przez rotawirusy, do eIF4G w miejscu oddziaływania z PABP, co uniemożliwia cyklizację mRNA [18].

INICJACJA PROCESU TRANSLACJI EUKARIOTYCZNYCH mRNA, ZACHODZĄCA Z WYKORZYSTANIEM ELEMENTÓW IRES

Niedługo po tym jak zidentyfikowano pierwszą strukturę IRES wewnątrz 5'UTR pikornawirusów [4], Peter Sarnow wraz ze współpracownikami odkryli, że mRNA białka wiążącego się z łańcuchem ciężkim immunoglobulin (BiP, ang. *Immunoglobulins heavy chain Binding Protein*) może ulegać translacji w komórkach zainfekowanych wirusem polio, kiedy translacja zależna od kapu jest zahamowana w wyniku proteolitycznego cięcia czynnika eIF4G przez wirusową proteazę [8]. Na podstawie tej obserwacji i późniejszych badań strukturalnych dowiedziono, że 5'UTR mRNA kodującego BiP tworzy wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem, IRES. Przez długi czas przykład tego mRNA wraz z mRNA homeotycznych genów *Antennapedia* i *Ultrabithorax* u *Drosophila melanogaster* były traktowane jako wyjątki od generalnego mechanizmu inicjacji translacji zależnego od kapu. Jednakże, te pierwsze odkrycia zwróciły zainteresowanie badaczy w stronę innych komórkowych mRNA, które mogłyby zawierać struktury typu IRES w obrębie swoich regionów niekodujących 5'.

Wykazano, że od 3 do 5% wszystkich komórkowych mRNA jest zasocjowane z polirybosomami w trakcie za-

http://rcin.org.pl

Tabela 1. Elementy IRES zidentyfikowane w eukariotycznych mRNA. Tabela powstała w oparciu o dane zamieszczone w pracach przeglądowych [20,24] oraz wskazanych pracach źródłowych.

mRNA/IRES	Funkcja białka	Organizm	Warunki indukcji
Apaf-1	czynnik proapoptotyczny	człowiek	apoptoza
XIAP	czynnik antyapoptotyczny	człowiek	apoptoza/promieniowanie/głód
c-Myc	czynnik transkrypcyjny	człowiek	apoptoza/rozwój/stres genotoksyczny/ cykl kom./spec. tkankowa
DAP5	czynnik translacyjny	człowiek	apoptoza
Kinaza białkowa Cδ	kinaza białkowa C delta	szczur	apoptoza/faza G2/M cyklu kom.
Reaper	czynnik proapoptotyczny	*Drosophila*	apoptoza/szok cieplny
Hsp70	białko szoku cieplnego	*Drosophila*	apoptoza/szok cieplny
Bcl-2	czynnik antyapoptotyczny	człowiek	apoptoza
HIAP2	czynnik antyapoptotyczny	człowiek	apoptoza/promieniowanie/ stres endopl.
Surwiwina	czynnik antyapoptotyczny	mysz	apoptoza/faza G2/M cyklu kom.
La1	białko wiążące się z RNA	człowiek	apoptoza/zapalenie/ infekcja wirusowa
La1′	białko wiążące się z RNA	człowiek	apoptoza/zapalenie/ infekcja wirusowa
Unr	białko wiążące się z RNA	człowiek	apoptoza/infekcja wirusowa
Hid [62]	czynnik proapoptotyczny	*Drosophila*	apoptoza
Grim [62]	czynnik proapoptotyczny	*Drosophila*	apoptoza
ODC	dekarboksylaza ornitynowa	szczur	faza G2/M cyklu kom.
Kinaza PITSLRE	kinaza zależna od cyklin	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
NAP1L1	udział w składaniu nukleosomów	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
NPM1	nukleofosmina	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
ABETA	prekursor amyloidu β	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
Cyr61	aktywator angiogenezy	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
GRP58	chaperon	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
hnRNP A/B	heterogenna rybonukleoproteina A/B	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
SNM1	białko naprawcze DNA	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
Sp3	czynnik transkrypcyjny	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
Hairless	inhibitor transkrypcji	*Drosophila*	faza G2/M cyklu kom.
Wimentyna	białko strukturalne	człowiek	faza G2/M cyklu kom.
p53 [44]	czynnik transkrypcyjny	człowiek	faza G2/M i G1/S cyklu kom.
βPix-b(L)	GTPaza z rodziny białek Rho	mysz	rozwój
Antennapedia	białko homeotyczne	*Drosophila*	rozwój/spec. tkankowa
Ultrabithorax	białko homeotyczne	*Drosophila*	rozwój/spec. tkankowa
IGF-II lider 2	insulinopodobny czynnik wzrostu II	człowiek	rozwój
Nkx6.1	czynnik transkrypcyjny	mysz	rozwój
Notch2	białko receptorowe	*Drosophila*	rozwój/spec. komórkowa
AML1/RUNX1	czynnik transkrypcyjny	człowiek	różnicowanie
MYT2	czynnik transkrypcyjny	szczur	różnicowanie
IGF-II lider 1	insulinopodobny czynnik wzrostu II	człowiek	różnicowanie/proliferacja
IGF-IR	receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu I	szczur	różnicowanie/proliferacja
Mnt	inhibitor transkrypcji	człowiek	różnicowanie/proliferacja
FGF-2	czynnik wzrostu fibroblastów 2	człowiek	spec. tkankowa/hiperglikemia
FGF-1a	czynnik wzrostu fibroblastów 1a	człowiek mysz	spec. tkankowa
FGF-1b	czynnik wzrostu fibroblastów 1b	człowiek	spec. tkankowa
FGF-1c	czynnik wzrostu fibroblastów 1c	człowiek	spec. tkankowa
FGF-1d	czynnik wzrostu fibroblastów 1d	człowiek	spec. tkankowa
N-myc	czynnik transkrypcyjny	człowiek	spec. tkankowa
Koneksyna 32	składnik synapsy elektrycznej	człowiek	spec. tkankowa
Koneksyna 43	składnik synapsy elektrycznej	szczur	spec. tkankowa
PP2Cβ	fosfataza białkowa 2Cβ	szczur	spec. tkankowa
Utr	utrofina	mysz	spec. tkankowa
NRF	czynnik transkrypcyjny	człowiek	spec. komórkowa
Kinaza II α-CaM	podjednostka α kinazy II zależnej od wapnia i kalmoduliny	szczur	spec. komórkowa
ARC	białko związane z cytoszkieletem	szczur	spec. komórkowa

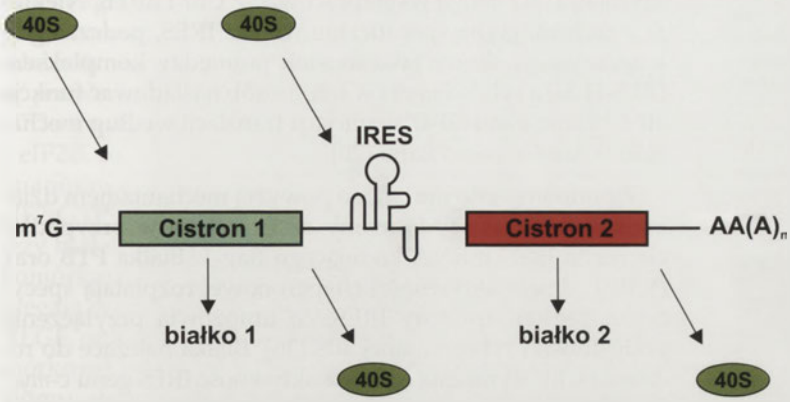
http://rcin.org.pl

Dendryna	modulator cytoszkieletu postsynaptycznego	szczur	spec. komórkowa
FMR1	białko wiążące się z RNA	człowiek	spec. komórkowa
MAP-2	białko związane z cytoszkieletem	szczur	spec. komórkowa
Neurogranina (RC3)	regulator aktywności kinazy CaMKII	szczur	spec. komórkowa
Scamper	kanał wapniowy	pies	spec. komórkowa
TRKB	kinaza tyrozynowa	człowiek	spec. komórkowa
L-Myc	onkogen Myc specyficzny dla płuc	człowiek	spec. komórkowa
CCND1	cyklina D1	człowiek	traktowanie rapamycyną
VEGF-AiresA	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu	człowiek mysz	hypoksja
VEGF-AiresB	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu	człowiek	hypoksja
HIF-1α	czynnik transkrypcyjny	mysz	hypoksja
TIE2	kinaza tyrozynowa	człowiek	hypoksja/spec. komórkowa
Cat-1	błonowy transporter aminokwasów	szczur	hypoksja/niedobór aminokwasów stres endopl./niedobór glukozy
BAG-1 p36	czynnik antyapoptotyczny	człowiek	szok cieplny
BiP	chaperon	człowiek	szok cieplny
Ure2	regulator katabolizmu azotu	drożdże	szok cieplny
Hsp101	białko szoku cieplnego	kukurydza	szok cieplny
Hsp70	białko szoku cieplnego	człowiek	szok cieplny
Runx2 Typ I	czynnik transkrypcyjny	mysz	stres genotoksyczny
Runx2 Typ II	czynnik transkrypcyjny	mysz	stres genotoksyczny
eIF4G	czynnik translacyjny	człowiek	zakażenie wirusowe
Kv1.4	kanał potasowy	mysz	zakażenie wirusowe
ORF1p [63]	białko wiążące się z RNA	mysz	retrotranspozycja elemenu LINE-1
ORF2p [63]	endonukleaza i odwrotna transkryptaza	mysz	retrotranspozycja elemenu LINE-1
AT1R	receptor angiotensyny	człowiek	głód
Rbm3	białko wiążące się z RNA	mysz	łagodna hipotermia
MS	syntaza metioninowa	człowiek	witamina B12
HAP4	czynnik transkrypcyjny	drożdże	represja kataboliczna
V1br	receptor wazopresyny V1b	szczur	aktywacja kinazy białkowej C
GATA-4 [64]	czynnik transkrypcyjny	człowiek	wazopresyna
Bcl-xL [65]	czynnik antyapoptotyczny	mysz	promieniowanie
MPD6 [66]	antygen	człowiek	interferon
NBS1	zmutowana forma białka zaangażowanego w naprawę DNA	człowiek	brak danych
c-Myb	czynnik transkrypcyjny	człowiek	brak danych
MYCHEX1	nieznana	człowiek	brak danych
TFIID	czynnik transkrypcyjny	drożdże	brak danych
MTG8a	czynnik transkrypcyjny	człowiek	brak danych
Gtx	białko homeodomenowe	mysz	brak danych
ERα	receptor estrogenowy α	człowiek	brak danych
P150 (TIF4631)	czynnik translacyjny	drożdże	brak danych
YAP1	aktywator transkrypcyjny	drożdże	brak danych
APC	supresor nowotworzenia	człowiek	brak danych
Koneksyna 26	składnik synapsy elektrycznej	człowiek	brak danych
c-Jun	czynnik transkrypcyjny	kurczak	brak danych
Smad5	embriogeneza	człowiek	brak danych
LEF-1	czynnik transkrypcyjny	człowiek	brak danych

każenia wirusem polio, a także podczas mitozy, hypoksji i apoptozy, kiedy proces translacji zależny od kapu jest zahamowany lub zachodzi na silnie obniżonym poziomie [19]. W ostatnich kilku latach, elementy IRES identyfikuje się we wzrastającej liczbie komórkowych mRNA. Jak dotąd, struktury tego typu zostały znalezione w mRNA białek zaangażowanych w procesy regulacji ekspresji genów podczas apoptozy, podziału komórkowego, rozwoju, różnicowania, wzrostu komórki oraz kancerogenezy. Wraz z odkryciem struktur IRES w komórkowych mRNA odkryto także białka wiążące się specyficznie z tymi elementami [20]. Białka te nazwano czynnikami wiążącymi się z IRES *in trans* (ITAF, ang. *IRES Trans-Acting Factors*). Godne uwagi jest także to, że duża część struktur typu IRES bierze udział w inicjacji translacji białek chroniących komórki w warunkach stresowych, takich jak: głód, szok cieplny, promieniowanie, niedotlenienie. Funkcje białek i warunki, w jakich ujawnia się ich zależna od IRES translacja przedstawiono w Tabeli 1.

Do identyfikacji elementów IRES służy test z wykorzystaniem wektorów bicistronowych (Ryc. 2). Wektor

http://rcin.org.pl



Rycina 2. Cząsteczka bicistronowego mRNA, wykorzystywana w badaniach aktywności translacyjnej elementów IRES. Pierwszy cistron ulega translacji w procesie zależnym od obecności kapu, podczas gdy drugi ulega translacji tylko wtedy, gdy sekwencja znajdująca się pomiędzy obydwoma cistronami może funkcjonować jako element IRES.

taki składa się z dwóch genów reporterowych, pomiędzy które wklonowuje się badaną sekwencję o potencjalnej zdolności do kierowania procesem wewnętrznej inicjacji translacji. Ulegający transkrypcji mRNA na końcu 5′ zawiera strukturę kapu. Pierwszy gen ulega translacji zależnej od kapu, podczas gdy drugi jest pod kontrolą potencjalnego elementu IRES. Ostatnio pojawiły się doniesienia, że użycie wektorów bicistronowych może niekiedy prowadzić do niewłaściwej interpretacji otrzymywanych wyników, ponieważ w szeregu sekwencji IRES stwierdzono obecność kryptycznych promotorów transkrypcyjnych oraz miejsc składania mRNA [21,22]. Doprowadzić to może do powstania monocistronowego mRNA kodującego drugi gen reporterowy, który ulega translacji w sposób zależny od kapu. Dodatkowo, w badaniach prowadzonych *in vivo* istnieje możliwość fragmentacji dwucistronowego mRNA wskutek działania endonukleaz. Zazwyczaj mała efektywność translacyjna wektorów bicistronowych utrudnia ponadto ilościową interpretację wyników, a hybrydyzacja typu *Northern blotting* jest metodą za mało czułą do identyfikacji bicistronowych mRNA, przy jednoczesnym wykluczeniu form monocistronowych, powstałych wskutek obecności kryptycznych promotorów lub alternatywnych miejsc składania mRNA [21,22]. Należy zauważyć, że w pracach opublikowanych w ostatnich latach zwrócono większą uwagę na stosowanie w doświadczeniach szeregu reakcji kontrolnych, które pozwalają na wyeliminowanie wielu wątpliwości związanych z wykorzystaniem wektorów bicistronowych. Coraz częściej dokonuje się również transfekcji komórki bicistronowym lub pozbawionym kapu RNA, co pozwala na ominięcie etapu transkrypcji i wykluczenie obecności kryptycznych promotorów oraz alternatywnych miejsc składania mRNA [23].

CHARAKTERYSTYKA STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA KOMÓRKOWYCH STRUKTUR IRES

Jednym z najistotniejszych pytań dotyczących funkcjonowania komórkowych elementów IRES jest to, w jaki sposób wiążą one podjednostkę rybosomalną 40S. Te fragmenty sekwencji mRNA tworzą określone struktury drugo- i trzeciorzędowe, dzięki czemu mogą oddziaływać z elementami aparatu translacyjnego: podjednostką rybosomalną 40S, kanonicznymi czynnikami inicjacyjnymi oraz czynnikami białkowymi ITAF. Oddziaływania te umożliwiają utworzenie kompletnego rybosomu w sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego i rozpoczęcie procesu translacji mRNA.

Elementy IRES znajdują się zwykle w długich, posiadających złożoną strukturę, regionach 5′ UTR mRNA, bogatych w pary GC. Istnieją jednak przypadki, takie jak mRNA białka Notch i kinazy $p58^{PITSLRE}$, gdzie elementy IRES znajdują się wewnątrz regionu kodującego [19]. Okazuje się, że większość komórkowych IRES ma długość od 150 do 300 nukleotydów [24]. Istnieją także doniesienia, że struktury IRES o długości 55 nukleotydów mogą wykazywać pełną aktywność w procesie inicjacji [25]. Skrajnym przypadkiem jest IRES znajdujący się w regionie 5′UTR mRNA homeodomenowego białka Gtx, którego długość wynosi zaledwie 9 nukleotydów. Sekwencja ta jest w 100% komplementarna do fragmentu 18S rRNA (nukleotydów 1132-1124) w podjednostce rybosomalnej 40S. Sugeruje się, że parowanie zasad tych sekwencji prowadzi do wiązania rybosomu i inicjacji translacji, podobnie jak ma to miejsce u Prokaryota. Trzeba jednak zaznaczyć, że dotychczas nie ma jednoznacznych dowodów na istnienie tego typu oddziaływania [26].

Dotychczasowe badania komórkowych IRES wykazały, że nie ma wyraźnych podobieństw strukturalnych pomiędzy tymi elementami. Niektórzy badacze sugerowali, że komórkowe elementy IRES mogą zawierać motyw trzonu i pętli typu Y (ang. *Y-type stem-loop structural motif*). Jednakże brak jest jednoznacznych doniesień, aby struktury tego typu odpowiedzialne były za inicjację translacji [27]. Co więcej, nie znaleziono strukturalnych podobieństw pomiędzy różnymi elementami IRES nawet wówczas, gdy porównywane cząsteczki mRNA pochodziły od blisko spokrewnionych genów, jak w przypadku c-*myc* i L-*myc* [28]. Sądzi się zatem, że istnieje wiele różnych struktur RNA, które przy współudziale czynników białkowych mogą związać podjednostkę rybosomalną 40S.

Analiza strukturalna, której została poddana jak na razie niewielka grupa komórkowych mRNA zawierających IRES, m.in. c-*myc* [29], *FGF-2* [30], L-*myc* [31], *Apaf-1* [32], *cat-1* [33], *FGF-1* [34], *IGF-II* [35], ujawniła, że posiadają one motywy strukturalne typu trzonu i pętli oraz pseudowęzła. Inaczej niż w przypadku wirusowych IRES, gdzie pojedyncze delecje powodują nierzadko całkowitą blokadę inicjacji, obserwowano, że niekiedy delecje nawet większych fragmentów komórkowych IRES jedynie nieznacznie obniżały poziom translacji. Ponadto, w niektórych przypadkach indywidualne ich części są zdolne do inicjacji translacji, choć nie tak wydajnie jak struktury kompletne [28].

Co ciekawe, w regionach niekodujących 5′ kilku komórkowych mRNA zawierających struktury typu IRES zaobserwowano obecność małych otwartych ramek odczytu (uORF, ang. *Upstream Open Reading Frame*) w obrębie sekwencji wewnętrznego miejsca oddziaływania z rybosomem. Początkowo przypuszczano, że biorą one udział w hamowaniu procesu translacji zależnego od

http://rcin.org.pl

Tabela 2. Czynniki białkowe ITAF, oddziałujące z IRES *in trans*. Tabela powstała w oparciu o dane zamieszczone w pracy przeglądowej [24] oraz wskazanych pracach źródłowych. Dla czynników wymienionych w kolumnie ITAF postulowano wcześniej następujące role: PTB/nPTB — białko wiążące się z traktami polipirymidynowymi, PCBP1/2 — białko wiążące się z traktami bogatymi w cytozyny, hnRNPK — heterogenna jądrowa rybonukleoproteina K, La — ATPaza zależna od DNA lub RNA, Unr — białko wiążące się z RNA, hnRNPC1/C2 — heterogenna jądrowa rybonukleoproteina C1/C2, DAP5 — czynnik translacyjny, eIF4GI fragment — czynnik translacyjny, NSAP1 (hnRNPQ) — heterogenna jądrowa rybonukleoproteina Q, Zuo1p — chaperon RNA, Ku — ATP-zależna helikaza DNA II, hnRNPA1 — heterogenna jądrowa rybonukleoproteina A1.

ITAF	mRNA/IRES
PTB/nPTB	Apaf-1, Bag-1, Mnt, Myb, MTG8a, BiP, IGF1R, Unr [23], HIF-1α [67]
PCBP1/2	c-myc
hnRNPK	c-myc
La	BiP, XIAP
Unr	Apaf-1, Unr [23] Kinaza PITSLRE [48]
hnRNPC1/C2	XIAP, Unr [23]
DAP5	HIAP, XIAP, Apaf-1, c-myc
eIF4GI fragment	Apaf-1, DAP5
NSAP1 [54]	BiP
Zuo1p [68]	TFIID
Ku [69]	VEGF
hnRNPA1 [70]	XIAP

kapu. Jednakże niedawne badania wewnętrznej inicjacji translacji białka Cat-1 pokazały, iż translacja uORF jest niezbędna do podwyższenia aktywności IRES mRNA tego białka podczas warunków stresowych — niedoboru aminokwasów i glukozy [33]. Na podstawie tej obserwacji przedstawiono nową koncepcję tzw. „dynamicznego IRES". Sugeruje ona, że gdy uORF nie ulega translacji, element IRES istnieje jako struktura nieaktywna. Dopiero translacja uORF umożliwia zachodzenie procesu translacji zależnego od IRES [33].

CZYNNIKI BIAŁKOWE ITAF ODDZIAŁUJĄCE Z IRES

Cząsteczki mRNA, posiadające elementy IRES do wiązania podjednostki 40S, wykorzystują niektóre kanoniczne czynniki translacyjne oraz niekanoniczne czynniki białkowe, tzw. ITAF (Rys. 1B). Rola czynników ITAF badana była do tej pory tylko w nielicznych przypadkach komórkowych mRNA ulegających wewnętrznej inicjacji translacji. Wszystkie znane ITAF są białkami wiążącymi się z RNA i pełnią one różne funkcje w komórce (Tab. 2). Czynniki te wiążą się specyficznie tylko z niektórymi komórkowymi elementami IRES [20]. Na przykład, IRES proapoptotycznego czynnika aktywującego proteazy Apaf-1 (ang. *Apoptotic protease-activating factor 1*) może tworzyć specyficzny kompleks z białkami Unr i nPTB. Kombinacja tych czynników stymuluje wewnętrzną inicjację translacji Apaf-1 [32]. Domena wiążąca Unr znajduje się po stronie 5' elementu IRES sekwencji kodującej Apaf-1. Związanie do niej Unr powoduje rozplecenie struktury dwuniciowej RNA, w wyniku czego powstaje duża pętla, która stabilizowana jest przez ten czynnik białkowy. Dodatkowo, Unr wpływa na strukturę domeny znajdującej się po stronie 3' elementu IRES, co z kolei umożliwia związanie się do niej białka nPTB. Wynikiem oddziaływania obydwu białek z IRES mRNA genu *Apaf-1* są zmiany konformacyjne tej domeny, umożliwiające wiązanie podjednostki rybosomalnej 40S [32]. Być może także inne czynniki ITAF mogą współpracować z Unr i nPTB. Niektóre z nich mogłyby specyficznie wiązać IRES, podczas gdy kolejne mogą służyć jako mostek pomiędzy kompleksem IRES-ITAF a rybosomem i w ten sposób naśladować funkcje eIF3 i kompleksu eIF4F w inicjacji translacji według mechanizmu zależnego od kapu [20].

Z podobnym do opisanego powyżej mechanizmem działania czynników ITAF, mamy do czynienia w przypadku elementu IRES mRNA kodującego Bag-1. Białka PTB oraz PCBP1, dzięki aktywności chaperonowej rozplatają specyficzny region struktury IRES, co umożliwia przyłączenie podjednostki rybosomalnej 40S [36]. Białka należące do rodziny PCBP stymulują również aktywność IRES genu c-*myc*. Dlatego też, zmiany strukturalne wywołane chaperonową działalnością czynników ITAF, takich jak PTB, Unr i PCBP1, mogą stanowić element wspólny mechanizmów aktywacji komórkowych IRES [36]. Jednakże, trzeba podkreślić, że te czynniki nie wpływają na wszystkie do tej pory odkryte elementy IRES komórkowych mRNA. Co więcej, PTB może funkcjonować jako represor wewnętrznej inicjacji translacji białka BiP co sugeruje, że chaperony RNA mogą mieć zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ na elementy IRES [28].

Istotną cechą wielu czynników ITAF jest to, że należą one do grupy heterogennych jądrowych rybonukleoprotein hnRNP typu: A1, C1/C2, I, E1/E2 i K, które przemieszczają się wahadłowo pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Sugeruje się, że poziom odpowiednich czynników ITAF w cytoplazmie jest różny podczas różnych warunków stresowych, a ich dystrybucja komórkowa lub tkankowa może znacząco zmieniać efektywność translacji zależnej od elementów IRES [20].

Ostatnio pojawiły się doniesienia, że w regulacji translacji zależnej od elementów IRES biorą udział związki niskocząsteczkowe, takie jak witamina B_{12} [37] i testosteron [38]. Ich działanie polega na oddziaływaniu ze specyficznymi czynnikami ITAF, co prowadzi do aktywacji lub przemieszczenia tych białek, przez co wiążą się one do elementów IRES, stymulując wewnętrzną inicjację translacji.

ROLA ELEMENTÓW IRES W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW NA POZIOMIE TRANSLACJI

Pomimo identyfikacji coraz większej liczby komórkowych mRNA zawierających elementy IRES, ich rola w regulacji ekspresji genów jest nadal słabo poznana. Sądzi się, że komórkowe elementy IRES, podobnie jak i wirusowe, uczestniczą w procesie translacji mRNA w warunkach, w których synteza białek zależna od kapu jest mało efektywna. Ma to miejsce np. podczas przejścia z fazy G2 do fazy mitozy w cyklu komórkowym oraz podczas apoptozy [20]. W takich warunkach, aktywność czynnika inicjacyjnego eIF4E, wiążącego się z kapem jest obniżona, wskutek zmian w jego ufosforylowaniu lub tworzenia kompleksu z białkami 4E-BP, które uniemożliwiają mu oddziaływanie ze strukturą kapu [39]. Większość warunków stresowych, jak np. niedobór czynników wzrostu, głód, szok cieplny, promieniowanie UV, hypoksja, stres endoplazmatyczny oraz zakażenie wirusowe, prowadzi również do zaburzenia aktyw-

http://rcin.org.pl

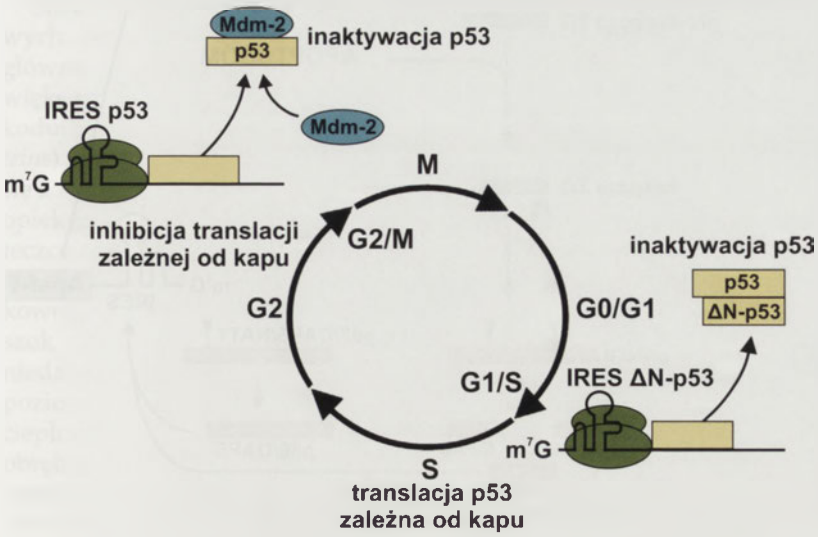
ności czynnika inicjacyjnego eIF2 poprzez fosforylację jego podjednostki α [20]. Ufosforylowany eIF2 ma zwiększoną zdolność wiązania się do czynnika inicjacyjnego eIF2B, który prowadzi wymianę eIF2-GDP na eIF2-GTP. Fosforylacja eIF2α powoduje tworzenie trwałego kompleksu eIF2-GDP z eIF2B, co silnie redukuje zdolność wymiany nukleotydów guaninowych przez eIF2B. Tym samym, redukcja poziomu eIF2-GTP prowadzi do silnego zahamowania procesu syntezy białek zależnego od kapu [40]. Jednakże, istnieje grupa komórkowych mRNA zawierających elementy IRES, które ulegają wydajnej translacji w takich warunkach. Są to m.in. *VEGF*, onkogen c-*myc*, kinaza^{PITSLRE}. Oznacza to, że różne komórkowe mRNA mają różne wymagania odnośnie do poziomu aktywnego kompleksu eIF2-GTP-Met-tRNA$_i$. Choć wykazano, że translacja zależna od IRES jest dużo mniej wrażliwa na redukcję poziomu eIF2-GTP niż proces zależny od kapu, nadal nie jest jasne dlaczego tak się dzieje [20]. Interesujące jest natomiast to, że element IRES znaleziony w mRNA białka Cat-1 wymaga fosforylacji podjednostki α podczas translacji indukowanej w warunkach stresowych [33].

Odkąd zauważono, że wiele komórkowych elementów IRES jest aktywnych w komórkach zakażonych wirusem polio, sądzono, że mają one zredukowane wymagania co do obecności czynnika eIF4G, który jest wówczas cięty przez wirusową proteazę. Rzeczywiście, niedawno doniesiono, że na inicjację translacji, zachodzącą za pośrednictwem IRES mRNA kodujących c-Myc i BiP, nie wpływa proteolityczne cięcie eIF4G, a nawet jest ona stymulowana w tych warunkach [41]. Zahamowanie syntezy większości białek podczas apoptozy ma natomiast miejsce w wyniku cięcia przez kaspazy czynników inicjacyjnych: eIF4G, eIF4B (stymuluje helikazową aktywność eIF4A), a także zmian w ufosforylowaniu eIF2α [40]. Jednakże, istnieją silne przesłanki wskazujące na to, że translacja mRNA kodujących c-Myc, DAP5, XIAP, HIAP2, białko Reaper, Hsp70, Bcl-2, Surwiwinę, PKCδ oraz Apaf-1 zachodzi w tych warunkach z wykorzystaniem elementów IRES [20].

CYKL KOMÓRKOWY

Kluczową rolę w kontrolowaniu cyklu komórkowego odgrywa białko p53. O znaczeniu tego białka świadczą doniesienia, że około 50% wszystkich rodzajów nowotworów u człowieka związanych jest z mutacjami w genie p53 [42]. Niedawno doniesiono, że w procesie translacji, oprócz białka o pełnej długości, powstaje jego skrócona forma, ΔN-p53, na drodze wykorzystania alternatywnego kodonu start AUG [43]. Okazało się, że skrócona forma p53 hamuje aktywność białka o pełnej długości, co ma zasadnicze znaczenie dla jego funkcji podczas kontroli cyklu komórkowego. Wykazano, że obydwie formy białka p53 powstają z wykorzystaniem tego samego elementu IRES, znajdującego się w regionie 5'UTR mRNA z tą różnicą, że IRES kontrolujący translację krótszej formy jest dłuższy i obejmuje fragment sekwencji kodującej [44].

Zaproponowano mechanizm opisujący rolę obu izoform białka p53 w regulacji cyklu komórkowego (Ryc. 3). Podczas przejścia z fazy G1 do fazy S syntetyzowana jest krótsza izoforma, ΔN-p53, w procesie zależnym od elementu IRES. ΔN-p53 wiąże się do białka o pełnej długości, hamując jego aktywność. Umożliwia to wejście komórki w fazę syntezy DNA. Podczas przejścia G2/M ma miejsce zahamowanie procesu translacji zależnego od kapu. Pomimo tego, zachodzi synteza białka p53 o pełnej długości, dzięki wykorzystaniu mechanizmu wewnętrznej inicjacji. Umożliwia to utrzymanie określonego poziomu białka p53, z którym wiąże się czynnik Mdm-2. W następstwie tego oddziaływania, białko p53 traci aktywność, co pozwala na kontrolowane przejście komórki do następnej fazy cyklu komórkowego — mitozy [44]. Zatem, wzajemny stosunek ilości każdej z izoform p53 oraz zróżnicowana aktywność elementów IRES wydają się odgrywać ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Ponadto, białko p53 o pełnej długości ma zdolność wiązania się z regionem 5' UTR swojego mRNA, hamując własną translację na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Sugeruje to, że może ono funkcjonować również jako specyficzny czynnik ITAF [45].



Rycina 3. Proponowany mechanizm regulacji translacji mRNA p53 z wykorzystaniem elementów IRES obecnych w jego regionie niekodującym 5'. Aktywność IRES dla krótszej izoformy białka ΔN-p53 jest najwyższa podczas przejścia z fazy G1 do fazy S. Wysoki poziom tej izoformy hamuje aktywność p53 o pełnej długości, dzięki czemu komórka może przejść do fazy syntezy DNA. Podczas przejścia z fazy G2 do fazy mitozy czynnik Mdm2 inaktywuje białko p53 pełnej długości, powstające również na drodze translacji zależnej od elementu IRES, co umożliwia indukcję podziału komórkowego zależną od tego czynnika białkowego.

Dekarboksylaza ornitynowa, ODC (ang. *Ornithine Decarboxylase*), jest kluczowym enzymem w biosyntezie poliamin. Podczas cyklu komórkowego poziom tego enzymu dwukrotnie wzrasta. Pierwszy wzrost ilości ODC obserwuje się na granicy faz G1/S, natomiast drugi, podczas przejścia G2/M. Wzrost syntezy ODC na granicy G1/S zbiega się ze wzrostem efektywności syntezy białek niezbędnych do wejścia komórki w fazę S. Z drugiej strony, pomimo silnego hamowania translacji, która ma miejsce, gdy komórka wchodzi w etap mitozy, synteza ODC zachodzi na wysokim poziomie. Wyniki te potwierdziły przypuszczenie, że dekarboksylaza ornitynowa ulega translacji w sposób niezależny od kapu, dzięki obecności

http://rcin.org.pl

elementu IRES w 5'UTR mRNA podczas przejścia z fazy G2 do fazy mitozy [46].

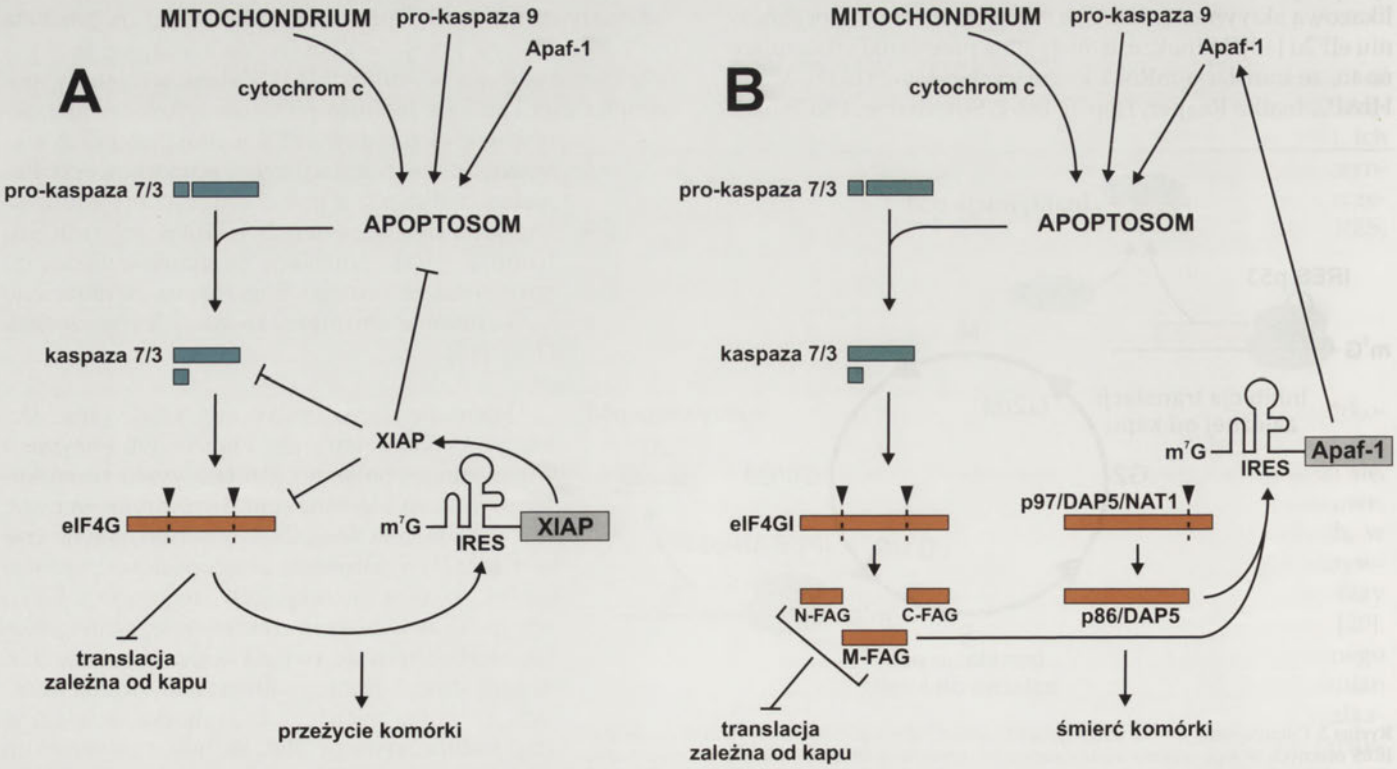
Regulacja aktywności elementu IRES cząsteczki mRNA kodującej enzym ODC zachodzi w wyniku kontroli translacyjnej zależnej od etapu cyklu komórkowego. Kontrola ta jest negatywna podczas przejścia G1/S (umożliwiając wówczas syntezę ODC tylko w sposób zależny od kapu), natomiast jest pozytywna, gdy komórka wchodzi w etap mitozy (synteza ODC w sposób zależny od IRES) [46]. Ostatnio odkryto dwa czynniki ITAF, które oddziałują z elementem IRES ODC [47]. Być może w zależności od etapu cyklu komórkowego umożliwiają one translację dekarboksylazy w sposób niezależny od kapu.

W fazie G2/M funkcjonują także elementy IRES innych mRNA związanych z regulacją cyklu komórkowego. Zarówno kinaza $p110^{PITSLRE}$, jak i $p58^{PITSLRE}$ ulegają translacji z jednego mRNA, lecz poziom syntezy kinazy $p58^{PITSLRE}$ wzrasta znacznie w komórkach zatrzymanych w fazie G2/M [48]. Jak wykazano, element IRES obecny jest tuż powyżej kodonu start AUG w mRNA *p58*^{PITSLRE}. Również IRES c-*myc* funkcjonuje we wszystkich fazach cyklu komórkowego, włączając fazę G2/M, w której regulacja jego translacji niezależnej od kapu jest pod kontrolą białka hnRNPC [49]. Zatem, elementy IRES mogą stymulować inicjację translacji podczas fazy G2/M cyklu komórkowego, gdy zależna od kapu synteza białek jest zahamowana, zapewniając odpowiedni poziom białek niezbędnych do przeprowadzenia mitozy.

APOPTOZA

Podczas apoptozy dochodzi do znacznego zahamowania poziomu syntezy białek w komórce. Efekt ten wydaje się harmonizować z cięciem i/lub modyfikacją szeregu eukariotycznych czynników inicjacyjnych. Doniesienia z różnych laboratoriów wskazują, że czynniki inicjacyjne, takie jak: eIF4G, eIF4B i 4E-BP1, ulegają cięciu przez kaspazy podczas wczesnych etapów apoptozy. W takich warunkach obserwuje się również zmiany w fosforylacji czynników eIF2α, 4E-BP1, a także silną degradację mRNA [19]. Te zdarzenia doprowadzają w rezultacie do zahamowania translacji. Okazuje się jednak, że nie dotyczy to wszystkich białek. Przykładem są antagonistycznie działające czynniki XIAP oraz Apaf-1 (Ryc. 4). Zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowe sygnały indukujące proces apoptozy doprowadzają do uwolnienia cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy, gdzie wiąże się z białkiem Apaf-1. Powoduje to oligomeryzację Apaf-1 i utworzenie kompleksu apoptosomu, który aktywuje prokaspazę 9, kluczowy element kaskady sygnalnej podczas apoptozy. Z drugiej strony, czynnik XIAP oraz inni członkowie rodziny białek IAP (ang. *Inhibitors of Apoptosis*) są potencjalnymi inhibitorami tego procesu, ponieważ wiążą się do różnych kaspaz, blokując ich działanie.

Wykazano, że mRNA kodujący białko XIAP ulega translacji w warunkach apoptozy, dzięki obecności elementu IRES [50]. Poziom czynnika XIAP nie ulega obniżeniu i jeśli komórka znajduje się w warunkach proapoptotycznych



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie udziału białek XIAP i Apaf-1 w regulacji translacji podczas apoptozy. A – czynniki proapoptotyczne indukują zależną od IRES translację XIAP, który wiążąc się do kaspaz blokuje ich działanie. Umożliwia to komórce przetrwanie warunków dla niej niekorzystnych. B – warunki proapoptotyczne prowadzą również do aktywacji elementu IRES, tym razem w mRNA białka Apaf-1. Prowadzi to do indukcji apoptozy wskutek tworzenia się apoptosomu, aktywującego kaspazy. Szczegółowy opis w tekście.

http://rcin.org.pl

krótko, to poprzez blokowanie kaspaz możliwe jest zahamowanie jej śmierci i powrót do stanu wyjściowego [51] (Ryc. 4).

Element IRES w mRNA czynnika XIAP powoduje, że translacja tego białka jest niezależna od obecności eIF4G. Dlaczego zatem, jeśli translacja XIAP jest odporna na cięcie czynnika eIF4G komórka przeważnie umiera? Prawdopodobnie jest to wynikiem antagonistycznego działania proapoptotycznego czynnika Apaf-1 [51]. Zapewnienie stałego poziomu Apaf-1 podczas apoptozy jest niezbędne do aktywacji kaspaz i zachodzi dzięki jego translacji zależnej od IRES [52]. Tak więc mechanizm, który zapewnia stałą translację XIAP podczas apoptozy, pozwala również kontynuować syntezę Apaf-1, który indukuje śmierć komórki (Ryc. 4). Zarówno pro-, jak i antyapoptotyczne czynniki białkowe używają prawdopodobnie tego samego lub bardzo podobnego mechanizmu kontroli translacyjnej. Ostateczny rezultat ich antagonistycznego działania może zależeć od wielu zmiennych, takich jak: typ i intensywność działania stresu, droga sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a także od wydajności, stabilności i poziomu translacji danego mRNA [51].

Proces translacji mRNA posiadającego kap wymaga obecności czynnika inicjacyjnego eIF4G, podczas gdy translacja cząsteczek mRNA zawierających elementy IRES jest kontynuowana nawet wtedy, gdy czynnik ten jest nieobecny. Ponadto, produkty indukowanego przez kaspazy cięcia izoformy czynnika eIF4G, eIF4GI oraz, należącego do tej samej rodziny, białka p97/DAP5/NAT1 stymulują apoptozę poprzez aktywację niezależnej od kapu translacji białka Apaf-1 (Ryc. 4). Proteolityczne cięcie eIF4G oraz innych czynników białkowych wydaje się mieć zatem kluczowe znaczenie dla przełączenia translacji podczas apoptozy z procesu zależnego od kapu, na zależny od elementów IRES [51].

WARUNKI STRESOWE

Szok cieplny jest jednym z głównych czynników stresowych. W wyniku jego działania w komórce zachodzą dwa główne zdarzenia. Pierwszym, jest zahamowanie syntezy większości białek. Drugim, specyficzna translacja mRNA kodujących białka szoku cieplnego Hsp (ang. *Heat Shock Proteins*) [53]. Jednym z takich białek jest BiP, czynnik wiążący się z łańcuchem ciężkim immunoglobulin. BiP jest białkiem opiekuńczym, które ułatwia fałdowanie innych białek w siateczce śródplazmatycznej oraz bierze udział w kierowaniu źle sfałdowanych z powrotem do tego przedziału komórkowego. Chociaż regulacja syntezy BiP indukowana przez szok cieplny zachodzi głównie na poziomie transkrypcji, niedawno odkryto, że dodatkowo wzmocniona jest ona na poziomie translacji. Indukcja translacji BiP podczas szoku cieplnego możliwa jest dzięki obecności struktury IRES w obrębie 5'UTR jego mRNA. Sugeruje się, że ten mechanizm translacji może mieć krytyczne znaczenie dla przetrwania komórek [53].

Nie jest jasne, w jaki sposób szok cieplny wzmacnia wewnętrzną inicjację. Możliwe jest, że jej stymulacja zachodzi przez oddziaływania między czynnikami ITAF i elementami struktury IRES. Przypuszczenie to potwierdziło niedawne odkrycie, że białko NSPA1 funkcjonuje jako ITAF, stymulując translację BiP zależną od elementu IRES [54]. Dodatkowo, białka szoku cieplnego mogą wpływać na własną syntezę również zależną od elementów IRES. Białka Hsp70 i Hsp110 wiążą się do motywów mRNA zaangażowanych w jego stabilizację. Sugeruje to, że pewne Hsp mogą funkcjonować jako czynniki oddziałujące z RNA *in vivo*, umożliwiając odpowiednie fałdowanie substratów, co jest niezbędne dla procesów regulacyjnych, takich jak degradacja mRNA lub translacja [55].

Niedobór aminokwasów w komórkach ssaków powoduje wzrost fosforylacji czynnika eIF2α, co jednocześnie przyczynia się do globalnego obniżenia poziomu syntezy białek [33]. Znaczącym elementem odpowiedzi komórki na warunki niedoboru aminokwasów jest wzrost ekspresji genu *cat-1*, który koduje błonowy transporter aminokwasów o ładunku dodatnim (lizyny i argininy) [56]. Synteza białka Cat-1 jest w tych warunkach stymulowana dzięki obecności struktury typu IRES w obrębie 5'UTR jego mRNA. Zaproponowano schemat regulacji aktywności tego elementu IRES zakładający, że w pierwszym etapie zachodzi translacja uORF znajdującej się wewnątrz 5'UTR *cat-1*. To powoduje zmianę konformacyjną, dzięki której element IRES przyjmuje formę aktywną. W drugim etapie następuje indukcja jego aktywności translacyjnej, która zależna jest od fosforylacji czynnika eIF2α. Czas, jaki upływa od fosforylacji eIF2α do wzrostu aktywności translacji Cat-1 pozwala przypuszczać, że w tym okresie syntetyzowany jest, niezbędny do inicjacji translacji, hipotetyczny czynnik ITAF [33].

PROCES NOWOTWORZENIA

Zidentyfikowano grupę onkogenów, które ulegają wewnętrznej inicjacji translacji, jak na przykład członkowie rodziny genów *myc*, antyapoptotyczne białko Bag-1 i czynniki wzrostu, np. VEGF, FGF-2 [57]. Szereg elementów IRES może funkcjonować w warunkach stresowych, szczególnie podczas rozwoju nowotworu, gdy w warunkach hypoksji zachodzi zależna od IRES translacja czynników angiogenezy naczyń krwionośnych, takich jak: FGF2 i VEGF, kiedy zahamowana jest zależna od kapu synteza białek. Podczas rozwoju guza nowotworowego pojawiają się w pewnym momencie warunki hypoksji. Nadprodukcja VEGF i FGF-2 w wyniku translacji zależnej od IRES może prowadzić do unaczynnienia nowotworu. Doniesiono również, że mRNA czynnika transkrypcyjnego *HIF-1* indukowanego hypoksją, zawiera element IRES, który funkcjonuje w warunkach obniżonego poziomu tlenu w komórce. Proces translacji mRNA *HIF-1*, zachodzący dzięki wewnętrznej inicjacji, pozwala na akumulację tego czynnika, przez co aktywuje i stymuluje transkrypcję *VEGF* [57].

Zaburzony przebieg translacji mRNA na drodze zależnej od IRES może harmonizować z patogenezą chorób człowieka, takich jak choroba Charcot-Marie-Tooth — CMTX (ang. *X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy*) oraz szpiczak plazmocytowy [58].

Chociaż wiele mutacji u pacjentów z CMTX zostało znalezionych w regionie kodującym mRNA koneksyny 32, zidentyfikowano również pojedynczą tranzycję C→U w jego

http://rcin.org.pl

5'UTR, prowadzącą do bardzo silnego hamowania translacji mRNA tego białka. Późniejsze badania wykazały, że w regionie tym znajduje się struktura IRES, dzięki czemu translacja koneksyny 32 zachodzi w sposób niezależny od kapu. W wyniku badań prowadzonych na myszach transgenicznych wykazano, że zamiana C→U prowadzi do zahamowania genu reporterowego znajdującego się poniżej zmutowanej struktury IRES [59].

Szpiczak plazmocytowy jest kolejną chorobą, w etiologii której mają miejsce zaburzenia prawidłowej funkcji elementów IRES. U chorych zidentyfikowano specyficzną mutację w genie *c-myc*, polegającą na tranzycji C→U w regionie sekwencji IRES jego mRNA [28,57]. Mutację tę znaleziono w 42% przypadków spośród 19 osób z tą chorobą, przy czym u 21 kontrolnych, zdrowych osobników nie stwierdzono takiej zmiany. Konsekwencją mutacji jest 10–25-krotny wzrost syntezy c-Myc w komórkach szpiczaka plazmocytowego, bez jednoczesnego wzrostu ilości powstających transkryptów mRNA i bez zmian w okresie półtrwania tego białka. Dalsze badania wykazały, że zmutowany IRES jest sześciokrotnie bardziej aktywny w procesie translacji niż jego odpowiednik typu dzikiego. Badania struktury drugorzędowej elementu IRES wykazały, że tranzycja C→U występuje w strukturalnie słabo uporządkowanym regionie [28,57]. Jednakże, w regionie tym znajduje się motyw strukturalny typu trzonu i pętli, w której dochodzi do zmutowania pojedynczego nukleotydu. Powoduje to wzrost stabilności tego elementu strukturalnego, czego konsekwencją jest zwiększona możliwość wiązania grupy białek, z których część okazała się być członkami rodziny PCBP [28].

PODSUMOWANIE

Odkrycie grupy wirusów RNA o polarności dodatniej, nie posiadających struktury kapu na końcu 5', a pomimo tego ulegających efektywnej translacji w komórkach eukariotycznych wskazało, że komórki te mogą prowadzić translację w sposób alternatywny, wykorzystując elementy IRES znajdujące się w wirusowych RNA [5-7]. Niedawno zaproponowano precyzyjny mechanizm działania elementów IRES HCV [6] oraz CrPV [60], na podstawie wyników przeprowadzonych badań strukturalnych tych elementów oraz wizualizacji tworzonych kompleksów z podjednostką rybosomalną 40S metodą mikroskopii krioelektronowej.

Hipoteza, że podobnie jak wirusowe RNA, niektóre mRNA w komórkach eukariotycznych mogą ulegać translacji na drodze niezależnej od obecności kapu na ich końcach 5', sformułowana została ponad 15 lat temu [8]. W ostatnich latach liczba takich mRNA oraz postulowanych komórkowych elementów IRES wzrosła do kilkudziesięciu (Tab. 1). Jednak w opinii niektórych badaczy jest jeszcze zbyt wcześnie, aby hipotezę tę uznać za w pełni potwierdzoną [21,22]. Pojawiające się wątpliwości dotyczą przede wszystkim interpretacji doświadczeń, w których do wykazania, że badana sekwencja zdolna jest inicjować translację w sposób niezależny od kapu, wykorzystano wektory bicistronowe. Ze względu na to, że wszystkie komórkowe mRNA mają charakter monocistronowy, translacja mRNA, które posiadają elementy IRES musi zachodzić na drodze kompromisu między procesem kap-zależnym i kap-niezależnym. W związku z tym, stosowane w badaniach układy modelowe powinny w większym stopniu odzwierciedlać sytuację, w której elementy IRES działają *in vivo*. Zaplanowanie takich doświadczeń napotyka jednak na szereg trudności. Między innymi, wiążą się one z faktem, że dla efektywnego działania elementów IRES niezbędne są czynniki białkowe ITAF, które zastępują niektóre kanoniczne czynniki translacyjne (Tab. 2). Ich dostępność wydaje się być zróżnicowana nie tylko w zależności od rodzaju komórki, ale nawet od jej stanu fizjologicznego. Z jednej strony ma to zasadnicze znaczenie dla postulowanej roli funkcjonalnej elementów IRES, z drugiej natomiast, znacznie utrudnia planowanie doświadczeń i interpretację otrzymywanych wyników.

Cząsteczki mRNA, zawierające elementy IRES, posiadają kluczowe znaczenie dla funkcjonowania komórki, gdyż kodowane przez nie białka uczestniczą w takich procesach, jak: różnicowanie, cykl komórkowy, apoptoza, czy też odpowiedź komórki na warunki stresowe [20,24]. Skoro poziom translacji komórkowych mRNA na drodze procesu niezależnego od kapu zależy w istotnym stopniu od warunków w jakich przebiega, to dalsze badania elementów IRES wymagać będą bardzo uważnej interpretacji doświadczeń prowadzonych *in vitro* z wykorzystaniem układów modelowych. Niedawno opisano wyniki pierwszych badań funkcjonalnych komórkowych IRES, które przeprowadzone zostały *in vivo* [38,61]. Można sądzić, że jedynie badania prowadzone na tym poziomie będą mogły w pełni potwierdzić fascynującą rolę biologiczną, jaką przypisuje się elementom IRES na kluczowych etapach rozwoju komórki eukariotycznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Kozak M (2005) Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. Gene 361: 13-37
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW i wsp. (2001) The sequence of the human genome. Science 291: 1304-1351
3. Jackson RJ, Standart N (2007) How do microRNAs regulate gene expression? Sci STKE 2007: re1
4. Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334: 320-325
5. Jang SK (2006) Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus. Virus Res 119: 2-15
6. Fraser CS, Doudna JA (2007) Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nat Rev Microbiol 5: 29-38
7. Dutkiewicz M, Świątkowska A, Ciesiołka J (2006) Struktura i funkcja regionów niekodujących RNA wirusa zapalenia wątroby typu C. Postepy Biochem 52: 62-71
8. Macejak DG, Sarnow P (1991) Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. Nature 353: 90-94
9. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. J Virol 66: 1476-1483
10. Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF (2001) The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. J Virol 75: 181-191
11. Bieleski L, Talbot SJ (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vCyclin open reading frame contains an internal ribosome entry site. J Virol 75: 1864-1869
12. Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. J Biol Chem 273: 18599-18604

http://rcin.org.pl

13. Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. Proc Natl Acad Sci USA 101: 16990-16995

14. Wilson JE, Powell MJ, Hoover SE, Sarnow P (2000) Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. Mol Cell Biol 20: 4990-4999

15. Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. Mol Cell Biol 18: 334-342

16. Kuyumcu-Martinez NM, Van Eden ME, Younan P, Lloyd RE (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. Mol Cell Biol 24: 1779-1790

17. Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A, Sonenberg N (1996) Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5578-5583

18. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. EMBO J 17: 5811-5821

19. Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE (2005) Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. Cell Death Differ 12: 585-591

20. Komar AA, Hatzoglou M (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. J Biol Chem 280: 23425-23428

21. Kozak M (2005) A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. Nucleic Acids Res 33: 6593-6602

22. Kozak M (2006) Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes. Gene 382: 1-11

23. Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Parthoens E, Haegman M, Beyaert R, Cornelis S (2007) A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. EMBO J 26: 158-169

24. Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006) Searching for IRES. RNA 12: 1755-1785

25. Oh SK, Scott MP, Sarnow P (1992) Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5′-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. Genes Dev 6: 1643-1653

26. Chappell SA, Edelman GM, Mauro VP (2000) A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. Proc Natl Acad Sci USA 97: 1536-1541

27. Le SY, Maizel JV Jr (1997) A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. Nucleic Acids Res 25: 362-369

28. Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. Oncogene 23: 3200-3207

29. Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE (1998) C-Myc 5′ untranslated region contains an internal ribosome entry segment. Oncogene 16: 423-428

30. Bonnal S, Schaeffer C, Creancier L, Clamens S, Moine H, Prats AC, Vagner S (2003) A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. J Biol Chem 278: 39330-39336

31. Jopling CL, Spriggs KA, Mitchell SA, Stoneley M, Willis AE (2004) L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. RNA 10: 287-298

32. Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ, Jackson RJ, Willis AE (2003) The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. Mol Cell 11: 757-771

33. Fernandez J, Yaman I, Merrick WC, Koromilas A, Wek RC, Sood R, Hensold J, Hatzoglou M (2002) Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. J Biol Chem 277: 2050-2058

34. Martineau Y, Le BC, Monbrun L, Allo V, Chiu IM, Danos O, Moine H, Prats H, Prats AC (2004) Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. Mol Cell Biol 24: 7622-7635

35. Pedersen SK, Christiansen J, Hansen TO, Larsen MR, Nielsen FC (2002) Human insulin-like growth factor II leader 2 mediates internal initiation of translation. Biochem J 363: 37-44

36. Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, Willis AE (2004) Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. Mol Cell Biol 24: 5595-5605

37. Oltean S, Banerjee R (2005) A B12-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase. J Biol Chem 280: 32662-32668

38. Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC (2006) Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. FASEB J 20: 476-478

39. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu Rev Biochem 68: 913-963

40. Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ (2000) Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. Cell Death Differ 7: 603-615

41. Thoma C, Bergamini G, Galy B, Hundsdoerfer P, Hentze MW (2004) Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. Mol Cell 15: 925-935

42. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. Science 253: 49-53

43. Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U, Oren M, Hainaut P (2002) DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. Oncogene 21: 6722-6728

44. Ray PS, Grover R, Das S (2006) Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. EMBO Rep 7: 404-410

45. Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. EMBO J 14: 4442-4449

46. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. Mol Cell 5: 607-616

47. Gerbasi VR, Link AJ (2007) The myotonic dystrophy type-2 protein ZNF9 is part of an ITAF complex that promotes cap-independent translation. Mol Cell Proteomics 6: 1049-1058

48. Tinton SA, Schepens B, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S (2005) Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. Biochem J 385: 155-163

49. Kim JH, Paek KY, Choi K, Kim TD, Hahm B, Kim KT, Jang SK (2003) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. Mol Cell Biol 23: 708-720

50. Holcik M, Yeh C, Korneluk RG, Chow T (2000) Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. Oncogene 19: 4174-4177

51. Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 318-327

52. Coldwell MJ, Mitchell SA, Stoneley M, MacFarlane M, Willis AE (2000) Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. Oncogene 19: 899-905

53. Kim YK, Jang SK (2002) Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. Biochem Biophys Res Commun 297: 224-231

http://rcin.org.pl

54. Cho S, Park SM, Kim TD, Kim JH, Kim KT, Jang SK (2007) BiP internal ribosomal entry site activity is controlled by heat-induced interaction of NSAP1. Mol Cell Biol 27: 368-383
55. Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von GA, Subjeck JR (1999) Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. J Biol Chem 274: 17318-17324
56. Hyatt SL, Aulak KS, Malandro M, Kilberg MS, Hatzoglou M (1997) Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. J Biol Chem 272: 19951-19957
57. Pickering BM, Willis AE (2005) The implications of structured 5′ untranslated regions on translation and disease. Semin Cell Dev Biol 16: 39-47
58. Hellen CU, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. Genes Dev 15: 1593-1612
59. Hudder A, Werner R (2000) Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene. J Biol Chem 275: 34586-34591
60. Hellen CU (2007) Bypassing translation initiation. Structure 15: 4-6
61. Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovoni JS, Lacazette E, Prats AC, Touriol C, Prats H (2007) Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. Circ Res 100: 305-308
62. Vazquez-Pianzola P, Hernandez G, Suter B, Rivera-Pomar R (2007) Different modes of translation for hid, grim and sickle mRNAs in Drosophila. Cell Death Differ 14: 286-295
63. Li PW, Li J, Timmerman SL, Krushel LA, Martin SL (2006) The dicistronic RNA from the mouse LINE-1 retrotransposon contains an internal ribosome entry site upstream of each ORF: implications for retrotransposition. Nucleic Acids Res 34: 853-864
64. Sharma A, Masri J, Jo OD, Bernath A, Martin J, Funk A, Gera J (2007) Protein kinase C regulates internal initiation of translation of the GATA-4 mRNA following vasopressin-induced hypertrophy of cardiac myocytes. J Biol Chem 282: 9505-9516
65. Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D (2006) Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. Science 312: 902-906
66. Xiong Z, Liu E, Yan Y, Silver RT, Yang F, Chen IH, Chen Y, Verstovsek S, Wang H, Prchal J, Yang XF (2006) An unconventional antigen translated by a novel internal ribosome entry site elicits antitumor humoral immune reactions. J Immunol 177: 4907-4916
67. Schepens B, Tinton SA, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S (2005) The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia. Nucleic Acids Res 33: 6884-6894
68. Raychaudhuri S, Fontanes V, Banerjee R, Bernavichute Y, Dasgupta A (2006) Zuotin, a DnaJ molecular chaperone, stimulates cap-independent translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun 350: 788-795
69. Silvera D, Koloteva-Levine N, Burma S, Elroy-Stein O (2006) Effect of Ku proteins on IRES-mediated translation. Biol Cell 98: 353-361
70. Lewis SM, Veyrier A, Hosszu UN, Bonnal S, Vagner S, Holcik M (2007) Subcellular Relocalization of a Trans-acting Factor Regulates XIAP IRES-dependent Translation. Mol Biol Cell 18: 1302-1311

Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode

Leszek Błaszczyk, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiołka✉

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

✉e-mail: ciesiolk@ibch.poznan.pl

Key words: translation initiation, mRNA, IRES, ITAF, ribosome

ABSTRACT

All eukaryotic mRNA molecules have a cap structure at the 5′ ends which plays a crucial role in the scanning model of their translation initiation. In an alternative way of translation, the active ribosome is formed in a cap-independent mode due to the presence of IRES, internal ribosome entry site, in the 5′ untranslated region of certain mRNAs. This region folds into a distinct secondary and tertiary structure, which binds the 40S ribosomal subunit and some protein factors, and subsequently forms the initiation complex and the translationally active 80S ribosome. This enables the synthesis of specific proteins under the conditions when cap-dependent translation is inhibited or strongly reduced. The cap-independent mode of translation initiation concerns proteins that play very important roles during cell cycle, apoptosis, response to stress stimuli and cancer development.

http://rcin.org.pl

MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów

STRESZCZENIE

MikroRNA to grupa małych, niekodujących RNA, które w postaci dojrzałej regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Wchodząc w skład kompleksu RISC, wiążą się z obszarem 3' UTR mRNA genu docelowego, implikując zahamowanie translacji lub degradację mRNA. Transkrypt pierwotny miRNA ma kilkaset nukleotydów długości, w trakcie dojrzewania przybiera charakterystyczną formę „spinki do włosów" (ang. *hairpin*), postać aktywną natomiast stanowi jednoniciowy fragment o długości 21-23 nt. Przewiduje się, że geny kodujące miRNA człowieka stanowią około 2% genomu, cząsteczki te mogą brać udział w regulacji ekspresji nawet 30% genów strukturalnych [1,2]. Praca jest próbą uporządkowania obecnego stanu wiedzy na temat biogenezy miRNA, rodzajów małych, niekodujących RNA o funkcji regulatorowej, mechanizmów modulacji ekspresji genów za ich pośrednictwem oraz roli, jaką miRNA odgrywają w procesie transformacji nowotworowej.

WPROWADZENIE

Zainteresowanie grupą niekodujących RNA (ncRNA) jest zrozumiałe nie tylko z uwagi na fakt, że stanowią one znakomitą większość (60-70%) transkryptów w komórkach człowieka [3]. Poza cząsteczkami o wcześniej udokumentowanym znaczeniu, takimi jak rRNA, tRNA, snRNA czy snoRNA, należą do niej także inne „małe" RNA, których odkrycie zmieniło dotychczasowe dogmaty, dotyczące regulacji ekspresji genów.

Zgodnie z podziałem czynnościowym małych niekodujących RNA przedstawionym przez Backofena i wsp. do grupy tej zaliczyć można: miRNA (ang. *microRNA*), endogenne siRNA (ang. *short interfering RNA*), rasiRNA (ang. *repeat-associated RNA*) oraz piRNA (ang. *PIWI-interacting RNA*) [4].

Istnienie mikroRNA opisano po raz pierwszy we wczesnych latach 90. podczas badań nad etapami rozwoju nicienia *Caenorhabditis elegans*. Stwierdzono wówczas obecność dwóch transkryptów genu *lin-4*, z których krótszy (21 nt) wykazywał komplementarność do sekwencji zlokalizowanej w obszarze 3' UTR mRNA genu *lin-14* [1,5]. *Lin-4*, którego obecność warunkuje prawidłowe przejście ze stadium larwalnego L1 do L2, okazał się być negatywnym regulatorem *lin-14* [6]. Sugerowany wówczas mechanizm atenuacji translacji w wyniku oddziaływania antysensowego RNA i mRNA został potwierdzony w roku 1998, kiedy Fire i wsp. opisali zjawisko interferencji RNA (Andrew Z. Fire, Craig C. Mello, nagroda Nobla w dziedzinie medycyny 2006). W roku 2001 trzy niezależne grupy badaczy zdefiniowały miRNA jako rodzinę powszechnie występujących, krótkich RNA, różniących się składem nukleotydowym i profilem ekspresji, które biorą udział w specyficznej (zależnej od sekwencji) potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [1].

Obecnie wiadomo, że miRNA występują u wielu gatunków tak odległych ewolucyjnie, jak rośliny, grzyby, owady czy kręgowce; są także doniesienia o ich obecności u organizmów jednokomórkowych i wirusów [7].

Dotychczas opisano ponad 470 miRNA człowieka, około 1000 przewidywanych genów „kandydatów" czeka na weryfikację doświadczalną [8]. Aktualna lista znanych miRNA *C. elegans, Drosophila, Arabidopsis*, myszy i człowieka dostępna jest na stronie http://microrna.sanger.ac.uk [2]. Ponieważ jeden rodzaj miRNA może bezpośrednio lub pośrednio wpływać na ekspresję wielu genów, mechanizm regulacji potranskrypcyjnej zależny od miRNA znajduje się w centrum uwagi naukowców w wielu ośrodkach badawczych.

Agata Filip✉

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego, Lublin

✉Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin; tel.: (081) 532 56 68, e-mail: aafilip@hotmail.com

Artykuł otrzymano 26 czerwca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 28 sierpnia 2007 r.

Słowa kluczowe: miRNA, ekspresja genów, onkogeneza

Wykaz skrótów: dsRNA (ang. *double-stranded RNA*) — dwuniciowe RNA; dsRBD (ang. *double-stranded RNA binding domain*) — domena wiążąca dwuniciowe RNA; LTR (ang. *long terminal repeats*) — długie powtórzenia końcowe; ncRNA (ang. *non-coding RNA*) — niekodujące RNA; RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) — kompleks rybonukleoproteinowy, biorący udział w wyciszaniu ekspresji genu; RITS (ang. *RNA induced transcriptional silencing complex*) — kompleks rybonukleoproteinowy, biorący udział w hamowaniu translacji; RdRP (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) — polimeraza RNA zależna od RNA; snRNA (ang. *small nuclear RNA*) — małe jądrowe RNA; snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) — małe jąderkowe RNA; UTR (ang. *untranslated region*) — obszar nieulegający translacji

http://rcin.org.pl

LOKALIZACJA GENÓW DLA miRNA

Warunkiem regulacji ekspresji na drodze interferencji RNA jest komplementarność sekwencji pomiędzy cząsteczką regulatorową i mRNA genu docelowego. miRNA rozpoznają i wiążą obszar 3′ UTR transkryptu. Zasada ta jest pomocna w poszukiwaniu genów dla miRNA, pozwala bowiem na zastosowanie porównawczych technik bioinformatycznych dla skanowania genomu [2]. Mapowanie genów dla miRNA prowadzi się także z wykorzystaniem metody analizy etykiet sekwencji ulegających ekspresji (ang. *expressed sequence tags*, EST) i metody GSS (ang. *genomic survey sequence analysis*). Nie wszystkie jednak, odnalezione w ten sposób sekwencje zostają pomyślnie zweryfikowane doświadczalnie [2].

Geny dla miRNA mogą mieć różną lokalizację, mieszczą się w intronach i/lub egzonach genów strukturalnych (25-40% miRNA człowieka) lub w obszarach międzygenowych [7,9,10]. Dla badań nad onkogenezą bardzo istotny jest fakt, iż ponad połowa genów człowieka dla miRNA mieści się w tych miejscach genomu, które szczególnie często ulegają amplifikacji, delecji bądź rearanżacji w przebiegu transformacji nowotworowej [9]. Geny kodujące miRNA mogą występować pojedynczo, często jednak tworzą policistronowe skupiska, posiadające wspólne sekwencje regulatorowe [6,10].

Sekwencje genów dla miRNA są zachowawcze filogenetycznie. Jednym z pierwszych genów dla miRNA opisanych u człowieka był *LET-7*, homologiczny do genu *let-7 C. elegans* (kolejny gen odpowiedzialny za prawidłowy rozwój osobniczy nicienia). Obecność genu homologicznego do *let-7* stwierdzono także u muszki owocowej [2,6].

BIOGENEZA miRNA

Większość genów dla miRNA jest transkrybowana przez polimerazę RNA II; opisano także kilka miRNA człowieka, których transkrypcja zachodzi przy udziale polimerazy RNA III [7]. Policistronowe geny miRNA tworzą zwykle niezależne transkryptony; transkrypcja genów zlokalizowanych wewnątrz genów strukturalnych często związana jest z ekspresją genu „gospodarza" [1]. Podobnie jak w przypadku mRNA, transkrypt pierwotny miRNA (pri-miRNA, ang. *primary miRNA*) posiada na końcu 5′ czapeczkę (cap) z 7-metyloguanozyny i ogon złożony z poli-A na końcu 3′. Pri-miRNA ma wielkość do kilku kb, w obrębie tej sekwencji znajduje się fragment 60-70 nt, przyjmujący strukturę „spinki do włosów" (dwuniciowy fragment przedzielony pętlą niesparowanych nukleotydów, Ryc. 1). W dojrzewanie pri-miRNA zaangażowane są dwa enzymy z rodziny rybonukleazy III: Drosha i Dicer [1,6].

DROSHA

Jest endonukleazą klasy II, opisaną po raz pierwszy jako enzym biorący udział w obróbce pre-rRNA [1]. Enzymy tej rodziny charakteryzuje obecność podwójnej domeny RNazy III (RIIID), domeny wiążącej dwuniciowe DNA (dsDNA) na końcu C oraz obszaru bogatego w reszty proliny (PRR) i domeny bogatej w reszty argininy i seryny (RS) na końcu N. Enzymy homologiczne do Drosha człowieka opisano u *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Mus musculus*; nie występują natomiast u drożdży *S. pombe* i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana*, co może świadczyć o odmiennym mechanizmie dojrzewania miRNA u tych gatunków.

Niezbędnym kofaktorem Drosha, wchodzącym w skład funkcjonalnego jądrowego kompleksu enzymatycznego o nazwie Mikroprocesor (~ 650 kDa), jest białko DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome Critical Region 8*), posiadające dwie domeny wiążące dwuniciowe RNA i domenę WW, mogącą łączyć się z obszarem PRR. Kofaktor ten decyduje o specyficzności endonukleazy. Odpowiednikiem u *Drosophila* DGCR8 człowieka jest białko Pasha [1,6].

Dwie domeny RIIID Drosha mogą tworzyć wewnątrzcząsteczkowy dimer (ang. *intramolecular dimer*), dzięki czemu przecinają pri-miRNA u podstawy „hairpin", pozostawiając pre-miRNA o długości ~70 nt (Ryc. 1). Wykazano, że domeny nukleazowe Drosha działają niezależnie od siebie: RIIIDa przecina część 5′, natomiast domena RIIIDb część 3′ transkryptu [1]. Powstałe pre-miRNA mają zakończenia typowe dla produktów enzymów rodziny nukleazy III: posiadają grupę fosforanową na końcu 5′ i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3′ [1,11].

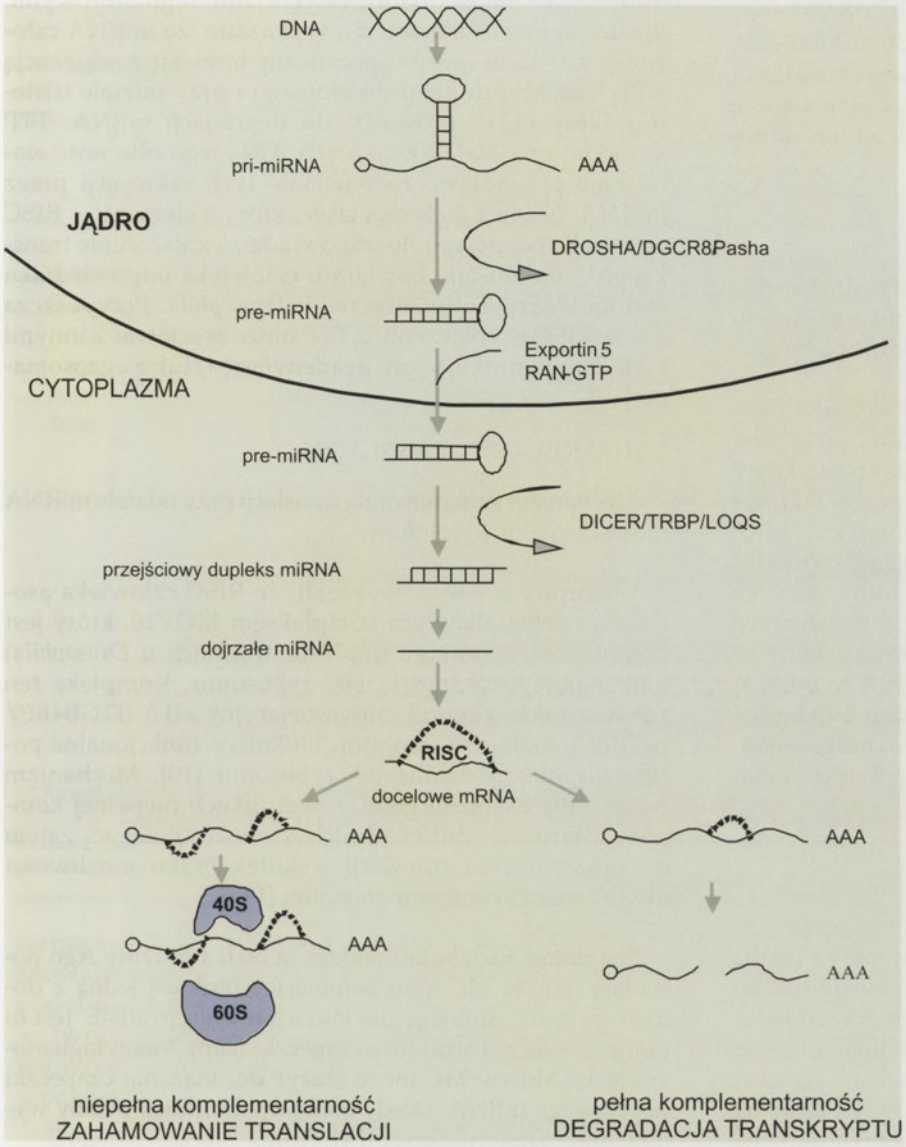
Pre-miRNA, w połączeniu z jądrowym białkiem transportowym Exportin-5, przechodzi do cytoplazmy. Exportin-5 należy do rodziny białek karioferynowych β; do związania się z pre-miRNA wymaga obecności Ran-GTP [9].

DICER

Enzym opisany po raz pierwszy jako rybonukleaza wycinająca 21-23 nt fragmenty RNA z dsRNA podczas inicjacji procesu interferencji RNA u *Drosophila*. Wykazano, że mutacje typu null genu kodującego Dicer u *C. elegans* powodują zaburzenia dojrzewania miRNA, kumulację pre-miRNA i zaburzenia rozwoju nicienia. Dicer w komórkach człowieka występuje głównie na obszarze cytoplazmy i siateczki śródplazmatycznej; jest dużym białkiem (~ 200 kDa), posiadającym kilka domen: N-końcową o aktywności ATPazy/helikazy (zawierającą boks DECH), domenę DUF283 o nieznanej funkcji, domenę PAZ (PIWI/Ago/Zwolle) oraz C-końcową RIIID, złożoną z dwóch domen katalitycznych o aktywności RNazy III i domeny dsRBD [1,6]. Zhang i wsp. wskazują na obecność jednego centrum katalitycznego w obrębie Dicer; może to świadczyć o funkcjonalnej dimeryzacji domen nukleazowych, podobnie jak ma to miejsce w przypadku Drosha [5].

Dicer jest enzymem zależnym od ATP, wykazującym silne powinowactwo do dsRNA posiadających dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3′. Za rozpoznanie tego końca dsRNA odpowiada domena PAZ [1,2,6]. Przypuszcza się, że każda z domen katalitycznych RIIID przecina łańcuch pre-miRNA z jednej strony pętli niesparowanych nukleotydów w taki sposób, że tworzy się przejściowa, dwuniciowa forma miRNA (miRNA::miRNA*, Ryc. 1). Długość powstałych łańcuchów RNA (~ 21 nt) jest zdeterminowana odległością centrum katalitycznego enzymu od domeny PAZ [1].

http://rcin.org.pl



Rycina 1. Biogeneza i mechanizmy działania miRNA.

W genomie człowieka, *C. elegans* i *S. pombe* zmapowano jeden gen dla enzymu Dicer, u *A. thaliana* opisano cztery różne geny (DCL1-4), a u *D. melanogaster* dwa (DCR-1-2) [1].

Wykazano, że obecność Dicer jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju ssaków; myszy z wyłączonym genem *DCR-1* giną w stadium embrionalnym [1]. Dicer wpływa na wiele innych procesów poza dojrzewaniem miRNA: ma znaczenie dla namnażania się komórek, różnicowania komórek macierzystych, a także utrzymania prawidłowej struktury chromatyny, segregacji chromosomów i centromerowego wyciszania ekspresji genów [12].

Podczas dojrzewania miRNA dla prawidłowej aktywności Dicer konieczna jest obecność białek towarzyszących: TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*), Ago2 (rodzina białek Argonaut), FMRP (ang. *fragile X mental retardation protein*) i PACT (ang. *protein kinase R activating enzyme*).

TRBP jest białkiem opisanym w 1991 roku jako czynnik działający synergistycznie z wirusowym białkiem Tat w transaktywacji sekwencji LTR wirusa HIV-1. Istnieją dwie izoformy TRBP: TRBP1 i TRBP2, posiadajace trzy domeny dsRBD i zasadowy koniec karboksylowy. Odpowiednikiem TRBP u *Drosophila* jest białko Loquacious (LOQS). Obecność TRBP jest niezbędna dla aktywności endonukleolitycznej Dicer, rekrutacji białka Ago2 do miejsca związania enzymu z miRNA, ma także wpływ na wyciszanie ekspresji genów za pośrednictwem siRNA [1].

Powstałe w wyniku działania Dicer dupleksy miRNA::miRNA* są nietrwałe, łańcuchy dosyć szybko ulegają rozdzieleniu. Jeden z nich (miRNA) zostaje włączony w kompleks RISC, służąc jako jego „przewodnik" do docelowego mRNA (Ryc. 1), drugi (miRNA*) ulega degradacji.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZY UDZIALE miRNA

Dojrzałe miRNA zostaje włączone w efektorowy kompleks białkowy RISC i wraz z nim może rozpoznawać mRNA genu docelowego i wpływać na poziom jego ekspresji. Istotą tego mechanizmu regulacji jest komplementarność pomiędzy miRNA a obszarem 3′ UTR transkryptu. Jeśli komplementarność ta jest całkowita, dochodzi do nukleolitycznej degradacji mRNA, co ma miejsce najczęściej w komórkach roślinnych [6]. Natomiast w przypadku niepełnej komplementarności następuje zatrzymanie procesu translacji, podczas gdy ilość transkryptu pozostaje bez zmian (Ryc. 1). W ten sposób dokonuje się zazwyczaj regulacja ekspresji genów zwierzęcych, chociaż są wyjątki. Yekta i wsp. opisali degradację transkryptu genu HOXB8 w komórkach embrionów mysich wskutek działania w pełni komplementarnego miR-196 [13].

Kluczowy dla rozpoznania transkryptu genu docelowego wydaje się być zwłaszcza koniec 5′ miRNA, a szczególnie pozycje nukleotydów 2-8 (ang. *seed pairing*). Badając linię komórkową HeLa, Lim i wsp. wykazali, że związanie tylko tego fragmentu miRNA z obszarem 3′ UTR mRNA genu docelowego wystarczy, by nie tylko atenuować translację, lecz także prowadzić do zmniejszenia ilości transkryptu [14].

Pojedyncze miRNA może być komplementarne do sekwencji 3′UTR mRNA wielu różnych genów, a transkrypt jednego genu może w obszarze 3′UTR posiadać kilka sekwencji rozpoznawanych przez miRNA [13,15].

http://rcin.org.pl

Rozpoznanie i związanie transkryptu docelowego przez kompleks RISC zachodzi najprawdopodobniej w określonych rejonach cytoplazmy, tak zwanych ciałkach P (ang. *processing bodies*) lub ciałkach GW (zawierają one między innymi wiążące RNA białko GW182 i inne, odpowiedzialne za degradację mRNA) [1].

RISC

RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) jest to duży (~ 500 kDa), złożony z wielu białek kompleks o aktywności specyficznej nukleazy. Jego budowa nie jest dokładnie poznana.

U *Drosophila* w skład kompleksu RISC wchodzi białko lub białka rodziny Argonaut, białko VIG (ang. *vasa intronic gene protein*, RBP), Tudor-SN (białko posiadające pięć domen SN o aktywności nukleazy i domenę Tudor) i dFXR, będące ortologiem białka FMRP człowieka. FMRP i FXR1 mają zdolność wiązania RNA, działają jako modulatory translacji, głównie w neuronach, co może mieć też związek z ich rolą w represji translacji indukowanej przez miRNA. „Minimalny" RISC człowieka, funkcjonalny w warunkach pełnej komplementarności miRNA/mRNA, składa się z nukleazy Dicer, białka Argonaut 2 (hAgo2/eiF2C2) i TRBP [5,16,17]. W skład kompleksu mogą wchodzić także m. in. helikazy Gemin 3 i Gemin 4 oraz białko PACT [1,15].

BIAŁKA ARGONAUT

Wśród białek Argonaut wyróżniamy dwie podrodziny: Ago i Piwi. U ssaków powszechnie występują 4 białka Ago (hAgo1-4), natomiast ekspresję 4 genów podrodziny Piwi opisano dotychczas jedynie w komórkach jąder i komórkach macierzystych układu hemopoetycznego; ich funkcja nie jest znana. Eukariotyczne białka Argonaut mają wielkość ~100 kDa i są silnie zasadowe. Posiadają one domenę PAZ (podobnie jak białka Dicer) i domenę Piwi, wspólną dla podrodzin Ago/Piwi. Domena PAZ odpowiada za specyficzne wiązanie dupleksów RNA z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3' [6].

MECHANIZMY WYCISZANIA EKSPRESJI GENÓW

DEGRADACJA TRANSKRYPTU

W przypadku pełnej komplementarności pomiędzy miRNA a transkryptem genu docelowego, związanie regionu 3' UTR tego ostatniego przez miRNA implikuje przecięcie transkryptu na dwie części i ich degradację przy udziale nukleaz komórkowych (Ryc. 2 i 3). Przecięcie mRNA w obrębie kompleksu RISC następuje pomiędzy miejscami sparowanymi z 10 i 11 nukleotydem miRNA, licząc od końca 5'; proces ten nie wymaga obecności ATP. Następnie kompleks RISC oddysocjowuje (miRNA pozostaje z nim związane) i może wiązać kolejne mRNA.

Kluczowe dla procesu niszczenia transkryptu są prawdopodobnie sekwencje ARE (ang. *AU-rich*), znajdujące się w regionie 3'UTR wielu transkryptów o krótkim okresie półrozpadu (mRNA cytokin, protoonkogenów) [16,17]. Motywy te są znanymi sekwencjami regulatorowymi, działającymi w układzie *cis*. Wykazano, że miRNA człowieka mir-16 w sposób specyficzny łączy się z sekwencją ARE transkryptu genu docelowego i przy udziale tristetraproliny (TTP) prowadzi do degradacji mRNA. TTP jest jednym z białek wiążących ARE, jego obecność warunkuje prawidłowe rozpoznanie tych sekwencji przez miRNA. Nie jest do końca jasne, który z elementów RISC człowieka bezpośrednio odpowiada za zniszczenie transkryptu, nie opisano bowiem u człowieka odpowiednika endonukleazy Tudor obecnej u *Drosophila*. Przypuszcza się, że RISC w połączeniu z TTP może asocjować z innymi białkami warunkującymi deadenylację i/lub z egzosomami [16].

ZAHAMOWANIE TRANSLACJI

Mechanizm zahamowania translacji przy udziale miRNA nie jest w pełni wyjaśniony.

Chenrimada i wsp. wykazali, że RISC człowieka asocjuje z wielobiałkowym kompleksem MOV10, który jest homologiem Armitage (represor translacji u *Drosophila*) i białkami podjednostki 60S rybosomu. Kompleks ten zawiera także czynnik antyasocjacyjny eIF6 (ITGB4BP/p27BBP), białkowy inhibitor, blokujący funkcjonalne połączenie obu podjednostek rybosomu [10]. Mechanizm wyciszenia ekspresji genu w warunkach niepełnej komplementarności miRNA/mRNA może polegać zatem na zahamowaniu translacji wskutek braku możliwości utworzenia czynnego monosomu [9].

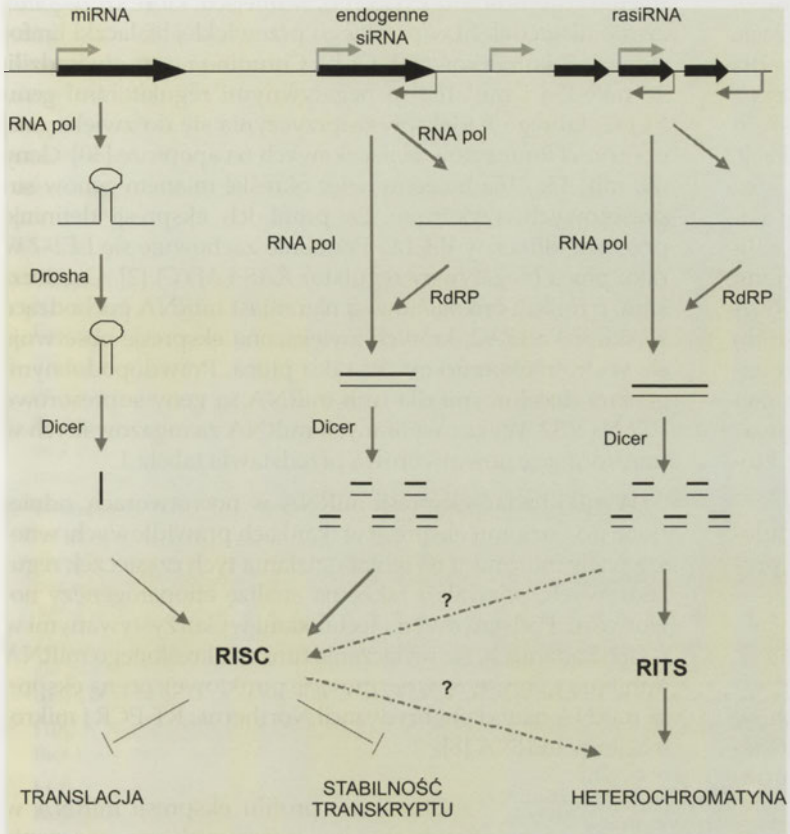
Natomiast Kiriakidou podaje, iż białka rodziny Ago posiadają motyw MC, przypominający budową jedną z domen czynnika istotnego dla inicjacji translacji, eIF4E. Jest to domena wiążąca strukturę czapeczki (cap) 7-metyloguanozynowej. Motyw MC może służyć do wiązania czapeczki docelowego mRNA, wtedy atenuacja translacji byłaby wynikiem kompetycji Ago i eIF4E [18].

INNE MAŁE RNA REGULATOROWE I KOMPLEKS RITS

Poza miRNA, funkcję negatywnych regulatorów ekspresji genów mogą pełnić inne „małe" cząsteczki RNA. Są to piRNA, endogenne siRNA oraz rasiRNA, przy czym te ostatnie, regulując strukturę chromatyny, wpływają na poziom transkrypcji genu docelowego [1,4,17,19,20] (Ryc. 2 i 3). Baza danych, zawierająca znane sekwencje genów małych niekodujących RNA człowieka, myszy i szczura (RNAdb 2.0), jest dostępna na stronie http://research.imb.uq.edu.au/RNAdb [21].

piRNA to klasa niedawno opisanych cząsteczek RNA o długości 26-31 nt, których obecność stwierdzono w komórkach jąder myszy, szczura i człowieka [4,20]. Ich nazwa odzwierciedla związek z białkami PIWI. Większość genów dla piRNA mieści się w obszarach genomu uważanych dotychczas za nieaktywne transkrypcyjnie [20]. Podobnie jak miRNA, piRNA są transkrybowane w postaci długich transkryptów, które dojrzewają przy udziale nukleaz z rodziny RNazy III. Nie zaobserwowano natomiast, by w trakcie dojrzewania przyjmowały

http://rcin.org.pl



Rycina 2. Dojrzewanie i funkcje niektórych ncRNA. Za Sontheimer i Carthew [17], modyfikacja. Linia przerywana - prawdopodobny mechanizm działania.

formę spinki do włosów bądź posiadały jakąkolwiek zachowaną ewolucyjnie strukturę drugorzędową. Prawdopodobną funkcją piRNA jest represja translacji i udział w tworzeniu par przez chromosomy homologiczne, a tkankowo-specyficzna ekspresja wskazuje na ich rolę w procesie spermatogenezy [4,20].

Dojrzałe cząsteczki **siRNA** są nieco większe niż miRNA (23-27 nt). Początkowo sądzono, iż mogą być one wyłącznie pochodzenia egzogennego (np. jako wynik zakażenia wirusowego). Okazało się jednak, że siRNA mogą także powstawać w komórkach roślin, grzybów i zwierząt. Cząsteczki te różnią się od miRNA tym, że ich prekursory nie przyjmują formy „spinki do włosów". Niedojrzała postać dwuniciowa może być efektem dwukierunkowej transkrypcji locus chromosomowego lub transkrypcji jednokierunkowej i dobudowania drugiego łańcucha przez RNA polimerazę zależną od RNA (RdRP). Dalszy etap dojrzewania przebiega z udziałem Dicer [17] (Ryc. 2).

Główna klasa siRNA (**rasiRNA**) jest kodowana przez sekwencje powtarzające się, często przypominające transpozony, zlokalizowane w heterochromatynowych obszarach centromerowych i telomerowych. Taka lokalizacja wiąże się z funkcją rasiRNA, którą jest formowanie i utrzymywanie odpowiedniej struktury chromatyny [17]. Stwierdzono, że stabilizacja heterochromatyny okolic centromerowych u drożdży wymaga obecności Dicer i białek Argonaut, co potwierdza udział mechanizmów interferencji RNA w tym procesie [17].

MECHANIZM REGULACJI STRUKTURY CHROMATYNY

Badając komórki drożdży *S. pombe*, Volpe i wsp. wykazali, że dsRNA kodowane przez powtórzenia centromerowe regulują powstawanie i funkcję centromerów [10]. W następstwie interferencji RNA dochodzi bowiem do metylacji lizyny 9 histonu H3 [1,17]. Białkowym kompleksem efektorowym, analogicznym do RISC, jest w tym układzie RITS (ang. *RNA induced transcriptional silencing complex*). W skład RITS, poza siRNA (powstałymi przy udziale Dicer) , wchodzą białka Ago1, Chp1 i Tas3 [22]. siRNA, homologiczne do powtórzeń centromerowych, „naprowadzają" kompleks na regiony heterochromatyny (centromery, telomery) i wiążą się z nimi. Oddziaływanie to sprawia, iż kompleks RITS promuje, katalizowaną przez metylotransferazę Clr4, metylację histonu H3 K9, co powoduje powstanie miejsca wiązania białka heterochromatyny Swi6. Związanie Swi6 „przyciąga" kolejne cząsteczki Clr4, co implikuje metylację sąsiednich nukleosomów [5,17].

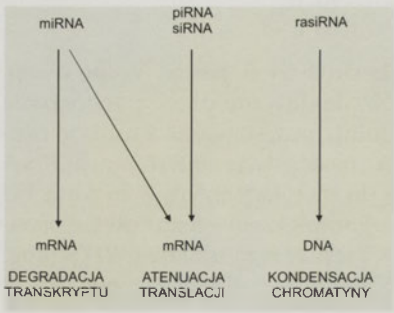
Podobny mechanizm kondensacji chromatyny opisano ostatnio u wyższych kręgowców [1,23,24]. Kawasaki i wsp. stwierdzili, że wprowadzenie syntetycznego siRNA, komplementarnego do wysp CG promotora genu dla E-kadheryny w komórkach linii MCF7 człowieka, prowadzi do metylacji DNA i histonu H3, co hamuje ekspresję tego genu na poziomie transkrypcji [23]. Schemat mechanizmów regulacji ekspresji genów zależnej od „małych" cząsteczek RNA przedstawia rycina 3.

BIOLOGICZNA ROLA miRNA

miRNA biorą udział w interferencji RNA i potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów co sprawia, że odgrywają ważną rolę w procesach kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Opisane przez Ambrosa i Ruvkuna badania wykazały wpływ miRNA na regulację genów heterochronicznych nicienia *C. elegans* (są to geny odpowiedzialne za prawidłową sekwencję zdarzeń podczas poembrionalnego rozwoju osobniczego), następne grupy badaczy udowodniły znaczenie miRNA dla rozwoju i dojrzewania innych gatunków zwierząt [1,19]. miRNA uczestniczą w różnicowaniu komórek macierzystych, utrzymywaniu określonego profilu ekspresji genów poszczególnych tkanek, kontroli namnażania się i programowanej śmierci komórki [25,26]. Mogą wpływać na proces przekazywania sygnału, a także stanowić część mechanizmu obrony organizmu przed wirusami. Szczegółowe informacje na ten temat są dostępne w literaturze [3,6,11,22].

Tak powszechne zaangażowanie miRNA w różnorodne procesy biologiczne ma istotne znaczenie dla onkogenezy, co sprawia, że cząsteczki te stanową przedmiot intensywnych badań w wielu laboratoriach. miRNA wydają się bowiem być znakomitym czynnikiem diagnostycznym, prognostycznym i celem terapii [8,27]. Wpływając na ekspresję genów strukturalnych, mogą pośrednio pełnić funkcję zarówno onkogenów (ang. *oncomirs*), jak i genów supresorowych

http://rcin.org.pl



Rycina 3. Poziom regulacji ekspresji genów przy udziale małych ncRNA.

[1,2,6]. Jak już wspomniano, lokalizacja genomowa genów dla miRNA jest zbieżna z miejscami częstych delecji, amplifikacji, przeniesień czy też insercji sekwencji wirusowych [28]. Analiza struktury regionu 5′ genów dla miRNA wykazała, że poziom ich ekspresji może zależeć od stopnia metylacji wysp CG [29]. Ta właściwość także może rzutować na udział miRNA w etiopatogenezie nowotworów, w których często obserwuje się zaburzenia metylacji genów.

Z uwagi na fakt, iż jeden rodzaj miRNA może modulować ekspresję wielu genów, udziału tych cząsteczek w procesie onkogenezy nie da się przecenić [14,27].

miRNA I ONKOGENEZA

Klasycznym przykładem miRNA, zaangażowanych w etiopatogenezę nowotworzenia, są miR-15 i miR-16 człowieka. Geny dla tych miRNA zlokalizowane są na długim ramieniu chromosomu 13 (13q14), w miejscu, które szczególnie często ulega delecji w przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej (B-CLL). Cimmino i wsp. stwierdzili, że miR-15a i miR-16a są negatywnymi regulatorami genu *BCL-2*, którego nadekspresja przyczynia się do zwiększonej oporności limfocytów białaczkowych na apoptozę [30]. Geny dla miR-15a/16a możemy więc określić mianem genów supresorowych; wykazano, że profil ich ekspresji definiuje przebieg kliniczny B-CLL. Podobnie zachowuje się *LET-7* w raku płuca (negatywny regulator *RAS* i *MYC*) [2]. Cząsteczkami o funkcji onkogenów są natomiast miRNA pochodzące ze skupiska 17-92, których zwiększoną ekspresję obserwuje się w drobnokomórkowym raku płuca. Prawdopodobnymi genami docelowymi dla tych miRNA są geny supresorowe *PTEN* i *RB2*. Wykaz wybranych miRNA zaangażowanych w transformację nowotworową przedstawia tabela 1.

Wyniki badań ekspresji miRNA w nowotworach, odniesione do poziomu ekspresji w tkankach prawidłowych, wnoszą wiele informacji na temat działania tych cząsteczek regulatorowych, pozwalają także na analizę etiopatogenezy nowotworu. Podstawowymi technikami wykorzystywanymi w takich badaniach, są: wyłączenie funkcji określonego miRNA (inhibitory antysensowne, mutacje punktowe), ocena ekspresji miRNA metodą hybrydyzacji Northerna, RT-PCR i mikromacierzy miRNA [8].

Tabela 1. Zmiany ekspresji miRNA w wybranych nowotworach. Za Zhang i wsp. [2], modyfikacja.

Rodzaj nowotworu	miRNA	Poziom ekspresji*	Gen docelowy
Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL)	miR-15a miR-16a	↓	BCL-2
Rak płuca	let-7	↓	RAS MYC
	miR-17-92	↑	PTEN RB2
Rak piersi	miR-125b miR-145 miR-21 miR-155	↓	
Rak jelita grubego	miR-143 miR-145	↓	
Nowotwory mózgu	miR-221 miR-21	↑	
	miR-181a miR-181b miR-181c	↓	
Szpiczak	miR-155	↓	BIC PU.1
	miR-17-92	↑	
Rak tarczycy	miR-221 miR-222 miR-146	↑	KIT
Rak jądra	miR-372 miR-373	↑	LAST2
Rak wątroby	miR-18 miR-224	↑	
	miR-199a miR-195 miR-200a miR-125a	↓	

*w porównaniu z tkanką prawidłową

Określanie profilu ekspresji miRNA w tkankach nowotworowych ma znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. Profil ten bardziej specyficznie określa pochodzenie nowotworu niż profil ekspresji mRNA. Umożliwia to nie tylko badania nowotworów niskozróżnicowanych, w przypadku których wynik badania histopatologicznego nie jest informatywny, ale także charakterystykę nowotworów przerzutujących o nieznanym ognisku pierwotnym, które stanowią 3-5% rozpoznań w onkologii [8]. Natomiast analiza porównawcza profili ekspresji miRNA chorych z określonym rodzajem nowotworu pozwala na ustalenie prawdopodobnego przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie.

Trwają badania nad wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA i miRNA w leczeniu choroby nowotworowej. Celem terapii może być bezpośrednie oddziaływanie na protoonkogeny lub geny supresorowe (*RAS*, *TP53*, *BCR-ABL*), uwrażliwianie komórek na chemioterapię (np. atenuacja ekspresji genu oporności wielolekowej *MDR*) czy też zahamowanie migracji komórek nowotworowych, prowadzącej do powstawania odległych przerzutów [8,27].

PODSUMOWANIE

Odkrycie zjawiska interferencji RNA pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów.

http://rcin.org.pl

Badania małych regulatorowych RNA rozwijają się bardzo dynamicznie. Dotychczas poznano niewielki fragment złożonej sieci zależności rządzących ekspresją genów strukturalnych. Z uwagi na znaczenie tej wiedzy dla badań cyklu komórkowego, programowanej śmierci czy onkogenezy dalsze zainteresowanie naukowców mechanizmem regulacji zależnym od „małych", niekodujących RNA wydaje się być jak najbardziej uzasadnione.

PIŚMIENNICTWO

1. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil L-A, Plante P, Provost P (2006) MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. J Biomed Biotech 2006: 1-20
2. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol 302: 1-12
3. Berkhout B, Jeang K-T (2007) RISCy business: microRNAs, pathogenesis and viruses. J Biol Chem, w druku (opublikowany online 12 lipca, manuscript R700023200)
4. Backofen R, Bernhart SH, Flamm C, Fried C, Fritzsch G, Hackermuller J, Hertel J, Hofacker IL, Missal K, Mosig A, Prohaska SJ, Rose D, Stadler PF, Tanzer A, Washietl S, Will S (2007) RNAs everywhere: genome-wide annotation of structured RNAs. J Exp Zoolog B Mol Dev Evol 308: 1-25
5. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. Cell 118: 57-68
6. Filip A (2006) Mikro-RNA - małe cząsteczki o wielkim znaczeniu. Post Biol Kom 33: 29-41
7. Li S-C, Tang P, Lin W-C (2007) Intronic micro-RNA: discovery and biological implications. DNA Cell Biol 26: 195-207
8. Hernando E (2007) microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. Clin Transl Oncol 9: 155-160
9. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) Micro-RNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature 447: 823-828
10. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. Science 297: 1833-1837
11. Wyszko E, Szaflarski W, Barciszewski J (2003) Interferencyjny RNA - molekularny regulator ekspresji genu. Postepy Biochem 49: 2-8
12. Provost P, Silverstein RA, Dishart D, Walfridsson J, Djupedal I, Kniola B, Wright A, Samuelsson B, Radmark O, Ekwall K (2002) Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. Proc Natl Acad Sci USA 99: 16648-16653
13. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP (2004) Micro-RNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science 304: 594-596
14. Lim PL, Lau NC, Garret-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature 433: 769-773
15. Liu W, Mao S-Y, Zhu W-Y (2007) Impact of tiny miRNAs on cancers. World J Gastroenter 13: 497-502
16. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin S-C, Gram H, Han J (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. Cell 120: 623-634
17. Sontheimer EJ, Carthew RW (2005) Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. Cell 122: 9-12
18. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007) An mRNA m(7)G cap binding-like motif within Ago2 represses translation. Cell 129: 1141-51
19. Tomaru Y, Hayashizaki Y (2006) Cancer research with non-coding RNA. Cancer Sci 97: 1285-1290
20. Costa FF (2007) Non-coding RNAs: Lost in translation? Gene 386: 1-10
21. Pang KC, Stephen S, Dinger ME, Par GE, Lenhard B, Mattick JS (2007) RNAdb 2.0 - an expanded database of mammalian non-coding RNAs. Nucleic Acid Res 35, database issue: D178-182
22. Noma K, Sugiyama T, Cam H, Verdel A, Zofall M, Songtao J, Moazed D, Gerval SIS (2004) RITS acts in *cis* to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. Nature Gen 36: 1174-1180
23. Kawasaki H, Taira K (2004) Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. Nature 431: 211-217
24. Morris KV, Chan SW-L, Jacobsen SE, Looney DJ (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science 305: 1289-1292
25. Hwang HW, Mendell JT (2006) MicroRNAs in cell proliferation, cell death and tumorigenesis. Br J Cancer 94: 776-780
26. Zhang B, Pan X, Anderson PA (2006) MicroRNA: a new player in stem cells. J Cell Physiol 209: 266-269
27. Wu W, Zou G-M, Chen J (2006) Micro-RNA and cancer: current status and prospective. Int J Cancer 120: 953-960
28. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. Proc Natl Acad Sci USA 101: 2999-3004
29. Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F (2007) Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. Cell Cycle 6: 1001-1005
30. Cimmino A, Calin GA, Fabri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqueilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR16 induce apoptosis by targeting BCL-2. Proc Natl Acad Sci USA 102: 13944-13949

miRNA – new mechanisms of gene expression control.

Agata Filip

Department of Human Genetics, Medical Academy of Lublin,11 Radziwillowska St., 20-950 Lublin, Poland

e-mail: aafilip@hotmail.com

Key words: miRNA, gene expression, oncogenesis

ABSTRACT

MicroRNAs are small, non-coding RNAs that regulate gene expression on post-transcriptional level. When included in RISC complex they bind to 3' UTR of target gene implicating inhibition of translation or mRNA degradation. Primary miRNA transcripts are several hundred nucleotides long, during maturation they have typical hairpin secondary structure. Active, mature miRNA is a single-stranded molecule 21-23 nt long. Human miRNA genes may constitute even 2% of the genome. miRNA molecules influence the expression of over 30% of structural genes. Paper presents current knowledge about miRNA biogenesis, types of small non-coding RNAs that are biologically functional, mechanisms of gene expression regulation they exert and the role of miRNA in oncogenesis.

http://rcin.org.pl

Terminacja translacji u Prokaryota i Eukaryota

Jan Kutner✉

Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

✉Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel.: (022) 5921311, faks (022) 658 46 36, e-mail: janek@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 17 kwietnia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 19 czerwca 2007 r.

Słowa kluczowe: eRF1, hipoteza mimikry tRNA, kodon stop, mRF1, RF1, RF2, terminacja translacji

Stosowane skróty: RFs — czynniki terminacyjne; PTC — centrum peptydylotransferazy; mRF1 — mitochondrialny czynnik terminacji translacji; DC — centrum dekodowania

Podziękowanie: Chciałbym serdecznie podziękować prof. Magdalenie Bogucie oraz dr Joannie Towpik za krytyczne uwagi i sugestie w trakcie pisania tej pracy.

STRESZCZENIE

Terminacja translacji różni się pod wieloma względami u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. W początkowej fazie terminacji biorą udział czynniki rozpoznające kodon stop w miejscu A rybosomu, zwane czynnikami terminacyjnymi. Czynniki te są odpowiedzialne za hydrolizę wiązania peptyd — tRNA i uwolnienie nowo syntetyzowanego białka. U Eukaryota występuje tylko jeden taki czynnik — eRF1, podczas gdy u Prokaryota za proces ten odpowiedzialne są dwa czynniki — RF1 i RF2. W terminacji translacji mitochondrialnej, procesowi zbliżonemu do terminacji translacji u Prokaryota, za rozpoznawanie kodonu stop odpowiedzialny jest jeden czynnik, zwany mRF1. Badania we wszystkich tych układach ujawniły występowanie w czynnikach terminacyjnych ważnych domen biorących udział w skomplikowanym etapie terminacji translacji. Praca ta ma na celu przybliżenie nowych aspektów, dotyczących mechanizmu terminacji translacji, jak i prób wizualizowania samego procesu licznymi badaniami strukturalnymi.

WPROWADZENIE

W procesie biosyntezy białka biorą udział mRNA, tRNA, czynniki translacyjne i rybosomy. Wszystkie te makromolekuły ściśle ze sobą współdziałają. W procesie translacji wyróżnia się cztery główne etapy: inicjację, elongację, terminację oraz odnawianie (ang. *recycling*).

Sygnałem dla terminacji translacji jest pojawienie się w mRNA kodonu stop w miejscu A rybosomu. Terminacja jest przeprowadzana przez specyficzne czynniki terminacyjne, opisywane symbolem RFs (ang. *Release Factors*).

Najlepiej poznano proces terminacji translacji u bakterii. Pierwsza grupa czynników terminacyjnych odpowiada za rozpoznanie kodonu stop w mRNA. Czynniki te wiążą się do miejsca A w rybosomie oraz hydrolizują wiązanie estrowe peptyd-tRNA w miejscu P rybosomu, pozostawiając nienaładowany tRNA oraz wolny peptyd. Po odcięciu peptydu, czynnik terminacyjny pierwszej grupy jest odłączany od rybosomu pod wpływem czynnika terminacyjnego drugiej grupy, zależnego od GTP. Następnie, pod wpływem czynnika z trzeciej grupy, rybosom dysocjuje na składowe podjednostki, które są w stanie wziąć udział w nowej rundzie inicjacji translacji [1].

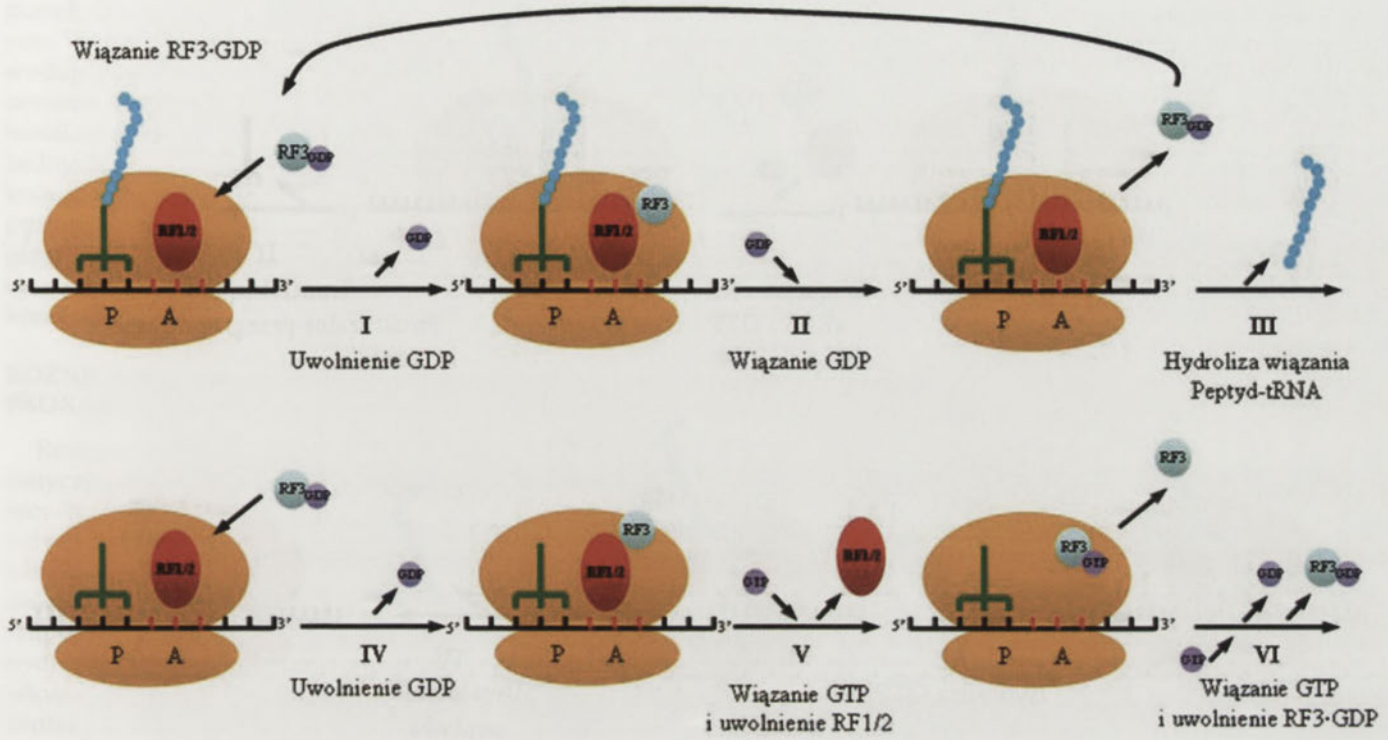
BAKTERYJNE CZYNNIKI TERMINACJI TRANSLACJI

Proces terminacji translacji został najlepiej poznany u bakterii *Escherichia coli*. Uczestniczą w nim dwa czynniki pierwszej grupy – RF1 i RF2, rozpoznające kodony stop, odpowiednio: UAA i UAG oraz UAA i UGA. Czynniki te oddziałują bezpośrednio z mRNA, hydrolizują wiązanie peptyd-tRNA, uwalniając białka z miejsca P w rybosomie. Hydroliza wiązania peptyd–tRNA przeprowadzana jest przy udziale sekwencji GGQ, zachowanej ewolucyjnie zarówno w prokariotycznych, jak i eukariotycznych czynnikach terminacji translacji pierwszej grupy. Rejon ten, poprzez wiązanie cząsteczki wody, „naśladuje" aminoacylo-tRNA i w ten sposób przyczynia się do hydrolizy wiązania estrowego [2].

Poziom czynników terminacyjnych w komórce *E. coli* wynosi dla RF1 - 500, a dla RF2 - 700 cząsteczek [3]. Nadekspresja czynników terminacyjnych jest letalna [4], a mutacje w genach kodujących RF1 (*prfA*) i RF2 (*prfB*) powodują niewłaściwe odczytanie kodonów stop, błędy w syntetyzowanym białku i temperaturowrażliwy (ts) wzrost komórek [5] (Ryc. 1).

Po rozpoznaniu kodonu stop (Ryc. 1, etap I) i uwolnieniu peptydu przez RF1 lub RF2 (Ryc. 1, etap III), czynnik RF3 powoduje dysocjację RF1 lub RF2 z miejsca A rybosomu przy udziale GTP. RF3 jest czynnikiem terminacyjnym drugiej grupy, zależnym od GTP. Czynnik ten występuje w kompleksie z GDP poza

http://rcin.org.pl



Rycina 1. Mechanizm terminacji translacji u bakterii (na podstawie [6]).

rybosomem, zaś w kompleksie z GTP wtedy, gdy jest związany z rybosomem (Ryc. 1, etap V). Po związaniu się RF3 następuje dysocjacja GDP, która stabilizuje wiązania. Stabilizacja ta trwa, aż do pojawienia się kolejnej cząsteczki GDP (Ryc. 1, etap II). RF3 w kompleksie z GDP może wiązać się do rybosomu słabymi wiązaniami, które łatwo ulegają dysocjacji (Ryc. 1, etap II). Takie niestabilne wiązanie, połączone z szybką dysocjacją, powtarza się do czasu, gdy nastąpi hydroliza wiązania peptyd-tRNA (Ryc. 1, etap III). Czynniki terminacyjne pierwszej grupy powodują wymianę GDP, związanego z RF3, na GTP (Ryc. 1, etap IV). Umożliwiają w ten sposób jego trwałe związanie do rybosomu, które prowadzi do dysocjacji RF1/2 (Ryc. 1, etap V). Następnie, GTP w RF3 jest hydrolizowane i dysocjuje w formie GDP (Ryc. 1, etap VI). Forma ta posiada niskie powinowactwo do rybosomu [6].

W dalszej części procesu podjednostka rybosomalna 50S dysocjuje od kompleksu mRNA•podjednostka 30S•tRNA pod wpływem, zależnego od GTP, czynnika elongacyjnego EF2 oraz czynnika terminacyjnego RRF, niezależnego od GTP, i bierze udział w kolejnej rundzie translacji. W końcowym etapie deacetylowane tRNA jest usuwane z miejsca P podjednostki 30S rybosomu przez czynnik inicjacyjny IF3. Brak genu kodującego RRF jest letalny dla komórki bakteryjnej, a sam proces rozpadu rybosomu na podjednostki 30S i 50S jest niezbędny do ponownego użycia rybosomu, czynników terminacyjnych oraz tRNA w kolejnym etapie biosyntezy peptydu [7].

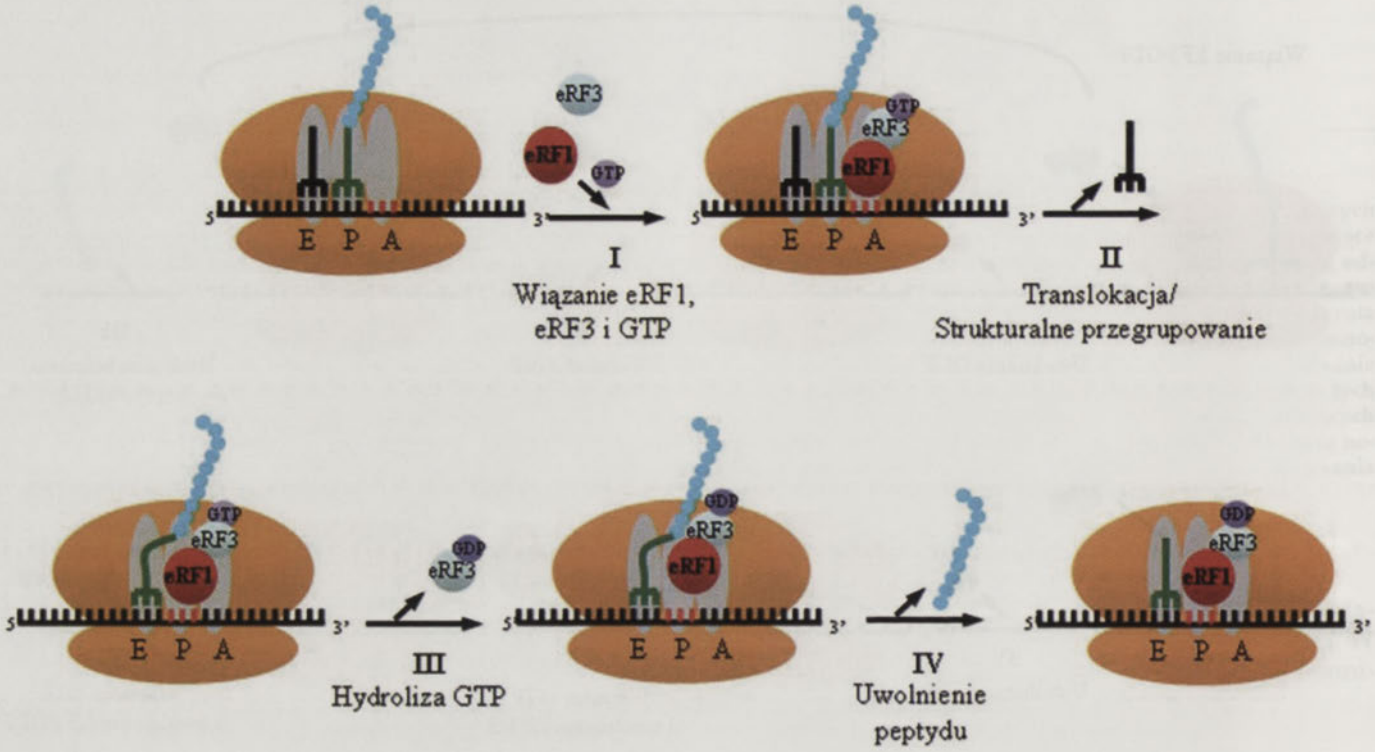
Terminacja translacji u bakterii była badana nie tylko w układach *in vivo*, ale również w układach *in vitro*. Badania w układzie *in vitro* wykazały, że przy braku białek RF3 i RRF pełny cykl translacji trwa ok. 40 sekund. Okres ten zmniejsza się do 30 sekund po dodaniu jedynie RF3 i do 15 sekund po dodaniu samego RRF. W obecności obu tych czynników okres odnowy rybosomu wynosi 6 sekund. Stwierdzono również, że aktywność katalityczna RRF zależy od czynnika elongacyjnego EF-G [8].

EUKARIOTYCZNE CZYNNIKI TERMINACJI TRANSLACJI

U Eukaryota terminacja translacji cytoplazmatycznej zachodzi z udziałem współdziałających ze sobą czynników terminacyjnych eRF1 i eRF3 (ang. *eukaryotic Release Factor*). U drożdży *S. cerevisiae* proces ten zachodzi z udziałem białek Sup35 (eRF3) i Sup45 (eRF1) [9]. Czynniki te tworzą kompleks zdolny do hydrolizy wiązania peptyd-tRNA. eRF1 jest czynnikiem pierwszej grupy, niezbędnym do życia komórki, rozpoznającym wszystkie trzy kodony stop i bezpośrednio z nimi oddziałującym [10]. eRF3 jest czynnikiem drugiej grupy, zależnym od GTP, i stymuluje aktywność eRF1 [9]. eRF3 wiąże GTP tylko w kompleksie eRF1•eRF3 [11]. Powstały kompleks eRF1•eRF3•GTP•Mg^{2+} powoduje aktywację centrum GTPazy, wiąże się do rybosomu i następnie powoduje hydrolizę wiązania peptyd-tRNA (Ryc. 2).

Zaproponowano model terminacji translacji u Eukaryota [12]. W pierwszym etapie eRF1, eRF3 i GTP wiążą się do kompleksu preterminacyjnego, składającego się z rybosomu związanego z kodonem stop w mRNA w miejscu A i peptydylo-tRNA w miejscu P (Ryc. 2, etap II). Utworzenie na rybosomie kompleksu eRF1•eRF3•GTP powoduje rearanżację kompleksu preterminacyjnego – tzn. translokację rybosomu na mRNA i związane z tym prze-

http://rcin.org.pl



Rycina 2. Model terminacji translacji u Eukaryota (na podstawie [12]).

mieszczenie kodonu stop do miejsca P, zaś peptydylo-tRNA do miejsca E (Ryc. 2, etap II). Zmiany strukturalne polegają na częściowej lub całkowitej translokacji kodonu w mRNA wobec ramienia antykodonu w peptydylo-tRNA. Odpowiednie ułożenie motywu GGQ w eRF1, w miejscu peptydylotransferazy (PTC) przegrupowującego się kompleksu, wymaga hydrolizy GTP poprzez eRF3 (Ryc. 2, etap III). eRF1 stymuluje GTPazową aktywność eRF3 [11]. Hydroliza wiązania eRF3•GTP może skutkować uwolnieniem eRF3•GDP z rybosomu lub modyfikacją ich oddziaływania z eRF1 (Ryc. 2, etap III). Pozwala to z kolei na poprawne dopasowanie motywu GGQ do PTC. W etapie IV (Ryc. 2) odpowiednio ułożony eRF1 powoduje hydrolizę peptydylo-tRNA. Kolejny etap może polegać na dysocjacji eRF1 wraz z eRF3 lub samego eRF1, jeśli eRF3•GDP został uwolniony natychmiast po hydrolizie GTP.

eRF3 posiada inne funkcje niż prokariotyczny RF3 [13]. Podczas gdy RF3 stymuluje uwalnianie czynników RF1/2 z rybosomu, eRF3, tworząc kompleks z eRF1, wpływa na szybką i wydajną hydrolizę wiązania peptyd-tRNA. U Prokaryota hydroliza wiązania peptyd-tRNA poprzedza zmianę GTP, związanego z RF3, na GDP, podczas gdy u Eukaryota hydroliza GTP i uwolnienie eRF3•GDP jest konieczne do hydrolizy wiązania peptyd-tRNA. Powodem, dla którego eRF3 ma tak rozwiniętą funkcję, może być występowanie u Eukaryota tylko jednego czynnika rozpoznającego wszystkie kodony stop eRF1 – obniżenie selektywności w rozpoznawaniu kodonów stop oraz brak w układzie eukariotycznym prokariotycznego odpowiednika RRF [12].

U Eukaryota mRNA przedstawiono jako model „zamkniętej pętli", co sugerowałoby brak uwalniania podjednostki 40S w procesie terminacji [14]. Zamiast tego podjednostka 40S mogłaby kursować w poprzek lub na ogonie poli(A) z powrotem do 5'-końca mRNA poprzez czynniki translacyjne połączone z 5' i 3'-końcem. W tym modelu proponowana jest raczej reinicjacja niż (lub dodatkowo) inicjacja. Zostało to poparte odkryciem oddziaływania pomiędzy eRF3 i PABP (ang. *Poly(A)-Binding Protein*), wzmacniającym wiązanie aparatu terminacyjnego z 3' końcem mRNA [1].

Wykazano, że kompleks tworzony przez dwa czynniki, eRF1 i eRF3, znacznie wzmacnia powinowactwo eRF3 do GTP. Sam eRF3 w komórce eukariotycznej, poza kompleksem, ma wyższe powinowactwo do GDP, podczas gdy w kompleksie z eRF1 ma wyższe powinowactwo do GTP. W analogiczny sposób EF-Tu tworzy kompleks z aminoacylowanym tRNA i GTP. Wskazuje to, iż kompleks eRF3•eRF1 powoduje wzrost powinowactwa eRF3 do GTP, a równocześnie kompleks eRF3•GTP powoduje wzrost powinowactwa eRF3 do eRF1. Sugeruje to, że eRF3 pod wpływem GTP zmienia swoją konformację tak, aby dopasować się do kompleksu z eRF1 i tworzy kompleks eRF3•GTP•eRF1. Natomiast białko PABP tworzy kompleks eRF3•GDP, a obecność GTP nie sprzyja jego tworzeniu. Dodanie PABP do mieszaniny eRF1 i eRF3 obniża powinowactwo eRF3 do GTP [14,15].

U ssaków występują dwa geny kodujące dwie różne formy białka eRF3: eRF3a (*GSPT1*) i eRF3b (*GSPT2*). Wykazują 87% podobieństwa sekwencji aminokwasowej, a największa różnica występuje w N-końcowej domenie ich cząstecz-

http://rcin.org.pl

ki. Również poziom ich ekspresji jest odmienny dla różnych tkanek. Oba wiążą się do eRF1 i powodują jego uwalnianie *in vivo*. Wykazano, że wyciszenie genu kodującego eRF3a powoduje obniżenie przeczytywania (ang. *readtrough*) kodonu nonsens w reporterowym mRNA, tzn. obniżenie wierności translacji. Wyciszenie genu kodującego eRF3b nie powoduje żadnych znaczących efektów. Ponadto, nadekspresja genu kodującego eRF3b niweluje efekt przeczytywania i spadku poziomu komórkowego eRF1, powodowany wyciszeniem genu kodującego eRF3a. Wskazuje to, że eRF3a jest głównym czynnikiem biorącym udział w terminacji translacji w komórkach ssaków [16].

RÓŻNICE W TERMINACJI TRANSLACJI: UKŁAD PROKARIOTYCZNY I EUKARIOTYCZNY

Różnice w translacji w układzie prokariotycznym i eukariotycznym wynikają już z samej budowy składników biorących w niej udział. Eukariotyczne rybosomy składają się z dwóch podjednostek 60S i 40S, podczas gdy w skład prokariotycznych rybosomów wchodzą podjednostki 50S i 30S. Eukariotyczne mRNA posiada charakterystyczną sekwencję czapeczki na 5'-końcu i niemal we wszystkich przypadkach koduje tylko jedno białko. Prokariotyczne mRNA posiada sekwencję „Shine-Dalgarno" i może służyć jako matryca do syntezy wielu białek. Różnice występują niemal na każdym etapie biosyntezy białka.

Najważniejsza z różnic, dotycząca terminacji translacji, polega na tym, że w komórkach drożdży *S. cerevisiae* eRF1 i eRF3 występują jako heterodimer, co wykazano w układach *in vivo* i *in vitro* [9,17,18]. Tymczasem u *E. coli* RF3 nie wiąże się stabilnie do RF1 lub RF2 [19].

Ponadto, u Eukaryota nie udało się zidentyfikować do tej pory homologa prokariotycznego czynnika RRF, który może brać udział w translacji cytoplazmatycznej. Natomiast u archebakterii nie udało się zidentyfikować dotychczas homologa eRF3 [1]. Wykazano, że jednoczesna nadekspresja genów kodujących eRF1 (*SUP45*) i eRF3 (*SUP35*) powoduje wzrost wydajności terminacji u drożdży *S. cervisiae* [9], podczas gdy nadekspresja pojedynczego genu kodującego RF1, RF2 lub RF3 jest wystarczająca do powstawania antysupresorowego fenotypu u *E. coli* [20].

Brak RF1 i RF2 powoduje, że czynnik RF3 jest aktywną GTP-azą w rybosomie bakteryjnym [21], podczas gdy eRF3 do aktywności GTP-azy potrzebuje obecności eRF1 [22]. Może to wiązać się z tworzeniem funkcjonalnego kompleksu eRF1 z eRF3 [9,17]. Ponadto, delecja genu *SUP35*, kodującego eRF3 u *S. cerevisiae*, jest letalna w przeciwieństwie do czynnika RF3, który nie jest niezbędny do życia komórki bakteryjnej. Nadprodukcja samego eRF1 w układzie komórek ssaków obniża efekt „readtrough", spowodowany supresorowym tRNA, tym samym wykazuje aktywność antysupresorową [23].

TRANSLACJA W MITOCHONDRIACH

W porównaniu z przedstawioną prokariotyczną i eukariotyczą terminacją translacji jeszcze mniej wiadomo o tym procesie w organellach. Jak dotąd wszystko wskazuje na to, że terminacja translacji w organellach jest bardzo podobna do translacji bakteryjnej. Mitochondria posiadają swój autonomiczny genom – mitochondrialne DNA (mtDNA) i maszynerię niezbędną do jego ekspresji. Drożdżowy mtDNA koduje osiem białek, z których siedem wchodzi w skład aparatu oddechowego, a jedno białko jest składnikiem małej podjednostki mitochondrialnego rybosomu.

Wszystkie ramki odczytu, kodujące osiem białek mitochondrialnych u drożdży, rozpoczynają się od kodonu AUG. Jednakże budowa mitochondrialnego mRNA jest bardziej złożona niż u Prokaryota i nie posiada charakterystycznej sekwencji „Shine-Dalgarno". mRNA posiada 5' niekodującą sekwencję (5'UTR), której długość waha się od 300 do 950 par zasad przed właściwym kodonem start. Wydaje się, że kodon ten nie jest jedynym sygnałem startu translacji. Podobną strukturę wykazuje mRNA w chloroplastach. Struktura ta nie występuje w mitochondrialnym mRNA u ssaków. Translacja mitochondrialna dostarcza jedynie kilka białek kodowanych przez mtDNA. Pozostałe białka niezbędne do funkcjonowania tych organelli kodowane są jądrowo, syntetyzowane w cytoplazmie i importowane do mitochondriów. Złożenie kompleksu oddechowego wymaga skoordynowanej ekspresji genów mitochondrialnych i jądrowych. Większość składników układu mitochondrialnego kodowanych jądrowo jest funkcjonalna jedynie w mitochondriach. Wykazano istnienie enzymów związanych z biosyntezą i aminoacylacją tRNA, które są wspólne dla układu jądrowo-cytoplazmatycznego [24].

W odróżnieniu od translacji w układzie bakteryjnym, w inicjacji translacji mitochondrialnej biorą udział kodowane przez jądrowy genom aktywatory białkowe. Każdy mitochondrialny mRNA ma inny zestaw białek znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białka te wiążą się do jego 5'-końca mRNA i kierują translację do błony mitochondrialnej. Kolejne etapy translacji przebiegają podobnie jak u Prokaryota.

Terminacja translacji przeprowadzana jest przez jedyny poznany do tej pory czynnik terminacji translacji mitochondrialnej – mRF1 (ang. *mitochondrial Release Factor*), kodowany przez gen *MRF1*. mRF1 jest homologiem bakteryjnych czynników RF1 i RF2. Rozpoznaje tylko dwa kodony stop: UAA i UAG, ponieważ UGA w układzie mitochondrialnym koduje tryptofan [24]. mRF1 jest prawdopodobnie jedynym i wystarczającym czynnikiem rozpoznającym kodon stop w mitochondrialnym mRNA. Zaobserwowano lekko toksyczny efekt nadekspresji *MRF1* u drożdży *S. cerevisiae* [25]. Być może u drożdży występuje czynnik terminacji translacji, będący analogiem RF3, jednak jak dotąd nie został zidentyfikowany. Mitochondrialną rolę prokariotycznego czynnika RRF odgrywa drożdżowy homolog Fil1, nazywany inaczej Rrf1. Białko to jest związane z regulacją cyklu glioksalowego [26]. Delecja genu *FIL1* powoduje powstanie defektu oddechowego i niestabilność mtDNA.

Badania translacji mitochondrialnej drożdży *S. cerevisiae* mogą być prowadzone w układzie *in vivo*. Translacja mitochondrialna nie jest potrzebna dla ich żywotności w obecności fermentowalnych cukrów. Pozwala to na izolację oraz analizę mitochondrialnych i jądrowych mutantów,

http://rcin.org.pl

mających zaburzony wzrost na niefermentowalnych źródłach węgla. Analiza genetyczna u innych organizmów jest znacznie utrudniona.

BUDOWA CZYNNIKÓW TERMINACYJNYCH

W układzie prokariotycznym występują dwa czynniki terminacji translacji RF1 oraz RF2, rozpoznające odpowiednio kodony: UAA, UAG oraz UAA i UGA [27]. Wykazują one 40% podobieństwa sekwencji reszt aminokwasowych i można wyróżnić w nich cztery domeny. W dwóch różnych domenach zawarte są ważne funkcjonalnie motywy. Pierwszy motyw jest zlokalizowany w domenie II i odpowiada za rozpoznanie kodonu stop. Dla czynników RF1 i RF2 u *E. coli* są to odpowiednio sekwencje PAT i SPF [28]. Miejsca te znaleziono poprzez wymiany pomiędzy RF1 i RF2 fragmentów domen oraz odcinka 24 reszt aminokwasowych, zawierającego „antykodon". Genetyczne eksperymenty wykazały, że jest możliwa zmiana specyficzności RF1 i RF2 poprzez wymianę motywu trójaminokwasowego PAT i SPF pomiędzy czynnikami, odpowiednio RF1 i RF2 [28]. Może to wskazywać na to, iż trójaminokwasowy „antykodon" jest zaangażowany w bezpośrednie rozpoznawanie kodonu stop. Ponadto, wykazano, że pojedyncza zmiana aminokwasowa, w odległości 40 aminokwasów od „antykodonu" w RF2 (E167K), pozwala na terminację translacji ze wszystkich trzech kodonów stop [18].

Zmieniano sekwencję „antykodonu", podstawiając pod motywy PAT i SPF inne aminokwasy i badano wpływ na rozpoznawanie kodonów stop. Na podstawie dyskryminacji oddziaływań postawiono hipotezę, że te trójaminokwasowe sekwencje mogą rozróżniać drugi i trzeci nukleotyd kodonu stop [28]. Hipotezę tę potwierdza fakt, iż prokariotyczny RF2 może być *in vitro* wiązany poprzez światło UV do kodonu stop, posiadającego fotoaktywną 4-tiourydynę (s^4U) oraz do nukleotydów położonych poniżej i powyżej. Może to wskazywać, że RF2 ma bezpośredni kontakt z sygnałem terminacji [29].

Drugie, zachowane w ewolucji miejsce, występujące we wszystkich czynnikach terminacyjnych grupy pierwszej, znajduje się w domenie III. Jest to motyw GGQ, związany z aktywnością hydrolityczną czynników terminacyjnych. Zmiany aminokwasowe w miejscu GGQ znacznie redukują aktywność hydrolityczną czynników RF i wpływają na wiązanie się ich do rybosomu. Nie wpływają one na rozpoznawanie kodonu stop u Eukaryota [2,30,31]. Podobna sytuacja jest u Prokaryota, z tym że nie wykazano wpływu zmiany aminokwasowej w miejscu GGQ na wiązanie do rybosomu [6,32]. Zasadniczo, tylko podstawienie reszty glutaminy u bakterii powoduje zachowanie części aktywności *in vitro*, ale nie *in vivo*. Mutacje *in vivo* w miejscu GGQ są letalne [32]. Wykazano, że glutamina w zachowawczym motywie GGQ w czynnikach *E. coli* RF1 i RF2 (i drożdżowym czynniku mitochondrialnym mRF1) jest metylowana w pozycji N-5 [33]. Brak takiej modyfikacji u *E. coli* wpływa na kilkukrotne obniżenie aktywności uwalniania *in vitro* peptydu przez czynnik RF2, ale nie przez RF1.

Eukaryota i archebakterie posiadają pojedynczy czynnik rozpoznający kodon stop w terminacji translacji, nazywany odpowiednio eRF1 i aRF1. Czynniki tych organizmów są bardzo podobne do siebie, ale różnią się pod względem sekwencji i wielkości od czynników bakteryjnych [2]. Eukariotyczny czynnik terminacji translacji eRF1 zbudowany jest z trzech domen o podobnej wielkości. Domena I zawiera motywy NIKS i YXCXXXF, odpowiedzialne za rozpoznawanie kodonu stop [34,35]. Domena III posiada, zachowany w ewolucji, motyw GGQ. W miejscu GGQ, odpowiedzialnym za hydrolizę wiązania peptyd-tRNA, glutamina jest metylowana w pozycji N-5 [33]. Mutacje w miejscu kodującym motyw GGQ w eRF1 są *in vivo* śmiertelne dla komórek. W układzie *in vitro* zmutowane białko jest w stanie rozpoznać kodon stop, ale nie potrafi katalizować uwolnienia peptydu [30]. Domena II odpowiada za wiązanie eRF3.

Miejsce odpowiedzialne za wiązanie eRF3 zlokalizowano dokładnie w czynniku eRF1 z *S. pombe*. Delecja jedenastu C-końcowych reszt aminokwasowych eRF1 z *S. pombe* poważnie uszkadzała stabilne wiązanie z eRF3, lecz nadal umożliwiała, po ekspresji z plazmidu skróconej formy eRF1, komplementację temperaturowrażliwej mutacji *sup45* u *S. cerevisiae* [18].

Mitochondrialny czynnik terminacji translacji mRF1 składa się z czterech domen. Wykazuje homologię do prokariotycznych czynników terminacji translacji. Podobieństwo drożdżowego mRF1 do RF1 *E. coli* wynosi 38% (w pewnych obszarach do 79%). Najbardziej wyraźną homologię sekwencji obserwuje się w centralnej i C–końcowej części mRF1, szczególnie w odcinku 43 aminokwasów, między pozycją 280 i 322 mRF1 (domena III). Poprzez porównanie sekwencji aminokwasowych mRF1 z RF1 i RF2, można było przewidzieć występowanie dwóch motywów: pierwszego motywu PST (domena II), odpowiedzialnego za rozpoznawanie kodonu stop, oraz drugiego - ściśle zachowanego w ewolucji motywu GGQ (domena III), odpowiedzialnego za hydrolizę wiązania peptyd-tRNA [36].

Pierwsza, o nieznacznej homologii domena, zawierająca α-helisy, jest dłuższa o 47 reszt aminokwasowych od prokariotycznych czynników terminacyjnych i tworzy sekwencję kierującą do mitochondriów. Podobnie jak domena I, domena IV nie zawiera sekwencji zachowanych w ewolucji i nie znaleziono w niej istotnych motywów.

Przeprowadzono ekspresję drożdżowego genu *MRF1* w *E. coli* i wykazano, że białko kodowane przez ten gen wiąże się *in vitro* do rybosomów mitochondrialnych z drożdży i do rybosomów *E. coli* oraz posiada aktywność czynnika terminacji translacji [37].

RODZAJE, OTOCZENIE I WYBÓR KODONÓW STOP

Wykazano, że otoczenie kodonu stop istotnie wpływa na możliwość jego odczytania. Uważa się, że nukleotydy, które są poniżej (-) [38] i powyżej (+) [39] kodonu stop mogą wpływać na wydajność terminacji. U Eukaryota i Prokaryota sygnał terminacyjny zawiera dodatkowo ważny nukleotyd w pozycji +4 [1].

http://rcin.org.pl

Niektóre kodony stop u orzęsków zostały w ewolucji zmienione na kodony sensowne, co wskazywałoby na istnienie u tych organizmów niekonwencjonalnego eRF1. U orzęska *Euplotes octacarinatus* kodon stop UGA jest odczytywany jako cysteina obok dwóch konwencjonalnych kodonów cysteiny (UGU i UGC). Jako główny kodon stop jest używany UAA, zaś UAG jest rzadko spotykany. *Euplotes octacarinatus* posiada dwa typy czynników terminacyjnych pierwszej klasy (eRF1a i eRF1b). Podobieństwo sekwencyjne dla eRF1a i eRF1b wynosi 79%, a podobieństwo do ludzkiego eRF1 wynosi odpowiednio 57% i 58% [40].

U pantofelka (*Paramecium tetraurelia*) oraz orzęska (*Tetrahymena thermophila*) występują kodony UAA i UAG, kodujące glutaminę i jedynie kodon UGA funkcjonuje jako stop.

W celu zbadania domeny I eRF1, potencjalnie odpowiedzialnej za specyficzność rozpoznawania różnych kodonów stop u orzęska, skonstruowano hybrydową molekułę, zawierającą domenę I eRF1 z *T. thermophila* lub *E. octacarinatus* w fuzji z domenami II i III eRF1 z *S. cerevisiae*. Skonstruowane hybrydy poddano ekspresji w komórkach *S. cerevisiae*, zawierających unieczynniony gen kodujący czynnik eRF1. Okazało się, że hybryda eRF1 z *T. thermophila* powodowała przywrócenie wzrostu, podczas gdy hybryda eRF1 z *E. octacarinatus* nie przywracała żywotności komórki drożdżowej. Hybryda eRF1 z *T. thermophila* rozpoznawała wszystkie trzy kodony stop, dowodząc tym samym, że jej domena I nie jest w stanie narzucić specyficzności kodonowej. Przeciwnie jest w przypadku hybrydy eRF1 z *E. octacarinatus*, która nie rozpoznawała UGA jako kodonu stop. W obu tych organizmach występują inne mechanizmy rozpoznawania różnic w kodzie genetycznym [41].

Co ciekawe, wykazano, że u niektórych bakterii, np. *Mycoplasma genitalium*, występuje w ich małym genomie jedynie gen kodujący czynnik RF1. Postuluje się, że odpowiednik czynnika RF2 uległ eliminacji w trakcie ewolucji, w wyniku której u *M. genitalium* kodon UGA rozpoznawany jest jako glutamina.

Dwa gatunki archebakterii, *Methanococcus jannaschii* i *Archeoglobus fulgidus*, których genom został zsekwencjonowany, posiadają jedynie pojedynczy „eukariotyczny" czynnik terminacji translacji.

WPŁYW MUTACJI W GENACH KODUJĄCYCH CZYNNIKI TERMINACYJNE, RYBOSOMALNE RNA I BIAŁKA RYBOSOMU NA TERMINACJĘ TRANSLACJI

W celu określenia motywów w białkach RF, innych niż motyw antykodonu, wpływających na rozpoznawanie kodonu stop, wyizolowano szereg wtórnych mutacji w bakteryjnym RF2, które powodowały odwrócenie zahamowania wzrostu poprzez mutacje w „antykodonie" i jego otoczeniu (motyw SPF). Zidentyfikowano mutacje zmiany sensu w miejscu kodującym sekwencję SPF, które prowadziły do utraty funkcji RF2. Mutacje te były suprymowane innymi mutacjami zmiany sensu poprzedzającymi tę sekwencję o 40-50 aminokwasów [42]. Ponadto, mutacje polegające na podstawieniu reszty kwasu glutaminowego przez lizynę (zmiana cząstkowego ładunku ujemnego na dodatni) w innych miejscach w RF2, włącznie z domeną zawierającą trójaminokwasowy motyw, mogą powodować uwalnianie peptydu na innych kodonach stop, jak i na kodonach sensownych. Zjawisko to określono mianem *„codon bypasing"*. Powstała hipoteza, że domena II jest związana oddziaływaniami elektrostatycznymi nie tylko z innymi miejscami w czynniku terminacyjnym RF2, ale także z ujemnie lub dodatnio naładowanymi białkami rybosomu lub z rRNA [42]. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w późniejszych badaniach struktury RF2 związanego z rybosomem [43,44].

Wykazano toksyczność nadprodukcji RF2 ze szczepu bakteryjnego K12. Przyczyną tego zjawiska okazała się być obecność Thr^{246} RF2, podczas gdy w innych szczepach miejsce to zajmuje, zachowana w ewolucji, alanina lub seryna. Podstawienie treoniny na alaninę [45] lub serynę [46] w pozycji 246 powoduje zanik toksyczności, wynikający z nadprodukcji RF2. Treonina 246 jest w sąsiedztwie motywu GGQ (250-252), a toksyczność nadprodukowanego RF2 wzrasta wraz z brakiem metylacji glutaminy 252 [47].

Wyizolowano mutanty w genie *prfB* kodującym RF2 u *S. typhimurium*, nazwane Csu (ang. *Cross supression phenotype*), powodujące supresję kodonu UAG. Była to kolejna praca mająca na celu zrozumienie w jaki sposób czynniki terminacyjne rozpoznają kodon stop. Przeprowadzano mutagenezę plazmidu niosącego gen *prfB* w celu wyselekcjonowania dominujących supresorów nonsens UAG. Większość znalezionych mutacji dotyczyło C-końcowej części RF2. Sugerowało to, że N-końcowa domena I, niezależnie od rozpoznania kodonu stop, jest zaangażowana w formowanie kompleksu preterminacyjnego z rybosomem [48].

Badania genetyczne *in vivo* u *S. cerevisiae* pozwoliły na znalezienie nowych mutantów eRF1, posiadających unikatowe funkcje rozpoznawania kodonu stop. Mutacje w N-końcowej domenie okazały się decydujące dla struktury białka, jak i funkcji odczytywania kodonu stop. Analiza specyficzności supresorów nonsens, zlokalizowanych w okolicach motywu NIKS i YXCXXXF w N-końcowej domenie I eRF1 drożdży, wykazała różnicę w rozpoznawaniu każdego z trzech kodonów stop [49]. Poprzez mutacje w okolicach motywu NIKS omnipotentny (charakteryzujący się rozpoznawaniem wszystkich kodonów stop), eRF1 człowieka został zmieniony w unipotentny czynnik, rozpoznający jedynie jeden kodon stop UGA [35]. Przypuszcza się, że w rozpoznawaniu kodonu stop może brać udział wiele różnych reszt aminokwasowych w różnych domenach eRF1 i tylko niewielka ich część została do tej pory odkryta.

Poprzez zmianę, zachowanych w ewolucji, reszt aminokwasowych w motywie YXCXXXF w czynniku eRF1 człowieka, wykazano jego znaczący wpływ na rozpoznawanie kodonu stop [35]. Podobne doświadczenie przeprowadzono dla wykazania udziału motywu NIKS w eRF1 w terminacji translacji. Podstawienia aminokwasowe w motywie NIKS eRF1 człowieka, w teście *in vitro*, powodują zmiany odpowiedzi na pojawienie się kodonu stop [34].

Przedstawiono dowody świadczące o tym, że to raczej centrum peptydylotransferazy w rybosomie, nie czynnik

http://rcin.org.pl

terminacyjny katalizuje hydrolizę wiązania peptyd-tRNA [50]. Musi zatem istnieć jakaś komunikacja pomiędzy czynnikiem terminacyjnym a rybosomem. Doświadczenia wykonane na bakteriach i eukariontach wykazały, jakie elementy rybosomu są zaangażowane w proces rozpoznawania kodonu stop. Przedmiotem licznych badań było uzyskanie mutacji w 16S rRNA i 23S rRNA u *E. coli* oraz u drożdży w 18S rRNA, które wpływają na wydajność terminacji translacji [1]. Niektóre mutacje w szczególnym obszarze drożdżowego 18S rRNA, zwanym „decoding center", ułatwiają przeczytywanie kodonów stop (ang. *readtrough*), podczas gdy inne zmiany w tym obszarze kompensują defekty związane z mutacjami w genach kodujących eRF1 i eRF3, o fenotypie supresorów omnipotencjalnych. Takie mutacje w rRNA zostały nazwane antysupresorowymi, ponieważ powodują przywrócenie terminacji z mutacją w genach RF. Może to sugerować ważną rolę rRNA w utrzymaniu wydajnej terminacji translacji, tak samo ważną jak w procesie odczytywania kodonu podczas procesu elongacji polipeptydu [1,50] Box 11.

Sugeruje się, że rybosomalny 23S rRNA bierze udział w hydrolizie wiązania peptyd-tRNA. Mutacje w zachowanych w ewolucji, miejscach rdzenia centrum peptydylotransferazy (PTC) podjednostki 50S rybosomu, dramatycznie hamują uwalnianie peptydu, mając przy tym niewielki wpływ na tworzenie wiązania peptydowego [51].

Opisano 21 różnych mutacji w genie kodującym białko rybosomu L11 u *E. coli*, wpływających na terminację translacji. Jedna grupa była supresorami temperaturowrażliwych mutacji (ts) w RF1 i w RF2. Kolejna grupa mutantów L11 została wyselekcjonowana w układzie opartym o detekcję *„readtrough"* w genie kodującym galaktozydazę, zawierającym kodon stop UAG lub UGA. Wykazano, że zmiany w L11 podnoszą lub zmniejszają wydajność terminacji translacji z udziałem obu badanych kodonów (UAG lub UGA). Badania te wskazują na istotną rolę rybosomalnego białka L11 w funkcjonowaniu RF1 i RF2 [52].

W mutantach drożdży *S. cerevisiae*, które nie rosną na niefermentowalnych źródłach węgla (fenotyp Gly-), znaleziono zmiany nukleotydowe w genie *MRF1*, nazwane mutacjami *mrf1-13* oraz *mrf1-780*. Mutanty te otrzymano jako supresory mutacji *mit⁻* w mitochondrialnym genie *COX2* (*oxi1-V25*). Fenotyp Gly(-) jest powiązany z obniżeniem ekspresji genów mitochondrialnych. Na podstawie analizy komputerowej sporządzono model przestrzennej struktury mRF1. W strukturze 3D usytuowano miejsca mutacji *mrf1-13* i *mrf1-780*. Mutacja *mrf1-13* (R231G) znajduje się blisko miejsca kodującego motyw aminokwasowy PST (233-235) i poprzez zmianę ładunku, zachowanej w ewolucji, argininy, która stabilizuje konformację, może wpływać na położenie ruchomej pętli, zawierającej motyw PST i utrudniać rozpoznanie kodonu stop [36].

Mutacja *oxi1-V25* była również suprymowana poprzez zmutowany allel *nam9-1*. *NAM9* jest genem jądrowym, kodującym białko małej podjednostki mitorybosomu. Białko Nam9 wykazuje homologię z rybosomalnym białkiem prokariotycznym S4. Dominująca mutacja *nam9-1* powoduje zaburzenia elongacji translacji mitochondrialnej. Nadekspresja *MRF1* powoduje zniesienie przeczytywania kodonu stop w mutancie *nam9-1*, tak samo jak w mutancie *MSU1*. *MSU1* zawiera punktową mutację w mitochondrialnym 15S rRNA (pozycja 530), która suprymuje mutację *oxi1-V25*. Wykazano, że mutacja *MSU1* odpowiada pozycji w bakteryjnym 16S rRNA, w obszarze której wiąże się białko S4. Oba miejsca w 16S rRNA i S4 są odpowiedzialne za wiązanie czynnika elongacyjnego EF-Tu [53].

Opisano mutację w genie *MRF1* występującą dokładnie w tym samym miejscu co *mrf1-13* (R231G) i nazwano ją *mrf1-1* (R231K). Mutacja *mrf1-1*, podobnie jak mutacja *mrf1-13*, charakteryzowała się fenotypem Gly(-) [53].

Geny kodujące Sup35 i Sup45 są niezbędne do życia dla komórki drożdży. Wykazano, że mogą być zaangażowane w inne procesy niż translacja. Cytoplazmatyczne czynniki terminacji translacji eRF1 (Sup45) i eRF3 (Sup35) mogą być zaangażowane w kontrolę transmisji chromosomów [54], organizację cytoszkieletu i cykl komórkowy [55]. Wnioski te wyciągnięto z doświadczeń, w których obniżano poziom ekspresji lub indukowano mutacje w genach kodujących eRF1 i eRF3.

STRUKTURA PRZESTRZENNA CZYNNIKÓW TERMINACYJNYCH

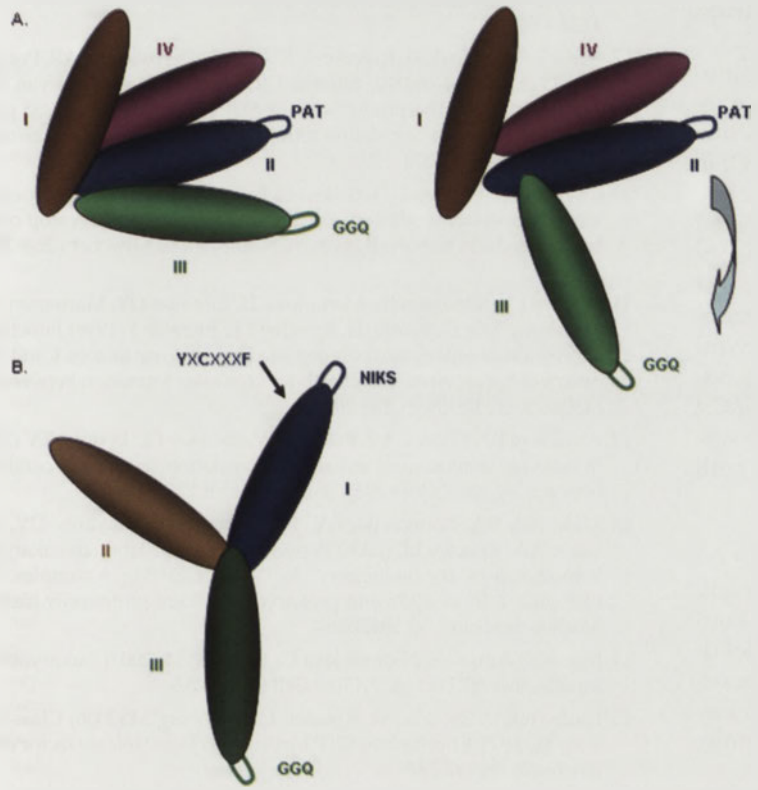
Budowa krystaliczna wyizolowanych białek prokariotycznych RF1 i RF2 jest podobna [56,57], lecz nie przypomina wcześniej rozwiązanej struktury eukariotycznego czynnika eRF1 [30]. Dotychczas rozwiązane struktury dla RF1 i RF2, to struktura w rybosomie 70S wraz z tRNA i mRNA z *Thermus thermophilus* [43], struktura w rybosomie 70S wraz z tRNA, mRNA i paromomycyną z *Thermus thermophilus* [58]. Dla RF1 rozwiązano strukturę w rybosomie 70S dla *Thermotoga maritima* [59] oraz oddzielną strukturę poza rybosomem ze *Streptococcus mutans* (PDB). Rozwiązano również strukturę krystalograficzną dla samego RF2 z *E. coli* [56] oraz dla kompleksu RF2 z rybosomem z *E. coli* [44].

Wykazano, że odległość pomiędzy trójaminokwasową sekwencją rozpoznającą kodon stop a motywem GGQ jest różna od odległości pomiędzy centrum dekodowania (DC) w podjednostce 30S i centrum peptydylotransferazy (PTC) w podjednostce 50S. Zatem RF2 musi być inaczej zorientowany w rybosomie. Rozbieżność pomiędzy odległością „antykodon"–GGQ w czynniku terminacyjnym, a odległością DC–PTC w rybosomie, została wyjaśniona przez dwa zespoły, które określiły strukturę krystalograficzną czynnika RF2, związanego z kodonem stop w rybosomie [44, 60]. W strukturach tych RF2 nie przypomina poprzednio rozwiązanej struktury, ze względu na radykalną zmianę orientacji domeny III względem rdzenia tworzonego przez domeny II i IV. Po związaniu do rybosomu, domena III, posiadająca motyw GGQ, zmienia położenie w kierunku PTC, tworząc tak zwaną konformację otwartą, w przeciwieństwie do konformacji zamkniętej w strukturze zaproponowanej dla niezwiązanego RF2. Jednakże modele opisane w obu doniesieniach różniły się, a rozdzielczość struktury nadal nie była wysoka (7Å). W 2005 roku Petry i wsp. [43] otrzymali strukturę krystalograficzną o lepszej rozdzielczości dla obu czynników terminacyjnych RF1

http://rcin.org.pl

(5.9Å) i RF2 (6.7Å) z *T. thermophilus*, związanych w miejscu A rybosomu oraz z tRNA w miejscu P rybosomu. Wyższa rozdzielczość umożliwiła dokładne określenie ułożenia domen czynników terminacyjnych w rybosomie. Struktury RF1 i RF2 okazały się bardzo podobne. Domeny II i III oraz C-końcowa część domeny IV w czynnikach RF1 i RF2 są prawie identycznie ułożone w rybosomie oraz w podobny sposób wiążą się do rybosomu. Największe zmiany dla domen III, zawierających motyw GGQ, zaobserwowano względem konformacji zamkniętych. Domena ta odgina się od rdzenia białka, aby dotrzeć do miejsca PTC (Rys. 3A). Zaobserwowano również rotację domeny I, odchylającej się od domen II i IV oraz kotwiczącej się do regionu rybosomalnego białka L11.

Pomimo 40% podobieństwa sekwencyjnego, czynniki RF1 i RF2 wykazują pewne różnice strukturalne. Największe różnice sekwencyjne wykazuje domena I, która nie jest bezpośrednio związana z funkcjonowaniem prokariotycznych czynników terminacyjnych, ale uczestniczy w oddziaływaniu z RF3 [61]. Domenę tę cechuje najniższa zachowawczość wśród prokariotycznych czynników terminacyjnych. Wykazano dla niej różne ułożenie dla RF1 i RF2 w rybosomie. W RF2 domena ta znajduje się blisko białka L11, podczas gdy w RF1 jest oddalona od L11. Autorzy pokazali strukturalnie bezpośrednie oddziaływanie trójaminokwasowego „antykodonu" z nukleotydami kodonu stop [43] (Ryc. 3).



Rycina 3. Budowa przestrzenna czynników terminacyjnych. A. Czynnik terminacji translacji RF1 bakterii; struktura zamknięta RF1 i otwarta RF1 (na podstawie [43]). Na rysunku zaznaczono wszystkie cztery domeny w kolorach (cyfry rzymskie), miejsce PAT („antykodon") i miejsce GGQ. Strzałką zaznaczono kierunek odgięcia się domeny III. B. Eukariotyczny czynnik terminacji translacji eRF1 (na podstawie [27]). Na rysunku zaznaczono wszystkie trzy domeny (cyfry rzymskie), miejsce YXCXXXF (zaznaczono strzałką) i miejsce NIKS („antykodon") i miejsce GGQ.

Eukariotyczny czynnik terminacji translacji, eRF1, zbudowany jest z trzech domen o podobnej wielkości i nie wykazuje podobieństwa sekwencyjnego ani strukturalnego do czynników bakteryjnych (Ryc. 3B). Dotychczas rozwiązano strukturę krystalograficzną dla eRF1 z *Homo sapiens* [30]. Struktura ta jest w kształcie litery „Y", której ramiona tworzą domeny I i II, a trzon domena III. Domena I eRF1 zawiera motyw NIKS, odpowiedzialny za rozpoznawanie kodonu stop i znajdujący się w przestrzeni między dwoma α-helisami. Domena III, utworzona przez α-helisę, posiada, zachowany w ewolucji, motyw GGQ. Zaproponowano, że glutamina motywu GGQ może koordynować cząsteczkę wody, służącą jako nukleofil, do hydrolizy wiązania estrowego peptyd–tRNA [30]. Domena II oddziałuje z domeną III, ale nie z domeną I. Domena II jest odpowiedzialna za wiązanie eRF3 [62,63], podczas gdy wszystkie trzy domeny są potrzebne do indukcji aktywności GTP-azowej eRF3. eRF1 tworzy z rybosomem GTP-azowe białko aktywujące (ang. *GAP-GTPase-Activating Protein*) [22].

W celu zbadania możliwych zmian konformacyjnych w eRF1 i RF2 przeprowadzono molekularną symulację dynamiki struktury, porównanie sekwencji oraz analizę elektrostatycznego oddziaływania domen. Symulacja pokazała różnice pomiędzy wpływem, zachowanych w ewolucji, reszt histydyny w eRF1 i RF2 na konformację neutralnych i protonowanych reszt histydyn (n-His i p-His). Konformacja obu czynników jest zbliżona do tej, która została rozwiązana krystalograficznie dla neutralnych histydyn. Po protonowaniu histydyn struktura staje się podobna do struktury czynników RF, zaproponowanej dla kompleksu z rybosomem. Pomimo tego, iż obszar i kierunek zmian konformacyjnych dla formy neutralnej (n-His) i protonowanej (p-His) jest odmienny dla eRF1 (zmniejsza się z 97,5 do 73Å) i RF2 (zwiększa się z 33 do 73Å), to zmiany te cechuje wspólny mechanizm. Konformacje RF1 i RF2 są bardziej podobne w formie p-His, w porównaniu do ich form n-His. Wskazywało to, że oba te czynniki mają podobną strukturę podczas wiązania się do rybosomu [27].

SŁUSZNOŚĆ HIPOTEZY MOLEKULARNEJ MIMIKRY

Wraz z coraz szybszym rozwojem metod pozwalających na określenie struktur makrocząsteczek pojawia się wyzwanie, dotyczące wykorzystania zgromadzonych informacji w celu lepszego zrozumienia funkcjonowania układów biologicznych. Struktura cząsteczki częstokroć dostarcza dane dotyczące pochodzenia, jak i biologicznej funkcji. Dla przykładu, dwa białka posiadające małe podobieństwo sekwencyjne, ale posiadające niespodziewanie duże podobieństwo na poziomie struktury, zazwyczaj wykazują podobne funkcje. Ta zależność strukturalno-funkcjonalna nie jest jedynie możliwa przy porównywaniu tych samych typów molekuł biologicznych. Została ona poszerzona o całkowicie różne typy molekuł, takie jak białka i RNA. W ciągu ostatnich dziesięciu lat wnikliwe badania nad

http://rcin.org.pl

trójwymiarową strukturą aparatu translacyjnego ujawniły kilka takich podobieństw, jak na przykład porównanie czynnika elongacji EF-G z kompleksem tRNA•EF-Tu lub czynników terminacyjnych z tRNA [64].

Odkrycie struktury czynników terminacyjnych spowodowało, że pojawiła się hipoteza „tRNA mimikry", mówiąca o ich podobieństwie do tRNA. Trójaminokwasowy antykodon" czynnika terminacyjnego i kodon stop w mRNA tworzą analogiczne oddziaływanie jak kodon–antykodon podczas parowania mRNA i tRNA. Poprzez analogię struktur RF i tRNA tłumaczono podobieństwo ich funkcji [45,65]. Hipoteza ta została poparta przez podobieństwo struktury pomiędzy czynnikiem elongacji EF-G [66] a kompleksem tRNA•EF-Tu [67]. Na podstawie zaproponowanej funkcjonalnej analogii pomiędzy czynnikami terminacyjnymi pierwszej klasy i czynnikiem elongacyjnym EF-G, którego domeny przypominają pętlę „antykodonu" i pętlę TψC cząsteczki tRNA, Nakamura i wsp. [45] zasugerowali, że czynniki terminacyjne pierwszej klasy stanowią strukturalne analogi cząsteczki tRNA.

Krystalograficzna struktura RRF dostarczyła kolejnego przykładu „tRNA mimikry". Jedna z domen RRF jest podobna do domeny I RF2 i przypomina „antykodonowe" ramię tRNA [68].

Po rozwiązaniu struktury krystalograficznej eRF1 człowieka, Song i wsp. [30] uznali, że nie jest on w pełni podobny do tRNA. Autorzy raczej skłaniali się ku hipotezie, że analogie funkcjonalne wymuszają podobieństwo struktury określonych motywów. Dla przykładu, motyw GGQ w eRF1 jest odpowiednikiem grupy CCA-3', która jest aminoacylowana w tRNA. Obie grupy oddziałują z centrum peptydylotransferazy (PTC) w rybosomie, powodując zupełnie inne rezultaty – terminację lub elongację translacji. Obie grupy są umieszczone w wyeksponowanych strukturalnie miejscach. Podobne umiejscowienie grupy GGQ w eRF1 i grupy aminoacylowej w tRNA może pozwalać na podobne oddziaływanie z PTC, sugerując, że domena II eRF1 jest strukturalnym odpowiednikiem aminoacylowego akceptorowego ramienia tRNA. Kolejnymi charakterystycznymi oddziaływaniami, wskazującymi na podobieństwo, są oddziaływania czynnika elongacyjnego EF-Tu z pętlą TψC i aminoacylowaną grupą CCA-3' w tRNA oraz oddziaływanie eRF3 z domeną III eRF1, która jest odpowiednikiem pętli TψC w tRNA [30].

Hipoteza molekularnej mimikry powstała ponad 10 lat temu. Napływające nowe informacje, dotyczące translacji, jak i samych czynników translacyjnych, wskazują, że koncepcja ta była pewnym uproszczeniem. Określenie molekularnej mimikry zostało w literaturze zdominowane przez okres zaawansowanych badań nad zrozumieniem syntezy białek. Po pojawieniu się pierwszych struktur rybosomów, koncepcja ta przetrwała i nadal funkcjonuje. Obecnie jesteśmy na etapie bardziej dokładnego zrozumienia oddziaływań molekularnych na poziomie rRNA i subtelnych zmian w orientacji przestrzennej atomów, pociągających za sobą te oddziaływania. Prostota początkowych założeń hipotezy mimikry została rozmyta przez wyniki coraz dokładniejszych analiz [69]. Ostatnie doniesienia wskazują na różnice w konformacji bakteryjnych czynników RF w rybosomie względem konformacji rozwiązanej dla wolnych RFów. Zaproponowano, że tRNA i jego białkowe „mimikry" są funkcjonalnie powiązane poprzez sposób oddziaływania z rybosomem [64].

PIŚMIENNICTWO

1. Kapp LD, Lorsch JR (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. Annu Rev Biochem 73: 657-704
2. Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisselev LL (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. RNA 5: 1014-1020
3. Klein H, Capecchi MR (1971) Polypetide chain termination. Purification of the release factors, R1 and R2, from *Escherichia coli*. J Biol Chem 246: 1055-1061
4. Donly BC, Edgar CD, Williams JM, Tate WP (1990) Tightly controlled expression systems for the production and purification of *Escherichia coli* release factor 1. Biochem Int 20: 437-443
5. Kawakami K, Nakamura Y (1990) Autogenous suppression of an opal mutation in the gene encoding peptide chain release factor 2. Proc Natl Acad Sci USA 87: 8432-8436
6. Zavialov AV, Mora L, Buckingham RH, Ehrenberg M (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. Mol Cell 10: 789-798
7. Karimi R, Pavlov MY, Buckingham RH, Ehrenberg M (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. Mol Cell 3: 601-609
8. Pavlov MY, Freistroffer DV, MacDougall J, Buckingham RH, Ehrenberg M (1997) Fast recycling of *Escherichia coli* ribosomes requires both ribosome recycling factor (RRF) and release factor RF3. EMBO J 16: 4134-4141
9. Stansfield I, Jones KM, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Poznyakovski AI, Paushkin SV, Nierras CR, Cox BS, Ter-Avanesyan MD, Tuite MF (1995) The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 14: 4365-4373
10. Chavatte L, Frolova L, Kisselev L, Favre A (2001) The polypeptide chain release factor eRF1 specifically contacts the s(4)UGA stop codon located in the A site of eukaryotic ribosomes. Eur J Biochem 268: 2896-2904
11. Frolova LY, Simonsen JL, Merkulova TI, Litvinov DY, Martensen PM, Rechinsky VO, Camonis JH, Kisselev LL, Justesen J (1998) Functional expression of eukaryotic polypeptide chain release factors 1 and 3 by means of baculovirus/insect cells and complex formation between the factors. Eur J Biochem 256: 36-44
12. Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV (2006) *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. Cell 125: 1125-1136
13. Mitkevich VA, Kononenko AV, Petrushanko IY, Yanvarev DV, Makarov AA, Kisselev LL (2006) Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1*eRF3*GTP*Mg2+ complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct. Nucleic Acids Res 34: 3947-3954
14. Inge-Vechtomov S, Zhouravleva G, Philippe M (2003) Eukaryotic release factors (eRFs) history. Biol Cell 95: 195-209
15. Hauryliuk V, Zavialov A, Kisselev L, Ehrenberg M (2006) Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3. Biochimie 88: 747-757
16. Chauvin C, Salhi S, Le Goff C, Viranaicken W, Diop D, Jean-Jean O (2005) Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. Mol Cell Biol 25: 5801-5811
17. Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtomov S, Kisselev L, Philippe M (1995) Termination of translation in eukaryotes

http://rcin.org.pl

is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. EMBO J 14: 4065-4072

18. Ito K, Ebihara K, Nakamura Y (1998) The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. RNA 4: 958-972

19. Grentzmann G, Kelly PJ, Laalami S, Shuda M, Firpo MA, Cenatiempo Y, Kaji A (1998) Release factor RF-3 GTPase activity acts in disassembly of the ribosome termination complex. RNA 4: 973-983

20. Nakamura Y, Ito K (1998) How protein reads the stop codon and terminates translation. Genes Cells 3: 265-278

21. Freistroffer DV, Pavlov MY, MacDougall J, Buckingham RH, Ehrenberg M (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. EMBO J 16: 4126-4133

22. Frolova L, Le Goff X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M, Kisselev L (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. RNA 2: 334-3341

23. Le Goff X, Philippe M, Jean-Jean O (1997) Overexpression of human release factor 1 alone has an antisuppressor effect in human cells. Mol Cell Biol 17: 3164-3172

24. Fox TD (1996) Genetics of Mitochondrial Translation. Cold Spring Harbor Press.

25. Towpik J, Kutner J, Boguta M (2005) Expression of mitochondrial release factor in relation to respiratory competence in yeast. Curr Genet 48: 101-108

26. Kanai T, Takeshita S, Atomi H, Umemura K, Ueda M, Tanaka A (1998) A regulatory factor, Fil1p, involved in derepression of the isocitrate lyase gene in *Saccharomyces cerevisiae* — a possible mitochondrial protein necessary for protein synthesis in mitochondria. Eur J Biochem 256: 212-220

27. Ma B, Nussinov R (2004) Release factors eRF1 and RF2: a universal mechanism controls the large conformational changes. J Biol Chem 279: 53875-5385

28. Ito K, Uno M, Nakamura Y (2000) A tripeptide ‚anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. Nature 403: 680-684

29. Poole ES, Major LL, Mannering SA, Tate WP (1998) Translational termination in *Escherichia coli*: three bases following the stop codon crosslink to release factor 2 and affect the decoding efficiency of UGA-containing signals. Nucleic Acids Res 26: 954-960

30. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 — mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. Cell 100: 311-321

31. Seit-Nebi A, Frolova L, Justesen J, Kisselev L (2001) Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition. Nucleic Acids Res 29: 3982-3987

32. Mora L, Heurgue-Hamard V, Champ S, Ehrenberg M, Kisselev LL, Buckingham RH (2003) The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability *in vivo* of bacterial release factors RF1 and RF2. Mol Microbiol 47: 267-275

33. Polevoda B, Span L, Sherman F (2006) The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mtq1p and Mtq2p. J Biol Chem 281: 2562-2571

34. Frolova L, Seit-Nebi A, Kisselev L (2002) Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. RNA 8: 129-136

35. Seit-Nebi A, Frolova L, Kisselev L (2002) Conversion of omnipotent translation termination factor eRF1 into ciliate-like UGA-only unipotent eRF1. EMBO Rep 3: 881-886

36. Towpik J, Chacinska A, Ciesla M, Ginalski K, Boguta M (2004) Mutations in the yeast mrf1 gene encoding mitochondrial release factor inhibit translation on mitochondrial ribosomes. J Biol Chem 279: 14096-14103

37. Askarian-Amiri ME, Pel HJ, Guevremont D, McCaughan KK, Poole ES, Sumpter VG, Tate WP (2000) Functional characterization of yeast mitochondrial release factor 1. J Biol Chem 275: 17241-17248

38. Mottagui-Tabar S, Tuite MF, Isaksson LA (1998) The influence of 5′ codon context on translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 257: 249-254

39. Poole ES, Brown CM, Tate WP (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. EMBO J 14: 151-158

40. Liang A, Brunen-Nieweler C, Muramatsu T, Kuchino Y, Beier H, Heckmann K (2001) The ciliate Euplotes octocarinatus expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. Gene 262: 161-168

41. Salas-Marco J, Fan-Minogue H, Kallmeyer AK, Klobutcher LA, Farabaugh PJ, Bedwell DM (2006) Distinct paths to stop codon reassignment by the variant-code organisms Tetrahymena and Euplotes. Mol Cell Biol 26: 438-447

42. Uno M, Ito K, Nakamura Y (2002) Polypeptide release at sense and noncognate stop codons by localized charge-exchange alterations in translational release factors. Proc Natl Acad Sci USA 99: 1819-1824

43. Petry S, Brodersen DE, Murphy FVt, Dunham CM, Selmer M, Tarry MJ, Kelley AC, Ramakrishnan V (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. Cell 123: 1255-1266

44. Klaholz BP, Pape T, Zavialov AV, Myasnikov AG, Orlova EV, Vestergaard B, Ehrenberg M, van Heel M (2003) Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. Nature 421: 90-94

45. Uno M, Ito K, Nakamura Y (1996) Functional specificity of amino acid at position 246 in the tRNA mimicry domain of bacterial release factor 2. Biochimie 78: 935-943

46. Wilson DN, Guevremont D, Tate WP (2000) The ribosomal binding and peptidyl-tRNA hydrolysis functions of *Escherichia coli* release factor 2 are linked through residue 246. RNA 6: 1704-1713

47. Dincbas-Renqvist V, Engstrom A, Mora L, Heurgue-Hamard V, Buckingham R, Ehrenberg M (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. EMBO J 19: 6900-6907

48. Yoshimura K, Ito K, Nakamura Y (1999) Amber (UAG) suppressors affected in UGA/UAA-specific polypeptide release factor 2 of bacteria: genetic prediction of initial binding to ribosome preceding stop codon recognition. Genes Cells 4: 253-266

49. Bertram G, Bell HA, Ritchie DW, Fullerton G, Stansfield I (2000) Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. RNA 6: 1236-1247

50. Arkov AL, Murgola EJ (1999) Ribosomal RNAs in translation termination: facts and hypotheses. Biochemistry (Mosc) 64: 1354-1359

51. Polacek N, Gomez MJ, Ito K, Xiong L, Nakamura Y, Mankin A (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. Mol Cell 11: 103-112

52. Sato H, Ito K, Nakamura Y (2006) Ribosomal protein L11 mutations in two functional domains equally affect release factors 1 and 2 activity. Mol Microbiol 60: 108-120

53. Pel HJ, Rep M, Dubbink HJ, Grivell LA (1993) Single point mutations in domain II of the yeast mitochondrial release factor mRF-1 affect ribosome binding. Nucleic Acids Res 21: 5308-5315

54. Borchsenius AS, Tchourikova AA, Inge-Vechtomov SG (2000) Recessive mutations in SUP35 and SUP45 genes coding for translation release factors affect chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 37: 285-291

55. Valouev IA, Urakov VN, Kochneva-Pervukhova NV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD (2004) Translation termination factors function outside of translation: yeast eRF1 interacts with myosin light chain, Mlc1p, to effect cytokinesis. Mol Microbiol 53: 687-696

56. Vestergaard B, Van LB, Andersen GR, Nyborg J, Buckingham RH, Kjeldgaard M (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. Mol Cell 8: 1375-1382

http://rcin.org.pl

57. Shin DH, Brandsen J, Jancarik J, Yokota H, Kim R, Kim SH (2004) Structural analyses of peptide release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome. J Mol Biol 341: 227-239

58. Selmer M, Dunham CM, Murphy FVt, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. Science 313: 1935-1942

59. Rawat U, Gao H, Zavialov A, Gursky R, Ehrenberg M, Frank J (2006) Interactions of the release factor RF1 with the ribosome as revealed by cryo-EM. J Mol Biol 357: 1144-1153

60. Rawat UB, Zavialov AV, Sengupta J, Valle M, Grassucci RA, Linde J, Vestergaard B, Ehrenberg M, Frank J (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. Nature 421: 87-90

61. Mora L, Zavialov A, Ehrenberg M, Buckingham RH (2003) Stop codon recognition and interactions with peptide release factor RF3 of truncated and chimeric RF1 and RF2 from *Escherichia coli*. Mol Microbiol 50: 1467-1476

62. Merkulova TI, Frolova LY, Lazar M, Camonis J, Kisselev LL (1999) C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction. FEBS Lett 443: 41-47

63. Eurwilaichitr L, Graves FM, Stansfield I, Tuite MF (1999) The C-terminus of eRF1 defines a functionally important domain for translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 32: 485-496

64. Liang H, Landweber LF (2005) Molecular mimicry: quantitative methods to study structural similarity between protein and RNA. RNA 11: 1167-1172

65. Moffat JG, Tate WP (1994) A single proteolytic cleavage in release factor 2 stabilizes ribosome binding and abolishes peptidyl-tRNA hydrolysis activity. J Biol Chem 269: 18899-18903

66. Czworkowski J, Wang J, Steitz TA, Moore PB (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. EMBO J 13: 3661-3668

67. Nissen P, Kjeldgaard M, Thirup S, Polekhina G, Reshetnikova L, Clark BF, Nyborg J (1995) Crystal structure of the ternary complex of PhetRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. Science 270: 1464-1472

68. Selmer M, Al-Karadaghi S, Hirokawa G, Kaji A, Liljas A (1999) Crystal structure of Thermotoga maritima ribosome recycling factor: a tRNA mimic. Science 286: 2349-2352

69. Poole ES, Askarian-Amiri ME, Major LL, McCaughan KK, Scarlett DJ, Wilson DN, Tate WP (2003) Molecular mimicry in the decoding of translational stop signals. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 74: 83-121

Termination of prokaryotic and eukaryotic translation

Jan Kutner✉

Department of Genetics, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, 5A Pawinskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

✉ e-mail: janek@ibb.waw.pl

Key words: eRF1, mRF1, RF1, RF2, stop codon, translation termination, tRNA mimicry

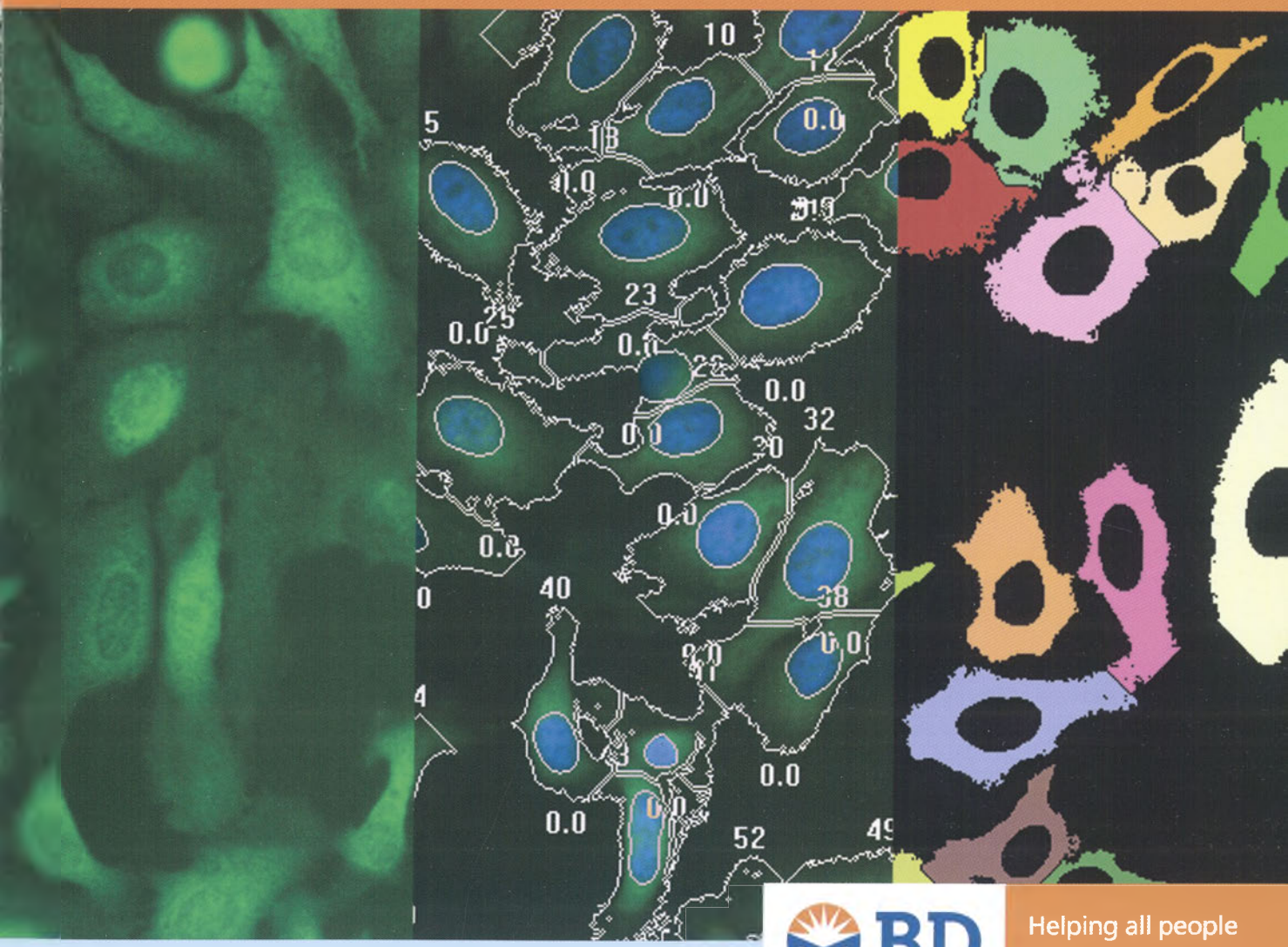
ABSTRACT

In prokaryotic and eukaryotic organisms termination of translation differs in many aspects. In the first step of termination the release factors recognize stop codons in A site of the ribosome. These factors are responsible for hydrolysis of peptide-tRNA bond and release of newly synthesized peptide. There is only one factor in eukaryotic cells, called eRF1, whereas in prokaryotic cells there are two factors called RF1 and RF2. In termination of translation in mitochondria, process similar to prokaryotes termination, there is only one factor known, called mitochondrial release factor 1 (mRF1). The research in all these systems has revealed important domains in release factors, which are involved in complicated process of termination of translation. This work summarizes new mechanistic aspects of termination of translation and shows some attempts of visualization of this process in many structural studies.

http://rcin.org.pl

Optymalizuj swoje wyniki

Nowość: Zestawy BD™ Calcium Assay



BD

Helping all people live healthy lives

Kombinacja Dająca Sukces

- Nowość: Zestawy BD™ Calcium i PBX Calcium Assay: Zwiększony stosunek sygnału do tła w porównaniu do metod standardowych.
- BD ACTOne™ cAMP Assay: Stabilnie transfekowane komórki HEK293 posiadające ekspresję opatentowanego biosensora typu CNG (cydic nudeotide-gated) i receptorów GPCR połączonych z białkiem Gs lub Gi.
- BD Falcon™ i BD BioCoat™ Viewing Plates do Oznaczeń Fluorescencyjnych: Wybór przygotowanych do hodowli i gotowych do użycia, biologicznie pokrytych powierzchni wzmacniających przyleganie komórek, ich rozprzestrzenianie i wzrost.

Skontaktuj się z nami aby dowiedzieć się więcej o optymalizacji oznaczeń!

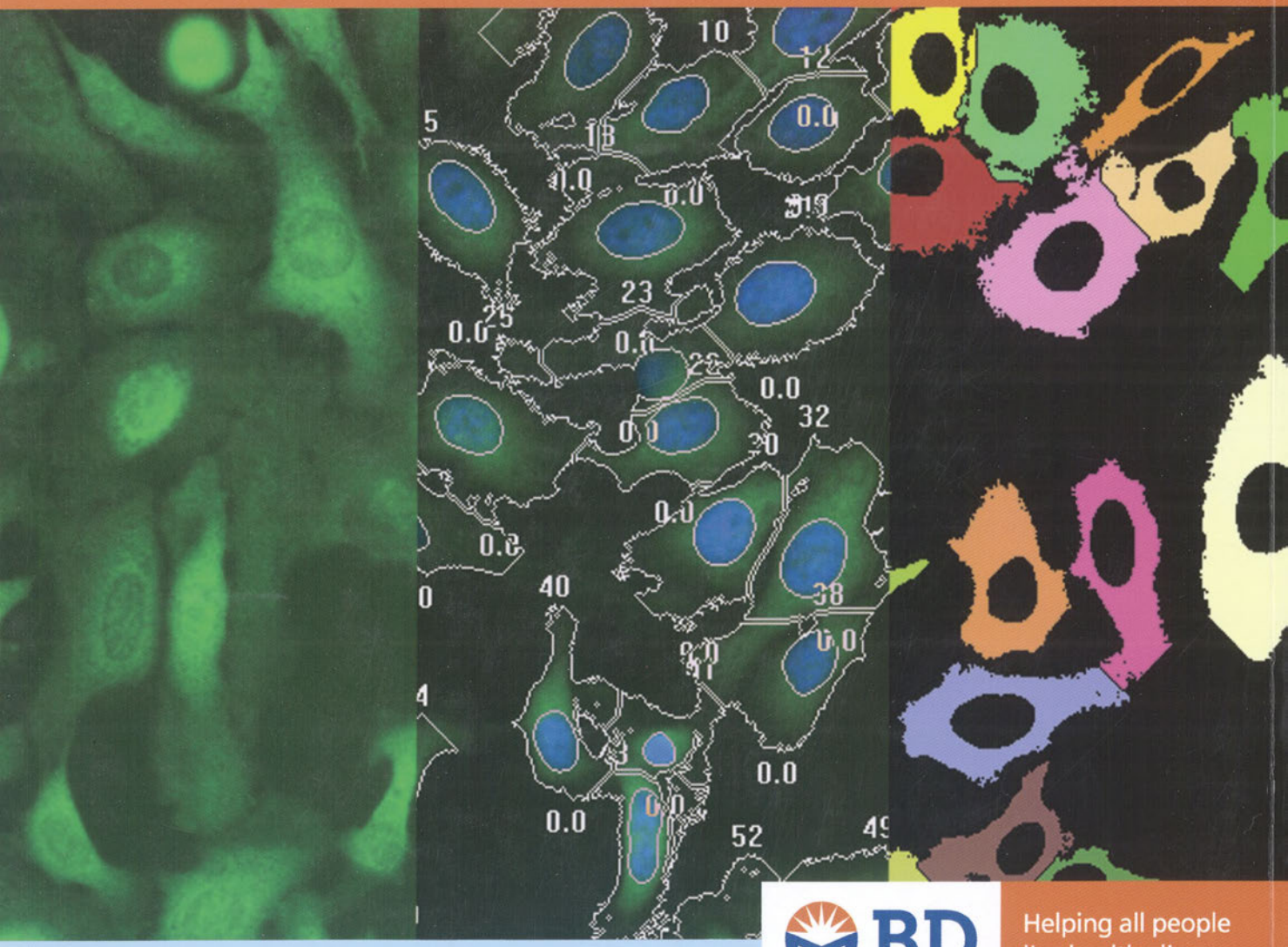
BD Biosciences
Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com

BD, BD Logo i wszystkie inne znaki handlowe są własnością Becton, Dickinson and Company ©2007 BD
A712-00

http://rcin.org.pl

BD Pathaway HT™ Bioimager

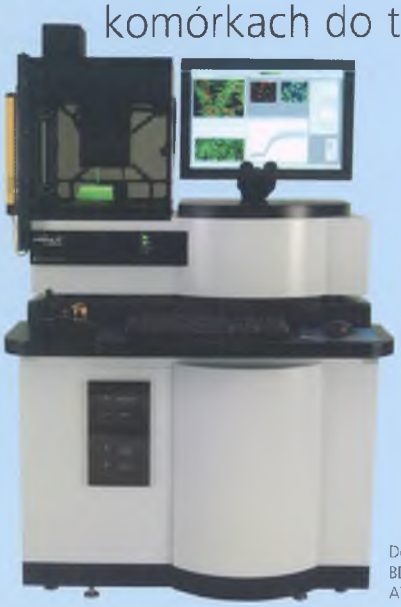
Badania Żywych Komórek Za Pomocą Automatycznego Obrazowania Konfokalnego



BD

Helping all people live healthy lives

Szybko rozwijane metody oparte na komórkach do tworzenia nowych leków i badań podstawowych



- Pokrycie pełnego spectrum z użyciem 16 filtrów wzbudzenia i 8 filtrów w torze emisji
- Autofokus i automatyczna identyfikacja śledzenia komórki
- Przełączanie pomiędzy trybem konfokalnym i szerokim polem
- Zintegrowana kontrola temperatury i CO_2
- Możliwość obrazowania zarówno komórek jak i tkanek
- Mozliwość bezpośredniego oglądania próbki jak w mikroskopie
- Pomiary kinetyki lub punktu końcowego

Skontaktuj się z nami po więcej informacji!

BD Biosciences
Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com

Do Badań Naukowych. Nie używać do diagnostyki lub leczenia
BD, BD Logo i wszystkie inne znaki handlowe są własnością Becton, Dickinson and Company. ©2007 BD
A712-00

http://rcin.org.pl