

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2010
TOM 56
NUMER 2

Czynnik transkrypcyjny Nrf2
a stres oksydacyjny

Modyfikacje białek
wywoływane przez NO

Reaktywne formy tlenu
w roślinach



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

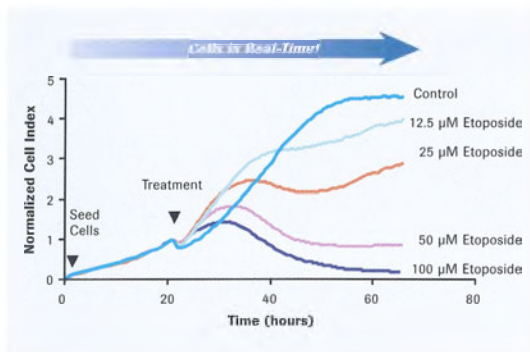


www.roche-applied-science.com

xCELLigence
Aparat RTCA SP

**xCELLigence system analizy komórek
w czasie rzeczywistym**

Głębsze spojrzenie, prawdziwe zrozumienie



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

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

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

System xCELLigence to głębsze spojrzenie dla prawdziwego zrozumienia

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

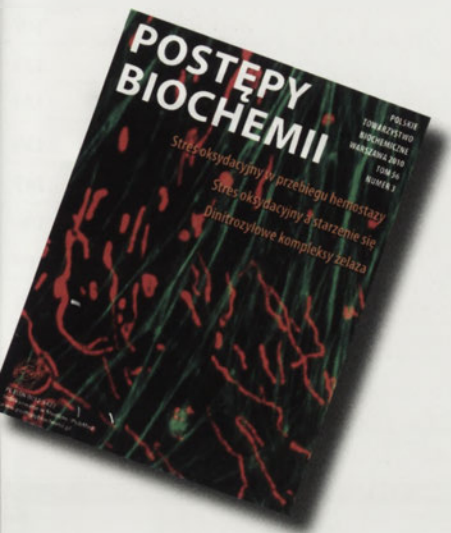


xCELLIGENCE jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.
© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>

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





W NASTĘPNYM NUMERZE:

Stres oksydacyjny w przebiegu hemostazy

Paweł Nowak, Beata Olas, Barbara Wachowicz

Stres oksydacyjny jako uniwersalna przyczyna starzenia się – od somatycznych komórek człowieka do jednokomórkowych drożdży i prokariotycznych komórek bakteryjnych

Krzysztof Książek

Dinitrozyłowe kompleksy żelaza – budowa i działanie biologiczne

Hanna Lewandowska, Kamil Brzó-ska, Sylwia Męczyńska-Wielgosz, Karolina Rumianek, Grzegorz Wój-ciuł, Marcin Kruszewski

Rysunek na okładce:

„Ostatni Marsz” Robert Kudera, www.robertkudera.pl. Opublikowano za zgodą autora.

NUMER SPECJALNY POD REDAKCJĄ GRZEGORZA BARTOSZA

TEMAT NUMERU – REAKTYWNE POCHODNE TLENU, STRES OKSYDACYJNY, ANTYOKSYDANTY – CZĘŚĆ I

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	99
--	----

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Nadtlenoazotyn jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny Lidia Gębicka, Joanna Didik	103
Modyfikacje strukturalne białek wywoływane przez tlenek azotu Agnieszka Szuba, Przemysław Wojtaszek	107
Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu <i>in vivo</i> Janusz M. Gębicki, Grzegorz Bartosz	115
Oksydacyjne uszkodzenia DNA – ich analiza oraz znaczenie kliniczne Tomasz Zaremba, Ryszard Oliński	124
Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA (mtDNA): przyczyna czy skutek zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu? Tomasz Płoszaj, Agnieszka Robaszkiewicz, Henryk Witas	139
Rola czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny Urszula Florczyk, Agnieszka Łoboda, Anna Stachurska, Alicja Józkowicz, Józef Dulak	147
Nowe oblicza czynników indukowanych przez hipoksję: HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny Anna Stachurska, Urszula Florczyk, Alicja Józkowicz, Józef Dulak, Agnieszka Łoboda	156
Rola białka p66Shc w fizjologii i patologii Magdalena Lebedzińska, Jan Suski, Jerzy Duszyński, Mariusz R. Wię-ckowski	165
Rola mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona Andonis Karachitos, Hanna Gałgańska, Hanna Kmita	174
Reaktywne formy tlenu w roślinach: powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału Renata Szymańska, Kazimierz Strzałka	182
Stres oksydacyjny wywołany działaniem metali ciężkich na rośliny Renata Rucińska-Sobkowiak	191

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Markery kwasu podchlorawego w układach biologicznych: identyfikacja i właściwości Agnieszka Robaszkiewicz	201
--	-----

NOWINKI TECHNICZNE

Sterowanie procesem akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu Becton Dickinson Polska	209
---	-----

Events/Opinions/Comments	99
REVIEWS	
Oxidative stress induced by peroxynitrite	103
Structural modifications of proteins induced by nitric oxide	107
The role of proteins in propagation of damage induced by reactive oxygen species <i>in vivo</i>	115
Oxidative DNA damage – analysis and clinical significance	124
Oxidative damage of mitochondrial DNA: the result or consequence of enhanced generation of reactive oxygen species	139
Role of Nrf2 transcription factor in cellular response against oxidative stress	147
The new face of factors induced by hypoxia – HIF-1 and HIF-2 and oxidative stress	156
Role of the p66Shc protein in physiological state and in pathologies	165
The role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease	174
Reactive oxygen species in plants – production, deactivation and role in signal transduction	182
Oxidative stress in plants exposed to heavy metals	191
Markers of chloric acid (I) in biological systems – identification and properties	201

Stres oksydacyjny

Odkrycie w końcu lat 60. ubiegłego stulecia dysmutazy ponadtlenkowej – enzymu, którego substratem jest wolny rodnik, rozbudziło ogromne zainteresowanie zagadnieniami powstawania, reakcji i biologicznych efektów wolnych rodników i innych reaktywnych pochodnych tlenu, a także enzymami usuwającymi reaktywne pochodne tlenu i nienenzymatycznymi przeciwutleniaczami. Te interdyscyplinarne z natury swojej badania angażują biologów, chemików, fizyków i lekarzy. Ich wyniki przedstawiane są na zjazdach wielu towarzystw naukowych i publikowane w różnych czasopiśmiech, jednak w 1982 powstało międzynarodowe Towarzystwo Badań Wolnych Rodników (*Society for Free Radical Research*) skupiające badaczy reaktywnych pochodnych tlenu i antyoksydantów.

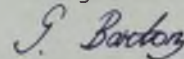
W czerwcu 1993 r. w Zwierzyńcu miało miejsce pierwsze austriacko-polskie spotkanie bilateralne poświęcone tematyce wolnorodnikowej, zorganizowane przez prof. Tomasza Bilińskiego i prof. Joerga Schaura. Na tym spotkaniu zapadła decyzja o utworzeniu Polskiej Sekcji *Society for Free Radical Research*, której pierwszym przewodniczącym został prof. T. Biliński. Była ona afiliowana przy Polskim Towarzystwie Biofizycznym. Kolejne sympozja tej sekcji Sekcji SFRR, z bogatym udziałem wykładowców zagranicznych odbywały się co dwa lata w Łodzi, a niestrudzoną ich organizatorką i wieloletnią przewodniczącą Polskiej Sekcji SFRR była prof. Maria Bryszewska. Ostatnie sympozjum tej serii miało charakter konferencji ogólnoeuropejskiej (*SFRR-Europe Summer Meeting*, Łódź 2004).

Decyzją Europejskiej Sekcji SFRR zlikwidowano narodowe sekcje towarzystwa. (Obecnie każdy badacz może zostać członkiem towarzystwa wypełniając deklarację i wpłacając składkę członkowską; odsyłać do strony internetowej <http://www.sfrr-europe.org/>). Ta zmiana zakończyła sympozja Polskiej Sekcji SFRR i sprawiła, że „wolnorodnikowcy” zaczęli spotykać się w ramach zjazdów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Sesje poświęcone tej tematyce znajdowały się w programie większości zjazdów naszego Towarzystwa w ostatnich latach, a niektóre z nich miały charakter w pełni międzynarodowy, z udziałem wielu wykładowców zagranicznych i obradami w języku angielskim (Gdańsk 2003, Białystok 2006). Również w programie tegorocznego, XLV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Wiśle, przewidziana jest sesja *Biochemia przeciwutleniaczy*, a tegoroczny zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego (Łódź, 28-30.IX.2010) przewiduje sesję *Wolne rodniki w biologii i medycynie*.

Duże zainteresowanie badawcze reaktywnymi pochodnymi form, tlenu i przeciwutleniaczami w naszym kraju było bodźcem do poświęcenia tym zagadnieniem specjalnego numeru *Postępów Biochemii* w bieżącym roku. Co więcej, sprawiło ono, że liczba zgłoszonych artykułów przekroczyła ramy jednego zeszytu i zamiast jednego, w roku 2010 ukażą się dwa numery specjalne *Postępów* (2 i 3). Zawierać one będą artykuły zgrupowane w kilka cykli tematycznych. W numerze 2 znajdują się artykuły poświęcone mechanizmom działania reaktywnych pochodnych tlenu i oksydacyjnym uszkodzeniom białek i kwasów nukleinowych (artykuły Gębickiej i wsp., Szuby i wsp., Gębickiego i wsp., Zaremby i wsp., Płoszaja i wsp.), aktywacji czynników transkrypcyjnych przez reaktywne pochodne tlenu (artykuły Florczyk i wsp., Stachurskiej i wsp.), mitochondriom jako źródłom reaktywnych pochodnych tlenu (artykuły Lebedzińskiej i wsp., Karachitosa i wsp.) oraz powstawaniu i roli reaktywnych pochodnych tlenu w roślinach (artykuły Szymańskiej i wsp., Rucińskiej-Sobkowiak). Numer 3 zawierać będzie artykuły omawiające fizjologiczne i patologiczne aspekty reakcji reaktywnych pochodnych tlenu (artykuły Nowaka i wsp., Książka, Jodko i Litwinienko), mechanizmy działania przeciwutleniaczy (artykuły Kowalewskiej i wsp., Muzolf-Panek i wsp., Stępień) oraz metalom w aspekcie stresu oksydacyjnego (artykuły Lewandowskiej i wsp., Lipińskiego i wsp., Lenartowicz i wsp.).

Wszystkim Autorom bardzo dziękuję za trud włożony w przygotowanie artykułów, a Czytelnikom życzę przyjemnej lektury.

Grzegorz Bartosz



PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartos@biol.uni.lodz.pl

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

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

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

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

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

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

Automatyczny bioimager

BD Pathway 855™

- *komora z kontrolowanym środowiskiem do badań in vivo*
- *zintegrowany system dozowania*
- *pełny zakres widma światła wzbudzającego fluorescencję*
- *system antywibracyjny*
- *analiza obrazu „in-the-fly” dla badań kinetycznych*



Helping all people
live healthy lives

Unikalny system do konfokalnego obrazowania żywych komórek w czasie rzeczywistym

Jeżeli chcesz dowiedzieć się więcej, skontaktuj się z nami

Becton Dickinson Polska Sp. z o.o., ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

Tel.: 022 651 62 52 Faks: 022 651 75 89

Adres e-mail: amelia_niewodzka@europe.bd.com



GRAFIKA | FOTOGRAFIA | PROJEKTY 3D

www.ROBERTKUDERA.pl

<http://rcin.org.pl>

Dr Zbigniew Dauter (Fot. 1), krytalograf, specjalista w dziedzinie współczesnych problemów biologii



Fot. 1. Dr Zbigniew Dauter z prof. Michałem Kleiberem.

strukturalnej, otrzymał prestiżowy Medal im. Mikołaja Kopernika przyznawany przez Polską Akademię Nauk. Dr Dauter pracuje w Argonne National Laboratory koło Chicago, dysponującym największym źródłem synchrotronowym w USA. Jednocześnie kieruje niezależną grupą badawczą w National Cancer Institute. Wcześniej współpracował z kilkoma najlepszymi naukowymi ośrodkami zagranicznymi, tj. z Uniwersytetem w Yorku w Wielkiej Brytanii, z ośrodkiem synchrotronowym EMBL w Hamburgu, a następnie w Brookhaven w Stanach Zjednoczonych. Wyniki badań naukowych opublikował w ponad 270 artykułach, w tym 15 z nich w „Nature”, a Jego prace były cytowane ponad 10 tysięcy razy. Jego badania wniosły znaczące wartości do rozwoju biologii strukturalnej, m.in. metodę halogenkowej derywatywacji kryształów białek (zwanej metodą dauteryzacji). Profesor Andrzej Legocki, który wygłaszał laudację uzasadniającą przyznanie Medalu, przypomniał, że w Pracowni dr Dauera wielu Polaków odbyło staże naukowe, a publikacje powstawały przy współpracy z nimi. Dr Dauter jest częstym gościem spotkań naukowych w Polsce (wg serwisu Nauka w Polsce).

Zachętą dla młodzieży do rozwijania zainteresowań i pogłębiania wie-

dzy z zakresu fascynującej dziedziny, jaką jest biochemia stał się KONKURS BIOCHEMICZNY adresowany do młodzieży licealnej. I edycja Konkursu odbyła się 26 marca 2010 r. w Lublinie (Fot. 2–5). Organizatorem konkursu było III Liceum Ogólnokształcące im. Unii Lubelskiej w Lublinie, patronat merytoryczny nad konkursem objął Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Patronat honorowy objęło Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

Konkurs spotkał się z ogromnym zainteresowaniem nauczycieli i uczniów ze środowiska woj. Lubelskiego. Do konkursu zgłosiło się 195



Fot. 2. Uczniowie liceów w oczekiwaniu na wyniki.



Fot. 3. Szczęśliwe twarze uczniów po skończeniu konkursu.

uczniów z 12 szkół ponad gimnazjalnych z województwa lubelskiego (I LO, III LO, V LO, IX LO oraz XXI LO w Lublinie, I LO w Chełmie, I LO i

III LO w Puławach, I LO w Radzynie Podlaskim, I LO w Świdniku, I LO i II LO w Zamościu). Konkurs został przeprowadzony w formie pisemnej (pytania testowe, schematy i cykle do uzupełnienia i opisania, tabele do uzupełnienia, wzory strukturalne do rozpoznania, oraz pytania opisowe) i swoim zakresem obejmował między innymi budowę i charakterystykę wybranych białek, metabolizmu pierwotnego i wtórnego, podstawowe szlaki biochemiczne, współzależność procesów metabolicznych na poziomie komórki i całego organizmu oraz wybrane zagadnienia z genetyki molekularnej. Wszystkie pytania zostały opracowane przez Pana mgr Tadeusza Walczyńskiego, nauczyciela

chemii w III LO w Lublinie i równocześnie studenta V-go roku biologii, specjalność biochemia na UMCS oraz przez członków Rady Naukowej Konkursu, którą tworzyli naukowcy z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie: **prof. Teresa Jakubowicz**, kierownik Zakładu Immunologii Bezkręgowców, **dr hab. Krzysztof Grzywnowicz**, profesor nadzwyczajny w Zakładzie Biochemii, oraz **dr hab. Anna Jarosz-Wilkolażka**, adiunkt w Zakładzie Biochemii. W przerwie poprzedzającej ogłoszenie wyników, uczestnicy mieli możliwość wysłuchania wykładu Pani dr hab. Anny Jarosz-Wilkolażkiej pt.: „Od grzybni do ... kłębka – możliwość wykorzystania

uczniów, uczestnicy mieli możliwość wysłuchania wykładu Pani dr hab. Anny Jarosz-Wilkolażkiej pt.: „Od grzybni do ... kłębka – możliwość wykorzystania



Fot. 4. Wręczenie dyplomów przez Dyrektora III LO w Lublinie oraz przez członków Rady Naukowej Konkursu.

barwników grzybowych". Prezydium komisji oceniającej (dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, dr hab. Anna Jarosz-Wilkolazka) na podstawie uzyskanych wyników, wyłoniło laureatów. Nagrody (1-3 miejsca) w postaci atrakcyjnych wydawnictw książkowych o łącznej wartości ok. 1100 zł, otrzymali: **I miejsce – Krzysztof Grzechnik** z I LO w Lublinie, **II miejsce – Ewelina Rybak** z I LO w Puławach, **III miejsce – Maciej Mrowiec** z I LO w Puławach. Wyróżnienia – od I do V dostali: I wyróżnienie – Anna Pastucha z III LO w Lublinie, II wyróżnienie – Joanna Krupka z I LO w Puławach, III wyróżnienie – Sara Janowska z I LO w Puławach, IV wyróżnienie – Anastazja Gładysz z I LO w Świdniku, V wyróżnienie – Paulina Gomółka z III LO w Lublinie. Fundatorami nagród byli: Dziekan Wydziału Biologii



Fot. 5. Studenci ostatnich lat Wydziału BiNoZ w czasie sprawdzania prac uczniów.

i Nauk o Ziemi UMCS, prof. dr hab. Anna Tukiendorf; Oddział Lubelski Polskiego Towarzystwa Biochemicznego; Oddział Lubelski Polskiego Towarzystwa Chemicznego; Firma

Sigma-Aldrich oraz Lecznica dla zwierząt CHIRON WET w Lublinie. Zwycięzcom gratulujemy, ponieważ udowodnili, że naprawdę znają biochemię, a fundatorom dziękujemy za ufundowanie atrakcyjnych nagród. Gorąco podziękowania należą się rów-

nież studentom ostatnich lat wydziału BiNoZ UMCS, którzy uczestniczyli w pracach komisji oceniającej. W przyszłym roku planowana jest kolejna edycja konkursu. Serdecznie zapraszamy! (opracowanie: Anna Jarosz-Wilkolazka – UMCS Lublin, Tadeusz Walczyński – III LO w Lublinie).

Staża w laboratorium biochemicznym dla studentów i absolwentów (uczestnicy projektu „Laboratorium biotechnologiczne w praktyce – stymulowanie przedsiębiorczości akademickiej w obszarze life science”) będą mogły odbyć się w Innowacyjnym-Wdrożeniowym Laboratorium Biotechnologii i Ochrony Środowiska (Pomorski Park Naukowo-Technologiczny). Z czterotygodniowego stażu – odbywającego się w 4 cyklach – będzie mogło skorzystać po 8 studentów lub absolwentów nauk przyrodniczych. Zajęcia przygotowano dla 3 grup studenckich i 1 grupy absolwentów.

Aktualny termin zgłoszeń dwóch pierwszych edycji minął 15 maja, a dla dwóch kolejnych edycji trwa do 15 sierpnia i 10 grudnia. Staże studenckie odbędą się na przeło-

mie czerwca i lipca oraz we wrześniu, a grupa absolwentów będzie uczyła się w październiku. Ostatni staż potrwa od połowy stycznia do połowy lutego 2011 r. W każdej grupie uczestnicy zapoznają się z praktycznymi aspektami pracy w laboratorium biotechnologicznym i dowiedzą się, jak stosować niektóre rozwiązane technologiczne i analityczne w przemyśle, a także jakie są ekonomiczne aspekty realizacji projektów. Uczestnicy stażów zdobędą wiedzę na temat wdrażania wyników badań w praktyce i ich komercjalizacji i praktyczne umiejętności. Poznają również zasady funkcjonowania laboratorium: od zaprojektowania doświadczenia, poprzez samodzielne wykonanie, aż do analizy wyników. W ramach seminariów stażyści poznają podstawy ochrony własności intelektualnej, możliwości finansowania projektów wdrożeniowych, dowiedzą się, jakie są źródła informacji patentowej. Podczas zajęć praktycznych w laboratorium każdy uczestnik wybierze jedną ze „ścieżek”, w której chciałby przeprowadzić badania. Stażyści mogą wybierać m.in. spośród dziedzin takich jak: oczyszczanie białek rekombinowanych; prowadzenie kultur tkankowych: roślinnych i zwierzęcych w warunkach *in vitro*; diagnostyka molekularna oparta o analizę DNA przy użyciu techniki PCR; klonowanie genów do układów ekspresyjnych w celu uzyskania heterologicznego białka. Osoby zainteresowane tą formą zajęć powinny pobrać ze strony www.pppt.gdynia.pl i wypełnić formularz zgłoszeniowy, a następnie wysłać go na jeden z adresów mailowych wskazanych przez organizatorów. Szczegółowe informacje na temat projektu są dostępne na stronie: www.pppt.gdynia.pl. (wg serwisu Nauka w Polsce).

Kilkanaście osób odebrało 19 kwietnia 2010 r. „Łódzkie Eureka” – prestiżowe wyróżnienia, popularyzujące działalność łódzkich naukowców i twórców, a przyznawane za wybitne osiągnięcia naukowe, artystyczne i techniczne. Uroczystość wręczenia nagród odbyła się podczas

inauguracji X Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Filharmonii Łódzkiej. Tegorocznymi laureatami zostali:

– prof. dr hab. Włodzimierz Bednarek, dr Dorota Sobczyńska, dr Agnieszka Sierpowska-Bartosik, mgr Julian Sitarek z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej, Uniwersytetu Łódzkiego za „Obserwacje i modelowanie emisji gamma ze źródeł kosmicznych”. Naukowcy otrzymali Nagrodę Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2009 r.;

– mgr inż. Damian Krzesimowski, dr hab. Zygmunt Ciota, prof. dr hab. Andrzej Napieralski z Katedry Mikroelektroniki i Techniki Informatycznych Politechniki Łódzkiej za „System monitorowania postępu leczenia udarów mózgu na podstawie analizy głosu”.

Wymienione osoby otrzymały złoty medal i Grand Prix na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków Brussels Innova 2009, w Brukseli;

– prof. dr hab. Edward Rybicki, dr inż. Edyta Matyjas-Zgondek, mgr inż. Anna Bacciarelli z Instytutu Architektury Tekstyliów, Politechniki Łódzkiej za „Tekstylię wykończoną nanosrebrem”, która to praca została nagrodzona złotym medalem na targach wynalazków International Trade Fair for Technological Innovation Eureka, Bruksela 2009;

– dr hab. Dariusz Kaca z ASP, nagrodzony na 6. Międzynarodowym Festiwalu Grafiki Artystycznej w Evora (Portugalia) w 2009 r.;

– mgr Artur Zagajewski z Katedry Kompozycji Akademii Muzycznej w Łodzi im. G. i K. Bacewiczów za nagrodę w Konkursie Twórczości Audiowizualnej i Elektroakustycznej

„in-OUT-side” w ramach Sound Screen Festival w Bydgoszczy za utwór „Re-cykl III”; III nagrodę za kompozycie „unhum” w III Międzynarodowym Konkursie Kompozytorskim im. G. Bacewicz; II nagrodę za utwór „Liście” w 50 Konkursie Młodych Kompozytorów im. Tadeusza Bairda.

– prof. dr hab. Marian Mikołajczyk z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, który otrzymał Międzynarodową Nagrodę im. Arbuzowych 2009 przyznaną przez Prezydenta Republiki

Polskę podczas konkursu organizowanego przez ministerstwo edukacji Indonezji i Gubernatora wyspy Bali. W konferencji uczestniczył prezydent Europejskiego Towarzystwa Fizycznego prof. dr hab. Maciej Kolwas. Złotym medalistą w kategorii „fizyka” został Jakub Polewka z Chorzowa. Licencja zbadana efekt zwany kieszenią powietrzną. Zaobserwował, że podczas dmuchania na powierzchnię wody strumieniem powietrza powstaje w niej dołek. Przygotowując projekt wykonał dużo doświadczeń. Wykorzystał do nich sprzęt laboratoryjny, a także



Fot. 6. Laureaci międzynarodowego konkursu dla młodzieży z fizyki z wizytą na Bali.

Tatarstanu w uznaniu wybitnych osiągnięć w rozwoju badań chemii fosforu;

– dr inż. Zdzisław Czaplicki z Oddziału Łódzkiego Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich za „Wysoko skuteczne kompozytowe włókniny filtracyjne z węglem aktywnym”. Wynalazek zaprezentowano w 2009 r. na wystawach w Warszawie, Brukseli, Taipei i Seulu i na wszystkich uzyskał złote medale (wg serwisu Nauka w Polsce).

Medale i wyróżnienia przywieźli młodzi Polacy z XVII Międzynarodowej Konferencji Młodych Naukowców (ICYS 2010), która odbyła się w dniach 12-17 kwietnia w Indonezji. Grupa Twórcza Quark (Fot. 6) pracownicy Pałacu Młodzieży w Katowicach, pod opieką fizyka Urszuli Woźnikowskiej-Bezak, reprezentowała

przedmioty codziennego użytku, takie jak suszarka do włosów i lejek kuchenny. Srebrny medal w kategorii „ekologia – fizyka środowiska” zdobyła Ilona Grzyb z Bolesławca. Zajęła się termomodernizacją - sposobami redukcji kosztów ocieplania i efektu cieplarnianego. W tej samej kategorii brąz wywalczyła Aleksandra Książek z Dębicy, której prezentacja nosi tytuł „Żarówkowa (r)ewolucja”. W kategorii „fizyka inżynierska” brązowy medal zdobyli Bartosz Moczala i Paweł Śmieja z Wodzisławia, którzy zajęli się bezprzewodowym przesyłaniem energii elektrycznej. Poza tym, wyróżnienia specjalne odebrali: Tomasz Kumor z Katowic (Fizyka łazienkowa: błona i bańki mydlane), Mateusz Górecki z Katowic (Pomiary sił aerodynamicznych profilu lotniczego skrzydła), Wioleta Kuczera z Rybnika (Anemometr) oraz Jakub Lubomirski z Wielunia (Zeroemisyjne technologie węgla – co zrobić z CO₂). W konferencji uczestniczyli pracownicy Pałacu Młodzieży w Katowicach: fizyk Anna Kazura i informatyk Adam Pucia. W pracach jury brała udział prof. dr hab. Krystyna Kolwas z PAN (wg serwisu Nauka w Polsce).

pod redakcją Teresy Wesołowskiej

PROFESOR ZOFIA MARTA ZIELIŃSKA OBCHODZI 95-TE URODZINY



SZANOWNI PAŃSTWO,

W tym roku Pani profesor Zofia Zielińska obchodzi swoje dziewięćdziesiąte piąte urodziny. Czytelnikom „Postępów Biochemii” przypo-

minamy, że od 1947 r. do przejścia na emeryturę w 1986 r. Pani profesor Zielińska pracowała w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcellego Nenckiego początkowo w Łodzi, a od jesieni 1955 r. w Warszawie. W Instytucie otrzymała stopień naukowy i stanowisko docenta, a także tytuł profesora nadzwyczajnego nauk przyrodniczych w 1966 r. i profesora zwyczajnego w 1972 r. Od roku 1971 była długoletnim kierownikiem Zakładu Biochemii Komórki. Na szczególne podkreślenie zasługuje działalność Pani profesor Zofii Zielińskiej w Polskim Towarzystwie Biochemicznym, którego członkiem zwyczajnym jest od 1958 r., a honorowym od 1983 r. Od 1959 r. uczestniczyła w pracach najpierw Zarządu Oddziału Warszawskiego, następnie Zarządu Głównego, będąc kolejno Sekretarzem, Wiceprezesem i przez dwie kadencje Prezesem tego Towarzystwa, a także przez szereg lat pełnomocnikiem Zarządu Głównego ds. wydawniczych. W okresie 1973–2000 była Redaktorem Na-

czelnym kwartalnika „Postępy Biochemii” a do dziś jest Redaktorem Seniosem naszego czasopisma. Pod redakcją Pani profesor Zofii Zielińskiej ukazało się 28 tomów kwartalnika. Prócz artykułów monograficznych z różnych dziedzin biochemii i biologii molekularnej w „Postęпах Biochemii” publikowano zbiory reguł polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje książek, liczne materiały biograficzne i sprawozdania. Jej osobistemu zaangażowaniu i życzliwej pomocy młodym i starszym autorom w pisaniu artykułów, „Postępy Biochemii” zawdzięczają swój wysoki poziom i rangę naukową. Swoją pracą Pani profesor Zofia Zielińska przyczyniła się do kształcenia polskich biochemików i biologów, dla których jest wciąż niepodważalnym autorytetem w wielu kwestiach lingwistycznych.

Zdrowia i uśmiechu,

życzą Koledzy i Przyjaciele z Redakcji „Postępów Biochemii”

VIII Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa

Kolejna, VIII Konferencja im. Parnasa odbędzie się w dniach 27–31 sierpnia 2011 r. w Warszawie. Głównymi organizatorami Konferencji są Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Ukraińskie Towarzystwo Biochemiczne oraz, po raz pierwszy, Izraelskie Towarzystwo Biochemii i Biologii Molekularnej. W organizacji Konferencji uczestniczą również Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN oraz Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Patronat nad Konferencją objęli Radosław Sikorski, Minister Spraw Zagranicznych i prof. Barbara Kudrycka, Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Przewodniczącym Komitetu Naukowego jest prof. Andrzej Dżugaj, prezes PTBioch, zaś Komitetowi Organizacyjnemu przewodniczy doc. Maria Jolanta Rędownicz, sekretarz Towarzystwa.

W skład Komitetu Naukowego wchodzi przedstawiciele każdego z Towarzystw. Stronę izraelską reprezentują prof. Michael Eisenbach (prezes Izraelskiego Towarzystwa), prof. Shimon Schuldiner i prof. Orna Elroy-Stein, stronę ukraińską prof. Serhij Komisarenko (prezes Ukraińskiego Towarzystwa), prof. Ganna Elska i prof. Sergey Kosterin, zaś stronę polską prof. Leszek Kaczmarek, prof. Jacek Kuźnicki i prof. Maciej Żylicz. Udział w Konferencji potwierdziło dwoje noblistów, prof. Ada Yonath i prof. Aaron Ciechanover. Planowane są następujące sesje naukowe: I. Protein structure (podsesje: Transporters in adaptation to hostile environments oraz Protein structure and function); II. Regulation of gene expression (podsesje: Expression control *via* non-coding RNA, Bioinformatics for gene expression i Gene expression and brain disease); III. Calcium in signaling; IV. Guidance mechanisms of cells; V. Post-transcriptional regulation. W programie Konferencji przewidziane jest również Forum Młodych, integrujące młodych badaczy z Izraela, Ukrainy i Polski. Zapraszamy Państwa do uczestnictwa w Konferencji. Wkrótce uruchomiona zostanie strona Konferencji, proszę śledzić stronę PTBioch — www.ptbioch.edu.pl.

Jolanta Rędownicz

Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

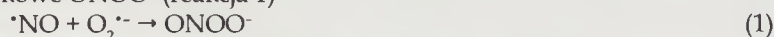
Nadtlenoazotyn jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny

STRESZCZENIE

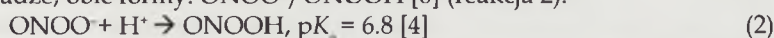
Nadtlenoazotyn tworzący się *in vivo* w warunkach stresu oksydacyjnego, w kontrolowanej dyfuzyjnie reakcji między $\cdot\text{NO}$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$, jest silnym utleniaczem i czynnikiem nitrującym. Uważa się, że może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób takich jak: cukrzyca, schorzenia kardiologiczne czy neurodegeneracyjne. Do tej pory poznano kilka fizjologicznych dróg detoksyfikacji nadtlenoazotynu. Do naturalnych katalizatorów rozkładu nadtlenoazotynu należą między innymi peroksyredoksyny, katalaza, niektóre peroksydazy, methemoglobina i metmioglobina. Prowadzi się również badania nad syntetycznymi związkami skutecznymi w osłabianiu toksycznego działania nadtlenoazotynu. Obiecujące wyniki otrzymano dla Mn(II), Mn(III) i Fe(III)-porfiryń.

WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE NADTLENOAZOTYNU

W żywych organizmach zachowana jest równowaga pomiędzy produkcją a usuwaniem tak zwanych reaktywnych form tlenu i azotu. Równowaga ta zostaje naruszona w warunkach stresu oksydacyjnego. Wtedy na skutek odpowiedzi immunologicznej, między innymi makrofagów, następuje wzmożona produkcja tlenu azotu ($\cdot\text{NO}$) oraz anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Mimo, że te dwa rodniki generalnie nie są zbyt reaktywne, reagują ze sobą ze stałą szybkości kontrolowaną dyfuzyjnie $(3,8-19,0) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [1-5], dając indywiduum nierodnikowe ONOO^- (reakcja 1)



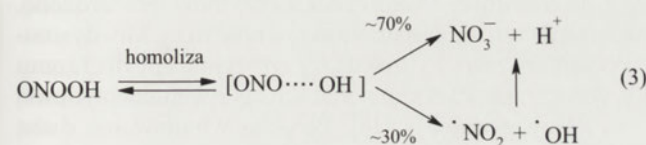
Anion ten jest w równowadze ze swoją formą sprotonowaną, kwasem nadtlenoazotawym. Terminem „nadtlenoazotyn” określa się, będące ze sobą w równowadze, obie formy: $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ [6] (reakcja 2):



W 1990 roku Beckman i współpracownicy stwierdzili, że nadtlenoazotyn powstaje w stanach zapalnych, podczas zwiększonego tempa wewnątrzkomórkowej produkcji tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego [7]. Oszacowano, że podczas gdy w warunkach fizjologicznych udział $\text{O}_2^{\cdot-}$ w reakcji tworzenia nadtlenoazotynu w stosunku do reakcji jego dysmutacji przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) wynosi 1:125, w warunkach patologicznych stosunek ten zmienia się drastycznie i może wynosić nawet 8:1 [8].

Nadtlenoazotyn jest silnym utleniaczem, mogącym utleniać cząsteczki zarówno na drodze jednoelektronowej [$E^\circ(\text{ONOOH}, \text{H}^+/\cdot\text{NO}_2, \text{H}_2\text{O}) = 1.6 \pm 0.1 \text{ V}$], jak i dwuelektronowej [$E^\circ(\text{ONOOH}, \text{H}^+/\text{NO}_2^-, \text{H}_2\text{O}) = 1.3 \pm 0.1 \text{ V}$] [9]. Reaktywność nadtlenoazotynu jest złożona i bardzo silnie zależy od pH. Anion nadtlenoazotawy (ONOO^-) w nieobecności substratów jest stosunkowo trwały i ulega powolnemu rozkładowi do azotynu i tlenu [10]. Natomiast kwas nadtlenoazotawy (ONOOH) jest nietrwały i szybko izomeryzuje do azotanu, ($k_{\text{HA}} = 1.2 \text{ s}^{-1}$ w 25°C [9]. Wraz ze spadkiem wartości pH rośnie udział formy ONOOH , a w konsekwencji wzrasta szybkość izomeryzacji nadtlenoazotynu.

Uważa się, że cząsteczka ONOOH ulega homolizie z rozerwaniem wiązania O-O tworząc parę rodnikową: $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$, zamkniętą w swoistej klatce, otoczonej cząsteczkami wody. Para $\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$ może następnie dyfundować na zewnątrz klatki (co zachodzi w ok. 30% przypadków) lub bezpośrednio rekombinować do NO_3^- (tej reakcji ulega ok. 70% par rodnikowych) (reakcja 3) [11].



Lidia Gębicka 

Joanna Didik

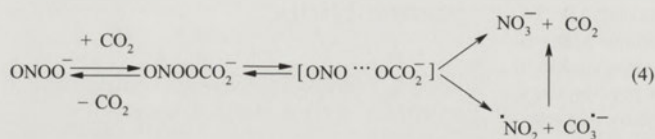
Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, Łódź

 Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, ul. Wróblewskiego 15, 93-590 Łódź; tel.: 42 6313160, e-mail: lgebicka@mitr.p.lodz.pl

Artykuł otrzymano 22 lutego 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 1 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: białka hemowe, nadtlenoazotyn, peroksyredoksyny, porfiryń, rodniki tlenowe, stres oksydacyjny

Nadtlenoazotyn reaguje z ditlenkiem węgla(IV) (CO_2) ze stałą szybkości $5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ w temperaturze 37°C [12]. Ze względu na wysokie stężenie CO_2 (1,3–1,5 mM) w komórkach i płynach pozakomórkowych jest on jednym z najważniejszych *in vivo* substratów dla nadtlenoazotynu. Nietrwałym produktem tej reakcji jest addukt ONOOCO_2^- , który ulega rozkładowi do azotanu i CO_2 , częściowo z wytworzeniem produktów rodnikowych: $\text{CO}_3^{\cdot-}$ i $\cdot\text{NO}_2$ (reakcja 4).



Wydajność tworzenia rodników podczas rozpadu ONOOCO_2^- jest dyskutowana. Większość doświadczeń wskazuje na to, że addukt nadtlenoazotynu z CO_2 w około 65% rozpada się bezpośrednio do NO_3^- i CO_2 , natomiast w 35% do rodników $\text{CO}_3^{\cdot-}$ i $\cdot\text{NO}_2$ [13].

REAKCJE NADTLENOAZOTYNU ZE ZWIĄZKAMI BIOLOGICZNIE WAŻNYMI

Reakcje, w których uczestniczy nadtlenoazotyn można podzielić na trzy grupy: [11]:
 bezpośrednie reakcje redoks,
 reakcje z CO_2 ,
 reakcje poprzez rodnikowe produkty rozkładu ONOOH ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$) i ONOOCO_2^- ($\cdot\text{NO}_2/\text{CO}_3^{\cdot-}$).

Nadtlenoazotyn oraz produkty pośrednie jego izomeryzacji lub reakcji z CO_2 mogą utleniać różne związki chemiczne. W przypadku bezpośredniego utleniania cząsteczek przez nadtlenoazotyn reakcja jest pierwszego rzędu zarówno względem nadtlenoazotynu, jak i substratu, zaś w drugim przypadku etapem limitującym szybkość reakcji jest przekształcenie nadtlenoazotynu w formy bogatsze energetycznie, parę rodnikową ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$) lub, w obecności CO_2 , parę rodnikową ($\text{CO}_3^{\cdot-}/\cdot\text{NO}_2$). Tak więc reakcja jest pierwszego rzędu względem nadtlenoazotynu i zerowego rzędu względem substratu [14].

Biorąc pod uwagę stężenia *in vivo* różnych biocząsteczek i stałe szybkości ich reakcji z $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$, szacuje się, że w komórce nadtlenoazotyn reaguje przede wszystkim z białkami oraz z CO_2 . Niskocząsteczkowe antyoksydanty mają niewielki udział w reakcjach nadtlenoazotynu. Znikoma część nadtlenoazotynu (ok. 1%) izomeryzuje z utworzeniem rodników $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{NO}_2$ [15].

Bezpośrednie reakcje nadtlenoazotynu z białkami dotyczą tylko trzech reszt aminokwasowych: cysteiny, metioniny i tryptofanu. Stałe szybkości reakcji $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ z tymi resztami aminokwasowymi wynoszą odpowiednio $4,5 \times 10^3$, $1,7\text{--}1,8 \times 10^2$ oraz $37,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ w pH 7,4 i 37°C [16]. Inne reszty aminokwasowe (przede wszystkim reszty tyrozyny, fenyloalaniny, histydyny) są modyfikowane przez produkty rodnikowe rozkładu nadtlenoazotynu: $\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$ lub $\text{CO}_3^{\cdot-}/\cdot\text{NO}_2$ w obecności CO_2 . Konsekwencją tych reakcji

jest utlenienie, nitrowanie (reszty tyrozyny i tryptofanu) lub nitrozowanie reszt aminokwasowych (reszta cysteiny) [15].

Produktami dwuelektronowego utlenienia reszty cysteiny i innych związków tiolowych (jak np. glutation czy albumina) przez nadtlenoazotyn są odpowiednie związki disiarczkowe [17]. Powstawanie wiązań disiarczkowych może być istotnym mechanizmem inaktywacji wielu enzymów, np. kinazy kreatynowej, dehydrogenazy alkoholowej, ATPazy wapniowej, hydroksylazy: tyrozyny i tryptofanu, fosfatazy tyrozynowej czy akonitazy [18]. Reakcja nadtlenoazotynu z grupami tiolowymi może również prowadzić do wytworzenia S-nitrotioli (RSNO_2) oraz S-nitrozotioli (RSNO) [18]. Nadtlenoazotyn może również utleniać tiole jednoelektronowo, przez produkty rodnikowe swego rozkładu ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$). Wówczas produktem przejściowym reakcji są odpowiednie rodniki tiolowe (RS^\cdot) [19].

Nadtlenoazotyn utlenia metioninę zarówno w procesach jedno-, jak i dwuelektronowych [20]. Jednoelektronowe utlenienie metioniny prowadzi do fragmentacji aminokwasu i wydzielania etylenu. W wyniku dwuelektronowego utlenienia powstaje sulfotlenek metioniny (MetSO). Modyfikacje reszt metioniny w wyniku reakcji z nadtlenoazotynem prowadzą do inaktywacji niektórych białek i enzymów, np.: α -1-antyproteinazy, kalmoduliny, czy syntetazy glutaminy u *Escherischia coli* [21]

Charakterystyczną reakcją dla nadtlenoazotynu jest nitrowanie tyrozyny. Przez długi czas nitrowanie reszt tyrozylowych białek uważano za swoisty marker aktywności nadtlenoazotynu *in vivo*. Późniejsze doświadczenia wykazały jednak, że nitrowanie tyrozyny może zachodzić bez udziałem nadtlenoazotynu. Stwierdzono tworzenie się 3-nitrotyrozyny podczas utlenienia NO_2^- do $\cdot\text{NO}_2$ w obecności H_2O_2 w reakcjach katalizowanych przez różne enzymy (głównie peroksydazy hemowe) [22]. Nitrowanie reszty tyrozyny obserwowano również w innej reakcji katalizowanej przez mieloperoksydazę. Enzym ten w obecności H_2O_2 utlenia jony Cl^- do HOCl , który reagując z NO_2^- tworzy chlorek nitrylu (NO_2Cl), związek wykazujący silne właściwości nitrujące [23].

Reszta tyrozyny nie reaguje bezpośrednio z nadtlenoazotynem, lecz z rodnikowymi produktami jego rozkładu w nieobecności i w obecności CO_2 : $\cdot\text{OH}$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\cdot\text{NO}_2$ [24]. Wydajność nitrowania reszty tyrozyny przez nadtlenoazotyn jest większa w obecności CO_2 [25,26]. Rodniki $\text{CO}_3^{\cdot-}$ reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie wodoru z grupy hydroksylowej, natomiast w odróżnieniu od rodników $\cdot\text{OH}$, nie przyłączają się do pierścienia aromatycznego. Stąd też, może powstawać więcej rodników tyrozylowych, które następnie ulegną rekombinacji z $\cdot\text{NO}_2$ tworząc nitrotyrozinę. Co prawda rodniki $\cdot\text{NO}_2$ również reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie atomu wodoru z grupy hydroksylowej, jednak stała szybkości tej reakcji jest 2–3 rzędy wielkości mniejsza od stałej szybkości reakcji rodników $\cdot\text{OH}$ czy $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [13]. Nitrowanie tyrozyny może prowadzić do dysfunkcji wielu białek i enzymów. Stwierdzono, że nitrowanie tyrozyny hamuje aktywność m.in. Mn-dysmutazy ponadtlenkowej, hydroksylazy tyrozynowej, cytochromu P450, syntazy prostacykliny, reduktazy rybonukleotydowej czy syntetazy glutaminy [18]. Ponadto wbudowanie dużej przestrzennie grupy NO_2 do reszty tyrozyny może wywo-

ływać steryczne i elektronowe zaburzenie, a to z kolei może wpływać na funkcje reszty tyrozyny w reakcjach przeniesienia elektronu i utrzymaniu struktury białek [15].

Reszta tryptofanu reaguje bezpośrednio z nadtlendioazotynem, lecz może być również modyfikowana przez rodnikowe produkty jego rozkładu [15]. Wydajność nitrowania tryptofanu, jak i powstawania rodników tryptofanowych zdecydowanie wzrasta w obecności CO_2 [27]. Reszty nitrotryptofanowe zidentyfikowano *in vitro* w Cu, Zn-SOD, mioglobinie i hemoglobinie poddanych działaniu nadtlendioazotynu [28,29].

Nadtlenoazotyn modyfikuje DNA poprzez reakcje nitrowania i utleniania, przy czym głównym celem ataku jest deoksyguanina (dG). Reakcja izolowanego DNA z ONOO⁻/ONOOH prowadzi do utworzenia 8-oksoguaniny oraz 8-nitroguaniny, z których ta ostatnia jest specyficznym markerem aktywności nadtlendioazotynu w DNA [30]. Stwierdzono, że inne związki o charakterze nitrującym, jak HNO_3 , $\text{C}(\text{NO}_2)_4$ oraz cząsteczki uwalniające $\cdot\text{NO}$ nie tworzą 8-nitroguaniny w reakcjach z DNA. Obecność CO_2 w układzie zwiększa (około 6-krotnie) tworzenie się 8-nitroguaniny. Potraktowanie plazmidowego DNA nadtlendioazotynem o małym stężeniu (1 μM) powoduje rozerwanie pojedynczej nici DNA [31]. Stwierdzono, że do datek CO_2 hamuje rozcięcie nici DNA, co sugeruje, że za jej uszkodzenie odpowiedzialny jest ONOOH [32]. Indukowane przez nadtlendioazotyn pęknięcia nici DNA aktywują enzym naprawczy, syntazę poli(ADP)-rybozy (PARS). Nadmierna aktywacja PARS może prowadzić do szybkiego zużycia NAD^+ i ATP, a w konsekwencji do zaburzenia funkcji komórki i jej śmierci na drodze apoptozy, bądź nekrozy [33].

Wykazano, że nadtlendioazotyn może inicjować wolnorodnikowe utlenianie lipidów, co w rezultacie prowadzi do powstania wodoronadtlenków lipidów, dienów, aldehydów, a nawet znitrowanych kwasów tłuszczowych [34]. Obecność CO_2 hamuje nitrowanie i utlenianie kwasu linoleinowego przez nadtlendioazotyn [35].

Powstawanie nadtlendioazotynu w stanach zapalnych wiąże się z licznymi uszkodzeniami tkanek. Nadtlendioazotyn modyfikuje cząsteczki odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie komórek, zaburzając tym samym komórkową homeostazę. Postuluje się udział nadtlendioazotynu w przebiegu wielu chorób takich jak: cukrzyca, schorzenia kardiologiczne czy neurodegeneracyjne [36,37].

DETOKSYFIKACJA NADTLENOAZOTYNU

Z uwagi na cytotoksyczne działanie nadtlendioazotynu trwają badania nad poszukiwaniem związków o działaniu detoksyfikującym ONOO⁻/ONOOH. Związki takie powinny posiadać następujące właściwości: (i) reagować na tyle szybko z nadtlendioazotynem, aby ten nie zdążył przereagować z ważną biologicznie „tarczą” (iloczyn stałej szybkości reakcji nadtlendioazotynu ze zmiataczem i stężenia zmiatacza powinien być wyraźnie większy od iloczynu stałej szybkości reakcji nadtlendioazotynu z „tarczą” i jej stężenia w danym przedziale komórkowym), (ii) reakcja powinna mieć charakter katalityczny, (iii) produkty powstałe w wyniku tej reakcji nie powinny być toksyczne [37]. Pośród związków występujących naturalnie w organizmach takimi właściwościami cha-

rakteryzują się katalaza [38], peroksydazy hemowe [39,40], peroksydaza glutationowa (zawierająca selen) [41], metmioglobina, methemoglobina [42] oraz peroksyredoksyny [43]. Te ostatnie, z uwagi na ich duże stałe szybkości reakcji z nadtlendioazotynem oraz stosunkowo duże lokalne stężenia, są postrzegane jako najbardziej efektywne naturalne zmiatacze nadtlendioazotynu poznane do tej pory [44].

Prowadzi się również badania nad syntetycznymi związkami które można by zastosować w celu wzmocnienia detoksyfikacji nadtlendioazotynu. Stwierdzono, że Mn(III) i Mn(II), Fe(III)-porfiryny są efektywne w zmiataniu nadtlendioazotynu, przy czym w przypadku porfiryn manganowych w cyklu katalitycznym muszą jeszcze uczestniczyć reduktanty, na przykład kwas askorbinowy lub glutation [44]. Innym syntetycznym związkiem zmiatającym katalitycznie nadtlendioazotyn *in vitro* jest ebselen, selenoorganiczny związek rozpuszczalny w lipidach, wykazujący aktywność peroksydazy glutationowej. Jednakże *in vivo* tworzy on addukty z tiolami i jego wysoka reaktywność z nadtlendioazotynem jest wątpliwa [37].

PODSUMOWANIE

Nadtlenoazotyn tworzy się w stresie oksydacyjnym i jest odpowiedzialny za uszkodzenia różnych związków ważnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju wielu chorób. W związku z tym prowadzone są intensywne badania nie tylko nad poznaniem fizjologicznych dróg detoksyfikacji nadtlendioazotynu lecz również nad syntetycznymi związkami osłabiającymi toksyczne działanie nadtlendioazotynu.

PIŚMIENNICTWO

1. Kobayashi K, Miki M, Tagawa J (1995) Pulse-radiolysis study of the reaction of nitric oxide with superoxide. *J Chem Soc Dalton Trans* 17: 2885-2889
2. Goldstein S, Czapski G (1995) The reaction of $\cdot\text{NO}$ with $\text{O}_2^{\cdot-}$ and HO_2^{\cdot} : A pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 19: 505-510
3. Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199
4. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol* 10: 1285-1292
5. Nauser T, Koppenol WH (2002) The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: approaching the diffusion limit. *J Phys Chem A* 106: 4084-4086
6. Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-L722
7. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624
8. Kissner R, Nauser T, Kury C, Koppenol WH (2003) Peroxynitrous acid – where is the hydroxyl radical? *IUBMB Life* 55: 567-572
9. Koppenol WH, Kissner R (1998) Can $\text{O}=\text{NOOH}$ undergo homolysis? *Chem Res Toxicol* 11: 87-90
10. Pfeiffer S, Gorren ACF, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B (1997) Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. *J Biol Chem* 272: 3465-3470
11. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30: 463-488

12. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R (1996) Peroxynitrite reactions with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333: 49–58
13. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CCX, Menzeles de L (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32: 841–859
14. Goldstein S, Squadrito GL, Pryor WA, Czapski G (1996) Direct and indirect oxidation by peroxynitrite neither involving the hydroxyl radical. *Free Radic Biol Med* 21: 965–974
15. Alvarez B, Radi R (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and protein. *Amino Acids* 25: 295–311
16. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA, Radi R (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* 274: 842–848
17. Trujillo M, Radi R (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch Biochem Biophys* 397: 91–98
18. Denicola A, Radi R (2005) Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 208: 273–288
19. Balazy M, Kaminski PM, Mao K, Tan J, Wolin MS (1998) S-nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J Biol Chem* 273: 32009–32015
20. Pryor WH, Jin X, Squadrito GL (1994) One and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11173–11177
21. Ducrocq C, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci* 55: 1068–1077
22. Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, de Groot H (2002) The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol Chem* 383: 389–399
23. Eiserich J, Cross C, Johnes A, Halliwell B, Vilet A (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 271: 19199–19208
24. Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4003–4008
25. Lyman SV, Jiang Q, Hurst JK (1996) Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry* 35: 7855–7861
26. Santos CXC, Bonini MG, Augusto O (2000) Role of the carbonate radical in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 377: 146–152
27. Alvarez B, Rubbo H, Kirk M, Barnes S, Freeman BA, Radi R (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* 9: 390–396
28. Yamakura F, Matsumoto T, Fujimura T, Taka H, Murayama K, Imai T, Uchida K (2001) Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate. *Biochim Biophys Acta* 1548: 38–46
29. Herold S, Shivashankar K, Mehl M (2002) Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. *Biochemistry* 41: 13460–13472
30. Szabo C, Ohshima H (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1: 373–385
31. Rubio J, Yermilov V, Ohshima H (1996) DNA damage induced by peroxynitrite: formation of 8-nitroguanine and base propenals. W: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA (red) *The Biology of Nitric Oxide* 5, Portland Press, London str. 34
32. Yermilov V, Yoshie Y, Rubio J, Ohshima H (1996) Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett* 399: 67–70
33. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salman AL (1996) DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1753–1758
34. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481–487
35. Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Kirshna RN, Kirk M, Barnes S, Usmar-Dareley VM, Frejman BA (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide and nitronium ion. *Chem Res Toxicol* 12: 83–92
36. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 662–68
37. Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R (2008) Peroxynitrite detoxification and its biological implications. *Antioxid Redox Sign* 10: 1–13
38. Gebicka L, Didik J (2009) Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J Inorg Biochem* 103: 1375–1379
39. Gebicka L, Didik J (2007) Kinetic studies of the reaction of heme-thiolate enzyme chloroperoxidase with peroxynitrite. *J Inorg Biochem* 101: 159–164
40. Gebicka L, Didik J (2010) Catalytic scavenging of peroxynitrite by lactoperoxidase in the absence and presence of bicarbonate. *Free Radic Res* 44: 217–223
41. Briviba K, Kissner R, Koppenol WH, Sies H (1998) Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 11: 1398–1401
42. Herold S, Shivashankar K (2003) Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. *Biochemistry* 42: 14036–14046
43. Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Radi R (2008) Kinetic studies of peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. *Methods Enzymol* 441: 173–196
44. Ferrero-Sueta G, Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion and radicals. *Chem Biol* 4: 161–177

Oxidative stress induced by peroxynitrite

Lidia Gębicka[✉], Joanna Didik

Institute of Applied Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Technical University of Lodz, 15 Wroblewskiego St., 93–590 Lodz, Poland

[✉]e-mail: lgebicka@mitr.p.lodz.pl

Key words: heme proteins, oxidative stress, oxygen radicals, peroxiredoxin, peroxynitrite, porphyrins

ABSTRACT

Peroxynitrite which is formed *in vivo* under oxidative stress in a diffusion-controlled reaction between $\cdot\text{NO}$ and O_2^- is a strong oxidizing and nitrating agent. It has been suggested that peroxynitrite is involved in the development of a variety of pathological conditions including diabetes, cardiovascular and neurodegenerative disorders. Several physiological routes for peroxynitrite decomposition have been found up to date. Among natural catalytical scavengers of peroxynitrite are peroxiredoxins, catalase, some peroxidases, methemoglobin and myoglobin. Reactions with synthetic peroxynitrite scavengers have been also studied. Successful results have been obtained for Mn(II), Mn(III) and Fe(III)-porphyrin.

Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu

STRESZCZENIE

Od mniej więcej dwóch dekad wiadomo, że tlenek azotu reguluje wiele czynności życiowych tak zwierząt, jak i roślin. Lista procesów regulowanych przez NO stale się rozszerza, powoli też zaczynamy rozumieć mechanizmy działania tej niewielkiej cząsteczki. Tlenek azotu może działać poprzez addycję do jonów metali przejściowych, które są ko-faktorami białek; w ten sposób zmienia aktywność cytoplazmatycznej cyklazy guanylowej. Ostatnio coraz częściej są jednak badane bezpośrednie modyfikacje strukturalne reszt aminokwasów wchodzących w skład łańcuchów polipeptydowych. Szczególne znaczenie przypisuje się modyfikacjom reszt cysteiny (S-nitrozylacja) oraz tyrozyny (nitracja), które zaczynają być postrzegane jako modyfikacje o znaczeniu sygnałowym. Wiadomo, że zmieniają one aktywności licznych białek. W niniejszej pracy dyskutujemy, na ile modyfikacje te spełniają warunki, które pozwoliłyby uznać je za modyfikacje o znaczeniu sygnałowym oraz przedstawiamy dostępne metody ich analizy i identyfikacji modyfikowanych białek.

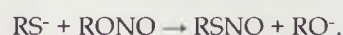
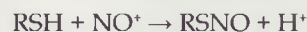
WPROWADZENIE

Jako składnik dymu papierosowego czy też spalin samochodowych tlenek azotu działa niekorzystnie na organizmy żywe, powodując liczne uszkodzenia DNA, białek i lipidów. Od dłuższego czasu wiadomo jednak, że jest on uwikłany w regulację wielu procesów biologicznych [1]. Przełomem w badaniach NO okazały się analizy, w których wykazano jego udział w procesie relaksacji naczyń krwionośnych. Za owo osiągnięcie przyznano w roku 1998 roku Nagrodę Nobla w zakresie fizjologii i medycyny. Rok ten okazał się również przełomowy w badaniach roli NO w roślinach; wykazano bowiem wtedy, że NO uczestniczy w reakcjach obronnych roślin na infekcję patogenną [2,3]. Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że NO wpływa na sygnalizację neuronalną, procesy tworzenia pamięci i uczenia się [4], procesy immunologiczne [5] i apoptozę [6]. U roślin reguluje tak różne procesy, jak otwieranie aparatów szparkowych [7], odpowiedź grawitropową [8] czy kiełkowanie nasion [9]. Pełni istotną rolę w programowanej śmierci komórek (PCD) [10], jest ważnym elementem szlaków sygnałowych, często krzyżujących się ze szlakami sygnalizacji hormonalnej [7,10]. Można powiedzieć, że u roślin funkcjonuje, do pewnego stopnia, jako drugi, obok etylenu, gazowy hormon roślinny.

WŁAŚCIWOŚCI TLENKU AZOTU

Tlenek azotu to niewielka i silnie reaktywna cząsteczka o charakterze rodnika o czasie półtrwania rzędu 6 s. Może penetrować błony biologiczne i działać nawet na stosunkowo dużych odległościach. NO łatwo reaguje z akceptorami i donorami elektronów. Może występować w trzech formach: rodnika (NO^\bullet), anionu (NO^-) oraz kationu (NO^+) [11,12]. W obecności tlenu tworzy znacznie bardziej toksyczny ditlenek azotu ($2\text{NO}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2^\bullet$), natomiast w roztworach wodnych zazwyczaj ulega utlenieniu do azotynu ($4\text{NO}^\bullet + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{NO}_2^-$) [13].

Jego działanie ochronne wynika między innymi z reakcji z reaktywnymi formami tlenu (RFT), zwłaszcza z rodnikiem hydroksylowym ($\text{NO}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{HNO}_2$). Jest to jedna z wielu reakcji między RFA i RFT, w których uczestniczy NO (więcej informacji w [14]). Jedną z ważniejszych biologicznie jest reakcja z anionorodnikiem ponadtlenkowym, prowadząca do powstania nadtlenoazotynu: $\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$, który może uczestniczyć m.in. w generacji nitrotyrozyny. Produktami działalności tlenu azotu są również S-nitrozotiole, które powstają poprzez addycję NO do grupy tiolowej -SH lub w reakcji z azotynami alkilowymi:



Agnieszka Szuba

Przemysław Wojtaszek✉

Pracownia Proteomiki i Metabolomiki, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

✉Pracownia Proteomiki i Metabolomiki, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel. (61) 829 59 72, e-mail: przemow@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 12 kwietnia 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2010 r.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, modyfikacje potranslacyjne, S-nitrozylacja, nitracja reszt tyrozynowych

Wykaz skrótów: cGC (ang. *cytosolic guanylyl cyclase*) – cytoplazmatyczna cyklaza guanylowa; GSNO – S-nitrozoglutation; GSNOR (ang. *S-nitrosoglutathione reductase*) – reduktaza S-nitrozoglutationowa; MALDI (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) – desorpcja/ionizacja laserowa wspomaganą matrycą; MS/MS – tandemowa spektrometria mas; NOS (ang. *nitric oxide synthase*) – syntaza tlenu azotu; PCD – programowana śmierć komórki; RFA – reaktywne formy azotu; RFT – reaktywne formy tlenu

Podziękowania: Badania modyfikacji potranslacyjnych wywołanych tlenkiem azotu w komórkach roślinnych zostały zapoczątkowane, a dalej kontynuowane w ramach projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego PBZ-KBN-110/P04/2004, N N301 164435 dla PW. Część z nich była również finansowana w ramach Polskiej Sieci „Mobilitas.pl”.

W badaniach udziału NO w procesach biologicznych używane są zwykle donory NO – związki, które uwalniają tlenek azotu do roztworu. Najczęściej substancje te uwalniają formę rodnikową NO[•], ale na rynku dostępne są również donory uwalniające pozostałe formy redoks tlenu azotu, np. powszechnie używany nitroprusydek sodu uwalniający NO⁺. Często wykorzystywane są również substancje usuwające tlenek azotu. Wśród nich należy wymienić 2-(4-karboxyfenylo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolino-1-oksylo-3-tlenek (cPTIO), [15,16] oraz błękit metylenowy [17]. Wykorzystywane są również związki, które mają wpływ na biosyntezę NO, takie jak inhibitory syntazy tlenu azotu (NOS) L-N^G-monometyloarginina (L-NMMA) oraz ingerują w szlaki sygnałowe związane z NO, takie jak inhibitor cytoplazmatycznej cyklazy guanylowej (cGC), 1-H-(1,2,4)-oksadiazolo[4,3,α]-chinoksalin-1-on (ODQ) czy też pochodne cGMP, które nie ulegają hydrolizie, np. 8-Br-cGMP.

JAK MOŻE DZIAŁAĆ TLENEK AZOTU

Tlenek azotu może działać na organizmy żywe na kilka różnych sposobów. Jednym z najważniejszych, niemniej nie omawianych tutaj bliżej, jest modulacja funkcjonowania wtórnych przekaźników sygnalizacji komórkowej. Głównym mechanizmem jest regulacja aktywności cGC. Enzym ten jest silnie aktywowany przez addycję NO do żelaza zawartego w hemie, czego skutkiem jest wzmocniona produkcja cGMP, a w ślad za tym aktywacja wielu szlaków sygnałowych uruchamianych przez cykliczną ADP-rybozę czy zmiany stężenia Ca²⁺ [3]. Aktywacja cyklazy guanylanowej ma swój udział np. w procesie relaksacji naczyń krwionośnych u zwierząt, a prawdopodobnie także w odpowiedzi grawitropowej u roślin [18].

Tlenek azotu może wiązać się również z innymi jonami metali przejściowych, które pełnią rolę kofaktorów białek. Może być to jon żelaza w przypadku hemoglobin, ale również jony miedzi, np. w oksydazie cytochromu *c*, oraz cynku w domenach białkowych zawierających palce cynkowe. Także i w tych przypadkach przyłączenie się NO może zmieniać aktywność białek (więcej informacji: [14]).

MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE WYWOŁANE PRZEZ TLENEK AZOTU

Innym sposobem działania NO są reakcje z resztami aminokwasowymi łańcucha polipeptydowego, które prowadzą do powstania swoistych modyfikacji potranslacyjnych aminokwasów, najczęściej reszt histydyny, tyrozyny, tryptofanu, metioniny lub cysteiny. W większości przypadków do modyfikacji dochodzi w warunkach stresu nitrozacyjnego, a produktami mogą być np. modyfikacje reszt cysteiny: RSO₂H (x=1,3), RSSR', RSNO, RSNO₂, RS(O)SR', RS(O)NH₂, RS(O₂)NHR', RCH=S. Większość z nich wpływa szkodliwie na funkcjonowanie białek. Szczególną rolę wydaje się odgrywać S-nitrozylacja (RSNO), która jest traktowana jako modyfikacja o charakterze sygnałowym. Z kolei jedną z najlepiej poznanych modyfikacji tyrozyny jest nitracja [19]. Te dwie wyszczególnione modyfikacje omówimy tu dokładniej, wraz z metodami wykorzystywanymi w ich analizie, a

także zastanowimy się, czy rzeczywiście można traktować je jako sygnały komórkowe?

S-NITROZYLACJA

Addycja grupy NO zarówno do wolnej cysteiny, jak i do reszt cysteiny w łańcuchu polipeptydowym, prowadzi do powstania S-nitrozocysteiny (CysNO). S-nitrozylacja pełni istotną rolę w funkcjonowaniu komórki [20]. Wpływa na funkcjonowanie receptorów, czynników transkrypcyjnych i wspomagających translację czy też kanałów wapniowych. Jej obecność wykryto w licznych białkach, takich jak: białka cytoszkieletu, enzymy metabolizmu podstawowego, np. glikolizy, białka związane z systemami antyoksydacyjnymi czy metabolizmem siarki. Pełni ważną rolę w sygnalizacji redoks, ale przypisuje się jej również rolę ochronną podczas stresu oksydacyjnego [21]. S-nitrozylacja jest jednym z elementów regulacji PCD, w szczególności kaspaz. Modyfikacja krytycznej reszty cysteiny w centrum aktywnym kaspaz powoduje bowiem zahamowanie aktywności, a w konsekwencji zatrzymanie procesu egzekucji PCD [21,22]. Wiadomo również, że aktywność niektórych form NOS jest kontrolowana przez S-nitrozylację [21]. Zmiany stężenia CysNO stwierdzono w wielu chorobach układu krwionośnego, płuc i układu nerwowego, m. in. takich jak astma, cukrzyca, choroba Alzheimera i choroba Parkinsona [22].

Postuluje się, że zarówno niskocząsteczkowe S-nitrozotiole (GSNO czy CysNO), jak i nitrozobiałka, zwłaszcza S-nitroalbumina, są rezerwuarami NO oraz jego transporterami na dalsze odległości [23]. S-nitrozotiole uwalniają głównie rodnik NO[•], ale udowodniono, że w warunkach fizjologicznych (pH 7,4) mogą również uwalniać pozostałe formy tlenu azotu, czyli NO⁺ i NO⁻. Co więcej, uczestniczą one w reakcji transferu nitrozylu, czyli transnitrozylacji, której efektem jest S-nitrozylacja kolejnej grupy -SH wg reakcji [24]:



Powszechny jest pogląd, że S-nitrozylacja ma wszystkie konieczne cechy modyfikacji sygnałowej. Po pierwsze, powstanie CysNO zazwyczaj nie jest przypadkowe, gdyż zachodzi w określonym miejscu w białku. Modyfikacji sprzyja występowanie reszt aminokwasów kwaśnych w otoczeniu reszty cysteiny oraz obecność lokalnych kieszeni hydrofobowych, a także charakterystycznego motywu aminokwasowego: (H,K,R)C(aminokwas hydrofobowy)X(D,E), gdzie X to dowolna reszta aminokwasowa [25,26]. Po drugie, jest to proces bardzo szybki, regulowany przez warunki panujące w bezpośrednim otoczeniu białka w komórce. Po trzecie, S-nitrozylacja jest procesem odwracalnym. Chociaż S-nitrozotiole są dość nietrwałe, to wiele wyników badań sugeruje, że w warunkach fizjologicznych są one stosunkowo stabilne. Po czwarte, poziom RSNO jest ściśle kontrolowany: z jednej strony przez aktywność enzymów typu NOS, a z drugiej – przez działalność enzymów degradujących S-nitrozotiole. Głównym enzymem redukującym S-nitrozotiole jest reduktaza nitrozoglutationowa (GSNOR). S-Nitrozoglutation (GSNO) jest głównym niskocząsteczkowym S-nitrozotiolem w komórkach żywych, a GSNOR jest enzymem powszechnie występującym w różnych typach

tkanek i komórek [22]. Rola tego enzymu jest kluczowa dla zachowania homeostazy RSNO. Zatem przy braku GSNOR znacząco wzrasta zawartość RSNO, co może prowadzić do poważnych konsekwencji [22]. Wydaje się, że podobnie jest u roślin, gdyż mutanty *Arabidopsis thaliana* o zmienionej aktywności reduktazy GSNO wykazują zmienioną odporność [27,28]. Poza reduktazą GSNO udział w kontrolowaniu zawartości RSNO mają również inne białka, zwłaszcza tioredoksyny [22], ale także izomeraza białkowych mostków disiarczkowych (PDI), oksydaza ksantynowa (XO), czy peroksydaza glutationowa (GPX). Wreszcie, po piąte, przyłączenie grupy NO do reszty cysteiny zmienia aktywność białek. Wykazano to na wielu przykładach, m.in. S-nitrozylocja zmienia aktywność białka p21^{Ras}, hemoglobin, czy też uruchamia kaskadę sygnałową białka H-ras [29]. Enzymem, którego aktywność jest odwracalnie zmieniana przez S-nitrozylocję zarówno u roślin jak i zwierząt jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Enzym ten był jednym z pierwszych enzymów roślinnych, u którego wykazano tego typu zmiany aktywności. Do dnia dzisiejszego lista takich białek znacznie się wydłużyła, gdyż dołączyły tu roślinne metakaspazy [30], niesymbiotyczne hemoglobiny roślinne klasy I [31] czy też peroksyredoksyna II E [32].

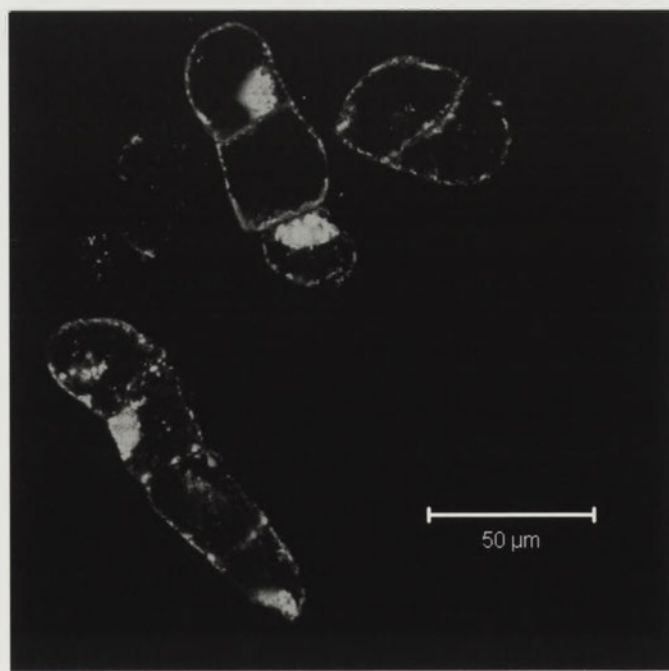
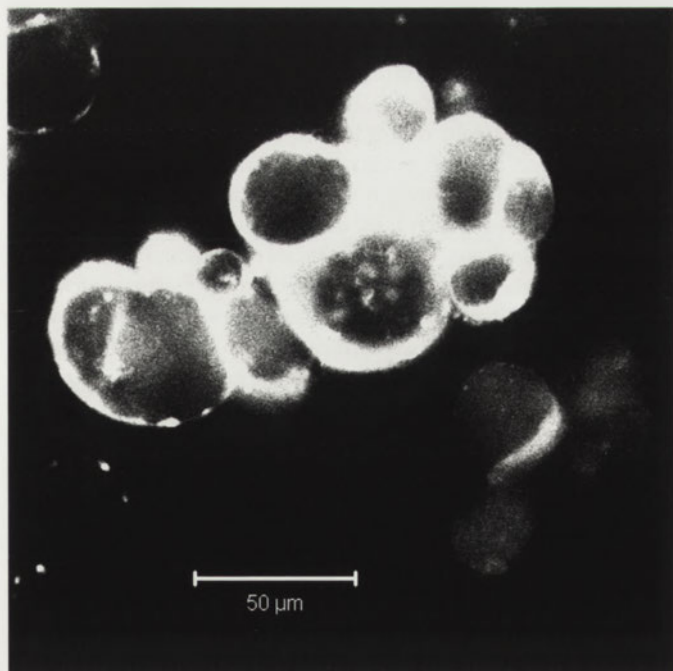
NITRACJA

Drugą istotną biologicznie modyfikacją jest nitracja reszty tyrozyny, w której grupa $-NO_2$ zostaje przyłączona do pierścienia aromatycznego Tyr. Mimo, że dołączana jest grupa $-NO_2$, a nie bezpośrednio NO, nitracja jest uważana za modyfikację wywołaną przez NO. Powstaje bowiem głównie w wyniku działania nadtlenuazotynu, produktu reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym (patrz wyżej). Możliwych jest jednak kilka innych sposobów generacji nitroty-

rozyny. Jednym z istotniejszych jest bezpośrednio działanie rodnika o właściwościach nitrujących: NO_2^* , powstającego m.in. podczas reakcji utleniania NO; potencjalnie nitrującą cząsteczką może być także NO_2Cl [33]. Z tego względu można uznać, że nitrotyrozyny nie są „odciskiem palca” nadtlenuazotynu, a markerem ogólniej pojmowanego stresu nitrozacyjnego wywołanego działalnością różnych RFA. Doświadczalnie potwierdzono kolokalizację NO oraz nitrotyrozyn w licznych przypadkach w materiale zwierzęcym [34,35]. Wykazano również, że lokalizacja subkomórkowa nitrotyrozyn odpowiada tym przedziałom komórki, gdzie jest syntezowany NO oraz są generowane cząsteczki nitrujące, a więc mitochondriom, peroksydom czy też siateczce śródplazmatycznej [36]. Ponieważ u roślin NO jest zwykle syntezowany nieco odmiennie [37,38], zarówno NO, jak i reszty nitrotyrozylowe wykrywane są głównie w okolicy ściany komórkowej (Ryc. 1).

Zwiększony poziom NO oraz reszt nitrotyrozylowych odnotowuje się zazwyczaj w procesach chorobowych, w których istotną rolę odgrywa stres oksydacyjny [34,35]. Wielokrotnie wykazano podwyższenie poziomu nitracji w różnych chorobach, na przykład w chorobach układu krążenia [39], stanach zapalnych [40], czy chorobach neurodegeneracyjnych, np. w chorobie Alzheimerera [41]. Podobnie u roślin zaobserwowano wzrost zawartości reszt nitrotyrozylowych w warunkach stresu abiotycznego [42] oraz ataku patogenów [43,44]. Jednak nitracja występuje również w warunkach fizjologicznych i odgrywa istotną rolę w takich procesach, jak aktywacja spermy, starzenie i apoptoza [45].

Warto wobec tego rozpatrzyć, czy nitracja spełnia podstawowe cechy modyfikacji sygnałowej. Wiadomo, że występuje selektywnie: prawdopodobieństwo wystąpienia nitracji rośnie w sąsiedztwie aminokwasów kwaśnych; ni-



Rycina 1. Wizualizacja tlenu azotu (prawy panel) oraz reszt nitrotyrozynowych (lewy panel) przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Tlenek azotu uwidocznił się za pomocą fluorochromu DAF 2FM w komórkach zawiesiny rzodkiewnika; nitrotyrozyny w komórkach zawiesiny tytoniu BY2 są wyznaczone z zastosowaniem przeciwciała antynitrotyrozynowego. Największe nagromadzenie zarówno NO jak i nitrotyrozyn widoczne jest w okolicach ścian komórkowych.

tracja częściej też zachodzi w obrębie domen hydrofilowych białka (badania własne, [46]). Umieszczenie nitracji zależy od struktury drugo- i trzeciorzędowej białka [47]; często występuje w wypętlonych fragmentach struktur białkowych [40]. Nitracji sprzyja obecność CO₂, oraz odpowiednie pH (optymalnym jest fizjologiczne pH 7,4) [33,48]. Tak więc jest to proces regulowany przez warunki występujące w komórce. Ze względu na charakter rodnikowy reakcji, nitracja reszt tyrozyny jest szybka. Wiadomo także, że obecność reszt tyrozynowych powoduje zmiany aktywności białek, np. MnSOD jest silnie hamowana w konsekwencji pojedynczej nitracji reszty tyrozyny w centrum katalitycznym. W większości znanych przypadków występowanie i nagromadzenie nitracji jest kojarzone ze skutkami stresu [49].

Potencjalną rolą nitracji może być regulowanie fosforylacji/defosforylacji reszt tyrozyny. Jedną z przyczyn takiej zależności może być dodatkowa zawada przestrzenna oraz zmiana pK_a (10,1 dla tyrozyny i 7,2 dla nitrotyrozyny). Nitracja białek ulegających również fosforylacji została potwierdzona na materiale zwierzęcym [50]. Choć większość doniesień sugeruje, że nitracja tyrozyny zasadniczo zapobiega fosforylacji/defosforylacji [51], stwierdzenie to należy to uznać za uproszczone. Niektóre badania wskazują bowiem, że niewielkie stężenia ONOO⁻ mogą promować fosforylację [45,52]. Może to sugerować, że efekt działania nadtlenoazotynu na białka istotne w procesach fosforylacji jest zależny od dawki czynników nitrujących. Promowanie fosforylacji mogłoby polegać na wymuszających przez nitrację zmianach konformacji kinaz tyrozynowych. Należy jednak dodać, że zaobserwowano także odwrotną zależność, tj. zapobieganie nitracji przez fosforylację reszt tyrozynowych [53].

Aby modyfikacja uznana została za taką, która pełni funkcje sygnałowe, powinna być usuwana w warunkach ściśle kontrolowanych. Do niedawna, z uwagi na wysoką stabilność nitrotyrozyn w szerokim zakresie pH oraz odporność na działanie wysokich temperatur, reszty nitrotyrozyny uważano za modyfikacje trwałe. Wiadomo było, że białka zawierające reszty nitrotyrozyny ulegają agregacji lub są degradowane w proteasomach [45]. Jednak od pewnego czasu pojawiają się prace świadczące o możliwości istnienia biologicznych systemów denitrujących. Stwierdzono, że homogenaty niektórych, ale nie wszystkich tkanek szczura wykazują aktywność denitrującą *in vitro* mierzoną jako spadek liczby epitopów nitrowanej albuminy rozpoznawanych przez monoklonalne przeciwciała anty-nitrotyrozylowe. Czynniki aktywne, inaktywowane przez trypsynę i wysoką temperaturę o masie cząsteczkowej większej niż 10 kDa, nazywane denitrazą nitrotyrozynową [54]. Wykazano, że także osocze człowieka przejawia zdolność usuwania epitopów nitrotyrozyn [51]. Co więcej, niektóre znane już enzymy mają zdolność do zmniejszania liczby reszt nitrotyrozylowych białek *in vitro*; należą do nich m.in. peroksydaza glutationowa czy S-transferaza glutationowa [55,56]. Aktywność taka jest przypisywana również reduktazie azotanowej *E. coli* oraz reduktazie cytochromu P-450 ssaków zależnej od NADPH [57]. W badaniach dotyczących denitracji trzeba jednak wziąć pod uwagę możliwość redukcji nitrotyrozyn podczas wykonywania analiz. Wykazano bowiem, że stosowanie DTT oraz wysokiej temperatury (np. gotowanie próbek przed elektroforezą białek) może spowodować redukcję

nitrotyrozyn do aminotyrozyn i być traktowane jako objaw denitracji *in vivo* [33].

METODY IDENTYFIKACJI MODYFIKACJI POTRANSLACYJNYCH

S-NITROZYLACJA

S-nitrozotiole są bardzo nietrwałe; ulegają rozpadowi pod wpływem wielu naturalnych czynników redukujących, takich jak glutation czy kwas askorbinowy [58]. Ulegają one również rozpadowi pod wpływem światła i w obecności jonów metali przejściowych, zwłaszcza miedzi. Dlatego też analiza wolnych CysNO lub białek je zawierających nie jest łatwa. Stosunkowo proste jest wykrywanie S-nitrozotiole oraz ilościowe ustalenie poziomu S-nitrozytacji. W tym celu stosuje się metodę Saville'a [59], która wykorzystuje niestabilność chemiczną S-nitrozotiole. Pod wpływem jonów rtęci lub srebra RSNO rozpadają się z uwolnieniem HONO, który w szeregu reakcji chemicznych jest przeprowadzany w barwną sól azową. Jej zawartość określana jest spektrofotometrycznie. Metoda Saville'a stała się podstawą wielu innych technik badawczych. Na przykład zamiast przeprowadzania w barwną sól azową proponuje się obecnie zastosowanie odczynników, takich jak 2,3-diaminonaftalen [60] lub Alexa Fluor 488 Hg-Link Phenylmercury (Invitrogen), które po reakcji z HONO tworzą związki fluorydujące. Umożliwia to także detekcję RSNO w tkankach [42].

Do analiz ilościowych S-nitrozotiole stosuje się również czulą metodę chemiluminescencji ozonu. Za pomocą tej techniki wykrywa się tlenek azotu uwalniany z S-nitrozotiole. Rozpad RSNO jest generowany przez inkubację w roztworach HgCl₂ lub zawierających jony miedzi a ilość uwolnionego NO jest mierzona na podstawie ilości energii świetlnej powstającej w reakcji [61,62]: $NO + O_3 \rightleftharpoons NO_2^- + O_2$, $NO_2^- \leftrightarrow NO_2 + hv$.

Ustalenie, które konkretnie białka ulegają modyfikacji, jak i określenie miejsca S-nitrozytacji jest już nieco bardziej złożone. W tym celu mogą być użyte metody immunochemiczne, znanych jest jednak zaledwie kilka prac opisujących wykorzystanie przeciwciał anty-nitrozocysteinowych, zarówno komercyjnych [63], jak i wytwarzanych przez różne grupy badawcze [64]. Najczęściej stosowaną metodą jest metoda podstawienia biotynowego (ang. *biotin switch*). W skrócie polega ona na przyłączeniu cząsteczki biotyny do nitrozylowanych reszt cysteinowych, co umożliwia następnie detekcję na drodze immunologicznej lub chromatografii powinowactwa [65]. Procedura jest kilkietapowa – w pierwszej kolejności niezmodyfikowane grupy tiolowe są metylowane za pomocą S-metylometanotiosiarczanu (MMTS). Występujące w białkach S-nitrozotiole są następnie przekształcane w wolne grupy tiolowe w obecności kwasu askorbinowego. Te z kolei są kowalencyjnie łączone z pochodną biotyny (HPDP-biotyna), reagującą wybiórczo z grupami -SH. Zmodyfikowane białka analizuje się najczęściej techniką Western blot, identyfikując interesujące białka przy użyciu spektrometrii mas [65]. W ten sposób zidentyfikowano wiele białek zawierających CysNO, zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego.

Metoda podstawienia biotynowego doczekała się licznych modyfikacji. Na przykład, metoda SNO SID (ang. *SNO Site Identification*) umożliwia identyfikację miejsc S-nitrozylacji w złożonych próbach biologicznych. Białka zawierające biotynylowane reszty CysNO są trawione trypsyną, a modyfikowane peptydy wychwytywane z użyciem chromatografii powinowactwa i następnie identyfikowane z wykorzystaniem LC MS/MS. Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas umożliwia dokładne poznanie miejsca S-nitrozylacji [66]. Częstą modyfikacją jest wykorzystanie znaczników fluorescencyjnych. Przykładem jest użycie zamiast modyfikowanej biotyny-HPDP, jej fluorescencyjnego odpowiednika – N-([6-7-amino-4-metylokumaryno-3-acetamido]heksylo)-3'-(2'-pyridylo)propionamidu (AMCA-HPDP), co pozwala skrócić czas analizy, gdyż po rozdziale w żelu poliakrylamidowym można identyfikować znakowane, zawierające pierwotnie reszty S-nitrozocysteiny białka na podstawie ich fluorescencji [67]. Opublikowaną niedawno modyfikacją wykorzystującą znaczniki fluorescencyjne jest podstawienie fluorescencyjne (ang. *fluorescence switch*). W połączeniu z dwukierunkową elektroforezą ta metoda umożliwia czułą identyfikację RSNO w bardzo małej ilości materiału biologicznego. Zwiększona czułość metody pozwala na dość łatwą identyfikację RSNO powstających w warunkach fizjologicznych [68]. W badaniach *in situ* rozmieszczenia S-nitrozotoli w komórkach do wizualizacji RSNO wykorzystuje się także streptawidynę sprzężoną z fluorochromem [69].

Odrębną kategorią są próby bezpośredniej detekcji S-nitrosotoli z wykorzystaniem metod spektrometrii mas. Powstanie CysNO powoduje bowiem wzrost masy białka/peptydu o 29 Da, co może być wykryte na podstawie analiz widma masowego. Aby identyfikować białka w skomplikowanych mieszaninach, stosowana jest technika LC MS/MS. Zasadniczym problemem bezpośrednich analiz S-nitrosotoli jest wybór takich procedur izolacji i trawienia

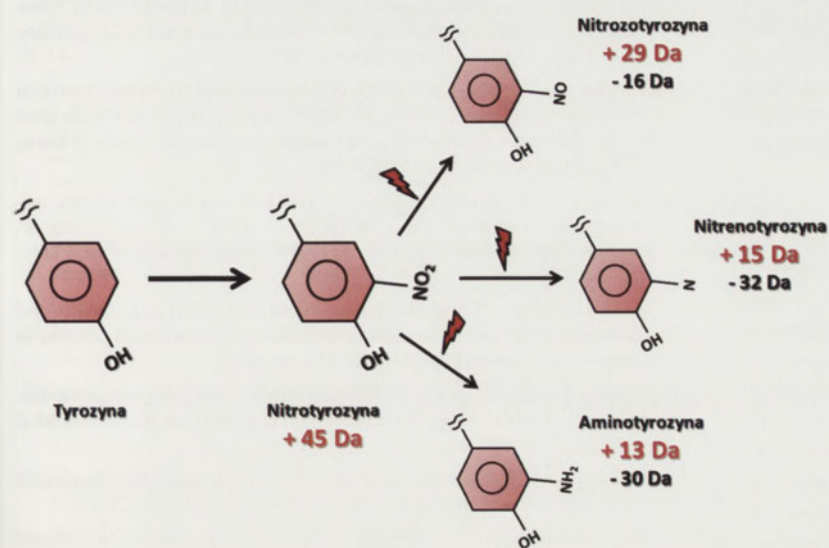
białek, które nie wpłyną na zawartość nietrwałych CysNO [43]. Większość badań jest obecnie uzupełniana przez analizy bioinformatyczne. Identyfikując charakterystyczne otoczenie aminokwasowe, które zwiększa prawdopodobieństwo pojawienia się S-nitrozylacji (patrz wyżej), można *in silico* typować białka potencjalnie S-nitrozylowane [26].

NITRACJA

Z uwagi na stabilność chemiczną, metod analiz nitracji jest znacznie więcej niż w przypadku S-nitrozylacji. Główną trudnością, podobnie zresztą jak ma to miejsce przy analizach S-nitrosotoli, jest wykrycie białek nitrowanych wśród dużej liczby białek niemodyfikowanych. Do dnia dzisiejszego wśród technik analizy nitracji królują metody immunochemiczne, które wykorzystują przeciwciała anty-nitrotyrozynowe [49]. Z ich użyciem wykonuje się analizy półilościowe (ELISA); bardzo powszechne są również immunochemiczne analizy mikroskopowe, ukazujące rozmieszczenie modyfikowanych reszt tyrozyny w tkankach, oraz typowe analizy typu Western blot, umożliwiające identyfikację modyfikowanych białek. Do dość popularnych zaliczyć należy również techniki chromatograficzne, zarówno chromatografii cieczowej jak i gazowej. Ta druga jest częściej wykorzystywana w analizach wolnej 3-nitrotyrozyny [70], natomiast chromatografia cieczowa jest szeroko stosowana w analizach modyfikowanych białek. Reszty nitrotyrozyny można wówczas identyfikować mierząc różnice w czasach retencji peptydów [71] lub też, w ostatnio znacznie częściej stosowanym podejściu badawczym, w połączeniu z analizami spektrometrii mas.

Wykorzystanie metod MS, zwłaszcza tandemowej spektrometrii mas w połączeniu z wcześniejszym rozdziałem chromatograficznym jest obecnie prawdopodobnie najpotężniejszym dostępnym narzędziem w badaniach nitrowanych białek. Za jego pomocą rozdzielone chromatograficznie peptydy trafiają bezpośrednio do spektrometru. Reszty nitrotyrozyny są identyfikowane na podstawie przesunięcia widma masowego, spowodowanego zwiększeniem masy badanego białka/peptydu/aminokwasu o grupę $-NO_2$, czyli o 45 Da (Ryc. 2). Podejście takie umożliwia wysoko przepustową analizę złożonych mieszanin bez konieczności wcześniejszej elektroforezy. Podczas eksperymentów typu MudPIT (ang. *multidimensional protein identification technology*) [72] szybko uzyskuje się globalny profil białek/peptydów zawartych w mieszaninie. Wymaga to również wielopoziomowej weryfikacji wyników. Dokonuje się tego za pomocą normalizacji danych, usunięcia z otrzymanych widm masowych pików przypadkowych, oraz analizy tzw. koelucji jonów o tych samych wartościach izobarycznych [70,73].

Innym ciekawym wykorzystaniem metod spektrometrii mas podczas analiz reszt nitrotyrozyn jest użycie spektrome-



Rycina 2. Nitracja reszt tyrozyny powoduje zmianę masy peptydu (+45Da). Przy zastosowaniu lasera UV w spektrometrze mas ze źródłem jonów typu MALDI obserwuje się zmiany wywołane fotodegradacją reszt nitrotyrozyny. Czerwone liczby przedstawiają obserwowane wzrosty masy w porównaniu do niemodyfikowanej reszty tyrozyny, czarne – ubytek masy wynikający z degradacji reszt nitrotyrozyny.

tru mas ze źródłem jonów typu MALDI (desorpcja/ionizacja laserowa wspomaganą matrycą; ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). W tym przypadku zazwyczaj nie wykonuje się wcześniejszego rozdzielania chromatograficznego, a badaniu poddaje się wysuszoną mieszaninę matrycy, ułatwiającej jonizację badanej próbki, oraz peptydów otrzymanych podczas trawienia enzymatycznego samej próbki [74,75]. Podczas analizy spektrometrycznej promień lasera padający na próbkę wybija z niej peptydy, które są analizowane w detektorze. Podobnie jak w przypadku omawianych wyżej analiz, nitrotyrozynę można zidentyfikować na podstawie zwiększenia masy o 45 Da. Jednak w przypadku zastosowania źródła MALDI, światło lasera powoduje dodatkowo charakterystyczny rozpad analizowanej nitrotyrozyny. Promień lasera powoduje głównie utratę jednego (- 16 Da) lub dwóch atomów tlenu (- 32 Da) (Ryc. 2), w wyniku czego uzyskuje się „odcisk palca” nitrotyrozyny [76]. Co ciekawe, fotodegradację nitrotyrozyny wywołuje jedynie laser UV, lecz nie laser IR [77]. Metoda ta została wykorzystana do analiz białek i peptydów modelowych [78], oraz do badań próbek wzbogaconych w reszty nitrotyrozyny [79]. Wadą opisanego podejścia jest podwyższony próg detekcji nitrotyrozyny. Wynika to z tego, że intensywność jonu molekularnego jest rozdzielona na co najmniej trzy główne jony potomne, co oznacza obniżenie intensywności sygnału pierwotnego o 60–70% w porównaniu do jonów nie podlegających fotodegradacji [33]. Zwiększająca się z roku na rok czułość dostępnych spektrometrów mas umożliwi prawdopodobnie w najbliższej przyszłości identyfikację białek zawierających nitrotyrozyne w złożonych próbkach biologicznych.

Stosunkowo niedawno zaproponowano, by nitrotyrozyne analizować za pomocą znakowania miejsc nitracji z wykorzystaniem chlorku dansylu. Znakowane, a następnie strawione białka są identyfikowane bezpośrednio w spektrometrze mas. Rozpoznanie modyfikowanych peptydów odbywa się na podstawie porównania jonu prekursorowego oraz analizy MS³ i obserwacji produktów fragmentacji charakterystycznych dla dansylu. Metoda ta jest dedykowana do analiz skomplikowanych mieszanin białek [80]. Proponuje się również wykorzystanie podejścia analogicznego do techniki podstawienia biotynowego, w którym miejsca nitracji są identyfikowane po dołączeniu do nitrotyrozyny specjalnie modyfikowanej cząsteczki biotyny (sulfo-NHS-SS-biotyna) [81].

Większość dostępnych metod badania nitracji opiera się na identyfikacji modyfikowanych białek, natomiast metody oznaczania ilościowego są traktowane nieco po macoszemu. Analizy takie mogą być wykonane z wykorzystaniem technik immunochemicznych, takich jak dot-blot, jednak otrzymany wynik jest co najwyżej półilościowy. Ostatnio zaproponowano metodę umożliwiającą ocenę ilościową nitracji z zastosowaniem izotopowego oznaczania peptydów metodą iTRAQ (ang. *isobaric tag for relative and absolute quantitation*). Polega ona na znakowaniu każdej pierwszorzędowej aminy, czyli w praktyce wszystkich peptydów, znacznikami zawierającymi różne izotopy. Umożliwia ona analizę porównawczą 8 wariantów jednocześnie. Dzięki zastosowaniu tej metody w jednym doświadczeniu można

zidentyfikować modyfikowane białko, oraz ustalić miejsce i stopień nitracji [82].

PIŚMIENNICTWO

1. del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792
2. Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
3. Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADPrbose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10328-10333
4. Edwards TM, Rickard NS (2004) New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 413-425
5. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916
6. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 1: 1421-1441
7. Garcia-Mata C, Lamattina L (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci* 8: 20-26
8. Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 137: 663-670
9. Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221
10. Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 449-455
11. Snyder SH, Bredt DS (1992) Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 266: 68-71
12. Wendehenne D, Pugin A, Klessig D, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 177-183
13. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* 4: 227-237
14. Łapa A, Wojtaszek P (2005) Modyfikacje białek spowodowane tlenkiem azotu – charakterystyka, wykrywanie i identyfikacja. W: H Korniak, J Barciszewski, red, Na pograniczu chemii i biologii. Tom XII, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 369-392
15. Huang X, Stettmaier K, Hutzler Ch, Mueller M, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938-946
16. Małolepsza U, Różalska S (2005) Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 43: 623-635
17. Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* 224: 545-555
18. Salmi ML, Morris KE, Roux SJ, Porterfield DM (2007) Nitric oxide and cGMP signaling in calcium-dependent development of cell polarity in *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 144: 94-104
19. Schöneich Ch, Sharov VS (2006) Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 41: 1507-1520
20. Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 921-930
21. Sun J, Steenbergen Ch, Murphy E (2006) A-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid Redox Sign* 8: 1693-1705
22. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 721-732

23. Zhang Y, Hogg N (2005) S-nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med* 38: 831-838
24. Arnelle DR, Stamler JS (1995) NO[•], NO[•] and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implication for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 318: 279-285
25. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150-166
26. Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS (2001) S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol* 3: E46-E49
27. Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8054-8059
28. Rustèrcci Ch, Espunya MC, Díaz M, Chabannes M, Martínez MC (2007) S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol* 143: 1282-1292
29. Landar A, Darley-Usmar VM (2002) Nitric oxide and cell signaling: modulation of redox tone and protein modification. *Amino Acids* 25: 313-321
30. Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackener A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 282: 1352-1358
31. Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHB1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16: 2785-2794
32. Romero-Puertas MC, Laxa M, Matté A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones A, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19: 4120-4130
33. Abello N, Kerstiens HA, Postma DS, Bischoff R (2009) Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res* 8: 3222-3238
34. Nang S, Picard P, Stewart DJ (2001) Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood-brain barrier breakdown and repair after cold injury. *Lab Invest* 81: 41-49
35. Wang HW, Su WF, Lin YS, Kang BH (2002) Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in recurrently inflamed, human palatine tonsils. *Eur Arch Oto-rhino-laryngol* 259: 413-418
36. Heijnen H, van Donselaar E, Slot J., Fries D, Blachard-Fillion B, Hodara R, Lightfoot R, Polydoro M, Spielberg D, Thomson L, Regan E, Crapo J, Ischiropoulos H (2006) Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 40: 1903-1913
37. Crawford NM (2005) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* 57: 471-478
38. Stör Ch, Stremiau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* 57: 463-470
39. Turko IV, Murad F (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 54: 619-634
40. Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 28: 646-654
41. Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, Gollomp SM, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ (2000) Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol* 157: 1439-1445
42. Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Luque L, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, del Rio LA, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 581: 453-461
43. Romero-Puertas MC, Camprostrini N, Matté A, Righeti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 8: 1459-1469
44. Saito S, Yamamoto-Katou A, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 47: 689-697
45. Monteiro HP, Arai RJ, Travassos LR (2008) Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid Redox Sign* 10: 843-889
46. Ischiropoulos H (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 776-783
47. Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Raman CS, Ischiropoulos H (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 371: 169-178
48. Pietraforte D, Salzano AM, Marino G, Minetti M (2003) Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 25: 341-350
49. Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 365: 1-11
50. Monteiro HP (2002) Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Radic Biol Med* 33: 765-773
51. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* 385: 63-66
52. Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, Radi R, Cayota AM (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 162: 3356-3366
53. Shi WQ, Cai H, Xu DD, Su XY, Lei P, Zhao YF, Li YM (2007) Tyrosine phosphorylation/ dephosphorylation regulates peroxynitrite-mediated peptide nitration. *Regul Pept* 144: 1-5
54. Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee Y, Murad F (1998) An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Biochemistry* 95: 11584-11589
55. Kuo WN, Kocis JM (2002) Nitration/S-nitrosation of proteins by peroxynitrite-treatment and subsequent modification by glutathione S-transferase and glutathione peroxidase. *Mol Cell Biochem* 233: 57-63
56. Kuo WN, Kocis JM, Mewar M (2002a) Protein denitration/modification by glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase. *J Biochem, Mol Biol Biophys* 6: 143-146
57. Kuo WN, Kocis JM, Webb JK (2002b) Protein denitration/modification by *Escherichia coli* nitrate reductase and mammalian cytochrome P-450 reductase. *Front Biosci* 7: 9-14
58. Zhang Y, Keszler A, Broniowska K, Hogg N (2005) Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins. *Free Radic Biol Med* 38: 874-881
59. Saville B (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670-672
60. Park J, Kostka P (1997) Fluorometric detection of biological S-nitrosothiols. *Anal Biochem* 249: 61-66
61. Butler AR, Rhodes P (1997) Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem* 249: 1-9
62. Ewing JF, Janero DR (1998) Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium (III) reduction and ozone - chemiluminescent detection. *Free Radic Biol Med* 25: 621-628
63. Eyerman D J, Yamamoto BK (2007) A rapid oxidation and persistent decrease in the vesicular monoamine transporter 2 after methamphetamine. *J Neurochem* 103: 1219-1227
64. Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H, Stamler JS (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* 277: 9637-9640
65. Jaffrey SR, Snyder SH (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science STKE* 86: PL1-9

66. Hao G, Derakhshan B, Shi L, Campagne F, Gross SS (2006) SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1012-1017
67. Han P, Zhou X, Huang B, Zhang X, Chen Ch (2008) On-gel fluorescent visualization and the site identification of S-nitrosylated proteins. *Anal Biochem* 377: 150-155
68. Tello D, Tarín C, Ahicart P, Bretón-Romero R, Lamas S, Martínez-Ruiz A (2009) A "fluorescent switch" technique increases the sensitivity of proteomic detection and identification of S-nitrosylated proteins. *Proteomics* 9: 5359-5370
69. Ckless K, Reynaert N, Taatjes D, Lounsbury K, van der Vliet A, Janssen-Heininger Y (2004) In situ detection and visualization of S-nitrosylated proteins following chemical derivatization: identification of Ran GTPase as a target for S-nitrosylation. *Nitric Oxide* 11: 216-227
70. Duncan MW (2003) A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 25: 351-361
71. Nakagawa H, Komai N, Takusagawa M, Miura Y, Toda T, Miyata N, Ozawa T, Ikota N (2007) Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome c is associated with caspase-cascade inactivation. *Biol Pharmaceut Bull* 30: 15-20
72. Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorin J, Mock H-P, Rossi-gnol M (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285-298
73. Stevens SM, Prokai-Tatraix K, Prokai L (2008) Factors that contribute to the misidentification of tyrosine nitration by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 7: 2442-2451
74. Chapman JR red (2000) Mass spectrometry of proteins and peptides. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa
75. de Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3rd Edition, Wiley
76. Turko IV, Murad F (2005) Mapping sites of tyrosine nitration by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Meth Enzymol* 396: 266-274
77. Petre BA, Youhnovski N, Lukkari J, Weber R, Przybylski M (2005) Structural characterization of tyrosine-nitrated peptides by ultraviolet and infrared matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 11: 513-518
78. Sarver A, Scheffler K, Shetlar MD, Gibson BW (2001) Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12: 439-448
79. Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S, Alexander CB, Rosenfeld SS, Freeman BA (2003) Nitric oxide dependent generation of reactive species in sickle cell disease actin tyrosine nitration induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem* 278: 4194-4204
80. Amoresano A, Chiappetta G, Pucci P, D'Ischa M, Mariano G (2007) Bidimensional tandem mass spectrometry for selective identification of nitration sites in proteins. *Anal Chem* 79: 2109-2117
81. Nuriel T, Deeb RS, Hajjar DP, Gross SS (2008) Protein 3-nitrotyrosine in complex biological samples: quantification by high-pressure liquid chromatography/electrochemical detection and emergence of proteomic approaches for unbiased identification of modification sites. *Meth Enzymol* 441: 1-17
82. Chiappetta G, Corbo C, Palmese A, Marino G, Amoresano A (2009) Quantitative identification of protein nitration sites. *Proteomics* 9: 1524-1537

Structural modifications of proteins induced by nitric oxide

Agnieszka Szuba, Przemysław Wojtaszek✉

Laboratory of Proteomics and Metabolomics, Institute of Bioorganic Chemistry PAS, 12/14 Z. Noskowskiego St., 61-704 Poznan, Poland

✉e-mail: przemow@amu.edu.pl

Key words: detection, nitric oxide, posttranslational modifications, S-nitrosylation, tyrosine nitration

ABSTRACT

It is well known for *ca.* two decades that nitric oxide regulates many life processes both in animals and in plants. The list of processes controlled by NO is steadily expanding, and some of the mechanisms of action of this small molecule are being unravelled and understood. Nitric oxide is exerting its action through addition to the transition metal ions which normally function as protein cofactors; in this way NO regulates e.g. the activity of cytoplasmic guanyl cyclase. Recently, however, more and more often direct structural modifications of peptidyl amino acid residues are being studied. Particular attention is being paid to the modifications of cysteine (S-nitrosylation) and tyrosine (nitration) residues with respect to their putative signalling functions. It is also known that these modifications are modulating activities of numerous proteins. In this paper we are discussing structural modifications of amino acid residues by NO taking into account the conditions which should be fulfilled to consider their signalling functions. Moreover, we also present available methodologies for their analysis and identifications of modified proteins.

Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu *in vivo*

STRESZCZENIE

Mechanizm, poprzez który częściowo zredukowane formy tlenu (CZFT) wywołują uszkodzenia, które *in vivo* prawdopodobnie prowadzą do rozwoju stanów patologicznych, ciągle nie jest jasny. W niniejszym artykule przedstawiono szereg argumentów przemawiających za słusznością tezy, że białka są pierwotnym celem CZFT w komórkach, a wolne rodniki białek i inne reaktywne formy białek, powstające w reakcjach z CZFT, pełnią rolę pośredników przekazujących uszkodzenia oksydacyjne na inne składniki komórki. Poznanie przebiegu reakcji reaktywnych form białek może pozwolić na bardziej skuteczną ochronę organizmu przed skutkami stresu oksydacyjnego.

WPROWADZENIE

Możliwość kontrolowania destrukcyjnego działania wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu pozostaje jednym z ważnych, ale ciągle nierozwiązanych problemów współczesnej biologii i medycyny. Toksyczne skutki działania podwyższonych stężeń tlenu na mikroorganizmy, zwierzęta i ludzi są znane od wielu lat. Natomiast rola reaktywnych form tlenu (RFT) lub (co wydaje się być właściwszym terminem) częściowo zredukowanych form tlenu (CZFT) w inicjacji reakcji chemicznych odpowiedzialnych za szkodliwe efekty działania wysokich stężeń tlenu *in vivo* została odkryta stosunkowo niedawno. Istotne znaczenie w zrozumieniu roli CZFT miało poznanie zarówno szkodliwych, jak i terapeutycznych efektów promieniowania jonizującego (co rozpoczęło się już w końcu XIX wieku) i równoległe szybki postęp w zakresie fizyki i chemii wolnych rodników które, jak obecnie wiemy, są nieuniknionymi produktami metabolizmu wszystkich organizmów tlenowych [1,2]. Pomimo zgromadzonej wiedzy, poszczególne ogniwa łańcucha łączącego powstawanie CZFT ze zmianami patologicznymi pozostają nadal nieznane, co wydaje się zarówno dziwne, jak i ważne. Dziwne, ponieważ całkiem dokładnie znana jest tożsamość „biologicznych” CZFT, drogi ich powstawania i mechanizmy reakcji chemicznych. A ważne, ponieważ dotychczas nie mamy możliwości jakże pożądanej kontroli destrukcyjnych reakcji CZFT w organizmach żywych.

Celem tego artykułu jest krótkie przedstawienie dowodów na rzecz hipotezy zakładającej, że reakcje reaktywnych form białek są odpowiedzialne za większość procesów uszkadzających krytyczne elementy komórek *in vivo*. Ewentualna weryfikacja słuszności tej tezy winna wytyczyć nowe kierunki badań pozwalające na odkrycie metod ograniczania albo eliminacji destrukcyjnych skutków działania CZFT w organizmach żywych.

STADIA REAKCJI CZFT W ORGANIZMACH ŻYWYCH

Procesy zainicjowane przez CZFT *in vivo* składają się z kolejnych etapów prowadzących od stresu oksydacyjnego do powstania patologii. Niniejsza praca poświęcona jest wyłącznie omówieniu reakcji CZFT prowadzących do niekorzystnych zmian w organizmie. Należy jednak podkreślić, że obecność CZFT w pewnych granicach stężeń jest konieczna do utrzymania normalnego funkcjonowania komórek [3]. Zadaniem układu obrony antyoksydacyjnej jest utrzymanie właściwego poziomu CZFT w organizmie. Kiedy równowaga pomiędzy reakcjami wytwarzającymi CZFT a układem antyoksydacyjnym przechyla się w stronę zwiększonej produkcji CZFT, organizm jest w stanie *stresu oksydacyjnego*, który może spowodować zaburzenia w przekazywaniu sygnałów w komórkach i między komórkami oraz przejściowe albo nieodwracalne uszkodzenie krytycznych elementów komórek [4,5]. Związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a stanami patologicznymi jest dobrze udokumentowany. Mnóstwo przekonujących danych dowodzi, że ponad 50 chorób i sytuacji upośledzających funkcjonowanie organizmu takich jak np. niedożywienie, artretyzm, niektóre nowotwory,

Janusz M. Gębicki¹

Grzegorz Bartosz²

¹Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney, Australia,

²Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

[✉]Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney 2109, Australia; e-mail: jgebicki@cbms.mq.edu.au

Artykuł otrzymano 24 lutego 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 23 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, askorbinian, białka, częściowo zredukowane formy tlenu, glutation, stres oksydacyjny, wolne rodniki

Wykaz skrótów: CZFT – częściowo zredukowane formy tlenu; GSH – glutation; HAsc⁻ – askorbinian; RFT – reaktywne formy tlenu

azbestoza, zaćma, choroby płuc, chroniczne stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona) i starzenie są powodowane albo wzmagane czy przyspieszane przez nadmierne poziomy CZFT [1,6]. Łańcuch przyczynowo-skutkowy łączący stres oksydacyjny i stan patologiczny może być przedstawiony w uproszczonej formie jako szereg indywidualnych etapów, z których każdy cechuje się określonym czasem trwania (Ryc. 1). Stres oksydacyjny może trwać krótko, jak podczas zabiegów medycznych lub awarii reaktorów jądrowych, ale może także rozciągać się na całe życie organizmu, co ma miejsce w przypadkach palenia tytoniu albo nadmiernej konsumpcji alkoholu.

Oczywiste jest, że uniknięcie stresu oksydacyjnego albo przerwanie tego łańcucha przyczynowo-skutkowego przedstawionego na rycinie 1 dałoby możliwość zapobiegania wielu chorobom albo zahamowania ich rozwoju. Zadanie to jest jednak na tyle trudne, że skuteczny sposób jego realizacji nie został zaproponowany. Rozpatrując kolejno poszczególne etapy przedstawione na rycinie 1, należy stwierdzić, że stres oksydacyjny może być powodowany przez czynniki trudne do kontrolowania, takie jak normalny metabolizm tlenowy, samoutlenianie zredukowanych form wielu związków obecnych w organizmie, nadmierna aktywność fizyczna, trauma, urazy, reperfuzyja po niedokrwieniu, niektóre procedury medyczne, a także takie czynniki środowiska jak wysoka temperatura, zamrażanie, promieniowanie nadfioletowe i jonizujące oraz wiele ksenobiotyków [1,3-5,7]. Niekiedy można zminimalizować skutki działania wymienionych i podobnych czynników poprzez ich unikanie, jednak w większości przypadków możliwości takich działań są ograniczone. Należy więc stwierdzić, że zupełne wykluczenie sytuacji stresu oksydacyjnego i co za tym idzie, wytwarzania nadmiernych ilości CZFT w organizmie, jest praktycznie nieosiągalne.

Interwencja w następnym etapie, jakim są reakcje CZFT ze składnikami żywych komórek, jest też praktycznie niemożliwa (choć nie brakuje zwolenników odmiennego poglądu). Większość reakcji biologicznie istotnych wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu ze składnikami żywych organizmów zachodzi w czasie mikro- albo milisekund, tak więc wprowadzenie do zagrożonych tkanek dostatecznej ilości środków mogących modulować te reakcje *post factum* nie wchodzi w grę [8]. Kluczowym problemem w następnym etapie jest identyfikacja pierwotnych substratów reakcji CZFT w komórkach i tkankach, gdyż daje to możliwość zahamowania albo zmniejszenia dalszych destrukcyjnych reakcji.

Najbardziej powszechną CZFT powstającą w organizmach jest anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$. Mimo sto-

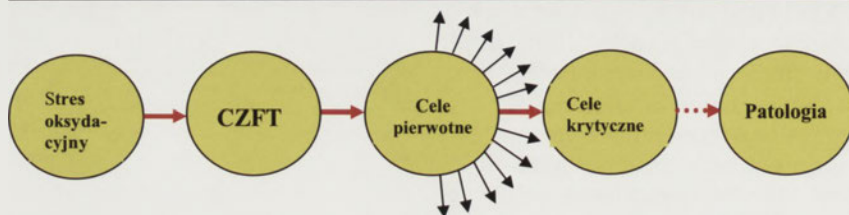
sunkowo słabej reaktywności, $O_2^{\cdot-}$ jest uważany za głównego inicjatora uszkodzeń biologicznych, gdyż może generować bardzo silny oksydant (rodnik wodorotlenowy HO^{\cdot}) i jest prekursorem nadtlenku wodoru, który także może tworzyć HO^{\cdot} w reakcji ze zredukowanymi formami jonów metali ziem przejściowych, takimi jak Fe^{2+} lub Cu^+ . Inne potencjalnie szkodliwe rodniki, jak rodnik nadtlenkowy (ROO^{\cdot}) i alkoksylowy (RO^{\cdot}), tworzą się głównie w reakcjach HO^{\cdot} z organicznymi składnikami organizmów w obecności tlenu [9]. Duża reaktywność tych rodników, które reagują z częściami związkami organicznymi ze stałymi szybkości rzędu 10^8 - 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ [10], nie pozwala na przewidzenie, jakie związki będą pierwotnymi obiektami ich ataku w komórkach. O tym, które z możliwych reakcji zajdą w warunkach *in vivo*, decydują wartości iloczynów stężeń poszczególnych związków i stałych szybkości ich reakcji z daną CZFT.

Dlaczego reakcje CZFT ze składnikami organizmu prowadzą do patologii? Przyczyną może być albo bezpośrednie uszkodzenie przez CZFT krytycznych składników organizmu, albo wywoływanie przez nie reakcji chemicznych mogących propagować takie uszkodzenie. Wyniki wielu badań doświadczalnych i modelowania reakcji chemicznych zgodnie wskazują, że tylko mała część reakcji CZFT z pierwotnymi obiektami ataku może spowodować skutki niebezpieczne dla organizmu (Ryc. 1).

PIERWOTNE OBIEKTY ATAKU CZĘŚCIOWO ZREDUKOWANYCH FORM TLENU

Przyjmuje się powszechnie, że spośród wielu potencjalnych obiektów ataku CZFT w komórkach i tkankach uszkodzenie tylko trzech grup związków: DNA, lipidów i białek, może mieć krytyczne znaczenie dla losu komórek [11]. Najwięcej badań poświęconych mechanizmom uszkodzenia układów biologicznych przez CZFT dotyczyło utleniania lipidów zawierających wielonienasycone reszty kwasów tłuszczowych. Od dawna wiadomo, że nadtlenki lipidów mogą powstawać z dużą wydajnością w wyniku reakcji łańcuchowej, w wyniku której pojedynczy rodnik HO^{\cdot} może powodować wytworzenie w fazach skondensowanych, takich jak micelle czy dwuwarstwy, nawet około 100 cząsteczek nadtlenków [12]. Jeśli ekstrapolować te dane na sytuację *in vivo*, należałoby oczekiwać intensywnej peroksydacji lipidów w błonach biologicznych. Oczekiwanie to nie zostało nigdy potwierdzone, jednak dało asumpt do badań prowadzonych na dużych grupach ochotników, których celem była odpowiedź na pytanie, czy wieloletnia suplementacja witaminami E i C (która winna zmniejszać peroksydację lipidów *in vivo*) obniża ryzyko rozwoju chorób nowotworowych i chorób układu krążenia. Wyniki tych badań okazały się niejednoznaczne, a wnioski nierzadko sprzeczne [13].

Badania prowadzone na prostszych układach modelowych nie potwierdzają tezy, że lipidy są pierwotnym celem działania CZFT. Dla przykładu, pięciokrotne zwiększenie stężenia lipidów zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe w fibroblastach myszy nie wpłynęło na ich przeżywalność po ekspozycji na działanie promieniowania X [14,15]. W przypadku działania promieniowania jonizującego, czynnikiem uszka-



Rycina 1. Kolejne etapy szkodliwych reakcji częściowo zredukowanych form tlenu (CZFT) *in vivo*.

działającym jest głównie rodnik HO•, jednak podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach, w których stosowano inne CZFT. Sprzeczność pomiędzy tymi wynikami, a danymi wskazującymi na intensywne utlenianie lipidów podczas stresu oksydacyjnego można wyjaśnić zakładając, że lipidy są wtórnym, a nie pierwotnym obiektem ataku CZFT. Peroksydacja lipidów może przebiegać niezależnie od uszkodzeń komórek przez CZFT, jak stwierdzono w przypadku błon synaptycznych kory mózgowej poddanych działaniu askorbinianu i Fe²⁺ oraz błon plazmatycznych kardiomiocytów i hepatocytów, których przepuszczalność nie zwiększała się pod wpływem wolnych rodników, urazu reperfuzyjnego i produktów utlenienia lipidów [16-18]. Badania sekwencji utleniania białek, lipidów i DNA w wymienionych różnych typach komórek wykazały, że lipidy nie są pierwotnym obiektem ataku rodników wodoronadtlenkowych i nadtlenkowych [19,20]. Cząsteczki fosfolipidów w liposomach poddanych działaniu CZFT są skutecznie chronione przez białka przed utlenieniem; podobna sytuacja ma zapewne miejsce *in vivo* [21]; wykazano m.in., że utlenianie lipidów zachodzi dopiero w późnej fazie ostrego zapalenia trzustki [22].

Choć integralność DNA jest niewątpliwie kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania komórek, istnieją dane wskazujące, że, podobnie jak lipidy, DNA jest także wtórnym obiektem ataku CZFT. Wniosek ten wynika z badań zarówno układów modelowych, jak i żywych komórek. Jedne z pierwszych badań wirusa T4 wykazały, że białka, a nie DNA były głównym celem ataku rodnika HO• [23]. Następne badania tej samej grupy potwierdziły ten wniosek w odniesieniu do rodników H• i HO•, podkreślając równocześnie znaczenie lokalizacji miejsca wytwarzania rodników [24]. Wyniki badań sekwencji zdarzeń podczas uszkodzania cząsteczek różnych związków przez CZFT także nie wskazują na to, by pierwotnym obiektem ataku był DNA. Uszkodzenie DNA nie było wczesnym efektem działania CZFT na hepatocyty i komórki szpiczaka myszy [25]. Podobnie, fragmentacja DNA w komórkach Sp2/20 poddanych działaniu HO• zachodziła dopiero po dłuższej inkubacji, a elektroferogramy DNA cechowały się obecnością „drabinki”, co jest typowe dla enzymatycznej degradacji DNA, a nie bezpośredniej indukcji pęknięć DNA przez wolne rodniki, których reakcje nie są tak miejscowo specyficzne jak działanie nukleaz [26].

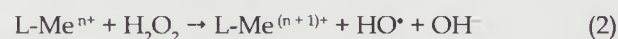
Niedawne badania dotyczące tzw. „efektu przypadkowego uszkodzenia” (ang. *bystander effect*) wskazały na konieczność modyfikacji dogmatu o mechanizmie mutagennego i kancerogennego działania promieniowania jonizującego [27]. Okazało się bowiem, że mutacje mogą powstawać w komórkach nie tyle w wyniku bezpośredniego uszkodzenia DNA przez promieniowanie, lecz raczej w wyniku działania czynników powstających w otoczeniu komórek (osoczu, płynie pozakomórkowym, komórkach sąsiadujących) [28-30]. Choć czynniki te, podobnie jak mechanizm ich działania, nie zostały jeszcze zidentyfikowane, badania te sugerują, że *in vivo* DNA jest skutecznie chroniony przed działaniem pierwotnych CZFT i jest w efekcie wtórnym obiektem ataku, podobnie jak lipidy.

Wyniki wielu prowadzonych prac wskazują na ochronną rolę białek w stosunku do DNA. Wcześniejsze prace wy-

kazały ochronną rolę histonów przed uszkodzeniem DNA przez promieniowanie jonizujące [31]. Późniejsze badania potwierdziły ochronne działanie białek na DNA i przyniosły szczegółowe wyjaśnienie mechanizmu tego efektu. Wykazano, że działanie rodników wytwarzanych przez kompleks żelaza z ADP w obecności H₂O₂ i askorbinianu powoduje stochastyczną degradację DNA i wytworzenie mieszaniny fragmentów o różnej długości, co daje obraz degradacji DNA zupełnie odmienny od degradacji przez nukleazy prowadzącej do powstawania fragmentów o określonej długości wskutek przecinania nici DNA w miejscach wolnych od histonów [32]. Ljungman i wsp. stwierdzili, że białka związane z DNA silnie chronią DNA niż białka obecne w cytosolu [33]. Późniejsze prace tej grupy wykazały postępującą degradację DNA w chromatynie poddanej działaniu rodników HO• w miarę usuwania z niej białek [34]. Wyniki szczegółowych badań dotyczących degradacji nukleosomalnego DNA przez HO• a prowadzonych przez grupę francuską pozostają w doskonałej zgodności z przewidywaniami modelu teoretycznego, zakładającego, że najważniejszym czynnikiem chroniącym DNA są histony [35]. Badania inaktywacji operonu *lac E. coli* przez promieniowanie wykazały, że większość rodników HO• (70-80%) wytworzonych przez promieniowanie reaguje z białkowym składnikiem kompleksu [36].

BIAŁKA JAKO PIERWOTNY OBIEKT ATAKU CZFT W KOMÓRCIE

Niskie prawdopodobieństwo bezpośrednich reakcji CZFT z lipidami i DNA w komórkach wskazuje na białka jako najbardziej prawdopodobny pierwotny obiekt ataku CZFT. Szereg obserwacji potwierdza to przewidywanie. Powstające w komórkach pierwotne CZFT, anionrodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, wytwarzają rodnik HO• w reakcji Fentona (2):



W reakcjach (1) i (2) L oznacza ligand, a Me jon metalu. Prawdopodobieństwo reakcji wytworzonego w ten sposób rodnika HO• z białkami jest bardzo wysokie z kilku powodów. Po pierwsze, wysoka wartość potencjału redoks HO• sprawia, że w złożonych układach o reaktywności HO• decydują głównie stężenia potencjalnych substratów. Rycina 2 pokazuje, że w typowej komórce ssaka ponad 70% wytworzonych rodników HO• reaguje z białkami, a nie z kwasami nukleinowymi czy lipidami. Nic więc dziwnego, że wiele danych wskazuje na ścisły związek pomiędzy wytwarzaniem CZFT i utlenianiem białek zarówno w układach modelowych, jak i w żywych komórkach i organizmach [37]. Po drugie, lokalizacja wytwarzania CZFT w komórce nie jest przypadkowa: HO• wytwarzany jest miejscowo specyficznie (reakcja 2), w tych miejscach, w których zlokalizowane są jony metali mogące uczestniczyć w reakcji Fentona. Średnia droga dyfuzji rodnika HO• wynosi tylko kilka nm, stąd też reaguje on blisko miejsca powstania. W organizmie jony metali przejściowych są zwykle luźno związane z białkami, na co wskazują wyniki badań uszkodzeń aminokwasów w białkach eksponowanych na działanie CZFT. Uszkodzeniu

ulegają zwykle aminokwasy wiążące jony metali [37]. Po trzecie, uszkodzenie białek może nastąpić nawet w obecności innych potencjalnych obiektów ataku CZFT, bo błony biologiczne i chromatyna zawierają zwykle zbliżone ilości białek i, odpowiednio, lipidów i DNA.

W oparciu o te przesłanki należy stwierdzić, że w organizmach żywych powstawanie CZFT prowadzi nieuchronnie do uszkodzeń białek. Chemia tych uszkodzeń jest dobrze znana. Wiadomo, że wszystkie CZFT tworzone w układach biologicznych powodują denaturację białek, ich fragmentację i agregację, utlenianie poszczególnych reszt aminokwasowych i zazwyczaj modyfikację lub utratę funkcji biologicznych białek [37]. Względny udział uszkodzeń poszczególnych typów zależy od rodzaju i stężenia CZFT oraz środowiska reakcji (pH, obecność tlenu, itd.). Bezpośrednie uszkodzenie białek wydaje się mieć jednak w większości ograniczone znaczenie biologiczne. Wobec braku danych wskazujących na możliwość pełnienia przez białka roli przekaźników szkodliwego działania CZFT, biochemię CZFT zdominował pogląd, że oksydacyjne modyfikacje białek nie są groźne dla komórek, gdyż mogą być naprawione przez antyoksydanty lub enzymy naprawcze, bądź też uszkodzone cząsteczki białek, będą usunięte drogą proteolizy i zastąpione przez nowo zsyntetyzowane cząsteczki [38].

Dogmat ten uległ rewizji stosunkowo niedawno, kiedy nasze badania wykazały, że białka utlenione przez CZFT stają się chemicznie aktywne [39]. Aktywność ta polega głównie na bardzo wydajnym wytwarzaniu grup wodoronadtlenkowych. Ekspozycja albuminy na działanie HO^\bullet powoduje powstawanie grup wodoronadtlenkowych $-\text{OOH}$ w ilościach dochodzących do około 50% ilości rodników HO^\bullet . Dalsze prace pokazały, że te grupy (BiaOOH) mogą inicjować powstawanie nowych rodników, takich jak rodniki nadtlenkowe (ROO^\bullet) i alkoksylowe (RO^\bullet), utleniać antyoksydanty (takie jak glutation i askorbinian), prowadzić do powstawania wiązań kowalencyjnych pomiędzy białkami a DNA i powodować inaktywację cząsteczek enzymów, które same nie były obiektem ataku rodników HO^\bullet . Wyniki te dowodzą, że białka są poważnymi kandydatami do roli pierwotnego obiektu ataku CZFT (Ryc. 2), a wodoronadtlenki białek muszą być uważane za nowy rodzaj CZFT [40].

Powstawanie nadtlenków białek w komórkach narażonych na stres oksydacyjny stwierdziliśmy po raz pierwszy 10 lat temu. Doświadczenia wykazały tworzenie nadtlenków białek w komórkach U937 eksponowanych na działanie inicjatora azowego, którego homolityczny rozkład prowadzi do powstawania rodników nadtlenkowych [41]. Dalsze prace, w których komórki szpiczaka myszy Sp2/20 poddawane były działaniu rodnika HO^\bullet potwierdziły wy-

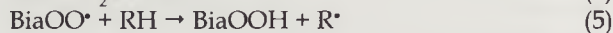
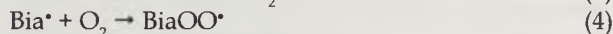
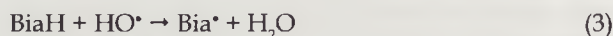


Rycina 2. Proporcje substratów pierwotnych reakcji rodników HO^\bullet w typowej komórce ssaka.

tworzenie nadtlenków białek i równocześnie wykazały, że tylko rodniki powstające wewnątrzkomórkowo są skutecznymi utleniaczami białek [26]. Obecnie nie ma wątpliwości, że efektem działania różnych CZFT zarówno w układach modelowych, jak w komórkach, jest utlenianie białek oraz, że utlenione białka mogą przekazywać uszkodzenia spowodowane przez CZFT innym składnikom komórek.

SZKODLIWE EFEKTY RODNIKÓW BIAŁEK

Reakcje chemiczne prowadzące do powstawania nadtlenków białek są proste. W przypadku ataku rodnika HO^\bullet , zachodzą następujące reakcje:



gdzie Bia oznacza cząsteczkę białka. Czynnikiem redukującym (RH) mogą być niskocząsteczkowe antyoksydanty takie jak glutation (GSH), czy askorbinian (HAsc), ale mogą nimi być także grupy $-\text{SH}$ białek, a nawet inne reszty aminokwasowe w utlenionym białku. Oczywiście jest, że wytwarzaniu końcowego produktu, jakim jest nadtlenek białka BiaOOH , towarzyszy powstawanie szeregu nowych wolnych rodników białek.

Wytwarzanie i przemiany rodników białek były badane intensywnie w ciągu ostatniego stulecia. Wyniki tych badań mają bezpośrednie przełożenie na sytuację *in vivo*, bowiem bardziej prawdopodobne jest tworzenie przez powstające w komórkach CZFT rodników białek niż rodników innych składników komórek. Chemia i biochemia wolnych rodników białek i aminokwasów omówiona jest w szeregu świetnych artykułów przeglądowych [31,37,42].

Wiadomo, że niesparowany elektron w pierwotnych rodnikach wytwarzanych w cząsteczkach białek jest zlokalizowany przeważnie na atomie węgla i ma zwykle właściwości redukujące. W warunkach tlenowych rodniki Bia^\bullet przeważnie reagują z tlenem, gdyż reakcja ta charakteryzuje się bardzo wysoką stałą szybkości, około $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. W tkankach, w których stężenie tlenu jest niskie, możliwe jest zachodzenie reakcji rodników Bia^\bullet z endogennymi antyoksydantami, takimi jak askorbinian, jeśli szybkość reakcji (6) jest porównywalna z szybkością reakcji (4):



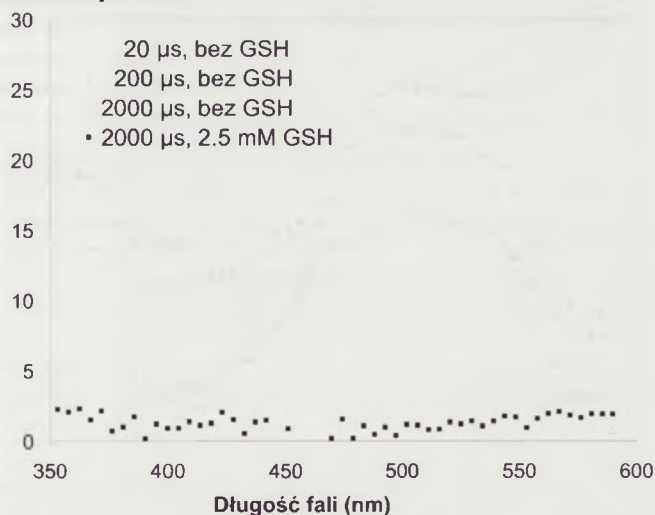
Zachodzenie reakcji (6) zostało stwierdzone dopiero niedawno, a bodźcem do podjęcia badań nad taką możliwością były dane dowodzące, że rodniki stworzone w reakcjach (3) i (4) mogą teoretycznie wywoływać silnie destrukcyjne efekty w organizmach żywych. Istotnym aspektem jest wysoka wydajność tworzenia nadtlenków białek, co świadczy, że ich prekursorzy, pierwotne rodniki białkowe Bia^\bullet , też muszą być tworzone w stosunkowo dużych ilościach. Do niedawna dane dotyczące reakcji rodników białek w warunkach zbliżonych do fizjologicznych były nieliczne. Jedyne opublikowane dane dotyczyły reakcji pierwotnych rodników lizozymu z askorbinianem i z kwasem moczowym [43]. Stałe szybkości tych reakcji okazały się być dość

wysokie (około $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), co sugerowało, że reakcje rodników innych białek także mogą być szybkie i odpowiadać za niektóre efekty biologiczne działania CZFT. Pomiary szybkości reakcji, których stałe szybkości są wyższe niż $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ wymagają użycia techniki radiolizy impulsowej albo fotolizy błyskowej. Podjęliśmy takie badania we współpracy z grupą profesora Koppenola w Zurychu, dysponującą odpowiednią aparaturą. Dotychczas doświadczenia skupiły się na pomiarach szybkości reakcji rodników lizozymu z glutationem i rodników szeregu innych białek z askorbinianem, ponieważ obie te substancje pełnią szereg fundamentalnych funkcji *in vivo* i są najważniejszymi hydrofilowymi niskocząsteczkowymi wewnątrzkomórkowymi antyoksydantami.

UTLENIANIE GLUTATIONU PRZEZ WOLNE RODNIKI LIZOZYMU

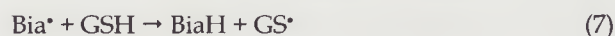
Glutation (GSH) składa się z trzech reszt aminokwasowych, z których reszta cysteiny zawiera reaktywną grupę -SH. Grupy -SH glutationu są najbardziej licznymi niskocząsteczkowymi tiolami w komórkach. GSH pełni istotną rolę w przebiegu i regulacji wielu funkcji komórek, takich jak detoksykacja ksenobiotyków, synteza DNA i innych makrocząsteczek, utrzymywanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym, regulacja cyklu komórkowego i utrzymywanie homeostazy redoks [3,44,45]. Ponadto, GSH może częściowo naprawiać uszkodzenia biomolekuł spowodowane przez reakcje wolnych rodników. W reakcjach tych powstaje rodnik GS^\bullet , usuwany zwykle poprzez tworzenie GSSG albo reakcje z tlenem [46,47]. Utrzymanie właściwego stężenia GSH jest więc krytyczne dla normalnego funkcjonowania komórek. Stężenie glutationu w komórkach może być obniżone w sytuacji stresu oksydacyjnego. Sytuacja taka ma miejsce w takich chorobach wątroby jak marskość i zapalenie wątroby (zwłaszcza typu B), choroba Wilsona, w alkoholizmie i niedożywieniu (kwashiorkor), w chorobach płuc (złóżnienie, azbestoza) i w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona [1,48].

Absorbancja x 1000

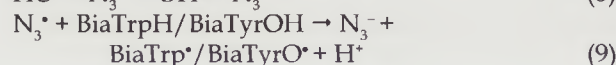
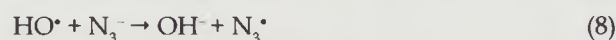


Rycina 3. Powstawanie i zanik rodników aromatycznych lizozymu.

Mechanizm obniżenia poziomu GSH podczas stresu oksydacyjnego nie jest jasny. Najprawdopodobniej, bezpośrednią przyczyną tego zjawiska jest utlenianie GSH i tworzenie S-koniugatów glutationu albo uszkodzenie enzymów odpowiedzialnych za syntezę GSH i wskutek tego zbyt powolna synteza *de novo*. Obie sytuacje mogą być wynikiem reakcji wolnych rodników, ale jak wynika z powyższych rozważań, bezpośrednia reakcja pierwotnych CZFT z GSH jest mało prawdopodobna w porównaniu z reakcją z białkami, tak więc wolne rodniki glutationu powstają, jak się wydaje, głównie w reakcjach glutationu z wolnymi rodnikami białek :



W naszych pomiarach reakcji rodników białek wykonywanych techniką radiolizy impulsowej roztwór lizozymu nasycony N_2O był poddany nanosekundowym impulsom elektronów o energii 2 MeV i widmo powstających rodników lizozymu mierzone było w przedziale czasu 1– $10^4 \mu\text{s}$ [49]. W tych warunkach HO^\bullet jest głównym rodnikiem atakującym substancje obecne w roztworze. Rodnik ten utlenia każdy związek organiczny, więc jego reakcje z białkiem wytworzyłyby szereg nowych rodników aminokwasów, z których każdy reagowałby z inną szybkością z GSH. Analiza kinetyczna tak skomplikowanego układu nie jest możliwa; aby uprościć układ, rodniki HO^\bullet zostały zastąpione przez rodniki azydkowe N_3^\bullet , które utleniają tylko reszty aminokwasów tryptofanu i tyrozyny [50]:



Reakcje powstawania i zaniku tych aromatycznych rodników można śledzić wykorzystując ich właściwości optyczne: rodnik Trp^\bullet wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 510 nm, a rodnik TyrO^\bullet przy długości fali około 400 nm. Rycina 3 pokazuje, że w lizozymie rodnik Trp^\bullet (LZTrp^\bullet) powstaje natychmiast po impulsie, a wzrost poziomu rodników TyrO^\bullet ma miejsce później, w wyniku translatacji elektronów z TyrOH do Trp^\bullet . Analogiczne pomiary w obecności GSH wykazały redukcję Trp^\bullet przez antyoksydant, a nie w wyniku translatacji elektronów z TyrOH . Efektem reakcji było utlenianie GSH w reakcji (10); stała szybkości tej reakcji w warunkach zbliżonych do fizjologicznych miała wartość $k_{10} = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$:

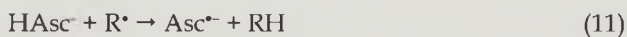


Wartość tej stałej, jak na reakcje wolnorodnikowe, nie jest duża, ale jeśli inne białka reagują podobnie, należy założyć, że w typowej komórce zawierającej białka w sumarycznym stężeniu około 5–10 mM i 2–5 mM GSH, reakcja (7) może teoretycznie doprowadzić do znaczącego utlenienia GSH w warunkach stresu oksydacyjnego. Dalsze pomiary reakcji GSH z rodnikami lizozymu w obecności tlenu wykazały że w warunkach, gdy GSH był utleniany przez rodniki nadtlenkowe (LZOO^\bullet), ilość GSH przekształconego w rodnik GS^\bullet w reakcji (10) wzrosła dziesięciokrotnie [49]. Ponieważ w tych warunkach rodnik HO^\bullet był prekursorem rodników

lizozymu, kinetyczna analiza reakcji rodników lizozymu z GSH była niemożliwa, ale badania te sugerują, że wysoce prawdopodobne jest efektywne utlenianie GSH przez wolne rodniki białek w warunkach fizjologicznych.

UTLENIANIE ASKORBINIANU PRZEZ WOLNE RODNIKI BIAŁEK

Askorbinian (HAsc⁻, witamina C) jest drugim najważniejszym antyoksydantem w organizmie, a przy tym antyoksydantem najbardziej skutecznym. Ta właściwość askorbinianu wynika ze stosunkowo niskiego potencjału redoks, pozwalającego na redukcję wielu wolnych rodników i innych oksydantów, powszechnej obecności wewnątrz komórek i w płynie pozakomórkowym oraz z niskiej reaktywności powstającego w reakcjach jednoelektrodowych redoks rodnika Asc⁻ [51]:



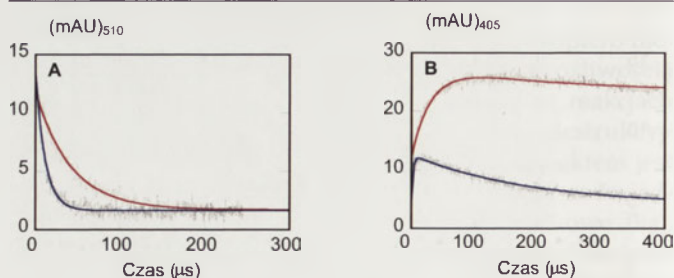
Reakcje tego rodzaju mogą prowadzić do naprawy częściowo utlenionych biomolekuł, choć niekiedy pierwotny proces prowadzący do wytworzenia wolnego rodnika białka może spowodować uszkodzenie, którego naprawa jest niemożliwa. Do kluczowego znaczenia askorbinianu w ochronie żywych organizmów przed skutkami stresu oksydacyjnego przyczyniają się też reakcje regeneracji zredukowanych form innych antyoksydantów przez askorbinian. Zarówno GS⁻ w cytosolu, jak i wolny rodnik tokoferolu (Toc⁻) w błonach komórkowych są regenerowane przez askorbinian. Należy podkreślić, że w tego typu reakcjach askorbinian ulega zwykle nieodwracalnemu utlenieniu, co ma szczególne znaczenie dla organizmów naczelnych (w tym człowieka), które utraciły zdolność biosyntezy askorbinianu wskutek mutacji genu kodującego oksydazę L-gulonolaktonową. Niedobór askorbinianu, nie uzupełniany w dostatecznym stopniu przez odpowiednią dietę, powoduje poważne zaburzenia, z których najbardziej znanym jest skorbut.

Szereg obserwacji wskazuje na obniżenie poziomu askorbinianu w sytuacjach stresu oksydacyjnego. Wyniki wcześniejszych prac poświęconych utlenianiu antyoksydantów w surowicy krwi ekspozowanej na działanie rodników nadtlenkowych wykazały, że w pierwszej kolejności utlenianiu ulega askorbinian, a dopiero potem utleniane są tokoferol, kwas moczowy i grupy tiolowe białek. Szereg doniesień dokumentuje obniżenie stężenia askorbinianu w komórkach i tkankach zwierząt i człowieka w warunkach stresu oksydacyjnego. Obniżenie stężenia tego antyoksydanta zostało stwierdzone w niedotlenieniu, w następstwie doświadczalnego urazu mózgu szczura, a także u pacjentów cierpiących na astmę, choroby nerek, zapalenie jelit, demencję, chorobę Alzheimera i chorobę Parkinsona [52-57]. W większości przypadków obniżenie stężenia askorbinianu przypisywane było jego reakcjom z CZFT i innymi niezidentyfikowanymi wolnymi rodnikami. Pierwsze pomiary szybkiego utleniania askorbinianu przez rodniki Trp⁻ lizozymu sugerują jednak, że reakcje rodników białek mogą być ważną przyczyną obniżenia poziomu askorbinianu w sytuacjach stresu oksydacyjnego [43]. Za słusznością tej tezy przemawiają: wysokie stężenia białek w komórkach i tkankach i efektyw-

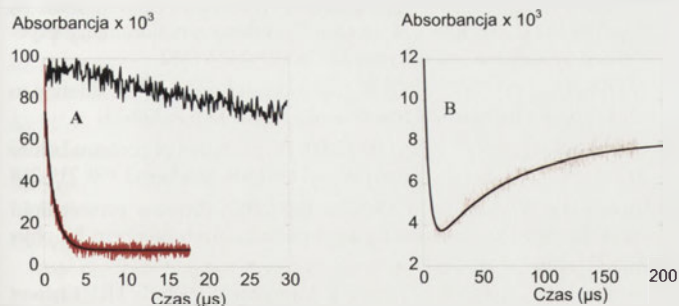
ność ich reakcji z ważnymi biologicznie CZFT. Pozostaje do wyjaśnienia, czy rodniki innych białek niż lizozym reagują równie szybko z askorbinianem, i czy niesparowane elektrony zlokalizowane na innych resztach aminokwasowych reagują z askorbinianem z podobną wydajnością jak wolne rodniki zlokalizowane na resztach tryptofanu, oraz jaki jest wpływ tlenu na te reakcje.

Poszukując odpowiedzi na powyższe pytania, zastosowaliśmy, podobnie jak w badaniach reakcji GSH, technikę radiolizy impulsowej [58]. Pochodne tryptofanu, tyrozyny oraz szeregu białek (insuliny, pepsyny, chymotrypsyny, β-laktoglobuliny i albuminy) były poddane impulsom wytwarzającym rodniki N₃⁻, a szybkość reakcji powstających rodników białkowych była mierzona przy długości fali 510 nm dla rodników BiaTrp⁻ albo 405 nm dla rodników BiaTyrO⁻. Na rycinie 4 pokazano przykład pomiaru wpływu askorbinianu na zanik wolnych rodników pepsyny. Seria pomiarów dla różnych stężeń askorbinianu pozwoliła na wyznaczenie stałych szybkości badanych reakcji. Wyniki tych oznaczeń zebrane są w tabeli 1. Wskazują one, że stałe szybkości reakcji aromatycznych rodników białek z askorbinianem są wysokie, co sugeruje, że rodniki te mogą być odpowiedzialne za utlenianie askorbinianu podczas stresu oksydacyjnego. Ponadto, w tabeli 1 pokazano, że stałe szybkości reakcji rodników Trp⁻ są podobne dla wolnego aminokwasu i dla reszt tryptofanowych w białkach, co wskazuje na łatwość penetracji HAsc⁻ do niesparowanych elektronów zlokalizowanych na resztach tego aminokwasu w białku. Reakcje BiaTrp⁻ różnią się od reakcji BiaTyrO⁻, których stałe szybkości są około 10 razy niższe, prawdopodobnie z powodu większej stabilności tych rodników w białkach.

Cenne byłoby porównanie stałych szybkości reakcji badanych rodników innych aminokwasów z askorbinianem, jednak uzyskanie analogicznych danych dla reszt aminokwasów niearomatycznych w białkach nie jest łatwe. Pierwotnym rodnikiem wytwarzanym w warunkach radiolizy impulsowej jest HO⁻, który, jak już wspomniano, jest mało selektywny w swych reakcjach i reaguje z każdą resztą aminokwasową tworząc mieszaninę różnych rodników w cząsteczkach białek. Wprawdzie rodniki niearomatycznych aminokwasów wykazują absorpcję promieniowania nadfioletowego, maksymalną w zakresie około 260 nm [59], lecz wartości współczynników absorpcji są niskie, a widma różnych aminokwasów są podobne i nie pozwalają na identyfikację poszczególnych rodników i wyznaczenie stałych

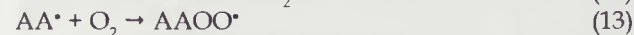
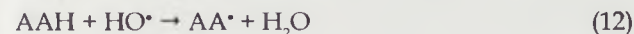


Rycina 4. Kinetyka zaniku rodników Trp⁻ (A) i TyrO⁻ (B) w pepsynie. Czerwone linie pokazują kinetykę zaniku w nieobecności askorbinianu, a niebieskie w obecności 0,2 mM HAsc⁻. Kolorowe linie są krzywymi dopasowanymi do punktów doświadczalnych. (mAU), absorbancja × 10³.



Rycina 5. A. Kinetyka zaniku wolnego rodnika Ala* w nieobecności tlenu (czarny wykres) i w obecności 150 μM tlenu (czerwony wykres). B. Szybki zanik rodnika Ala* w reakcji z tlenem (pierwsze 0-20 μs) tworzącej rodnik AlaOO* i wolniejsze tworzenie się rodnika Asc* w reakcji z AlaOO* (20-200 μs).

szybkości ich reakcji. Pewnym rozwiązaniem są pomiary reakcji *N*-acetylowych amidów aminokwasów, których reaktywność jest najbardziej zbliżona do reaktywności reszt aminokwasowych w białkach. Dodatkowymi ograniczeniami są jednak: rozpuszczalność aminokwasów w roztworach wodnych i szybkość ich reakcji z HO*, bowiem warunki doświadczenia muszą być tak dobrane, by prawie wszystkie wytworzone HO* reagowały z aminokwasem, a inne ich reakcje miały marginalne znaczenie. W wyniku tych ograniczeń, nasze pomiary reakcji rodników aminokwasów z askorbinianem mogły być przeprowadzone tylko dla pochodnych glicyny, alaniny i proliny. Szybkość reakcji rodników tych aminokwasów z tlenem mierzyliśmy za pomocą radiolizy impulsowej przy długości fali 260 nm, a szybkość reakcji z askorbinianem przy długości fali 360 nm; przy tej długości fali można jednocześnie obserwować zanik rodników aminokwasów (AA*) w reakcji (13) i powstawanie rodnika askorbinianu (reakcja 14):



Na rycinie 5 pokazano wyniki pomiarów szybkiej reakcji rodnika alaniny z tlenem ($k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i wolniejsze utlenianie askorbinianu (reakcja 14). Stałe szybkości reakcji (14) rodników nadtlenu glicyny, alaniny i proliny zestawione są w tabeli 2.

Tabela 1. Stałe szybkości reakcji askorbinianu z rodnikami aminokwasów aromatycznych

Wolny rodnik	$k \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	Piśmiennictwo
TyrO*	9.3×10^7	[43]
<i>N</i> -Ac-TyrO* amid	2.6×10^8	[60]
Trp*	1×10^8	dane własne
<i>N</i> -Ac-Trp* amid	1.4×10^8	dane własne
insulina (TyrO*)	2.9×10^8	dane własne
chymotrypsyna (TyrO*)	4×10^7	dane własne
chymotrypsyna (Trp*)	1.6×10^8	dane własne
pepsyna (TyrO*)	3.5×10^7	dane własne
pepsyna (Trp*)	1.8×10^8	dane własne
β-laktoglobulina (TyrO*)	4×10^5	dane własne
β-laktoglobulina (Trp*)	2.2×10^7	dane własne
lizozym (TyrO*)	1.1×10^7	[43]
lizozym (Trp*)	8×10^7	[61]

Tabela 2. Stałe szybkości reakcji askorbinianu z rodnikami nadtlenu pochodnych aminokwasów.

Rodnik nadtlenu pochodnej aminokwasu (AAOO*)	$k \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
<i>N</i> -Ac-GlyOO*-NH ₂	2.5×10^7
<i>N</i> -Ac-AlaOO*-NH ₂	8.7×10^6
<i>N</i> -Ac-ProOO*-NH ₂	1.5×10^7

Wyniki przedstawione w tabelach 1 i 2 pozwalają na wstępną odpowiedź na pytanie, które rodniki białek mogą być głównie odpowiedzialne za utlenianie askorbinianu: czy są to rodniki, w których niesparowany elektron jest zlokalizowany na atomie węgla, czy na atomie tlenu. Zależec to musi od stężeń tlenu i askorbinianu, które będą różne dla różnych tkanek. W tkankach człowieka stężenie askorbinianu waha się między 4 i 2800 μM, ze średnią wartością około 750 μM. Stężenie tlenu w większości tkanek wynosi zwykle około 30 μM lub jest niższe. Biorąc pod uwagę średnie wartości stężeń tlenu i askorbinianu można oczekiwać, że rodniki węglowe w białkach będą reagować z askorbinianem około dwa razy szybciej niż z tlenem, ale ten stosunek szybkości będzie różny w zależności od tkanki. Ogólnie biorąc, nasze wyniki wskazują, że zarówno rodniki Bia* jak i BiaOO* mogą skutecznie utleniać askorbinian w warunkach *in vivo*.

UWAGI KOŃCOWE

Chociaż szkodliwe efekty powstawania wolnych rodników w żywych organizmach są znane od dawna, ich istotna rola w utrzymywaniu homeostazy komórek została rozpoznana dopiero w ostatnich latach. Obecnie nie ulega wątpliwości, że prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych wymaga obecności wolnych rodników na określonym, dość niskim poziomie i przeciwdziałania ich nadmiarowi [1]. Wiele badań wykazało, że ingerencja w te procesy nie jest łatwa, a głównym problemem jest ciągle niedostateczna wiedza o kluczowych reakcjach w łańcuchu łączącym wytwarzanie nadmiaru wolnych rodników z patologią (Ryc. 1), co w rezultacie nie pozwala na racjonalne planowanie terapii chroniącej przed skutkami stresu oksydacyjnego. Sytuację komplikują kontrowersje co do patogenicznej roli wolnych rodników sprowadzające się głównie do pytania, czy wolne rodniki są bezpośrednią przyczyną pewnych stanów chorobowych, czy też przyczyniają się raczej do progresji tych stanów niż do ich genezy.

Z praktycznego punktu widzenia, jakim jest poszukiwanie metod ograniczania lub naprawy uszkodzeń składników organizmu spowodowanych przez stres oksydacyjny, kwestia ta wydaje się być czysto akademicka. Nie ulega wątpliwości, że wielu chorobom towarzyszy stres oksydacyjny, a co za tym idzie, nadmierny poziom wolnych rodników – a kwestia, czy wolne rodniki wywołują, czy tylko potęgują patologię ma drugorzędne znaczenie. Całkowite usunięcie wolnych rodników z organizmu jest nie tylko niemożliwe, ale i niepożądane, zatem prawdopodobnie najskuteczniejszą metodą zapobiegającą skutkom stresu oksydacyjnego jest utrzymanie optymalnego poziomu najważniejszych naturalnych endogennych antyoksydantów, askorbinianu i glutationu.

Zestawienie danych dokumentujących obniżenie poziomu tych antyoksydantów w warunkach stresu oksydacyjnego i wyników naszych badań dowodzących, że są one efektywnie utleniane przez rodniki białek, wskazuje nowy potencjalny kierunek terapii, polegający na zastosowaniu środków mogących przeciwdziałać reakcjom wolnych rodników białek. Zadanie to nie jest proste, bowiem związki, które mogłyby być zastosowane w terapii muszą być nietoksyczne, muszą gromadzić się w tkankach w odpowiednich stężeniach i szybko reagować z rodnikami białek. Być może niektóre ze znanych antyoksydantów spełniają te warunki, ale nie dysponujemy dobrymi narzędziami badania ich reakcji z wolnymi rodnikami białek. Należy jednak oczekiwać stworzenia takich narzędzi badawczych i znalezienia związków skutecznie zapobiegających przekazywaniu uszkodzenia przez CZFT od pierwotnego celu ataku, jakim są białka, do innych, wtórnych obiektów ataku w komórkach.

PIŚMIENNICTWO

- Halliwell B, Gutteridge J (2007) Free radicals in biology and medicine, 4th edn. Clarendon Press, Oxford.
- Bartosz G (1995) Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247
- Sies H (1991) Oxidative stress. Academic Press, London
- Sies H (1997) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31S-38S
- Pietzsch J, red (2006) Protein oxidation and disease. Research Signpost, Trivandrum, India
- Halliwell B (1995) The biological significance of oxygen-derived species. In: Valentine J, Foote C, Greenberg A, Liebman J (red) Active oxygens in biochemistry. Blackie Academic and Professional, Glasgow
- Von Sonntag C, Schuchmann H-P (1994) Suppression of hydroxyl radical reactions in biological systems: considerations based on competition kinetics. *Methods Enzymol* 233: 47-56
- Von Sonntag C (1987) The chemical basis of radiation biology. Taylor and Francis, Inc., London
- Buxton G, Greenstock C, Helman W, Ross A (1988) Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH•/•OH/O•) in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry, Reference Data* 17: 513-886
- Pryor WA (1986) Cancer and free radicals. *Basic Life Sci* 39: 45-59
- Gebicki JM, Allen AO (1969) Relationship between critical micelle concentration and rate of radiolysis of aqueous sodium linoleate. *J Phys Chem* 73: 2443-2444
- McCall MR, Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 26: 1034-1053
- Wolters H, Konings AW (1984) Radiosensitivity of normal and polyunsaturated fatty acid supplemented fibroblasts after depletion of glutathione. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 46: 161-168
- Goulet DL, Fisher GJ, Pageau R, van Lier JE (1986) Effect of membrane fatty acid composition on radiosensitivity of V79 Chinese hamster cells. *Biochim Biophys Acta* 875: 414-417
- Hensley K, Carney J, Hall N, Shaw W, Butterfield DA (1994) Electron paramagnetic resonance investigations of free radical-induced alterations in neocortical synaptosomal membrane protein infrastructure. *Free Radic Biol Med* 17: 321-331
- Durot I, Maupoil V, Ponsard B, Cordelet C, Vergely-Vandriessse C, Rochette L, Athias P (2000) Oxidative injury of isolated cardiomyocytes: dependence on free radical species. *Free Radic Biol Med* 29: 846-857
- Caraceni P, Yao T, Esposti S, Gasbarrini A, Bowie B, Zern M, Borle A, van Thiel D (1994) Effect of vitamin E on reoxygenation injury experienced by isolated hepatocytes. *Life Sci* 55: 1427-1432
- Du J, Gebicki JM (2002) DNA degradation and protein peroxidation in cells exposed to hydroxyl free radicals. *Redox Rep* 7: 329-331
- Gieseg S, Duggan S, Gebicki JM (2000) Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochem J* 350: 215-218
- Tweeddale HJ, Kondo M, Gebicki JM (2007) Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 459: 151-158
- Reinheckel T, Nedelev B, Prause J, Augustin W, Schulz HU, Lippert H, Halangk W (1998) Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 24: 393-400
- Samuni A, Chevion M, Halpern YS, Ilan YA, Czapski G (1978) Radiation-induced damage in T4 bacteriophage: the effect of superoxide radicals and molecular oxygen. *Radiat Res* 75: 489-496
- Samuni A, Chevion M, Czapski G (1984) Roles of copper and O₂ in the radiation-induced inactivation of T7 bacteriophage. *Radiat Res* 99: 562-572
- Caraceni P, De Maria N, Ryu HS, Colantoni A, Roberts L, Maitt ML, Pye Q, Bernardi M, Van Thiel DH, Floyd RA (1997) Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 23: 339-344
- Du J, Gebicki JM (2004) Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2334-2343
- Zhou H, Suzuki M, Randers-Pehrson G, Vannais D, Chen G, Trosko JE, Waldren CA, Hei TK (2001) Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14410-14415
- Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK (2000) Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2099-2104
- Lehnert BE, Goodwin EH, Deshpande A (1997) Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* 57: 2164-2171
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2001) Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 473-478
- Garrison WM (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem Rev* 87: 381-398
- Enright HU, Miller WJ, Hebbel RP (1992) Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage. *Nucleic Acids Res* 20: 3341-3346
- Ljungman M, Nyberg S, Nygren J, Eriksson M, Ahnstrom G (1991) DNA-bound proteins contribute much more than soluble intracellular compounds to the intrinsic protection against radiation-induced DNA strand breaks in human cells. *Radiat Res* 127: 171-176
- Ljungman M, Hanawalt PC (1992) Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Mol Carcinog* 5: 264-269
- Begusova M, Sy D, Charlier M, Spothem-Maurizot M (2000) Radiolysis of nucleosome core DNA: a modelling approach. *Int J Radiat Biol* 76: 1063-1073
- Begusova M, Eon S, Sy D, Culard F, Charlier M, Spothem-Maurizot M (2001) Radiosensitivity of DNA in a specific protein-DNA complex: the lac repressor-lac operator complex. *Int J Radiat Biol* 77: 645-654
- Davies MJ, Dean RT (1997) Radical-mediated protein oxidation. Oxford University Press, Oxford
- Halliwell B (1988) Albumin — an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 37: 569-571
- Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Gebicki JM, Dean RT (1992) Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins. *Biochem J* 282: 621-624
- Gebicki JM (1997) Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox Rep* 3: 99-110

41. Giese S, Duggan S, Gebicki JM (2000) Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals. *Biochem J* 350: 215-218
42. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324: 1-18
43. Hoey BM, Butler J (1984) The repair of oxidized amino acids by antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 791: 212-218
44. Sies H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27: 916-921
45. Wardman P (1988) Conjugation and oxidation of glutathione via thiol free radicals. W: Sies H, Ketterer B (red) *Glutathione conjugation*. Academic Press, New York
46. Wardman P, von Sonntag C (1995) Kinetic factors that control the fate of thiol radicals in cells. *Methods Enzymol* 251: 31-45
47. Schoneich C (1995) Kinetics of thiol reactions. *Methods Enzymol* 251: 45-55
48. Liu R-M, Gaston Pravia KA (2010) Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 48: 1-15
49. Nauser T, Koppenol WH, Gebicki JM (2005) The kinetics of oxidation of GSH by protein radicals. *Biochem J* 392: 693-701
50. Land EJ, Prutz WA (1979) Reaction of azide radicals with amino acids and proteins. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 36: 75-83
51. Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-43
52. Kume-Kick J, Rice M (1998) Estrogen-dependent modulation of rat brain ascorbate levels and ischemia-induced ascorbate loss. *Brain Res* 803: 105-113
53. Moor E, Shohami E, Kanevsky E, Grigoriadis N, Symeonidou C, Kohlen R (2006) Impairment of the ability of the injured aged brain in elevating urate and ascorbate. *Exp Gerontol* 41: 303-311
54. Buffinton G, Doe W (1995) Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients. *Free Radic Res* 22: 131-143
55. Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD, Young IS, Lawson JT (1999) Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM* 92: 39-45
56. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C (2003) Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1272-1280
57. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ (2005) Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 26: 257-264
58. Domazou AS, Koppenol WH, Gebicki JM (2009) Efficient repair of protein radicals by ascorbate. *Free Radic Biol Med* 46: 1049-1057
59. Nauser T, Casi G, Koppenol WH, Schoneich C (2008) Reversible intramolecular hydrogen transfer between cysteine thiol radicals and glycine and alanine in model peptides: absolute rate constants derived from pulse radiolysis and laser flash photolysis. *J Phys Chem B* 112: 15034-15044
60. Jovanovic SV, Simic MG (1985) Repair of tryptophan radicals by antioxidants. *J Free Radic Biol Med* 1: 125-129
61. Santus R, Patterson LK, Hug GL, Bazin M, Maziere JC, Morliere P (2000) Interactions of superoxide anion with enzyme radicals: kinetics of reaction with lysozyme tryptophan radicals and corresponding effects on tyrosine electron transfer. *Free Radic Res* 33: 383-391

The role of proteins in propagation of damage induced by reactive oxygen species *in vivo*

Janusz M. Gębicki^{1,✉}, Grzegorz Bartosz²

¹Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney 2109, Australia

²Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 S. Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

✉e-mail: jgebicki@cbms.mq.edu.au

Key words: antioxidants, ascorbic acid, free radicals, glutathione, oxidative stress, partially reduced oxygen species, proteins

ABSTRACT

Although the damaging effects of partially reduced oxygen species (PROS) *in vivo* have long been known, the mechanism of reactions responsible for their pathological effects is still not clear. Our review presents evidence supporting the thesis, that proteins are the primary targets of PROS in cells, and that the protein radicals and other reactive protein derivatives generated act as intermediates, propagating the oxidative damage to other cell components. Understanding of the reactions of reactive forms of proteins should result in more effective defence of organisms against the effects of oxidative stress.

Oksydacyjne uszkodzenia DNA – ich analiza oraz znaczenie kliniczne

Tomasz Zaremba

Ryszard Oliński

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

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; tel.: (52) 585 37 45, e-mail: ryszardo@cm.umk.pl

Artykuł otrzymano 10 marca 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 30 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: choroby wolnorodnikowe, DNA, modyfikacje zasad azotowych, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, wolne rodniki

Wykaz skrótów: 5-OH-Hyd – 5-hydroksyhydantoina; 5-OH-5-MeHid – 5-hydroksy-5-metylohydantoina; 5-OH-Cyt – 5-hydroksycytosyna; 5,6-diOH-Ura – 5,6-dihydroksyuracyl; 5-OH-Me-Ura – 5-hydroksy-5-metylouracyl; 8-OH-Ade – 8-hydroksyadenina; BER (ang. *Base Excision Repair*) – naprawa DNA przez wycinanie zasad azotowych; CU (łac. *colitis ulcerosa*) – wrzodzące zapalenie okrężnicy; FapyAde – 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna; FapyGua – 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; GC-MS – chromatografia gazowa – spektrometria mas; HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa; HPLC-EC – wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną; HPLC-UV – wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV; LC-MS lub LC-MS/MS – chromatografia cieczowa wraz z pojedynczą lub tandemową spektrometrią masową; MMR (ang. *Mismatch Repair*) – naprawa niesparowanych nukleotydów; NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*) – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; RFT/A – reaktywne formy tlenu/azotu; Tg – glikol tymidinowy; WRT – wolne rodniki tlenowe

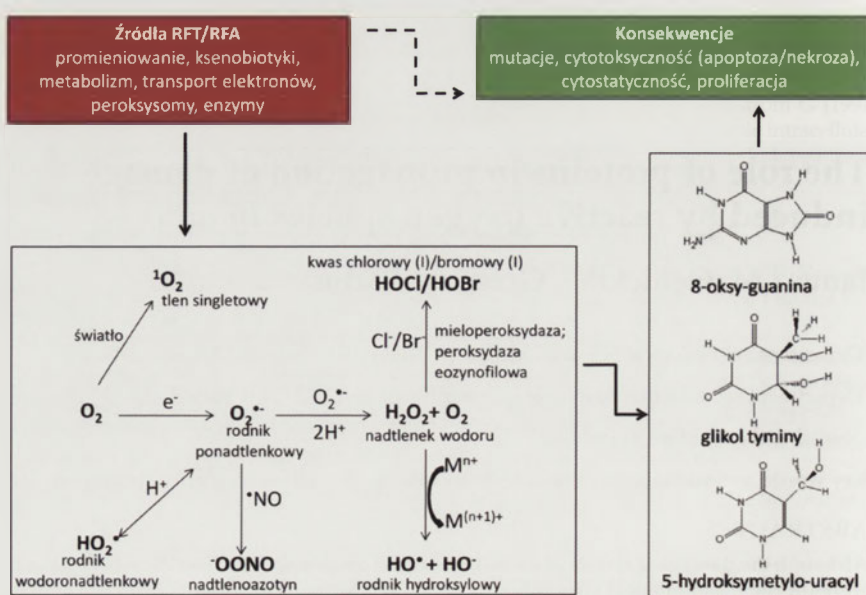
Podziękowania: Jeden z autorów (RO) jest partnerem sieci doskonałości ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility, contract No 513943).

STRESZCZENIE

Oksydacyjne uszkodzenia są niezbywalną, naturalną konsekwencją metabolizmu komórkowego wynikającą z powstawania reaktywnych form tlenu (RFT), w tym wolnych rodników tlenowych (WRT), jednak poziom oksydacyjnych uszkodzeń może być znacznie podwyższony w wyniku działania egzogennych czynników cytotoksycznych. W artykule przedstawiliśmy biologiczne podstawy powstawania oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz ich znaczenie w procesach patologicznych: chorobach nowotworowych, schorzeniach układu krążenia i starzeniu. Część artykułu poświęciliśmy również wyjaśnieniu mechanizmów naprawy DNA, od których zależy utrzymanie prawidłowego funkcjonowania komórki w następstwie uszkodzeń DNA. Pośród ponad 20 dotychczas zidentyfikowanych i opisanych oksydacyjnych modyfikacji zasad DNA jedynie 8-oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oksy-dG) stała się przedmiotem intensywnych badań. Dlatego znaczną część artykułu poświęciliśmy opisowi metod detekcji 8-oksy-dG jako markera stresu oksydacyjnego/oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

WPROWADZENIE – WOLNE RODNIKI A STRES OKSYDACYJNY

Wolne rodniki definiuje się jako reszty chemiczne (cząsteczki lub jony) posiadające na zewnętrznej orbicie (powłoce walencyjnej) reaktywnego atomu co najmniej jeden niesparowany, wolny elektron (oznaczany jako \cdot). Sytuacja, w której wypadkowy spin elektronowy jest różny od 0 czyni wolne rodniki wysoce reaktywnymi, natomiast sparowanie elektronów prowadzi do wzrostu stabilności cząsteczki. Wolne rodniki tlenowe (WRT) są cząsteczkami zawierającymi w swej strukturze atom tlenu, np.: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) czy rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Pozostałe reaktywne formy tlenu (RFT) nie mają charakteru rodnikowego, np. nad-tlenek wodoru (H_2O_2) czy tlen singletowy (1O_2) (Ryc. 1). Endogennym, naturalnym źródłem RFT jest normalny metabolizm komórkowy. Przyjmuje się, iż w zdrowym organizmie człowieka w przeciągu roku może powstawać do 2 kg $O_2^{\cdot-}$. Zakładając, że dorosły człowiek o masie 70 kg w stanie spoczynku wykorzystuje 3,5 ml O_2 /kg/min tj. 14,7 mola/dobę i że 1% tlenu pojawia się w formie $O_2^{\cdot-}$, można obliczyć, że w ciągu roku może powstać nawet 53,7 mola tj. ok. 1,7 kg tego rodnika, a w stanie wy-



Rycina 1. Reaktywne formy tlenu - źródła oraz konsekwencje dla procesów komórkowych; opracowane na podstawie [124].

Tabela 1. Charakterystyka reaktywnych form tlenu oraz ich endogenne źródła; opracowane na podstawie [133].

Cząsteczka	Symbol	Charakterystyka
anionorodnik ponadtlenkowy	$O_2^{\cdot-}$	powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego podczas fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach oraz w wyniku działania oksydaz NADPH i oksydazy ksantynowej; dobry reduktant, słaby utleniacz
rodnik hydroksylowy	$\cdot OH$	powstaje w wyniku rozpadu wiązania O-O w cząsteczce H_2O_2 pod wpływem wysokiej temp. lub promieniowania jonizującego oraz w reakcji Fentona (z udziałem jonów Fe^{2+} , Cu^+) i Habera Weissa; jest ekstremalnie reaktywny i dyfunduje na niewielkie odległości
rodnik wodoronadtlenkowy	HO_2^{\cdot}	silny oksydant, o większym powinowactwie do lipidów niż $O_2^{\cdot-}$, może inicjować peroksydację lipidów
rodnik nadtlenkowy	ROO^{\cdot}	ma gorszą zdolność do utleniania niż $\cdot OH$, ale lepszą zdolność do dyfuzji
rodnik alkoksylowy	RO^{\cdot}	reaktywność z lipidami pośrednia między ROO^{\cdot} a $\cdot OH$
tlen singletowy	1O_2	forma singletowa (bez niesparowanych elektronów) jest formą wzbudzoną o wyższej energii niż O_2 ; silny czynnik oksydacyjny o okresie półtrwania 10^{-6} s
nadtlenek wodoru	H_2O_2	utleniacz, ale reakcje z substratami organicznymi powoli; łatwo dyfunduje

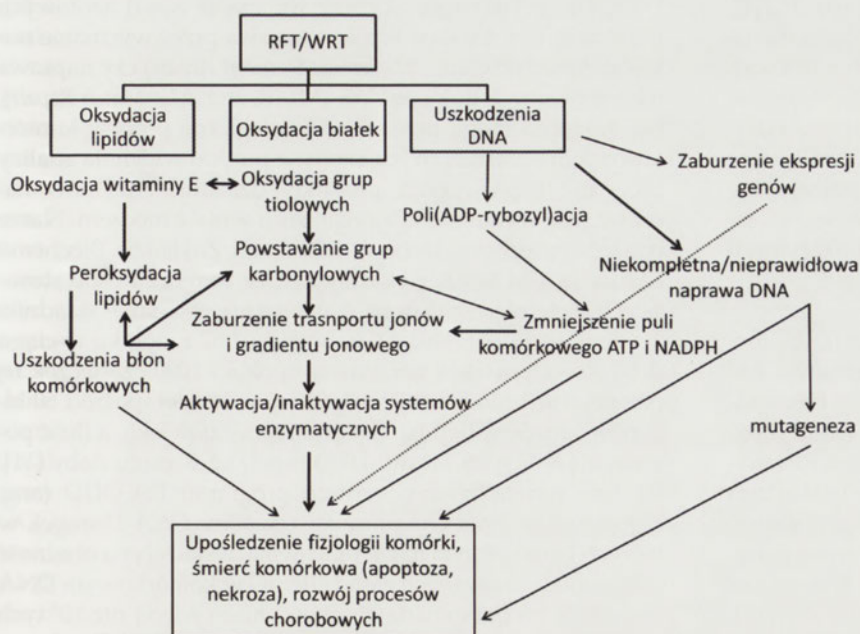
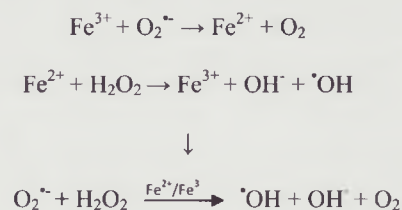
siłki fizycznego wartość ta może wzrosnąć nawet 10-krotnie [1] (obecnie wartości te korygowane są jednak nawet o jeden rząd wielkości w dół). Egzogenne źródła WRT są: promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV oraz czynniki chemiczne (np. ksenobiotyki). Szczegółowy opis RFT zamieszczono w tabeli 1.

Stała produkcja RFT w wyniku metabolizmu komórkowego prowadzi do tlenowych modyfikacji i uszkodzeń komponentów komórki (Ryc. 2). Ze względu na powszechność występowania tych uszkodzeń oraz ich szkodliwość, komórki (zarówno prokariotyczne jak i eukariotyczne) są wyposażone w liczne mechanizmy chroniące je przed negatywnym oddziaływaniem RFT. Jednak zaburzenie naturalnej równowagi pomiędzy powstawaniem RFT, a działaniem ochronnym systemu antyoksydacyjnego prowadzi do stanu stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji do niebezpiecznej akumulacji oksydacyjnych uszkodzeń komponentów komórki, aktywacji jądrowych/cytoplazmatycznych szlaków przekazywania sygnałów alarmujących o zagrożeniu komórki (np. aktywacja p53), modulacji ekspresji genów oraz aktywności polimeraz DNA

[2], co z kolei może prowadzić do rozwoju licznych stanów patologicznych. Jednymi z najgroźniejszych form uszkodzeń komórkowych są reakcje WRT z jądrowym DNA. Oddziaływanie te mogą prowadzić do powstania pojedynczych oraz podwójnych pęknięć DNA; te ostatnie są szczególnie toksyczne dla komórki i mogą bezpośrednio prowadzić do jej śmierci [3], a także powstawania wiązań sieciujących czy modyfikacji zasad azotowych. Dodatkowo szczególną uwagę zwraca się na uszkodzenia mitochondrialnego DNA (mtDNA), które mogą być istotnym elementem etiologii wielu zmian chorobowych oraz starczych [4]. Wspomniane formy uszkodzeń i ich konsekwencje dla funkcjonowania komórki będą opisane w dalszej części artykułu.

OKSYDACYJNE MODYFIKACJE/USZKODZENIA DNA

Nie wszystkie wymienione wcześniej RFT mogą bezpośrednio uszkadzać DNA [5]. Na przykład H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ inicjują uszkodzenia DNA poprzez oddziaływanie z jonami związków organicznych zawierających metale (żelazo, miedź) w reakcji Fentona prowadzącej do powstania $\cdot OH$:



Rycina 2. Zmiany struktury i funkcji komórek jako wynik oddziaływania RFT/WRT z lipidami, białkami i DNA; opracowane na podstawie [134].

Rodnik hydroksylowy, będący jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy, jest prawdopodobnie jedną z najistotniejszych przyczyn uszkodzeń DNA. Głównymi produktami oksydacyjnych uszkodzeń DNA są: 8-hydroksyadenina (8-OH-Ade), 8-oksyguanina (8-oksya-Gua), 5,6-dihydrokso-5,6-dihydrotymina (glikol tyminy, Tg) oraz uszkodzenia pierścieni zasad: 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna (FapyAde) i 2,6-diamino-4-hydrokso-5-formamidopirymidyna (FapyGua) [6,7]. Przykłady uszkodzeń i ich konsekwencje dla komórki opisane są w tabeli 2.

Tabela 2. Oksydacyjne uszkodzenia DNA i ich wpływ na procesy komórkowe; opracowane na podstawie [124].

Rodzaj uszkodzenia	Efekt	Opis
glikol tyminy (Tg)	zablokowanie replikacji	Pomimo że Tg nie posiada znaczącego potencjału mutagennego, może doprowadzić do zablokowania replikacji w odległości jednego nukleotydu przed lub za uszkodzeniem [125]; również w określonym kontekście zasad, tj. 5'-C(Tg)C-3' oraz 5'-C(Tg)A-3' może prowadzić do tranzycji T→C z częstością 0,4%
5-hydroksymetylo-uracyl (5-OHMUra)	delecja	Obecność 5-OHMUra w DNA nie prowadzi do mutacji punktowych natomiast wywołuje delecje w komórkach ssaków, które nie są spowodowane niewłaściwym wbudowaniem nukleotydów czy złym sparowaniem, lecz wynikiem procesów naprawczych (BER) poprzez udział glikozyazy [126]
niezidentyfikowane uszkodzenia	niestabilność mikrosatelitarnego DNA (MI), utrata heterozygotyczności (LOH)	W normalnych komórkach długość powtórzonych sekwencji DNA (mikrosatelitarne DNA, MI) jest stała, natomiast w komórkach nowotworowych długość ta może być zmienna. MI jest wynikiem uszkodzeń DNA i jest związana z kilkoma rodzajami nowotworów; związek pomiędzy oksydacją a MI został potwierdzony w badaniach, gdzie indukowano niestabilność a także LOH poprzez wprowadzanie mutacji w sekwencji powtózonego DNA drogą oksydacyjnego uszkodzania DNA [127,128]
Epigenetyczne efekty oksydacyjnych uszkodzeń DNA		
sygnalizacja komórkowa		RFT same w sobie stanowią rodzaj cząsteczek uczestniczących w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, jednak pozostaje w sferze przypuszczeń hipoteza, iż stres oksydacyjny jest w stanie doprowadzić do powstania takiej ilości RFT, która może następnie zmienić ekspresję genów [129]
kontrola transkrypcyjna		Wykazano, iż obecność 8-oksy-dG w rejonie promotorowym genów może wpłynąć na wiązanie czynników transkrypcyjnych [130]; obecność jednej reszty 8-oksy-dG w rejonie wiązania czynnika transkrypcyjnego AP-1 w obszarze promotorowym genów może całkowicie zatrzymać wiązanie tego czynnika a tym samym zablokować transkrypcję; reiony promotorowe bogate w GC stanowią częsty cel RFT; substytucja dG przez 8-oksy-dG w sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny Sp1 prowadzi do zaburzenia jego wiązania [131], a następnie do patologicznych konsekwencji; hipotezę tę wspierają badania wykazujące zaburzenie wiązania Sp1 oraz NF-κB w nerkach oraz wątrobie szczurów chorujących na cukrzycę, co przypisuje się uszkodzeniom DNA spowodowanym przez RFT [132]

Dotychczas najlepiej poznaną oksydacyjną modyfikacją DNA o właściwościach mutagennych jest 8-oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oksy-dG) znana też i opisywana jako forma tautomeryczna 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG). 8-OH-dG w warunkach fizjologicznych jest mniej stabilna. Występuje ona w dwóch formach: *anty* i *syn*. Forma *syn* może tworzyć stabilne pary zasad z adeniną i prawdopodobnie z guaniną [8]. Podczas procesu replikacji DNA może dojść do włączenia na przeciw 8-oksy-dG adeniny, co po dwóch rundach replikacyjnych prowadzi do transwersji G→T. Także zasady obecne w trifosfodeoksynukleotydach mogą wchodzić w reakcję z WRT. Dla przykładu 8-oksy-dGTP jest substratem dla polimeraz DNA. Możliwość błędnego parowania zmodyfikowanej oksydacyjnie guaniny może prowadzić do jej wbudowywania na przeciw adeniny i następnie po trzech rundach replikacyjnych do substytucji A→C.

Analizując zawartość 8-oksy-dG w moczu oszacowano, iż w pojedynczej komórce człowieka może powstawać nawet kilkaset takich modyfikacji w ciągu doby [9]. Pamiętając, iż modyfikacja guaniny jest jedną z bardzo wielu możliwych zmian mutagennych indukowanych przez RFT należy przypuszczać, iż większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest bądź to skutecznie usuwana przez systemy naprawy DNA, bądź jest usytuowana w nieaktywnej części genu. W przeciwnym razie ilość uszkodzeń DNA w komórce szacowana przez Ames i Golda na 10^5 w ciągu doby [10], niechybnie doprowadziłyby do śmierci komórki. Jednakże pewna część promutagennych uszkodzeń może znajdować się w obrębie genów supresorowych i onkogenów i, jeśli nie

jest naprawiona, może prowadzić do transformacji nowotworowej komórki.

NAPRAWA OKSYDACYJNYCH MODYFIKACJI/USZKODZEŃ DNA

Dzięki działaniu komórkowych mechanizmów naprawy DNA takich jak naprawa przez wycinanie zasad azotowych (BER, ang. *Base Excision Repair*), naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER, ang. *Nucleotide Excision Repair*) czy naprawa niesparowanych nukleotydów (MMR, ang. *Mis-Match Repair*), bez zakłóceń mogą przebiegać fizjologiczne procesy komórkowe. Jednocześnie, co jest istotne z punktu widzenia analizy procesów naprawczych, produkty działania enzymów naprawczych wydalone są z organizmu wraz z moczem. Nasze badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii Klinicznej CM UMK wykazały np., że w moczu osób stosujących dietę nierestrykcyjną (zawierającą wszystkie składniki żywieniowe) ilość 8-oksy-Gua wynosi 1,87 nmol/kg w ciągu doby, co odpowiada powstawaniu około 1000 cząsteczek tej potencjalnie mutagennej modyfikacji w każdej spośród 60 bilionów komórek budujących organizm człowieka, a ilość powstającej 8-oksy-dG wynosi 0,83 nmol/kg w ciągu doby [11]. Badania prowadzone w ramach programu ESCODD (ang. *European Standards Committee for Oxidative DNA Damage*), w których uczestniczyła nasza pracownia, wskazują na obecność kilku zmodyfikowanych zasad/ 10^6 dG w komórkowym DNA człowieka, co odpowiada obecności nieco więcej niż 10^3 tych modyfikacji w pojedynczej komórce człowieka [12]. Z połączenia obu tych faktów wynika, że 8-oksy-Gua jest bardzo efektywnie usuwana z komórek budujących organizm człowieka.

Z biologicznego i klinicznego punktu widzenia znaczącym jest fakt, że 8-oksyo-dG, będąc swoistym znacznikiem oksydacyjnych uszkodzeń DNA, ma działanie mutagenne.

NAPRAWA DNA PRZEZ WYCINANIE ZASAD AZOTOWYCH (BER)

BER uważana jest za zasadniczą ścieżkę usuwania i naprawy uszkodzeń oksydacyjnych. Proces ten angażuje specyficzne enzymy posiadające określone spektrum substratów, usuwające (wycinające) uszkodzoną zasadę pozostawiając miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP). Naprawa 8-oksyo-dG realizowana jest poprzez mechanizm zwany systemem „GO”. Pierwszą linią obrony stanowi fosfohydrolaza hMTH1 (ludzki homolog białka MutT), która usuwa 8-oksyo-GTP z puli nukleotydów komórkowych zapobiegając tym samym jego wbudowaniu do DNA. Drugą linią jest właściwa naprawa typu BER inicjowana przez glikozylazę. Zasadniczym enzymem odpowiadającym za pierwotną reakcję usuwania 8-oksyo-dG z DNA w komórkach człowieka jest glikozylaza 8-oksyo-dG (hOGG1) [13,14]. Enzym ten działa poprzez ścieżkę naprawy typu „short patch” („mała łata”) i posiada specyficzność w stosunku do par 8-oksyo-Gua:C w dwuniciowym DNA. Badania strukturalne hOGG1 wykazały, iż posiada ona dwie izoformy określane jako α - i β -hOGG1, przy czym izoforma α kolokalizuje z jądrem komórkowym a izoforma β z błoną wewnętrzną mitochondriów [15,16], gdyż system BER naprawia nie tylko DNA jądrowe, ale również mitochondrialne.

W celu zbadania roli OGG1 i ewentualnie innych niż BER ścieżek naprawy DNA w usuwaniu 8-oksyo-Gua, poziom tej modyfikacji w moczu został przeanalizowany u myszy z wyłączonym genem *OGG1* w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego [17]. Przy założeniu, że *OGG1* jest jedyną glikozylazą, której aktywność generuje 8-oksyo-Gua, należy oczekiwać, że poziom tej modyfikacji w moczu myszy *OGG1*^{-/-} będzie obniżony (przyjmując założenie, że system oparty o aktywność glikozylazy *OGG1* jest głównym mechanizmem naprawy uszkodzeń oksydacyjnych generującym 8-oksyo-Gua). Wyniki naszych badań pokazały obniżenie poziomu 8-oksyo-Gua w moczu u myszy *OGG1*^{-/-} o około 26% w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego [17]. Wyniki te sugerują, iż pomimo istotnej roli, jaką odgrywa *OGG1* w generowaniu 8-oksyo-Gua, istnieje alternatywna ścieżka niezależna od tego enzymu, która także prowadzi do uwalniania 8-oksyo-Gua. Ponieważ poziom 8-oksyo-Gua obniżył się zaledwie o 26% można wnioskować, iż alternatywna ścieżka efektywnie rekompensuje niedobór *OGG1*. W związku z tym, że nie zaobserwowano jednocześnie znaczącego wzrostu poziomu podstawowego 8-oksyo-Gua w komórkowym DNA myszy *OGG1*^{-/-}, dane te jasno dowodzą istnienia alternatywnej ścieżki ograniczającej poziom 8-oksyo-Gua w DNA, ale nie związanej z uwalnianiem samej zmodyfikowanej zasady. Mechanizm ten prawdopodobnie potrafi zastąpić (przynajmniej częściowo) *OGG1* w zwierzętach z wyłączonym genem *OGG1* i nie jest wykluczonym, iż jest nim naprawa przez nacięcie nukleotydu (NIR, ang. *nucleotide incision repair*), którego rola w usuwaniu 8-oksyo-Gua wciąż pozostaje w sferze badań [18,19].

Usuwanie 8-oksyo-Gua przez mechanizm typu BER jest uzupełniona przez przynajmniej dwa inne procesy: napra-

wę niesparowanych zasad z udziałem białka hMYH (ludzkiego homologu białka MutY) oraz zapobieganie niewłaściwego wbudowywania nukleotydu z udziałem hMTH1.

NAPRAWA NIESPAROWANYCH NUKLEOTYDÓW ORAZ ZAPOBIEGANIE NIEWŁAŚCIWEJ INKORPORACJI NUKLEOTYDU

Innym rodzajem glikozylazy jest hMYH, która usuwa źle sparowaną adeninę umieszczoną naprzeciw 8-oksyo-Gua. To błędne sparowanie może pojawić się bądź to w wyniku niewłaściwego wbudowania 8-oksyo-dGTP naprzeciw adeniny w nici matrycowej, bądź jako wynik wbudowania dATP naprzeciw nienaprawionej 8-oksyo-Gua obecnej także w nici matrycowej. Usunięcie przez hMYH niewłaściwie wbudowanej dA inicjuje naprawę poprzez BER, w której polimeraza naprawcza β z większą częstością wstawia dCTP naprzeciw 8-oksyo-dG w porównaniu z polimerazami replikacyjnymi, dając tym samym hOGG1 szansę usunięcia uszkodzenia. Podobnie usunięcie niewłaściwie wbudowanej 8-oksyo-Gua naprzeciw dA obecnej w nici matrycowej może być dokonane przez glikozylazę OGG2, której aktywność nakierowana jest na nowosyntezowaną w replikacji nici DNA. Ta specyficzność dotycząca rodzaju nici DNA ma ogromne znaczenie, ponieważ samo usunięcie dA w nici matrycowej przez hMYH nie eliminuje prawdopodobieństwa wystąpienia mutacji.

Dla odmiany, hMTH1 działa na wcześniejszym etapie blokując błędne wbudowanie 8-oksyo-Gua do DNA poprzez degradowanie 8-oksyo-dGTP do 8-oksyo-dGMP oraz pirofosforanu. Powszechnie uważa się, że 8-oksyo-dGMP jest ostatecznie degradowany do 8-oksyo-dG i wydalany [20]. Wciąż jednak istnieje niewiele dowodów na to, że 8-oksyo-dG jest bezpośrednim produktem naprawy DNA tj. uwolnionym z DNA jako deoksynukleozyd a nie zasada [21]. Inną nowo odkrytą glikozylazą jest glikozylaza-1 typu Nei, która usuwa 8-oksyo-Gua z niewłaściwych par z G oraz A. Jej aktywność wskazywać może na kolejny rodzaj ścieżki, w której źle sparowane uszkodzenie jest usuwane drogą naprawy DNA związanej z transkrypcją lub replikacją [22].

ROLA OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ DNA W CHOROBY

CHOROBY NOWOTWOROWE

Obecnie w pełni uwzględnia się udział oksydacyjnych uszkodzeń DNA w procesie mutagenyzy. Wystąpienie mutacji w genach supresorowych i/lub w onkogenach może prowadzić do inicjacji, promocji i progresji procesu kancerogenyzy. Wyniki badań potwierdzają, że WRT indukują mutacje w genach supresorowych p53 oraz onkogenie *Ha-ras* [12]. W przypadku genu p53 mutacja w kodonie 248 (CGG) jest najczęstszą mutacją w kilku nowotworach występujących u człowieka. Transwersje GC→TA, typowe dla błędnego sparowania 8-oksyo-Gua, są bardzo często przyczyną mutacji genu supresorowego p53 komórek raka płuc i protoonkogeny *ras* w przypadku raka wątroby u człowieka [12]. Inne badania pokazują, że zmodyfikowane zasady w DNA mogą być jednym z czynników decydujących o potencjale metastatycznym nowotworów [23]. Nasze badania dotyczące mięśniaka macicy (guz łagodny) wykazały pod-

wyższy poziom 8- oksy-Gua w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanek wolnych od zmian nowotworowych. Badania te wykazały również dodatnią korelację pomiędzy rozmiarem guza i poziomem 8-oksy Gua w DNA. Ponieważ stwierdzono zależność między złośliwieniem nowotworu i rozmiarem guza, może to oznaczać, że wysoki poziom 8-oksy-Gua i prawdopodobnie innych zmodyfikowanych zasad jest czynnikiem determinującym transformację guza łagodnego w postać nowotworu złośliwego [24]. Znacznie podwyższony poziom 8-oksy-dG w tkankach nowotworowych w porównaniu z odpowiadającymi im tkankami prawidłowymi stwierdzono również w nowotworach płuc palaczy [25]. Zaobserwowano także wzrost poziomu 8-oksy-dG wraz z liczbą wypalanych papierosów w ciągu jednego dnia [26]. Również w nowotworach żołądka, jajników i mózgu wykazano istotne zmiany zawartości 8-oksy-dG w porównaniu z odpowiadającymi im obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych [25]. Tabela 3 przedstawia zmiany poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA w różnych nowotworach.

Zwiększony poziom stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych może wynikać z faktu, iż komórki nowotworowe często wykazują znacznie obniżoną aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Niskie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy mogą prowadzić do stresu oksydacyjnego, którego skutkiem mogą być uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych. W celu wykazania zależności pomiędzy oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA, a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w tkankach nowotworowych i w tkankach wolnych od zmian nowotworowych zbadany został poziom zmodyfikowanych zasad oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej w prawidłowych i zmienionych nowotworowo tkankach płuc człowieka. W badaniach tych stwierdzono wyższy poziom uszkodzeń DNA w tkankach nowotworowych w porównaniu z obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych, szczególnie zmiany te dotyczyły poziomu 8-oksy-Gua i 8-oksy-Ade. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych była jednocześnie niższa w tkance nowotworowej [27]. Podobne zmiany stwierdzono w tkankach stercza pochodzących od pacjentów z łagodnym rozrostem prostaty, jednak tylko u części badanych pacjentów [28].

Zwiększona produkcja RFT w nowotworach

Ostatnio stwierdzony został interesujący fakt, że przynajmniej niektóre linie komórek nowotworowych produkują znaczące ilości H_2O_2 bez egzogennej indukcji przy jednoczesnym znacznie podwyższonym poziomie oksydacyjnych uszkodzeń DNA, obserwowanym w tych komórkach. H_2O_2 łatwo dyfunduje przez błony komórkowe i, jak wyjaśniliśmy wcześniej, może być przekształcany w formę wolnorodnikową $\cdot OH$ w obecności metali grup przejściowych (głównie żelaza Fe^{+2}) w przebiegu reakcji Fentona. W naszych badaniach wykazaliśmy dodatnią korelację pomiędzy poziomem tzw. wolnej puli żelaza (żelaza, które nie jest silnie związane z białkami) i endogennym poziomem 8-oksy-dG w limfocytach człowieka [29]. Wynik ten wskazuje na możliwość występowania reakcji Fentona w pobliżu komórkowego DNA, co może generować oksydacyjne

uszkodzenia tej molekuly. Inne wyniki badań [30] wykazują związek między poziomem wolnego żelaza w osoczu pacjentów chorych na hemochromatozę a zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej, co może sugerować, że podwyższony poziom żelaza w organizmie może być czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworów [31,32]. W większości nowotworów człowieka stwierdza się dużą liczbę mutacji oraz niestabilność genomu. Na przykład w DNA pojedynczej komórki izolowanej z guza nowotworowego jelita grubego stwierdza się obecność nawet 11 000 mutacji. Jednym ze źródeł tych licznych mutacji mogą być uszkodzenia DNA wywołane działaniem RFT.

Jednym z rezultatów podwyższonego poziomu RFT jest konstytutywna aktywacja czynników transkrypcyjnych, a tym samym genów podlegającym ich kontroli, (również genów kontrolujących proliferację), co w połączeniu z zwiększonym poziomem uszkodzeń DNA tworzy presję selekcyjną w kierunku fenotypu charakterystycznego dla raka [33]. Podczas gdy liczne badania zdają się potwierdzać hipotezę o roli stresu oksydacyjnego w procesie kancerogenezy, wciąż dyskutowana jest hipoteza dotycząca bezpośrednio udziału 8-oksy-dG w DNA w indukcji zmian nowotworowych. Trzeba także pamiętać, że istnieje pokaźna liczba innych stanów patologicznych, w których występuje podwyższony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA, jednakże nie prowadzi to do kancerogenezy (Tab. 3). Tym samym kwestia związku pomiędzy oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA a procesem kancerogenezy rodzi następujące hipotezy, wątpliwości i pytania:

1. Czy oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą stanowić swoisty epifenomen towarzyszący procesom patofizjologicznym, a ich podwyższony poziom nie odgrywa roli w procesie kancerogenezy?

2. „Przyczyna czy skutek?” – często wykrywany podwyższony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w nowotworach nie musi wskazywać na to, iż stał się on przyczyną zmian nowotworowych. Podwyższony poziom uszkodzeń może być efektem zmian charakterystycznych dla komórek nowotworowych (wzmocniony metabolizm, większa częstość podziałów komórkowych czy wspomniana zmniejszona aktywność enzymów antyoksydacyjnych).

3. Czy uszkodzenie oksydacyjne musi dotyczyć kodującego regionu DNA, by prowadziło do powstania mutacji ?

Jedynie rozstrzygnięcie powyższych kwestii może doprowadzić do poznania rzeczywistego związku pomiędzy oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA a nowotworem.

Zmiany w naprawie DNA w nowotworach

Zwiększona produkcja RFT może prowadzić do zwiększonego poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA, ale również może prowadzić do obniżenia syntezy i/lub aktywności enzymów usuwających takowe uszkodzenia. Istnieją wyniki badań sugerujące obniżenie aktywności procesów naprawy DNA (różne szlaki) u pacjentów cierpiących na raka [34]: 1). U pacjentów z rakiem płuc wykazano utratę heterozygotyczności w locus genu hOGG1 [35,36] z towarzyszącym podwyższeniem

Tabela 3. Oksydacyjne uszkodzenia DNA w wybranych nowotworach oraz stanach przedrakowych; opracowane na podstawie [124].

Nowotwór	Podwyższony poziom uszkodzeń ¹	Opis
ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)	↑, →	•znacząco podwyższony poziom FapyGua, 8-oksy-Gua, FapyAde, 8-oksy-Ade, 5-OH-Cyt, 5-hydrokso-5-metylohydantoiny (5-OH-5-MeHyd) oraz 5-hydroksohydantoiny (5-OH-Hyd) w DNA z limfocytów ALL (p<0,05) w porównaniu z grupą kontrolną
białaczka/chłoniak limfocytarny T-komórkowy dorosłych, ostra białaczka i zespół mieloblastyczny	↑	•znacząca różnica w poziomie 8-oksy dG w moczu i DNA limfocytów T pomiędzy białaczką/chłoniakiem dorosłych a grupą kontrolną (p<0,05); brak znaczącej różnicy w poziomie 8-oksy-dG pomiędzy chłoniakiem, ostrą białaczką i zespołem mieloblastycznym
rak skóry związany z tlenkiem arsenu (III)	↑	•statystycznie znaczący wzrost poziomu 8-oksy-dG (p<0,001) w chorobie Bowena, raku Bowena oraz rogowaceniu słonecznym w porównaniu z odpowiadającym im stanom niezwiązanym z tlenkiem arsenu (III)
różne nowotwory: gwiazdziaak włóknisty (FA; mózg); rak płuc (LC); rak żołądka (MC) rak jajnika (OC); rak okrężnicy i odbytnicy (CRC)	↑	•znacząco wyższy poziom (p≤0,05) następujących uszkodzeń: 5-OH-5-MeHyd – LC, CRC, OC 5-OH-Hyd – FA, LC, CRC, MC, OC 5-OH-MeUra – LC, MC, OC 5-OH-Cyt – LC, OC 5,6-diOH-Ura – FA, LC, CRC, MC, OC FapyAde – FA, LC, 8-oksy-Ade – FA, LC, MC, OC ksantyna – LC, MC, OC 2-OH-Ade – FA, LC, MC, OC FapyGua – FA, LC, MC, OC 8-oksy-Gua – FA, LC, CRC, MC, OC; uwaga: za wyjątkiem raka płuc (n=2) tylko po jednym pacjencie z danego typu nowotworu
rak piersi oraz inwazyjny, przewodowy rak piersi	↑	•statystycznie znacząco wyższy (p<0,0001) poziom 8-oksy-dG w DNA z tkanki nowotworowej w porównaniu ze zdrową tkanką •poziom 8-oksy-dG znacząco (p<0,001) podwyższony w tkance nowotworowej inwazyjnego, przewodowego raka piersi; również znacząco wyższy (p=0,007) w tkance nowotworowej ERα(+) w porównaniu z ERα(-)
rak jelita grubego	↑	•znacząco podwyższony poziom 8-oksy-dG w DNA pochodzącym z pierwotnego gruczolakoraka w porównaniu z otaczającą tkanką nierakową (p<0,005); ten sam wynik potwierdzony również metodami immunohistochemicznymi •znacząco podwyższony poziom 8-oksy-dG w DNA pochodzącym z limfocytów pacjentów z nowotworem w porównaniu z kontrolami •znacząco podwyższony poziom 8-oksy-dG (p<0,005) w DNA pochodzącym z tkanki nowotworowej w porównaniu z normalną błoną śluzówką •znacząca korelacja pomiędzy poziomem 8-oksy-dG w limfocytach a śmiertelnością u mężczyzn z nowotworem (r=0,91, p<0,05)
rak oraz gruczolakorak żołądka	↑	•poziom 8-oksy-dG znacząco podwyższony w DNA pochodzącym z chorych tkanek pacjentów z przewlekłym zanikowym zapaleniem żołądka (p=0,0009), metaplastją jelitową (p=0,035) czy infekcją <i>H. pylori</i> (p=0,001) w porównaniu z kontrolami •silna negatywna korelacja (r=-0,92, p=0,01) pomiędzy występowaniem raka żołądka u kobiet a poziomem 8-oksy-dG w limfocytach •znacząco podwyższony poziom 8-oksy-dG w DNA z tkanki nowotworowej gruczolakoraka i jej obrzeża w porównaniu ze zdrową tkanką (p<0,001)
rak jajników oraz szyjki macicy i inne nowotwory ginekologiczne	↑	•znacząco (p≤0,05) podwyższony poziom 8-oksy-dG w moczu pacjentek w porównaniu z kontrolami •znacząco podwyższony poziom formamidowych pochodnych pirymidyn oraz Tg w krwinkach białych pacjentek z rakiem jajników (n=19) w porównaniu z kontrolami (n=16) poziom 8-oksy-dG w DNA pochodzącym z raka szyjki macicy zarówno z tkanki o niskim i wysokim stopniu dysplazji znacząco (p<0,001) podwyższony w porównaniu ze zdrową tkanką; brak korelacji z infekcją HPV
rak wątroby oraz guz zarodkowy wątroby (hepatoblastoma)	↑	•statystycznie znacząco (p<0,005) podwyższony poziom 8-oksy-dG w DNA z tkanki okołorakowej w porównaniu z tkanką rakową; pacjenci z przerzutami do wątroby oraz z alkoholową chorobą wątroby w ostatnim stadium wykazali brak różnicy pomiędzy wymienionymi tkankami •pozytywne barwienie immunohistochemiczne dla 8-oksy-dG w wycinkach wątroby pochodzących od 5 pacjentów
rak płuc	↑	•poziom 8-oksy-dG w DNA z limfocytów znacząco wyższy (p<0,05) w porównaniu z kontrolami •podwyższony poziom 8-oksy-dG w DNA pochodzącym z tkanki nowotworowej w porównaniu z normalną tkanką płucną
rak miększu nerki	↑	•poziom 8-oksy-dG w DNA z tkanki nowotworowej znacząco wyższy (p<0,0005) w porównaniu z normalną tkanką

¹↑Oznacza statystycznie znaczący wzrost poziomu uszkodzeń w porównaniu z grupą kontrolną. →Oznacza brak różnicy między nowotworem a kontrolą.

poziomu 8-oksyo-dG; 2). Sugeruje się, iż polimorfizmy w genach kodujących enzymy naprawcze DNA mogą mieć związek z różnym poziomem wydajności naprawy uszkodzeń [37]. Ponadto niektóre badania sugerują związek polimorfizmów w genie *OGG1* z powstawaniem raka płuc [38], jednakże kwestia ta pozostaje dyskusyjna [39].

W badaniu z udziałem naszego zespołu [40] dokonano pomiaru wszystkich kluczowych parametrów opisujących oksydacyjne uszkodzenia DNA. Badania zostały przeprowadzone na pacjentach z drobnokomórkowym rakiem płuc (wszyscy pacjenci byli palaczami) oraz grupach kontrolnych. Zmierzony został poziom 8-oksyo-Gua oraz 8-oksyo-dG w moczu oraz poziom 8-oksyo-dG w DNA leukocytów. Poziom 8-oksyo-Gua w DNA leukocytów pochodzącym od pacjentów z rakiem był znacząco wyższy niż w grupach kontrolnych (pacjenci *vs.* palacze, $p \leq 0,03$ oraz pacjenci *vs.* niepalący, $p \leq 0,001$). Ponieważ jednocześnie poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA oznaczanych w moczu (produktów naprawy DNA) był podobny u pacjentów i w grupach kontrolnych, prawdopodobnym wydaje się, iż zwiększony poziom 8-oksyo-dG w DNA leukocytów pochodzącym od pacjentów z rakiem płuc jest wynikiem obniżonego poziomu naprawy DNA (najprawdopodobniej naprawy poprzez wycinanie zasad). Hipotezę tą wsparły analizy aktywności glikozylazy 8-oksyo-Gua u palaczy. Całkowita aktywność hOGG1 była niższa w grupie palaczy z rakiem w porównaniu z palaczami wolnymi od choroby. Dodatkowo wykazano, iż myszy z wyłączonym genem *mOGG1* są bardziej predysponowane do rozwoju raka płuc, a także wykazują akumulację 8-oksyo-Gua w DNA [41].

W celu lepszego zrozumienia roli oksydacyjnych uszkodzeń DNA w rozwoju raka płuc, trzy zasadnicze parametry oceny oksydacyjnych uszkodzeń i naprawy DNA były badane u pacjentów z drobnokomórkowym rakiem płuc: ilość 8-oksyo-Gua w DNA oraz aktywność *OGG1* i 8-oksyo-dGTPazy w tkance nowotworowej raka płuc i jej obrzeżach [42]. Wyniki badania wykazały, iż aktywność glikozylazy była niższa w tkance nowotworowej w porównaniu z normalną tkanką płuca ($p \leq 0,001$). Odmienne przedstawiała się sytuacja w przypadku hydrolitycznej aktywności 8-oksyo-dGTPazy, która była wyższa w tkance rakowej w porównaniu z normalną tkanką płucną, będąc jednocześnie o trzy rzędy wyższą w porównaniu z aktywnością glikozylazy. Wyniki te jasno wskazują, iż różne elementy systemu „GO” uczestniczą w utrzymaniu poziomu 8-oksyo-Gua w ludzkim DNA, z kluczowym udziałem procesu usuwania 8-oksyo-dGTP z komórkowej puli nukleotydowej [42].

Podsumowując, przedstawione wyniki badań jasno sugerują znaczącą rolę stresu oksydacyjnego w procesie kancerogenezy, jednak problem, w jakim stopniu oksydacyjne uszkodzenia DNA wpływają bezpośrednio na procesy nowotworzenia nie został jeszcze dokładnie zbadany. Niemniej jednak można na tym etapie pokusić się o wniosek, iż uszkodzenia DNA mogą być bardziej związane z procesem inicjacji nowotworzenia niż jego promocji.

STANY ZAPALNE I CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE

Związek pomiędzy zapaleniem a stresem oksydacyjnym jest dobrze udokumentowany [43]. Znane są liczne

jednostki chorobowe, w których zaobserwowano podwyższony poziom 8-oksyo-dG. Są to m.in.: chroniczne zapalenie wątroby [44], zapalenie wątroby typu C [45] oraz atopowe zapalenie skóry. Odpowiedź układu immunologicznego może prowadzić do aktywacji leukocytów, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonego zużycia tlenu, a tym samym do zwiększonej produkcji RFT (takich jak rodnik ponadtlenkowy czy nadtlenek wodoru) i uszkodzeń DNA. Dowodów potwierdzających tę hipotezę dostarczają wyniki badań Dizdaroglu i wsp. [46], którzy wykazali, iż ekspozycja komórek na oddziaływanie aktywowanych leukocytów prowadzi do uszkodzeń DNA podobnych do tych wywołanych przez rodnik hydroksyloxy. W innych pracach wykazano również, iż ekspozycja DNA na działanie aktywowanych neutrofilów w pozycywie zawierającej jony metali spowodowało tworzenie 8-oksyo-Gua poprzez ścieżkę blokową przez inhibitory peroksydazy, katalazę, dysmutazę ponadtlenkową czy oksykwasę [47].

Chroniczne zapalenie, a tym samym stres oksydacyjny, jest blisko związane z patogenezą takich chorób autoimmunologicznych jak: reumatoidalne zapalenie stawów [48] czy toczeń rumieniowaty układowy [49]. W przypadku przewlekłego zapalenia, produkcja wolnych rodników nie tylko prowadzi do uszkodzeń tkanki łącznej, ale również do oksydacyjnych modyfikacji biomolekuł, które jak się obecnie przypuszcza, stają się antygenami, przeciw którym produkowane są auto-przeciwciała, co w konsekwencji prowadzi do stałej reakcji autoimmunologicznej [50]. Chroniczne zapalenie może być blisko związane z kancerogenezą [51], chociaż mamy niewiele dowodów wskazujących na to, że pacjenci z chronicznym stanem zapalnym, takim jak toczeń rumieniowaty, mają zwiększone ryzyko rozwoju raka [52]. Jednakże doświadczenia pokazują, iż DNA z limfocytów pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, toczeniem rumieniowatym oraz chorobą Behçeta i waskulopatią (siniczne zapalenie naczyń) zawiera podwyższony poziom 8-oksyo-dG. Dodatkowo, limfocyty pochodzące od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i toczeniem rumieniowatym są bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie nadtlenu wodoru [53]. Obecnie szacuje się, że chroniczne zapalenie może być czynnikiem rozwoju ok. 1/3 wszystkich przypadków nowotworów na świecie [54,55]. Poniżej podajemy przykłady chorób związanych z zapaleniem prowadzących do rozwoju nowotworów.

Wrzodzące zapalenie okrężnicy

Wrzodzące zapalenie okrężnicy (CU, łac. *colitis ulcerosa*) należy do grupy nieswoistych zapaleń jelita i jest przykładem choroby związanej z chronicznym zapaleniem oraz z ryzykiem rozwoju raka jelita grubego. Błona śluzowa jelita grubego pacjentów z wrzodzącym zapaleniem okrężnicy wykazuje objawy charakterystyczne dla stanów zapalnych wraz ze zwiększoną produkcją RFT i zmniejszoną ochroną antyoksydacyjną [56]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA w błonie śluzowej pacjentów z wrzodzącym zapaleniem okrężnicy akumulują się w czasie trwania choroby i osiągają swój najwyższy poziom w najbardziej dysplastycznych zmianach chorobowych [57].

Infekcje spowodowane bakterią *Helicobacter pylori*

Infekcje wywołane *H. pylori* należą do grupy głównych czynników w etiologii nowotworów żołądka. Podobnie jak w CU, tak i w tym przypadku chroniczne zapalenie spowodowane infekcją bakteryjną prowadzi do zwiększonej produkcji RFT, a w konsekwencji do oksydacyjnych uszkodzeń DNA i kancerogenezy [58]. Zwiększony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA został wykazany w tkance żołądka we wczesnych etapach infekcji spowodowanej *H. pylori* [59].

Zapalenie wątroby

Chroniczna infekcja spowodowana wirusami zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV) może prowadzić do rozwoju nowotworu wątroby. Wykazano, iż białko rdzeniowe wirusa HCV (p22) indukuje rozwój raka wątroby u transgenicznym myszy, a tym samym można przypuszczać, że podobny efekt jest możliwy u ludzi [60]. Jednym z możliwych wyjaśnień tego procesu jest indukcja stresu oksydacyjnego poprzez białko rdzeniowe wirusa. Wykazano, iż jedną z konsekwencji syntezy białka rdzeniowego jest zależny od wieku wzrost stresu oksydacyjnego w wątrobie transgenicznym myszy. Stres ten występuje niezależnie od procesu zapalnego i może być bezpośrednio zaangażowany w rozwój raka wątroby. Wykazano także, iż białko rdzeniowe HCV może nie tylko indukować produkcję RFT w hepatocytach, ale także wzmacniać ich produkcję pod wpływem stymulatorów związanych z rozwojem raka wątroby takich jak alkohol czy stan zapalny [60].

Przewlekła infekcja HCV lub HBV może prowadzić do akumulacji 8-oksy-dG w hepatocytach [61]. Warto wspomnieć, iż infekcja ta jest związana ze wzrostem proliferacji komórek, co może przyczynić się do utrwalenia uszkodzeń 8-oksy-dG w postaci mutacji, łącząc oksydacyjne uszkodzenie DNA z rozwojem raka wątroby.

Infekcja wywołana wirusem HIV

Komórki zainfekowane wirusem HIV produkują znaczne ilości O_2^* [62], który to rodnik, w połączeniu z niedoborem kluczowych enzymów oraz witamin antyoksydacyjnych może prowadzić do ciężkiego stresu oksydacyjnego u pacjentów HIV-pozytywnych. Dotychczasowe badania pokazują, że ilość oksydacyjnie modyfikowanych zasad w DNA izolowanym z limfocytów pacjentów HIV-pozytywnych bez objawów chorobowych jest znacznie wyższa w porównaniu z pacjentami HIV-negatywnymi. Ponadto, wykazano również, że suplementacja witaminami antyoksydacyjnymi może zredukować poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA [63]. Pomimo iż nie ma wątpliwości, że HIV jest przyczyną AIDS to jednak można przypuszczać, że oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą prowadzić do apoptotycznej śmierci limfocytów u pacjentów z infekcją HIV, co z kolei może prowadzić do progresji AIDS [63].

CHOROBY UKŁADU KRĄŻENIA

Miażdżycy naczyń wieńcowych, ze względu na udział RFT w rozwoju płytki miażdżycowej [64,65], może być również rozpatrywana w kategorii chorób o podłożu chro-

niczno-zapalnym, mimo iż rola uszkodzeń DNA w procesie rozwoju miażdżycy wciąż pozostaje niejasna.

Pomimo niewielu badań poświęconych oksydacyjnym uszkodzeniom DNA w chorobach krążenia, jednym z bardzo znaczących doniesień była publikacja Collinsa i wsp. [66], którzy wykazali korelację ($r = 0,95$, $p \leq 0,01$) pomiędzy przebiegiem choroby wieńcowej (wczesnymi etapami) u mężczyzn populacji europejskiej a poziomem 8-oksy-dG w limfocytach tych pacjentów. Ponadto, poziom 8-oksy-dG był znacząco wyższy w grupie pacjentów z chorobą wieńcową w porównaniu z grupą kontrolną ($p \leq 0,009$). Oczywiście z badań tych nie można wnioskować, iż podwyższenie poziomu 8-oksy-dG jest bezpośrednio odpowiedzialne za rozwój choroby, ale może on wskazywać na warunki oksydacyjne w tkankach peryferyjnych, gdzie limfocyty przebywają przez znaczną część swojego życia. Sugeruje się również, że mutacje DNA mogą odgrywać rolę w etiologii zarówno formowania płytki miażdżycowej jak i raka [67,68]. Płytki miażdżycowe w ścianach tętnic zawiera również, pośród wielu komponentów, limfocyty [64]. Zatem możliwym wydaje się udział mutacji w rozwoju miażdżycy [69].

W literaturze obecne są dowody dotyczące roli utlenionej formy LDL w rozwoju miażdżycy [65]. Ostatnio wykazano, iż utleniona forma LDL (ale nie niemodyfikowana cząsteczka) prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji i/lub aktywności enzymów naprawy typu BER. Przyjmując, iż BER jest zaangażowany w usuwanie 8-oksy-Gua z DNA, możliwym wydaje się, iż utleniona forma LDL, działając supresyjnie na naprawę DNA, może podwyższać ilość 8-oksy-dG w DNA limfocytów. Dodatkowo wykazano, iż witamina C razem z witaminą A i tokoferolem chroni przed obniżeniem poziomu enzymów naprawy DNA [70]. Podobnie, w zwierzęcym modelu miażdżycy zwiększony poziom 8-oksy-dG w DNA makrofagów piankowatych generowany dietą wysokocholesterolową, ulega obniżeniu po diecie niskolipidowej [71]. Podobny efekt wykazano w odniesieniu do komórek związanych z płytką miażdżycową [72]. Także wyniki naszych badań wskazują na związek zarówno stresu oksydacyjnego jak i oksydacyjnych modyfikacji DNA z miażdżycą [73].

USZKODZENIA NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNE

Wykazano, iż w wyniku przeprowadzonej transplantacji wątroby u szczurów doszło do wzrostu poziomu glikolu tymidynowego (Tg) w moczu oraz, że wysoki poziom Tg był związany z lepszym przyjęciem się przeszczepionej tkanki. Wyższy poziom Tg w moczu wykazano również u pacjentów po transplantacji nerek [74], co prawdopodobnie było efektem uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego. Dodatkowo, badania Lofta i wsp. [75] wykazały wzrost oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu świń po transplantacjach.

STARZENIE

W 1956 roku Harman przedstawił wolnorodnikową teorię starzenia. Zgodnie z tą teorią uszkodzenia DNA spowodowane działaniem RFT uważane są za główną i pierwotną przyczynę starzenia się. Większość badań testujących tę teorię przeprowadzanych jest na hodowlach komórkowych lub modelach zwierzęcych, głównie na gryzoniach. W licznych

badaniach, przedstawionych poniżej, wykazano większą podatność komórek starszych zwierząt na działanie induktorów stresu oksydacyjnego. Zaobserwowano także zwiększenie wraz z wiekiem liczby oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA.

Badania hodowli komórkowych wykazały, że w starzejących się fibroblastach człowieka powstaje każdego dnia 4-krotnie więcej 8-oksy-dG, w porównaniu z młodymi komórkami, a stały poziom 8-oksy-dG w DNA jest o około 35% wyższy w starych komórkach w porównaniu z komórkami młodymi [76]. Wcześniejsze prace Hayflicka [77] wykazały, iż komórki hodowlane *in vitro*, w tym fibroblasty człowieka, mają określony limit podziałów komórkowych. Hayflick zaobserwował, że po okresie szybkiego wzrostu *in vitro* tempo proliferacji komórek gwałtownie spada. Komórki ostatecznie wchodzą w fazę całkowitego zahamowania podziałów. Jednakże w starych organizmach wiele komórek jest w dalszym ciągu zdolnych do podziałów. Charakterystyczna jest odwrotna korelacja między liczbą podziałów, do jakiej zdolne są komórki w hodowli *in vitro* a wiekiem organizmu ich dawcy [78].

W tym aspekcie interesujące są wyniki badań *in vitro* poziomu 8-oksy-dG w DNA diploidalnych fibroblastów człowieka (TIG-1) w różnych stadiach starzenia [79]. Mianowicie stwierdzono znaczący wzrost zawartości 8-oksy-dG w DNA starzejących się komórek (50 podziałów, $1,6 \times 10^6$ 8-OHdG/dG) w porównaniu z komórkami młodymi (22 podziały, $0,5 \times 10^6$ 8-OHdG/dG). W tych samych badaniach stwierdzono, że znacząco obniżyła się aktywność mechanizmów naprawczych podczas starzenia komórek *in vitro*. Zjawiskiem tym można tłumaczyć wzrost poziomu 8-oksy-dG wraz z wiekiem komórek.

W różnych narządach organizmu człowieka i wielu zwierząt doświadczalnych zaobserwowano wraz z wiekiem wzrost poziomu oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA np. w mózgu człowieka [80] i wątrobie szczura [81]. Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA był w tych przypadkach 10-krotnie wyższy w mitochondriach w porównaniu z DNA jądrowym. Co ciekawe, wyższy z wiekiem poziom uszkodzeń DNA odnotowano u szczurów, których dieta pozbawiona była witaminy E w porównaniu ze zwierzętami, których dieta zawierała tę witaminę. Wyniki badań naszego zespołu [82] wykazały dodatnią korelację między ilością 8-oksydG w DNA leukocytów a wiekiem badanych osób. Jednocześnie stwierdzono, że poziom witaminy C obniża się wraz z wiekiem człowieka, wykazując najwyższą wartość u dzieci i młodzieży, najniższą zaś u osób w podeszłym wieku. Udokumentowano ponadto niewielki, aczkolwiek statystycznie istotny, wzrost poziomu witaminy E oraz kwasu moczowego wraz z wiekiem badanych osób. Możliwym wyjaśnieniem obserwowanych zmian poziomu witamin jest sekwencyjna inaktywacja antyoksydantów w odpowiedzi na intensyfikację stresu oksydacyjnego. Wykazano, że obniżenie poziomu witaminy E związane z nasileniem procesów oksydacyjnych występowało dopiero po całkowitym zużyciu witaminy C.

Wzrost poziomu markera wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, jakim jest 8-oksy-dG, związany jest z upośledzeniem funkcji organów (np. mózgu czy wątroby) i wzrostem podatności komórek na zmiany mutagenne [83]. Interesujące są wy-

niki badań dotyczących poziomu 8-oksy-dG w moczu gryzo- ni i człowieka. Wykazano w nich, że w miarę wzrostu wieku organizmu obniża się poziom wydalanej w moczu 8-oksy-dG [84]. Jednocześnie poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA u osobników starych jest wysoki. Dane te wskazują, że wraz z wiekiem obniża się znacząco aktywność enzymów odpowiedzialnych za naprawę 8-oksy-dG. Obecnie powszechnie przyjmuje się, że usuwana z komórkowego DNA 8-oksy-dG jest wydalana z moczem (patrz wyżej). Warto w tym miejscu przypomnieć, że w starzejących się organizmach znacząco wzrasta poziom grup karbonylowych białek, np. w mózgu człowieka i zwierząt [85]. Jedną z przyczyn zmian starczych w komórkach może być zatem upośledzenie działania mechanizmów chroniących komórki przed toksycznym działaniem RFT.

W badaniach przeprowadzonych na szczurach [86] wykazano, że 8-oksy-dG gromadzi się w różnych narządach podczas starzenia i poziom tej modyfikacji DNA różni się w zależności od płci. Okazuje się, że liczba uszkodzeń DNA znacząco wzrasta po osiągnięciu przez organizm określonego wieku. Opisano dwukrotny wzrost poziomu 8-oksy-dG w jądrowym DNA (mózgu, serca, wątroby, nerki) samców szczurów w wieku 30 miesięcy w porównaniu z osobnikami w wieku od 2 do 24 miesięcy. Znaczna akumulacja 8-oksy-dG jądrowego DNA rozpoczyna się u badanych zwierząt w wieku powyżej 24 miesięcy [83]. W mózgu człowieka opisano wyraźny wzrost poziomu 8-oksy-dG w mtDNA osób w przedziale wiekowym 42-97 lat. Wzrost ten był mniej wyraźny w DNA jądrowym. Ciekawe jest, że szczególnie wysoką akumulację 8-oksy-dG w mtDNA obserwowano u osób powyżej 70 roku życia. Stosunek zawartości 8-oksy-dG w mtDNA/jądrowy DNA był równy 10 u osób poniżej 70 roku życia i wzrastał do wartości 15 u osób powyżej 70 roku życia [80]. Mitochondria są największym źródłem wolnych rodników, a tempo utleniania DNA tych struktur może być znacznie wyższe niż DNA w jądrze komórkowym. mtDNA jest szczególnie podatny na działanie RFT ponieważ: a) mitochondria konsumują ~90% tlenu przetwarzanego przez organizm, a 1-2% metabolizowanego tlenu (choć wielkość ta jest obecnie kwestionowana) ulega konwersji do form wolnorodnikowych; b) cząsteczki mtDNA znajdują się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej, w której system transportu elektronów generuje RFT; c) DNA mitochondriów nie jest związany z białkami histonowymi; d) geny mitochondrialne są słabiej chronione niż jądrowe przez system naprawy DNA, który jest jednak w nich obecny.

W mięśniu sercowym i mięśniu przepony człowieka wzrasta z wiekiem poziom 8-oksy-dG mitochondrialnego DNA [87,88]. Białka mitochondriów mięśni szkieletowych człowieka są także podatne na uszkodzenia indukowane przez RFT. Zaobserwowano, że tempo syntezy białek mitochondrialnych w mięśniach szkieletowych człowieka znacząco obniża się w starszych organizmach [89]. W jednym z najnowszych badań potwierdzono wiekowo-zależny wzrost poziomu 8-oksy-dG, dialdehydu malonowego (markera peroksydacji lipidów) i grup karbonylowych białek (markera utleniania białek) w biopsjach mięśni człowieka [85].

W świetle powyższych danych można przypuszczać, że atak utleniaczy tak na DNA, jak i białka oraz lipidy jest przyczyną postępującego z wiekiem spadku wydolności mitochondriów. Gdy liczba uszkodzonych w ten sposób

mitochondriów przekroczy pewną wartość krytyczną, zrozumiały staje się fakt niedostatku energii w komórkach starzejącego się organizmu. W trakcie życia człowieka pogłębia się nie-miażdżycowa dysfunkcja serca i innych tkanek organizmu, co w konsekwencji może prowadzić do zmian starczych i śmierci organizmu.

METODY ANALIZY OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ DNA

Wzrost produkcji wolnych rodników, a tym samym ilości uszkodzeń oksydacyjnych DNA występuje, jak opisaliśmy wcześniej, w wielu jednostkach chorobowych. Znaczenie tychże uszkodzeń w poszczególnych schorzeniach ciągle nie jest wyjaśnione, dlatego opracowanie/zastosowanie właściwej metody ich pomiaru wydaje się być kluczowe. Aby wykazać znaczenia oksydacyjnych uszkodzeń DNA w określonej jednostce chorobowej powinny być spełnione następujące warunki: 1) Oksydacyjne uszkodzenia DNA powstają w miejscu zmienionym patologicznie; 2) Czas powstawania oksydacyjnych uszkodzeń zbiega się z czasem patogenyzy; 3) Usunięcie uszkodzeń lub ich ograniczenie przynosi pozytywny efekt w zapobieganiu lub leczeniu choroby; 4) Indukcja oksydacyjnych uszkodzeń w systemach modelowych (zwierzęcych) na poziomie występującym w patologii człowieka prowadzi do występowania wszystkich lub większości symptomów choroby. Do analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA stosuje się poniżej opisane techniki.

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAMIA CIECZOWA (HPLC, ANG. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

Jednym z pierwszych analizowanych uszkodzeń DNA spowodowanych RFT był glikol tymidinowy (Tg) [90]. Już w latach 80 używano wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV (HPLC-UV) w celu identyfikacji i ilościowej analizy Tg w DNA poddanym działaniu promieniowania γ [91]. Tg powstaje stosunkowo łatwo – ok. 50% oddziaływań pomiędzy tyminą a rodnikiem hydroksylowym kończy się powstaniem Tg. Dla porównania, 25% oddziaływań pomiędzy guaniną a rodnikiem hydroksylowym daje w rezultacie 8-oksy-dG. Jednak to właśnie 8-oksy-dG przeważa ilościowo nad Tg w moczu myszy i człowieka [92]. Zasadniczym powodem tego stanu rzeczy jest względna niestabilność Tg w porównaniu z 8-oksy-dG [92], w konsekwencji czego czułość metody HPLC-UV przy pomiarze Tg w moczu zawsze pozostawała problematyczna [93]. Aby poprawić czułość metody, zmodyfikowano ją poprzez zastosowanie znakowanej radioaktywnie tyminy oraz zwiększenie dawek promieniowania w celu indukcji mierzalnej ilości Tg [94].

Problem czułości metod pomiaru oksydacyjnych uszkodzeń DNA został ostatecznie pokonany poprzez zastąpienie pomiarów Tg pomiarami 8-oksy-Gua w jego deoksynukleozydowej formie 8-oksy-dG w produktach trawienia DNA. Pierwsze pomiary dokonano przy użyciu HPLC z detekcją elektrochemiczną (HPLC-EC). Na procedurę tą składają się następujące etapy: DNA jest ekstrahowany z komórek lub tkanek, a następnie poddany enzymatycznemu trawieniu do wolnych deoksynukleozydów, które są następnie rozdzielane z zastosowaniem HPLC w układzie odwróconej fazy. Poziom 8-oksy-dG jest mierzony drogą detekcji elek-

trochemicznej, która to metoda daje 1000-krotnie większą czułość w porównaniu z metodą UV [92]. Metody używane do badania 8-oksy-dG w DNA poddane zostały skrupulatnym analizom wynikającym z obawy, iż samo przygotowanie próbek może być źródłem uszkodzeń DNA, w tym także powstawania 8-oksy-dG. Zagadnienie to zostało podjęte przez ESCODD, które skupiło swoją uwagę na walidacji metod ekstrakcji oraz hydrolizy DNA jako podstawowych źródeł artefaktów. Efektem walidacji było ulepszenie procesu przygotowania próbek do analizy, a w konsekwencji redukcja artefaktów i optymalizacja metody HPLC-EC dla analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA [94]. Metodę HPLC-EC stosuje się również do pomiaru 8-oksy-dG w moczu, dodając etap wstępnego oczyszczania moczu poprzez fazę stałą [95] lub immunopowinowactwo [94], pozwalające jedynie pożądanej frakcji dotrzeć do detektora HPLC [96].

SPEKTROMETRIA MAS

Metody takie jak chromatografia gazowa – spektrometria mas (GC-MS) dają możliwość analizy specyficznego profilu uszkodzeń DNA, co pozwala na efektywną charakterystykę produktów ataku rodnika hydroksylowego – zmodyfikowanych zasad [97]. Metoda GC-MS została użyta wcześniej do ilościowej analizy 8-oksy-Gua poprzez określenie stosunku zawartości G i 8-oksy-Gua w DNA [99]. GC-MS jest techniką uniwersalną, pozwalającą na zarówno detekcję 8-oksy-dG w moczu, jak i wyekstrahowanym komórkowym DNA [100].

Badania wykazują, iż poziom 8-oksy-Gua oznaczany za pomocą GC-MS jest wyższy w porównaniu z innymi metodami. W świeżo izolowanych komórkach poziom podstawowy mierzony za pomocą GC-MS może być kilka-kilkadziesiąt razy wyższy w porównaniu z wynikami uzyskanymi za pomocą HPLC/EC. Różne czynniki mogą wpływać na tę istotną różnicę pomiędzy metodami: 1) niekompletna hydroliza enzymatyczna oksydacyjnie modyfikowanego DNA, (HPLC/EC); 2) powstawanie artefaktów w trakcie hydrolizy DNA z użyciem kwasu mrówkowego i derywatywacji, które poprzedzają analizę GC-MS.

Aby uniknąć tworzenia się artefaktów podczas analizy GC-MS, zaproponowane zostało rozwiązanie w postaci uwolnienia zmodyfikowanych zasad z DNA za pomocą enzymów naprawczych (glikozylazy formamidopirymidyny oraz endonukleazy III) w miejsce hydrolizy kwasowej [101]. Wykazano, że po zastosowaniu tej modyfikacji poziom uszkodzeń jest porównywalny do najniższych wartości uzyskanych innymi metodami (np. HPLC/EC, LC-MS/MS) czyniąc tę technikę wielce użyteczną [102].

Ostatnio również chromatografia cieczowa wraz z pojedynczą lub tandemową spektrometrią masową (LC-MS lub LC-MS/MS) została skutecznie użyta do analizy oksydacyjnych uszkodzeń zarówno w DNA [102,103] jak i moczu [104]. Takie podejście pozwala na wykorzystanie zalet LC/MS bez dodatkowych etapów zbierania frakcji i derywatywacji próbek.

ZNAKOWANIE RADIOAKTYWNYM ^{32}P

Procedura znakowania ^{32}P daje możliwość detekcji szerokiego wachlarza produktów uszkodzeń takich jak Tg [105]

czy 8-oksyo-dG [106,107]. Jednakże technika ta należy do czasochłonnych (pojedyncza analiza zajmuje kilka dni) i złożonych, włączając proces oczyszczania DNA, trawienia enzymami, wzbogacania 8-oksyo-deoksynukleotydem, dodawanie znakowanego radioaktywnie fosforanu i chromatografię cienkowarstwową [108]. Podobna metoda znakowania z użyciem znacznika fluorescencyjnego została opisana dla oznaczenia 8-oksyo-dG analizowanego następnie ilościowo z użyciem HPLC z konwencjonalnym detektorem fluorescencji, co eliminuje konieczność stosowania znaczników radioaktywnych [109]. Pomimo wielu zalet, podczas ewaluacji przeprowadzonej przez ESCODD technika znakowania nie została zakwalifikowana jako właściwe narzędzie dla analiz oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

IMMUNODETEKCJA OKSYDACYJNYCH USZKODZEŃ DNA

Dotychczasowe próby opracowania metody analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA drogą immunodetekcji napotykały poważne trudności spowodowane przede wszystkim małą specyficznością przeciwciał. Dla przykładu West i wsp. [110] w badaniach radioimmunologicznych użyli poliklonalnych przeciwciał celem detekcji *cis* Tg w DNA pochodzącym z bakterii *Escherichia coli* po ekspozycji na promieniowanie γ . Kolejnym etapem udoskonalenia metod immunodetekcji było stworzenie przeciwciał monoklonalnych wykrywających Tg, co pozwoliło na względnie czułą detekcję tego uszkodzenia z użyciem testu immunoenzymosorbcyjnego (ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) w komórkach poddanych działaniu promieniowania γ lub w DNA traktowanym H_2O_2 [111,112]. Degan i wsp. [113] wyprodukowali przeciwciała poliklonalne anty-8-oksyo-dG o dużym powinowactwie, opracowując tym samym ulepszoną metodę oczyszczania moczu drogą ekstrakcji do fazy stałej, redukując złożoność analizy chromatogramu HPLC-EC. Przeciwciała te zostały także użyte do ilościowej analizy 8-oksyo-dG w enzymatycznych hydrolizatach DNA w kompetycyjnym badaniu radioimmunologicznym. Wyniki tych badań wykazały korelację z wynikami analizy z użyciem HPLC-EC. Obydwie techniki posiadają również porównywalny limit detekcji dla 8-oksyo-dG (badanie radioimmunologiczne: 63 fmol; analiza HPLC-EC: 50 fmol). Podobny limit detekcji wykazały komercyjnie dostępny zestaw ELISA i HPLC w analizie DNA pochodzącym z grasic bydłych, jednakże w badaniach tych stosowano materiał o wysokim poziomie 8-OH-dG [114].

Niewątpliwie użycie przeciwciał upraszcza analizę 8-oksyo-dG w moczu. Metodykę z zastosowaniem przeciwciał rozszerzyli i udoskonalili Park i wsp. [115] używając kolumny z monoklonalnym przeciwciałem do analizy 8-oksyo-dG w moczu, osoczu i pożywce z hodowli tkankowej. Próbę ilościowej analizy 8-oksyo-dG w DNA z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych metodą slot-blot przeprowadzili Musarrat i Wani [116]. Badanie wykazało użyteczność tej metody w detekcji zmodyfikowanych zasad nawet w bardzo małych próbkach DNA (ng). Niewątpliwą wadą tej metody pozostaje konieczność ekstrakcji DNA z badanych komórek. Jak wspomnieliśmy wcześniej, ekstrakcja DNA może prowadzić do powstawania artefaktów - uszkodzeń DNA, dlatego opracowanie metod pozwalających na badanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA *in situ* jest bardzo pożądane. Yarborough i wsp. [117] opublikowali wyniki sku-

tecznego użycia monoklonalnych przeciwciał wyprodukowanych przez Yin i wsp. [118] w immunocytochemicznej detekcji i półilościowej analizie 8-oksyo-dG w traktowanych aflatoksyną komórkach B, oraz w wycinkach tkanek. Metoda ta ma szeroki potencjał aplikacyjny w badaniach oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

Mimo iż limit detekcji większości dotychczas opracowanych metod ELISA jest wyższy od limitu detekcji 8-oksyo-dG mierzonego przez grupy zaangażowane w ESCODD, ich użycie ogranicza się głównie do oznaczania poziomu uszkodzeń w moczu [119]. Niewątpliwie, analiza immunocytochemiczna *in situ* będąc jedynie metodą półilościową, ma poważną zaletę, jaką jest możliwość wskazania konkretnego miejsca występowania uszkodzenia w komórce lub tkance. Należy jednak podkreślić, że specyficzność przeciwciał używanych do detekcji 8-oksyo-dG jest bardzo problematyczna [120] i interpretacja wyników testów z zastosowaniem immunodetekcji jest w dalszym ciągu kontrowersyjna.

TEST KOMETKOWY

Metoda elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (test kometkowy) została opracowana w celu analizy integralności DNA na poziomie komórki [121]. Ponieważ do testu kometkowego wymagana jest niewielka ilość komórek, metoda ta znalazła zastosowanie tam, gdzie występuje ograniczona ilość materiału biologicznego. Test opiera się na liczbie komórek zanurzonych w żelu agarozowym umieszczonym na szkiełku mikroskopowym; liza usuwa białka i lipidy komórkowe pozostawiając nukleoid. Wysokie pH powoduje rozwinięcie nukleoidów; w polu elektrycznym DNA wędruje w kierunku anody. Ruch DNA przypomina wówczas kometę z jądrem i ogonem (uszkodzone DNA), stąd nazwa testu. Przemieszczanie się DNA do ogona komety jest tym większe, im więcej występuje w nim pęknięć DNA – im dłuższy ogon, tym więcej pęknięć DNA.

Użycie testu kometkowego w połączeniu z glikozylazami specyficznymi do danego uszkodzenia (np. białko Fpg, wycinające 8-oksyo-Gua oraz formamidopirymidyny; endonukleaza III, wycinająca utlenione pirymidyny, np. glikolu tyminy) pozwala na wprowadzenie pęknięć do DNA. Wzrost długości ogona kometki oznacza wprowadzenie dodatkowych uszkodzeń DNA/pęknięć DNA poprzez działanie glikozylaz. Porównanie testu kometkowego z innymi metodami analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA przez ESCODD wykazało, że test ten pozwala na detekcję najmniejszej ilości 8-oksyo-dG (~0,8 8-oksyo-Gua na 10^6 G) [122] w porównaniu z metodami chromatograficznymi. Należy jednak pamiętać, że test kometkowy jest metodą pośrednią oznaczania oksydacyjnych uszkodzeń DNA; pozwala jedynie na analizę miejsc wrażliwych na Fpg/Endo III.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wciąż brak jest pełnej odpowiedzi na pytanie, dlaczego ewolucja włączyła w metabolizm komórek proces powstawania wolnych rodników. Tlen, który jest przecież niezbędny dla funkcjonowania organizmów aerobowych, staje się jednocześnie czynnikiem zagrażającym funkcjonowaniu czy nawet istnieniu komórek poprzez reakcję RFT z ich

składnikami, prowadząc do modyfikacji i uszkodzeń biomolekuł. Szczególne niebezpieczeństwo dla układów biologicznych niosą ze sobą oksydacyjne uszkodzenia DNA.

W naszej pracy próbowaliśmy wykazać związek stresu oksydacyjnego, a zwłaszcza oksydacyjnych uszkodzeń DNA z patogenezą. Stres oksydacyjny indukowany przez RFT uważany jest nie tylko za jeden z głównych czynników etiologicznych chorób nowotworowych, ale także schorzeń układu krążenia oraz stanów ischemii/reperfuzji, chorób neurodegeneracyjnych, stanów zapalnych i infekcji (zakażenia *Helicobacter pylori*, wirusem zapalenia wątroby typu B i C, wirusem HIV) czy też naturalnego procesu starzenia organizmu.

Pomimo wielu wyników doświadczeń omówionych w naszej pracy, dowodzących iż podwyższony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA towarzyszy licznym jednostkom chorobowym, wciąż bez odpowiedzi pozostaje ważne pytanie czy uszkodzenia te są bezpośrednią przyczyną opisanych chorób, czy raczej skutkiem toczących się procesów chorobowych. Wraz z wieloma autorami cytowanych prac uważamy, że w ogromnej większości omówionych przypadków uszkodzenia DNA pojawiają się jako wynik stresu oksydacyjnego, który jest skutkiem toczących się procesów chorobowych. Dobrym przykładem są tutaj stany zapalne oraz infekcje, którym stany zapalne towarzyszą. Zdecydowanie bardziej złożoną kwestią pozostaje wkład wolnorodnikowych uszkodzeń DNA w proces transformacji nowotworowej komórki. Dotychczasowe wyniki badań pozwalają stwierdzić, że wolne rodniki tlenowe mogą być jednym z uniwersalnych czynników decydujących o procesie transformacji nowotworowej komórki poprzez swój mutageny charakter. Obecność 8-oksyo-dG może również przyczynić się do modyfikacji metylacji genomu, a w konsekwencji prowadzić do zmiany ekspresji genów i indukcji procesu kancerogenezy [123].

Pomimo wymienionych pytań i wątpliwości dotyczących roli oksydacyjnych uszkodzeń DNA w procesach chorobowych z pewnością cieszy fakt, że posiadamy coraz więcej skutecznych metod i technik pomiaru i identyfikacji tychże uszkodzeń. Zanim jednak ilościowa i jakościowa analiza oksydacyjnych uszkodzeń DNA stanie się użytecznym klinicznie narzędziem prewencji, diagnozy, oceny stopnia zaawansowania czy progresji choroby, a wreszcie czynnikiem decydującym o rodzaju terapii, metody te muszą być w pełni zewalutowane i zwalidowane. Koniecznym jest, aby towarzyszyło temu pełniejsze zrozumienie roli RFT i uszkodzeń oksydacyjnych w patogenezie.

PIŚMIENNICTWO

1. Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-265
2. Wiseman H, Kaur H, Halliwell B (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett* 93: 113-120
3. Helleday T, Lo J, van G, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6: 923-935
4. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-10778
5. Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10: 5-12

6. Dizdaroglu M (1993) Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 315: 1-6
7. Dizdaroglu M (1986) Free-radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 238: 247-254
8. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 400: 99-115
9. Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health* 40: 391-404
10. Ames BN, Gold LS (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* 250: 3-16
11. Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P (2002) Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* 33: 192-200
12. Olinski R, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, Bialkowski K (2003) Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res* 531: 177-190
13. Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim SR, Nohmi T, Taniguchi M, Ohwada S, Yokota J (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14: 2857-2861
14. Rosenquist TA, Zharkov DO, Grollman AP (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7429-7434
15. Croteau DL, ap Rhys CM, Hudson EK, Dianov GL, Hansford RG, Bohr VA (1997) An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 272: 27338-27344
16. Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y (1999) Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10: 1637-1652
17. Rozalski R, Siomek A, Gackowski D, Foksinski M, Gran C, Klungland A, Olinski R (2005) Substantial decrease of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine, a product of the base excision repair pathway, in DNA glycosylase defective mice. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1331-1336
18. Ischenko AA, Saparbaev MK (2002) Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature* 415: 183-187
19. Daviet S, Couve-Privat S, Gros L, Shinozuka K, Ide H, Saparbaev M, Ischenko AA (2007) Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway. *DNA Repair (Amst)* 6: 8-18
20. Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry* 34: 89-95
21. Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J Biol Chem* 268: 19416-19421
22. Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, Dizdaroglu M, Mitra S (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3523-3528
23. Malins DC, Gunselman SJ (1994) Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13038-13041
24. Foksinski M, Kotzbach R, Szymanski W, Olinski R (2000) The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med* 29: 597-601.
25. Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* 309: 193-198

26. Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H (1997) Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18: 1763-1766
27. Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R (1994) Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 341: 59-64
28. Olinski R, Zastawny TH, Foksinski M, Barecki A, Dizdaroglu M (1995) DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med* 18: 807-813
29. Gackowski D, Kruszewski M, Bartlomiejczyk T, Jawien A, Ciecierski M, Olinski R (2002) The level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is positively correlated with the size of the labile iron pool in human lymphocytes. *J Biol Inorg Chem* 7: 548-550
30. de VB, Addicks MA, Gosriwatana I, Lu S, Hider RC, Marx JJ (2000) Non-transferrin-bound iron is present in serum of hereditary haemochromatosis heterozygotes. *Eur J Clin Invest* 30: 248-251
31. Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriishi K, Blumberg BS (1994) Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 56: 364-369
32. Nelson RL, Davis FG, Sutter E, Sobin LH, Kikendall JW, Bowen P (1994) Body iron stores and risk of colonic neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 86: 455-460
33. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358: 1-3
34. Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalter B, Diemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H (2000) hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer* 88: 932-937
35. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC (2001) Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 22: 593-597
36. Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, Allan JM, King RF, Williams GI, Wild CP (2000) The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis* 21: 167-172
37. Le ML, Donlon T, Lum-Jones A, Seifried A, Wilkens LR (2002) Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 409-412
38. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, Xu P, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Nakabeppu Y (2003) Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res* 63: 902-905
39. Hung RJ, Brennan P, Canzian F, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Chabrier A, Borel S, Hall J, Boffetta P (2005) Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 97: 567-576
40. Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Olinski R (2003) Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res* 63: 4899-4902
41. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seberg E, Lindahl T, Barnes DE (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13300-13305
42. Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, Zielinska M, Siomek A, Kowalewski J, Olinski R, Tudek B, Kusmirek JT (2005) Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 97: 384-395
43. Wiseman H, Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313: 17-29
44. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H (1994) Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 54: 3171-3172
45. Farinati F, Cardin R, Degan P, De MN, Floyd RA, Van Thiel DH, Naccarato R (1999) Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic Biol Med* 27: 1284-1291
46. Dizdaroglu M, Olinski R, Doroshow JH, Akman SA (1993) Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res* 53: 1269-1272
47. Shen Z, Wu W, Hazen SL (2000) Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical. *Biochemistry* 39: 5474-5482
48. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG (1993) Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 52: 659-666
49. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P (1994) 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett* 348: 131-138
50. Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J (1997) Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species—implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med* 22: 151-159
51. Weitzman SA, Gordon LI (1990) Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76: 655-663
52. Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA (2000) Is there an association of malignancy with systemic lupus erythematosus? An analysis of 276 patients under long-term review. *Rheumatology (Oxford)* 39: 1147-1152
53. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG (1993) Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 52: 659-666
54. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922
55. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867
56. Jackson AL, Loeb LA (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 477: 7-21
57. D'Inca R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC (2004) Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflamm Bowel Dis* 10: 23-27
58. Siomek A, Rytarowska A, Szaflarska-Poplawska A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Czerwionka-Szaflarska M, Olinski R (2006) Helicobacter pylori infection is associated with oxidatively damaged DNA in human leukocytes and decreased level of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Carcinogenesis* 27: 405-408
59. Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH (1996) Increased oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 56: 1279-1282
60. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4: 1065-1067
61. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H (1994) Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 54: 3171-3172
62. Kameoka M, Kimura T, Ikuta K (1993) Superoxide enhances the spread of HIV-1 infection by cell-to-cell transmission. *FEBS Lett* 331: 182-186
63. Jaruga P, Jaruga B, Gackowski D, Olczak A, Halota W, Pawlowska M, Olinski R (2002) Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients. *Free Radic Biol Med* 32: 414-420
64. Ross R (1993) Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 143: 987-1002
65. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809
66. Collins AR, Gedik CM, Olmedilla B, Southon S, Bellizzi M (1998) Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences

- ces between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J* 12: 1397-1400
67. Penn A (1990) Role of somatic mutation in atherosclerosis. *Prog Clin Biol Res* 340C: 93-100
 68. Penn A, Garte SJ, Warren L, Nesta D, Mindich B (1986) Transforming gene in human atherosclerotic plaque DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7951-7955
 69. De FS, Izzotti A, Walsh D, Degan P, Petrilli GL, Lewtas J (1997) Molecular epidemiology of atherosclerosis. *FASEB J* 11: 1021-1031
 70. Chen KH, Srivastava DK, Singhal RK, Jacob S, Ahmed AE, Wilson SH (2000) Modulation of base excision repair by low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and antioxidants in mouse monocytes. *Carcinogenesis* 21: 1017-1022
 71. Martinet W, Kockx MM (2001) Apoptosis in atherosclerosis focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr Opin Lipidol* 12: 535-541
 72. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM (2002) Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 106: 927-932
 73. Gackowski D, Kruszewski M, Jawien A, Ciecierski M, Olinski R (2001) Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 31: 542-547
 74. Thier R, Bruning T, Kocher K, Blaszkewicz M, Makropoulos V, Sundberg A, Bolt HM (1999) Determination of urinary thymidine glycol using affinity chromatography, HPLC and post-column reaction detection: a biomarker of oxidative DNA damage upon kidney transplantation. *Arch Toxicol* 73: 479-484
 75. Loft S, Larsen PN, Rasmussen A, Fischer-Nielsen A, Bondesen S, Kirkegaard P, Rasmussen LS, Ejlersen E, Tornoe K, Bergholdt R (1995) Oxidative DNA damage after transplantation of the liver and small intestine in pigs. *Transplantation* 59: 16-20
 76. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4337-4341
 77. Hayflick L (1989) Antecedents of cell aging research. *Exp Gerontol* 24: 355-365
 78. Hayflick L (1991) Aging under glass. *Mutat Res* 256: 69-80
 79. Homma Y, Tsunoda M, Kasai H (1994) Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1063-1068
 80. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34: 609-616
 81. Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467
 82. Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Guz J, Olinski R (2007) Higher leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans? *Antioxid Redox Signal* 9: 143-150
 83. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M (1996) Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res* 316: 277-285
 84. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4533-4537
 85. Mecocci P, Fano G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U, Beal MF (1999) Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 26: 303-308.
 86. Sai K, Takagi A, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y (1992) Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 11: 139-143
 87. Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T (1991) Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1023-1029
 88. Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T (1992) Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 979-985
 89. Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS (1996) Effect of age on *in vivo* rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15364-15369
 90. Hariharan PV, Cerutti PA (1974) Excision of damaged thymine residues from gamma-irradiated poly(dA-dT) by crude extracts of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 3532-3536
 91. Frenkel K, Goldstein MS, Teebor GW (1981) Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and gamma-irradiated deoxyribonucleic acid by high-pressure liquid chromatography analysis. *Biochemistry* 20: 7566-7571
 92. Bergtold DS, Simic MG, Alessio H, Cutler RG (1988) Urine biomarkers for oxidative DNA damage. *Basic Life Sci* 49: 483-489
 93. Cathcart R, Schwieters E, Saul RL, Ames BN (1984) Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5633-5637
 94. Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN (1994) Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 234: 16-33
 95. Shigenaga MK, Park JW, Cundy KC, Gimeno CJ, Ames BN (1990) *In vivo* oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 186: 521-530
 96. Tagesson C, Kallberg M, Klintenberg C, Starkhammar H (1995) Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying *in vivo* oxidative DNA damage in cancer patients. *Eur J Cancer* 31A: 934-940
 97. Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, Dizdaroglu M (1990) Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 29: 7876-7882
 98. Dizdaroglu M (1994) Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 234: 3-16
 99. Hamberg M, Zhang LY (1995) Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry. *Anal Biochem* 229: 336-344
 100. Teixeira AJ, Ferreira MR, van Dijk WJ, van de WG, de Jong AP (1995) Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat urine and liver DNA by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 226: 307-319
 101. Jaruga P, Speina E, Gackowski D, Tudek B, Olinski R (2000) Endogenous oxidative DNA base modifications analysed with repair enzymes and GC/MS technique. *Nucleic Acids Res* 28: E16
 102. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115
 103. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H (2001) Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 29: E12
 104. Weimann A, Belling D, Poulsen HE (2002) Quantification of 8-oxoguanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 30: E7
 105. Hegi ME, Sagelsdorff P, Lutz WK (1989) Detection by ³²P-postlabeling of thymidine glycol in gamma-irradiated DNA. *Carcinogenesis* 10: 43-47
 106. Rosier J, Van PC (1988) Detection of oxidatively modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate, using ³²P-postlabelling and anion-exchange thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 434: 222-227

107. Lutgerink JT, de GE, Hoebee B, Stavenuitez HF, Westra JG, Kriek E (1992) Detection of 8-hydroxyguanine in small amounts of DNA by 32P postlabelling. *Anal Biochem* 201: 127-133.
108. Carmichael PL, She MN, Phillips DH (1992) Detection and characterization by 32P-postlabelling of DNA adducts induced by a Fenton-type oxygen radical-generating system. *Carcinogenesis* 13: 1127-1135
109. Sharma M, Box HC, Paul CR (1990) Detection and quantitation of 8-hydroxydeoxyguanosine 5'-monophosphate in X-irradiated calf-thymus DNA by fluorescence postlabelling. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 419-424
110. West GJ, West IW, Ward JF (1982) Radioimmunoassay of a thymine glycol. *Radiat Res* 90: 595-608
111. Leadon SA, Hanawalt PC (1983) Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol. *Mutat Res* 112: 191-200
112. Hubbard K, Huang H, Laspia MF, Ide H, Erlanger BF, Wallace SS (1989) Immunochemical quantitation of thymine glycol in oxidized and X-irradiated DNA. *Radiat Res* 118: 257-268
113. Degan P, Shigenaga MK, Park EM, Alperin PE, Ames BN (1991) Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies. *Carcinogenesis* 12: 865-871
114. Evans MD, Cooke MS, Podmore ID, Zheng Q, Herbert KE, Lunec J (1999) Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 374-378
115. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P, Ames BN (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3375-3379
116. Musarrat J, Wani AA (1994) Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidized DNA. *Carcinogenesis* 15: 2037-2043
117. Yarborough A, Zhang YJ, Hsu TM, Santella RM (1996) Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res* 56: 683-688
118. Yin B, Whyatt RM, Perera FP, Randall MC, Cooper TB, Santella RM (1995) Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monooclonal antibody-based ELISA. *Free Radic Biol Med* 18: 1023-1032
119. Cooke MS, Lunec J, Evans MD (2002) Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 33: 1601-1614
120. Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS (2009) European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J* 24: 1249-1260
121. Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722: 225-254
122. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2002) Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 23: 2129-2133
123. Guz J, Fokinski M, Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Olinski R (2008) The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. *Mutat Res* 640: 170-173
124. Cooke MS, Olinski R, Evans MD (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 365: 30-49
125. Rossman TG, Goncharova EI (1998) Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutat Res* 402: 103-110
126. Chung W, Boorstein RJ (1997) Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells. *Mutat Res* 373: 125-137
127. Jackson AL, Chen R, Loeb LA (1998) Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12468-12473
128. Turker MS, Gage BM, Rose JA, Elroy D, Ponomareva ON, Stambrook PJ, Tischfield JA (1999) A novel signature mutation for oxidative damage resembles a mutational pattern found commonly in human cancers. *Cancer Res* 59: 1837-1839
129. Ward JF (1994) DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat Res* 138: S85-S88
130. Ghosh R, Mitchell DL (1999) Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res* 27: 3213-3218
131. Ramon O, Sauvaigo S, Gasparutto D, Faure P, Favier A, Cadet J (1999) Effects of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine on the binding of the transcription factor Sp1 to its cognate target DNA sequence (GC box). *Free Radic Res* 31: 217-229
132. Ramon O, Wong HK, Joyeux M, Riondel J, Halimi S, Ravanat JL, Favier A, Cadet J, Faure P (2001) 2'-deoxyguanosine oxidation is associated with decrease in the DNA-binding activity of the transcription factor Sp1 in liver and kidney from diabetic and insulin-resistant rats. *Free Radic Biol Med* 30: 107-118
133. Oliński R, Jurgowiak M (2003) Uszkodzenia DNA przez wolne rodniki tlenowe – konsekwencje biologiczne i implikacje kliniczne, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t VII*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 11-44
134. Dziaman T, Jurgowiak M, Oliński R (2007) Status oksydacyjny noworodków, W: Zabielski R (red) *Sterowanie rozwojem układu pokarmowego u nowo narodzonych ssaków*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, str. 270-291

Oxidative DNA damage – analysis and clinical significance

Tomasz Zaremba, Ryszard Oliński[✉]

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

✉ e-mail: ryszardo@cm.umk.pl

Key words: reactive oxygen species, free radicals, oxidative stress, DNA base modifications, free radical-associated diseases

ABSTRACT

Oxidative damage DNA is an inevitable, natural consequence of cellular metabolism resulting from formation of reactive oxygen species (ROS) including free oxygen radicals. However, the level of the damage may increase under conditions of oxidative stress, arising from exposure to a variety of physical or chemical insults. In this review we present the mechanisms by which oxidative damage to DNA may lead to pathological processes involved in the development of cancer, cardiovascular diseases and ageing. Furthermore, we describe mechanisms of DNA repair which play a key role in maintaining cellular function upon DNA insult. Among over 20 identified and described oxidative modifications of DNA bases only one derivative, namely 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), has become a subject of intense research. Therefore, we are presenting methods of 8-oxo-dG detection as a marker of oxidatively damaged DNA.

Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA – przyczyna czy skutek zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu

STRESZCZENIE

Proces starzenia według mitochondrialnej teorii starzenia się organizmów związany jest z gromadzeniem uszkodzeń mitochondrialnego DNA (mtDNA), wywołanych bezpośrednio sąsiedztwem łańcucha transportu elektronów, źródła reaktywnych form tlenu. Wśród najczęściej generowanych uszkodzeń są mutacje punktowe, jako produkt utleniania pirymidyn i puryn, zarówno tranzycji jak i transwersji, a także delecje, rzadziej insercje. Uszkodzenie mtDNA skutkuje często dysfunkcją komórki głównie z powodu zmniejszenia zawartości wewnątrzkomórkowego ATP, którego synteza odbywa się w obecności enzymów przezeń kodowanych. Istnieją dowody na to, że mutacje mitochondrialnego DNA pojawiają się podczas nasilonej produkcji reaktywnych form tlenu generowanych wcześniejszymi mutacjami. Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu zamyka w ten sposób samonapędzający się cykl: RFT → mutacje mtDNA.

WPROWADZENIE

Generowanie reaktywnych form tlenu towarzyszy produkcji cząsteczek ATP, w trakcie przepływu elektronów głównie przez dwa z pięciu kompleksów enzymatycznych (kompleks I i III). Kiedy stężenie utleniaczy przekracza potencjał antyoksydacyjny komórki dochodzi do zaburzenia równowagi redukcyno-oksydacyjnej (redoks), co staje się przyczyną modyfikowania głównie składników białek, lipidów i kwasów nukleinowych, a w rezultacie uszkodzenia szeregu struktur wewnątrzkomórkowych. Niejednokrotnie, produkty degradacji powodują w sposób pośredni lub bezpośredni nekrozę komórek, a w mniej drastycznych przypadkach indukują apoptozę, starzenie się komórki lub proces nowotworzenia.

O ile pula wewnątrzkomórkowych białek i lipidów ulega cyklicznej wymianie (są syntetyzowane *de novo*, a niepotrzebne lub uszkodzone są usuwane poza komórkę lub podlegają procesowi wewnątrzkomórkowej degradacji), o tyle kwasy nukleinowe mogą podlegać jedynie naprawie dzięki obecności odpowiednich systemów naprawy DNA, których elementy są również kodowane przez sekwencję nukleotydów nici DNA. Dlatego też uszkodzenia DNA genomowego, biorąc pod uwagę ilość zawartej w nim informacji genetycznej, wydają się najbardziej niebezpieczne z punktu widzenia komórki i całego organizmu. Jednak jedna z teorii starzenia przypisuje kluczową rolę w tym procesie akumulacji uszkodzeń DNA mitochondrialnego. Chociaż mtDNA koduje tylko 13 białek, to znaczenie mutacji w obrębie genów je kodujących, ze względu na fakt, że są to białka wchodzące w skład łańcucha oddechowego, okazało się mieć wpływ na metabolizm i funkcjonowanie całej komórki. Defekt łańcucha transportu elektronów wiąże się nie tylko z obniżeniem zdolności do syntezy ATP, ale także ze wzrostem ilości generowanych reaktywnych form tlenu.

MITOCHONDRIA – ORGANELLE GENERUJĄCE REAKTYWNE FORMY TLENU (RFT)

Funkcję biologiczną mitochondriów komórek eukariotycznych można właściwie sprowadzić do dostarczania komórce ATP oraz regulacji procesu apoptozy poprzez uwalnianie czynników proapoptotycznych. Fosforylacji oksydacyjnej towarzyszy generowanie reaktywnych form tlenu w czasie transportu elektronów w obrębie łańcucha oddechowego. Od 1 do 2% tlenu wykorzystywanego do syntezy ATP jest przekształcane w anionorodnik nadtlenkowy w wyniku jego jednoelektronowej redukcji [1].

UDZIAŁ KOMPLEKSÓW ENZYMATYCZNYCH W GENEROWANIU REAKTYWNYCH FORM TLENU

W skład łańcucha oddechowego wchodzi cztery kompleksy enzymatyczne, których zadaniem jest transport elektronów zgodny z gradientem ich potencja-

Tomasz Płoszaj^{1,✉}

Agnieszka Robaszkiewicz²

Henryk Witas¹

¹Zakład Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Plac Hallera 1, 91-647 Łódź

²Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź

✉ Zakład Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Plac Hallera 1, 91-647 Łódź; tel./faks: (42) 617 77 73, e-mail: tomlodz@gmail.com

Artykuł otrzymano 22 lutego 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 24 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: mtDNA, RFT, uszkodzenia DNA

Wykaz skrótów: ATP – adenozylo-5'-trifosforan; BER (ang. *Base Excision Repair*) – naprawa DNA przez wycinanie zasad azotowych; GSH – zredukowany glutation; GSSG – utleniony glutation (disiarczek glutationu); NAD – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, postać utleniona; NADH – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, postać zredukowana; NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*) – naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów; MnSOD, SOD2 (ang. *manganese superoxide dismutase*) – manganowa dysmutaza nadtlenkowa; mtDNA – mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza nadtlenkowa

łów redoks. Elektrony przenoszone są z układu o niższym do układu o wyższym potencjale redoks. Donorem elektronów i protonów są zredukowane nukleotydy (NADH, FADH₂), a ich akceptorem jest tlen cząsteczkowy, którego czteroelektronowa redukcja prowadzi do powstania cząsteczki wody. Kompleks I tworzy para oksydoreduktaza NADH:ubichinon, kompleks II – oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon, kompleks III – oksydoreduktaza ubichinol:cytochrom *c*, a w skład kompleksu IV wchodzi oksydoreduktaza cytochromu *c* (oksydaza cytochromowa) i tlen. Dodatkowo, wyróżniany jest kompleks V, który stanowi syntaza ATP, wykorzystująca gradient stężenia protonów powstający po przeciwnych stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej podczas transportu elektronów do gromadzenia energii w postaci adenozyntrifosforanu.

Produktem ubocznym fosforylacji oksydacyjnej jest anionorodnik ponadtlenkowy, produkt jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, możliwej dzięki wyciekowi elektronów, głównie w trakcie reakcji w obrębie kompleksów I i III [2]. Ubichinol, pełniący w obrębie kompleksu III rolę donora elektronów, przenosi elektrony na tlen cząsteczkowy obecny po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej, natomiast kompleks I uwalnia anionorodnik ponadtlenkowy wyłącznie do macierzy mitochondrialnej. Udział poszczególnych kompleksów w generowaniu anionorodnika zależy od rodzaju tkanki oraz wydajności oddechowej mitochondriów znajdujących się w jej komórkach. Podczas szybkiego przepływu elektronów, przy wysokiej wydajności syntezy ATP, częściowej depolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej i obniżonej wartości stosunku stężeń NADH/NAD⁺ (np. w mitochondriach mięśnia sercowego), za uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego odpowiada głównie kompleks III, przy czym liczba powstającego produktu jest proporcjonalna do szybkości przepływu elektronów. Kiedy jednak tempo transportu elektronów i syntezy ATP jest niskie, a stężenie zredukowanych nukleotydów wysokie, to anionorodnik jest generowany głównie przez kompleks I.

Chociaż dehydrogenaza bursztynianowa wchodząca w skład kompleksu II jest flawoproteiną, teoretycznie zdolną do jednoelektronowej redukcji tlenu, to dotychczas nie potwierdzono faktu uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego przez kompleks II [3].

DEHYDROGENAZA α -KETOGLUTARANOWA – ALTERNATYWNE ŹRÓDŁO REAKTYWNYCH FORM TLENU W MITOCHONDRiach

Badania przeprowadzone w ciągu ostatniej dekady pozwoliły na identyfikację dodatkowego źródła reaktywnych form tlenu w macierzy mitochondrialnej. Wykazano, że dehydrogenaza α -ketoglutaranowa posiada zdolność do katalizowania reakcji, której produktem jest m.in. nadtlenek wodoru [4]. Szybkość generowania nadtlenu wodoru jest wprost proporcjonalna do wartości stosunku stężeń NADH/NAD⁺, kiedy w środowisku znajdują się wszystkie substraty i koenzymy niezbędne do działania enzymu. Ponadto, wyniki doświadczeń potwierdzają udział dehydrogenazy w hamowaniu aktywności kompleksu I, co także przyczynia się pośrednio do uwalniania reaktywnych form tlenu przez mitochondria [5].

DALSZE LOSY ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO W KOMÓRCE

Anionorodnik ponadtlenkowy w zależności od rodzaju kompleksu, który go generuje w macierzy mitochondrialnej (kompleks I i III) lub w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (kompleks III) jest szybko usuwany przez mitochondrialną (MnSOD, $k = 1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lub cytoplazmatyczną (Cu/ZnSOD, $k = 2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) dysmutazę ponadtlenkową, a jednym z produktów tej reakcji jest nadtlenek wodoru. Rodnik może również ulegać spontanicznej reakcji dysproporcjonowania, jednak stałe szybkości tej reakcji w pH $\sim 7,4$ są o kilka rzędów niższe ($k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [6]. Jedną z możliwości usunięcia nadtlenu wodoru są reakcje katalizowane przez katalazę i wewnątrzkomórkowe peroksydazy (peroksydaza glutationowa, peroksyredoksyny). W obecności jonów metali przejściowych nadtlenek wodoru ulega redukcji, w wyniku której powstaje rodnik hydroksylowy, jeden z najsilniejszych biologicznych utleniaczy ($E'_0 = 2,31 \text{ V}$). Stałe szybkości jego reakcji z różnymi cząsteczkami biologicznymi mogą nawet osiągnąć wartość rzędu $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Wartości standardowych potencjałów redoks: $E'_0(\text{O}_2/\text{O}_2^-) = -0,33 \text{ V}$, $E'_0(\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2) = 1,0 \text{ V}$ wskazują, że anionorodnik ponadtlenkowy może pełnić zarówno rolę utleniacza, jak i reduktora, w zależności od układu i stężenia związków, z którymi reaguje. Rodnik utleniać może NADH, ale także redukować atom żelaza cytochromu *c*. Stałe szybkości reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z poszczególnymi elementami budulcowymi cząsteczek biologicznych są wyższe niż nadtlenu wodoru, chociaż potencjał redoks tego drugiego charakteryzuje większa wartość ($E'_0 = 1,32 \text{ V}$). Stosunkowo mała reaktywność nadtlenu wodoru sprawia, że może on dyfundować na znaczną odległość od miejsca powstania i swobodnie przenikać przez błony biologiczne.

OKSYDACYJNE MODYFIKACJE mtDNA

REAKTYWNE FORMY TLENU A MUTACJE MITOCHONDRIALNEGO DNA

Aktywność mitochondriów maleje wraz z wiekiem organizmu. Wykazano, że aktywność enzymów wchodzących w skład łańcucha oddechowego zmniejsza się proporcjonalnie wraz z wydłużaniem czasu życia, czemu towarzyszy stopniowe ograniczanie wydajności syntezy ATP oraz zwiększanie ilości uwalnianego anionorodnika ponadtlenkowego [7]. Potwierdzają to badania, które wykazały, że wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu rośnie wraz z liczbą podziałów fibroblastów człowieka w hodowli [8]. Wzmogoną ich produkcję zaobserwowano w przebiegu wielu chorób (choroby sercowo-naczyniowe, miażdżycza tętnic, chroniczne stany zapalne), szczególnie tych, w których kluczową rolę odgrywają oksydazy NADPH lub mieloperoksydaza. Reaktywne formy tlenu, podobnie jak reaktywne formy chloru i azotu powodują uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych dzięki stosunkowo wysokiej wartości potencjału redoks. Bezpośrednim dowodem potwierdzającym cytotoksyczne właściwości tych utleniaczy są wyniki badań przeprowadzone na muszkach owocowych. Wykazały one, że średni czas życia owadów jest odwrotnie skorelowany z tempem generowania w ich tkankach anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru [9]. Właściwości genotoksyczne reaktywnych form tlenu

przejawiają się głównie poprzez zdolność do indukowania oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych, ale także pojedynczych a nawet podwójnych pęknięć heliksu DNA, które powstają głównie, jako efekt działania rodnika hydroksylowego. Rolę reaktywnych form tlenu w uszkodzeniach mitochondriów potwierdzają badania przeprowadzone na zwierzętach z wyciszoną całkowicie lub częściowo ekspresją genu kodującego mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową, która jest pierwszą i jedyną enzymatyczną linią obrony mitochondriów przed działaniem anionorodnika ponadtlenkowego. Myszy pozbawione MnSOD charakteryzowała wysoka śmiertelność w grupie noworodków, kardiomiopatia rozszerzeniowa, dysfunkcja mitochondriów oraz zwiększony poziom oksydacyjnych uszkodzeń składników mitochondriów. Mysie heterozygoty (SOD2^{+/}) z częściowym niedoborem MnSOD (30–60%) wykazywały obniżoną aktywność mitochondriów spowodowaną głównie hamowaniem kompleksu I oraz związany z tym wzrost ilości uwalnianego anionorodnika ponadtlenkowego. Badania *in vitro* wykazały bowiem, że reaktywne formy tlenu powodując obniżenie aktywności enzymów wchodzących w skład kompleksów enzymatycznych mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów takich jak dehydrogenaza NADH i dehydrogenaza bursztynianowa przyczyniają się do zwiększenia szybkości uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego głównie przez kompleks I, którego to kluczowym elementem jest pierwszy z wymienionych enzymów, a którego już częściowe zahamowanie prowadzi do wycieku elektronów z tego właśnie kompleksu.

Mitochondria, które w większości rodzajów komórek są głównym źródłem RFT bywają bezpośrednio narażone na oksydacyjne uszkodzenia powstające w wyniku ich własnej aktywności fizjologicznej. Fakt, że wraz z wiekiem rośnie liczba mutacji mitochondrialnego DNA a także stężenie generowanych przez mitochondria reaktywnych form tlenu stał się podstawą do stworzenia mitochondrialnej teorii starzenia się organizmu. Bezpośrednim dowodem na udział reaktywnych form tlenu w kumulowaniu uszkodzeń mtDNA jest obecność w jego strukturze pierwszorzędowej 8-oksoguanozyny, związku – wskaźnika identyfikowanego podczas monitorowania efektu, jaki powoduje stres oksydacyjny w komórkach. Ponieważ mitochondrialny DNA występuje w bezpośrednim sąsiedztwie kompleksów łańcucha oddechowego, stężenie powstających reaktywnych form tlenu i tym samym uszkodzeń jest znacznie większe niż w DNA jądrowym. Potwierdzają to badania przeprowadzone na trzymiesięcznych szczurach, u których w mitochondrialnym DNA oznaczono większe stężenie 8-oksoguanozyny niż w jądrowym. Stężenie to rosło wraz z wiekiem szczurów [10]. Podobnie u człowieka, zawartość oksydacyjnie zmodyfikowanych nukleotydów rośnie wraz z wiekiem w mięśniu sercowym i mózgu [11]. Ponadto, u myszy i szczurów stwierdzono zależność pomiędzy wartością stosunku stężeń GSSG/GSH a poziomem 8-hydroksyguanozyny [12]. Wartość obu parametrów rosła wraz z wydłużającym się czasem życia zwierząt. Do najczęściej pojawiających się uszkodzeń mtDNA należą mutacje punktowe powstające głównie w wyniku oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych, ale także niewielkie delecje i duplikacje, oraz rzadziej insercje. Za hipotezą o udziale reaktywnych form tlenu w powstawaniu mutacji mtDNA przemawiają

badania przeprowadzone na szczurach. Dowodzą one, że powstanie 8-oksoguanozyny w mtDNA jest spowodowane zwiększonym uwalnianiem RFT w mitochondriach [13].

MECHANIZMY GENEROWANIA MUTACJI mtDNA PRZEZ REAKTYWNE FORMY TLENU

Każde mitochondrium zawiera od 1 do 21 cząsteczek kolistego DNA o długości 16 569 pz [14] wrażliwego na uszkodzenia wywołane przez RFT z kilku powodów. Jednym z nich jest brak histonów, które stanowią fizyczną barierę ochronną dla jądrowego DNA. Ponadto, w przypadku genów mitochondrialnych niepodzielonych intronami, w których każdy nukleotyd ma swoje istotne znaczenie, nawet niewielka zmiana pierwszorzędowej struktury mtDNA może spowodować wymierny efekt zmieniając skład jakościowy białek zaangażowanych w procesy transportu elektronów. Także, nieustana replikacja oraz ograniczona naprawa mtDNA zwiększają ryzyko wystąpienia mutacji [15].

Głównym uszkodzeniem wywołanym atakiem wolnych rodników na łańcuch DNA jest modyfikacja guanozyny, a dokładniej, powstanie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) oraz 8-oksoguaniny (8-oksogua), których obecność odpowiada za powstawanie mutacji punktowych [7]. Podczas replikacji mitochondrialna polimeraza γ wprowadza naprzeciw 8-oksogua adeninę lub cytozynę, co w konsekwencji prowadzi do transwersji G > T lub C > A po dwóch rundach replikacji [15]. Produkty innego rodzaju modyfikacji zasad azotowych takie jak 2-hydroksyadenina, glikol tyminy, dihydroksycytozyna, 7-metyloguanina lub hipoksantyna, choć występują rzadziej, to jednak mogą mieć wpływ na strukturę genomu mitochondrialnego [16]. Przykładem niech będzie glikol tyminy, który blokuje polimerazy DNA i RNA, powodując zmniejszenie ilości DNA w mitochondrium [17]. W genomie mitochondrialnym wyróżnić można miejsca, które są wrażliwsze na mutacje niż inne (ang. *hot-spots*) a mutacje punktowe występują tam znacznie częściej niż w innych regionach genomu mitochondrialnego. Jednym z takich miejsc jest gen kodujący tRNA dla leucyny. Wyróżniono aż 15 różnych typów mutacji występujących w tym rejonie [18]. Udowodniono, że powstające mutacje punktowe mogą mieć znaczący wpływ na funkcjonowanie i stan energetyczny mitochondrium w zależności od miejsca ich wystąpienia [19].

Innymi, często występującymi zmianami w mtDNA są delecje. Mechanizm ich powstawania jest nadal niewyjaśniony, ale dowiedziono, że powstają częściej w miejscach inicjacji replikacji [20]. Zaobserwowano również, że w ludzkich fibroblastach eksponowanych na RFT ma miejsce kumulacja jednej z najczęstszych delecji o długości 4977 pz (mtDNA⁴⁹⁷⁷, ang. *common deletion*) [21]. Fakt wzmożonej częstości występowania tej mutacji w komórkach, w których poziom 8-oksogua jest zwiększony [22] przemawia za udziałem RFT w mechanizmie jej powstawania. Duży ubytek materiału genetycznego spowodowany delecjami ma najczęściej wymierny wpływ na funkcjonowanie mitochondrium i wydajność produkcji ATP [23]. Wiele delecji, między innymi wyżej wymieniona mtDNA⁴⁹⁷⁷, powoduje choroby takie jak np. zespół przewlekłej postępującej ze-

wewnętrznej oftalmoplegii lub zespół Kearnsa-Sayre'a. Występują one także w zwiększonej liczbie w tkance nerwowej osób chorych na choroby Parkinsona i Alzheimer'a [23].

MECHANIZMY NAPRAWY mtDNA

Zróznicowany mechanizm naprawy chroni mtDNA przed zmianą zakodowanej w sekwencji nukleotydów informacji i jest kluczowy dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania komórek. Po tym jak stwierdzono, że poddane działaniu promieniowania UV mitochondria nie usuwają dimerów pirymidynowych [24], długo uważano, że te autonomiczne organelle są całkowicie pozbawione mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Jednak późniejsze badania wykazały, że mitochondria dysponują aparatem enzymatycznym, którego zadaniem jest ochrona struktury DNA. Większość białek zaangażowanych w obronę przed modyfikacjami kwasów nukleinowych ulega syntezie w jądrze komórkowym, skąd następnie transportowane są do mitochondrium.

NAPRAWA POPRZEZ WYCINANIE ZASAD

Modyfikacje nukleotydów wywołane działaniem reaktywnych form tlenu, np. 8-oksyGua lub deaminacja cytozyny do uracylu mogą być naprawiane dzięki mechanizmowi wycinania zasad (BER, ang. *Base Excision Repair*). Proces rozpoczyna się od rozpoznania przez glikozylazę DNA uszkodzonej zasady, po czym następuje hydroliza wiązania N-glikozydowego pomiędzy zmodyfikowaną zasadą azotową i deoksyrybozą, co skutkuje powstaniem miejsca AP (apurynowego lub apirymidynowego). Następnie łańcuch DNA jest nacinany i usuwana jest reszta fosfosacharydowa, co pozostawia jednonukleotydową przerwę opatrzoną z jednej strony końcem 5'-fosfo a z drugiej 3'-OH. Ich obecność jest niezbędna do resyntezy DNA. Katalizujące ten etap glikozylazy DNA posiadają również aktywność liaz. Potwierdzono także udział swoistych endonukleaz AP. Powstające miejsce AP jest następnie uzupełniane komplementarnym nukleotydem w obecności polimerazy DNA γ , który jest łączony z łańcuchem przy udziale ligazy DNA.

Jedną z najważniejszych glikozylaz występujących w mitochondriach ssaków jest glikozylaza 8-oksyGua (OGG1) rozpoznająca i usuwająca tą najczęściej spotykaną modyfikację powstającą w wyniku działania RFT [25]. W komórkach można wyróżnić dwie izoformy enzymu – α OGG1 występujący w jądrze komórkowym oraz β OGG1, w macierzy mitochondrialnej [26]. Wiele badań pokazało, że komórki pozbawione genu kodującego glikozylazę OGG1 charakteryzował wzmóżony stopień uszkodzenia DNA, m.in. w efekcie delekcji powstającej po ekspozycji na stres oksydacyjny [27,28]. Warto podkreślić jest również fakt, że szybkość naprawy 8-oksyGua w genomie mitochondrialnym jest 2 razy większa od tej, która zachodzi w jądrze komórkowym [29]. Uważa się, że brak w mtDNA przeszkody, którą w DNA jądrowym stanowią histony i/lub różnice we właściwościach katalitycznych izoform β OGG1 i α OGG1 wyjaśnić mogą obserwowane różnice.

Następną ważną glikozylazą, która usuwa produkty modyfikacji typu 2-hydroksyadenina lub adeninę błędnie spa-

rowaną z 8-oksyGua jest enzym kodowany u ssaków przez gen *MYH* [30]. W literaturze opisano kilka wariantów białka MYH powstających jako efekt alternatywnego składania genu [31], przy czym w macierzy mitochondrialnej występuje tylko jeden z nich o masie 57 kDa [32], którego zawartość jest proporcjonalna do stężenia RFT w komórce [33]. Uważa się, że wspólnie z glikozylazą 8-oksoGua (OGG1) stanowią one linię obrony przed utrwaleniem powstających transwersji G:C do T:A [34]. Oprócz wymienionych glikozylaz w mitochondriach ssaków występują jeszcze dwa inne ich typy: NTH1 oraz AAG, które są zaangażowane w procesy naprawy oksydacyjnie uszkodzonych zasad, w tym glikolu tyminy, dihydroksycytozyny, 7-metyloguaniny lub hipoksantyny [35,36].

Jednym z ważniejszych enzymów, które odgrywają kluczową rolę w naprawie BER oraz w samym funkcjonowaniu mitochondriów jest polimeraza DNA γ kodowana przez jądro gen *MIP1* [37]. U myszy, u których występuje mutacja w genie *MIP1* powodująca utratę funkcji egzonukleazy przez Pol γ wykazano większy niż w grupie odniesienia stopień delekcji oraz mutacji punktowych w mtDNA [38]. Polimeraza γ jest głównym aktywnym białkiem w macierzy mitochondrialnej atakowanej przez RFT w czasie ekspozycji ludzkich fibroblastów na działanie H_2O_2 [39]. Efektem oksydacyjnego uszkodzenia Pol γ jest zmniejszenie aktywności katalitycznej, a tym samym wydajności [39]. Skutkiem jest mniej dokładna replikacja i naprawa DNA, co w konsekwencji może prowadzić do dezintegracji całego genomu mitochondrialnego [40].

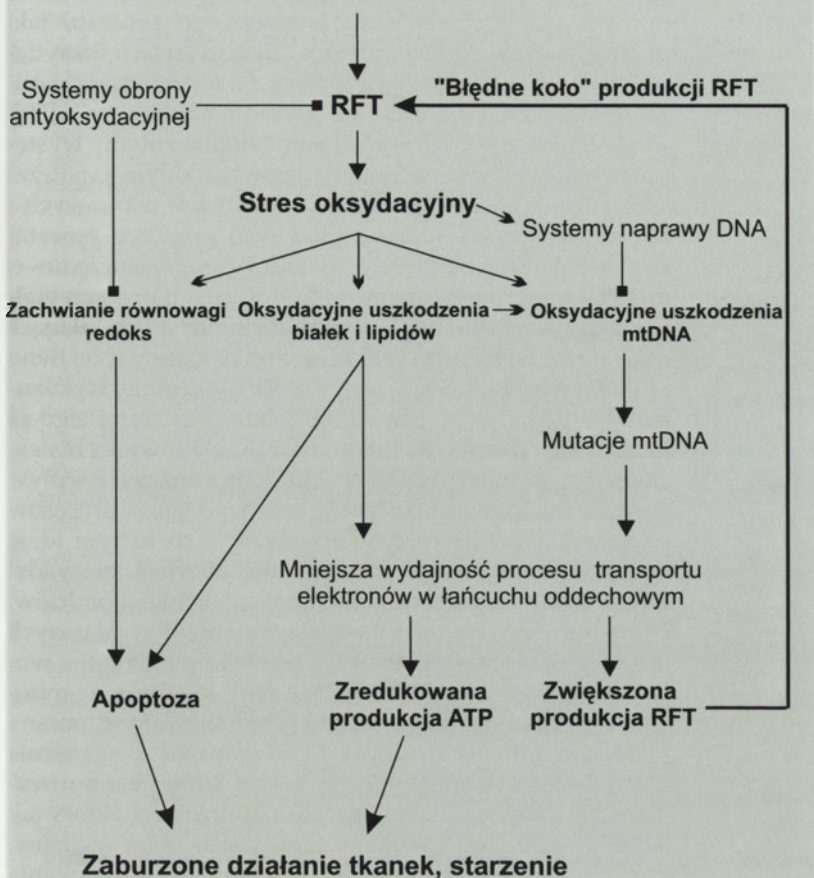
REKOMBINACYJNA NAPRAWA DNA

Podwójne pęknięcia mtDNA niebezpieczne dla organelum muszą być jak najszybciej i możliwie najefektywniej naprawione bez modyfikacji pierwotnej struktury pierwszorzędowej DNA. Obecność w macierzy mitochondrialnej drożdży białek takich jak Rad50, Mre11 i Cce1, biorących udział w procesie homologicznej rekombinacji podwójnych pęknięć, wskazuje na to, że mitochondria posiadają zdolność naprawy podwójnych pęknięć [41]. Istnieją doniesienia potwierdzające tę zdolność [42], niemniej znaleźć można także takie prace, które jednoznacznie zaprzeczają istnieniu w mitochondriach takiego systemu naprawy [43]. Niektórzy autorzy twierdzą, że wyżej wymienione enzymy nie są zaangażowane w procesy naprawy, lecz umożliwiają zajście procesu replikacji [17].

ELIMINACJA ZMODYFIKOWANYCH WOLNYCH NUKLEOTYDÓW

Aby uniknąć wbudowania oksydacyjnie zmodyfikowanych, wolnych nukleotydów do nowo syntezowanego łańcucha DNA, swoiste fosfatazy DNA usuwają je z mitochondriów. Jedną z takich fosfataz jest białko MTH1, występujące w macierzy mitochondrialnej, katalizujące hydrolizę 8-oksy-dGTP do 8-oksy-dGMP, zapobiegając włączeniu zmienionego nukleotydu do DNA [44]. Wykazano, że synteza mitochondrialnego białka MTH1 jest regulowana stężeniem reaktywnych form tlenu w tych organelach [45]. Innym ważnym enzymem usuwającym dUTP z macierzy mitochondrialnej jest dUTPaza, której biosynteza jest regulowana i zależy od fazy cyklu komórkowego [17].

Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów



Rycina 1. Schemat obrazujący zależność pomiędzy funkcjonowaniem mitochondriów a uwalnianiem reaktywnych form tlenu

Wymienione wyżej procesy i szlaki naprawy DNA mitochondrialnego pokazują, że te autonomiczne organella nie są całkowicie bezbronne wobec oksydacyjnych modyfikacji DNA. Jednak brak niektórych szlaków naprawy obecnych w jądrze komórki, np. naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER ang. *nucleotide excision repair*) sugeruje ograniczone zdolności naprawcze mtDNA. Potwierdzają to wyniki badań, w których generowane modyfikacje DNA były bardziej rozległe oraz utrzymywały się dłużej w mitochondrialnym niż jądrowym DNA [46]. Brak wspomnianego wyżej szlaku uniemożliwia między innymi naprawę dimerów tyminowych, które wstrzymują proces replikacji i transkrypcji DNA [17].

WPŁYW POWSTAŁYCH MUTACJI mtDNA NA STAN ENERGETYCZNY MITOCHONDRIMUM

mtDNA człowieka koduje 13 polipeptydów zaangażowanych w fosforylację oksydacyjną, 2 cząsteczki rRNA (12S i 16S) oraz 22 cząsteczki tRNA, które są niezbędne do syntezy białek [47]. Mimo że cały genom mitochondrialny koduje informacje tylko dla 13 białek, to jednak funkcja pełniona przez każde z nich jest na tyle istotna, że nawet najmniejsza zmiana struktury pierwszorzędowej może spowodować zaburzenie równowagi energetycznej mitochondrium. Ponieważ kompletny genom mitochondrialny występuje w licznych kopiach, to możliwe jest wspólne występowanie

nie uszkodzonych i fizjologicznych wersji genu w tym samym organellum, co efektywnie zwiększa tolerancję na zmiany w DNA. Wywołanie znaczących zmian w funkcjonowaniu mitochondrium jest możliwe dopiero po przekroczeniu pewnej krytycznej liczby powstałych uszkodzeń [47]. Niektórzy autorzy sugerują, że mitochondria dysponują mechanizmem selektywnej degradacji uszkodzonych kopii genomu dzięki wiązaniu swoistych białek TFAM (ang. *transcription factor A*), które także biorą udział w regulowaniu replikacji [48].

Rolę w zaburzeniu funkcjonowania mitochondriów i całych komórek przypisuje się głównie delecjom, ujmując tym samym znaczenia mutacjom punktowym [49]. Udowodniono, że pojawieniu się zarówno jednych, jak i drugich modyfikacji w mitochondrialnym DNA towarzyszy niejednokrotnie stres oksydacyjny. Potwierdzają to badania przeprowadzone na nicieniach z mutacją w obrębie genu kodującego cytochrom *b* [50]. Organizmy te charakteryzował zwiększony poziom reaktywnych form tlenu wewnątrz komórek, co z kolei pociągało za sobą dalszy wzrost uszkodzeń DNA w mitochondriach prowadząc ostatecznie do skrócenia długości życia badanych organizmów. Natomiast w kardiomiocytach szczurów oksydacyjna modyfikacja DNA mitochondrialnego powodowała zwiększoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego przez kompleks I łańcucha oddechowego, co prowadziło do apoptozy komórek [51].

Badanie fibroblastów człowieka wykazało, że oksydacyjne uszkodzenia mtDNA są przyczyną obniżonej zawartości cząsteczek mRNA wszystkich kodowanych przez genom mitochondrialny białek. Mniejszy stopień ekspresji prowadzi w konsekwencji do ograniczenia produkcji ATP, obniżenia potencjału błonowego oraz zwiększenia produkcji RFT w mitochondriach [52]. Warto również podkreślić fakt, że niedobór lub hamowanie aktywności któregośkolwiek z białek łańcucha oddechowego znacząco zwiększa wyciek elektronów. U osób z niedoborem oksydazy cytochromu *c* zaobserwowano wzrost poziomu enzymów wchodzących w skład bariery antyoksydacyjnej komórek i uznano ten fakt za pośredni dowód zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu [53]. Dokładnie taki sam efekt, będący wynikiem niedoboru kompleksu I w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, powoduje punktowa mutacja w genie ND6 (T14487C) kodującym dehydrogenazę NADH [54]. Mutacja w obrębie genu kodującego podjednostkę dehydrogenazy bursztynianowej (białko ulegające syntezie w jądrze komórkowym) w fibroblastach człowieka powoduje 3-krotny wzrost stężenia reaktywnych form tlenu. Zidentyfikowana w wielu chorobach o podłożu mitochondrialnym delecja mtDNA⁴⁹⁷⁷ zakłóca funkcjonowanie aż trzech kompleksów enzymatycznych: I, IV i V, wywołując dysfunkcję mitochondriów, pociągającą za sobą obniżenie potencjału mitochondrialnego, indukcję apoptozy oraz zwiększenie wewnątrzkomórkowej puli re-

aktywnych form tlenu [55]. Nawet częściowe zahamowanie aktywności enzymów biorących udział w fosforylacji oksydacyjnej, której podłożem są często mutacje mtDNA, może być przyczyną zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu. Wykazano, że do wycieku elektronów z kompleksu III i IV niezbędne jest jego zahamowanie aż w 70%, podczas gdy wzrost ilości uwalnianego anionorodnika ponadtlenkowego rozpoczyna się już przy 25% hamowaniu kompleksu I [5].

Mutacje w genach kodujących tRNA mogą również przyczynić się do zaburzeń homeostazy redoks. Za przykład niech posłuży tranzycja A3243G w genie tRNA^{Leu}(UUR), powodująca zaburzenie funkcjonowania mitochondriów. Wykazano bowiem, że jej obecność jest związana z obniżeniem aktywności kompleksu I i IV, a co za tym idzie ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia reaktywnych form tlenu [56].

Dodatkowych argumentów, przemawiających za rolą uszkodzeń DNA mitochondrialnego w generowaniu większej ilości anionorodnika ponadtlenkowego dostarczyły prace opisujące udział mutacji mtDNA w regulowaniu wewnątrzmitochondrialnej równowagi NAD⁺/NADH. Obniżenie wartości stosunku stężeń NAD⁺/NADH prowadzi do wzrostu aktywności dehydrogenazy α -ketoglutaranowej, a co za tym idzie do wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu w macierzy mitochondrialnej [57].

Jednak nie wszystkie spośród modyfikacji mtDNA prowadzą bezpośrednio do wzrostu produkcji RFT. Jeden z takich przypadków pokazały badania przeprowadzone na myszach, u których uszkodzony został gen polimerazy DNA, tak, że zaburzona została aktywność enzymu odpowiedzialna za korekcję błędów. Wynikiem ingerencji w strukturę genu polimerazy było zwiększenie liczby mutacji, przyspieszone starzenie, indukcja apoptozy oraz zaburzenia w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego, jednak mitochondria nie wytwarzały większych ilości reaktywnych form tlenu [58]. Niemniej, warto podkreślić fakt, że konsumpcja tlenu przez badane mitochondria była o 95% mniejsza niż w przypadku organelli stanowiących grupę odniesienia, co sugeruje, że powstające uszkodzenia mogły doprowadzić do całkowitej utraty aktywności mitochondriów

PODSUMOWANIE

Znaczenie mitochondriów jako źródła ATP w metabolizmie aerobowym było przedmiotem badań przez ponad pół wieku. Jednak udział tych organelli w chorobach i starzeniu organizmów zaczęto badać nie wcześniej niż 15 lat temu. Dotychczasowe doniesienia potwierdzają udział mitochondriów nie tylko w procesie dostarczania energii komórce, ale także dowodzą, że organella te są największym źródłem reaktywnych form tlenu na terenie komórki i jednocześnie jednym z głównych obiektów ataku produkowanych oksydantów. W fizjologicznych warunkach poziom utleniaczy generowanych przez mitochondria jest na tyle mały, że enzymatyczna i nieenzymatyczna linia obrony może efektywnie chronić przed uszkodzeniem struktur wewnątrz mitochondriów. Jednak, gdy ta

równowaga zostanie z jakiegoś powodu zachwiana, dochodzi do uszkodzenia elementów składowych białek, lipidów oraz zaburzenia integralności genomu, co może powodować dysfunkcję najważniejszego procesu, jaki przeprowadza mitochondrium, tj. fosforylacji oksydacyjnej. Wielu autorów twierdzi, że takie zmiany są naturalną konsekwencją procesu starzenia się komórek [59]. Zaobserwowano również, że wymienione zmiany występują wcześniej w komórkach o podwyższonym zapotrzebowaniu na energię, w tym w komórkach nerwowych i mięśniowych [47]. Jedną z głównych przyczyn powstających zaburzeń są zmiany struktury pierwszorzędowej mtDNA generujące zmiany w kodowanych przezeń białkach. Jak wspomniano wyżej, mitochondria produkujące duże ilości ATP, co za tym idzie zużywające więcej tlenu i intensywniej zamieniające go w RFT wcześniej wykazują objawy starzenia. Prawdopodobną przyczyną tego są liczne uszkodzenia nie tylko mtDNA, ale również białek, chociażby polimerazy DNA γ , która ma znaczący wpływ na wierność procesu replikacji oraz wydajność procesów naprawczych. Kumulacja uszkodzeń, a co za tym idzie mniejsza wydajność fosforylacji oksydacyjnej, prowadzi do zachwiania równowagi metabolicznej mitochondriów. Udowodniono, że mitochondria organizmów starszych odznaczają się średnio większą liczbą kopii genomu, wobec obniżonej zawartości mtRNA [60]. Możliwe, że mitochondria rekompensują w ten sposób utrwalone zmiany pierwszorzędowej struktury DNA poprzez zwiększenie liczby kopii. Niemniej jednak, więcej kopii genomu wymaga bardzo sprawnego aparatu naprawczego, który jak wyżej wspomniano, niekoniecznie jest w pełni wydajny. Wydaje się, że taki może być mechanizm powstawania tak zwanego „błędneho koła” (ang. *vicious cycle*), cyklu generowania RFT połączonego z powstawaniem mutacji mtDNA, który sam się napędza: mutacje DNA \leftrightarrow RFT. Aczkolwiek, w obliczu nowych doniesień mitochondrialna teoria starzenia się organizmów i rola „błędneho koła” wydają się nie być wystarczające [61]. Dowiedziono bowiem, że ani wzbogacanie diety w antyoksydanty, ani zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowych antyoksydantów, a tym samym obniżenie poziomu RFT poprzez manipulacje genetyczne nie wpływa na długość życia ssaków. Podobnie, nadprodukcja enzymów wchodzących w skład bariery antyoksydacyjnej komórek nie była w stanie wydłużyć czasu życia organizmów transgenicznych. Z kolei myszy transgeniczne SOD2^{+/-} pomimo zwiększonego poziomu RFT wewnątrz komórek nie charakteryzowały się skróconym czasem życia.

Nie ulega jednak wątpliwości, że na poziomie komórkowym zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu prowadzi do gromadzenia się uszkodzeń w DNA mitochondrialnym i odwrotnie, obecność licznych mutacji w mtDNA jest związane ze zwiększonym uwalnianiem anionorodnika ponadtlenkowego. Niemniej, pierwszym wydarzeniem inicjującym ciąg katastrofalnych w skutkach zdarzeń, wydaje się być zwiększona produkcja RFT w komórkach, które mają zwiększone zapotrzebowanie na ATP. Wywołane przez RFT uszkodzenia DNA wiodą następnie do kolejnych modyfikacji kwasów nukleinowych, białek i lipidów, inicjując w skrajnych przypadkach apoptozę zależną od mitochondriów.

PIŚMIENICTWO

- Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH (2009) Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1021-1029
- Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ (2006) Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1082-1088
- Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299: 700-704
- Tretter L, Adam-Vizi V (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 24: 7771-7778
- Adam-Vizi V (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140-1149
- Bartosz G (2003) *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa
- Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS (2006) Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations. *Free Radic Res* 40: 1284-1294
- Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH (2002) Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci* 9: 517-526
- Driver C, Tawadros N (2000) Cytoplasmic genomes that confer additional longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 1: 255-260
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467
- Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T (1991) Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1023-1029
- de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10: 333-338
- Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG (1998) Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* 29: 573-579
- Cavelier L, Johannisson A, Gyllenstein U (2000) Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res* 259: 79-85
- Jarrett SG, Lin H, Godley BF, Boulton ME (2008) Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 27: 596-607
- Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, Seeberg E, Lindahl T, Barnes DE (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13300-13305
- Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ (2005) Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 5: 89-108
- Schon EA, Hirano M, DiMauro S (1994) Mitochondrial encephalomyopathies: clinical and molecular analysis. *J Bioenerg Biomembr* 26: 291-299
- Wallace DC (1994) Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 26: 241-250
- Hou JH, Wei YH (1996) The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. *Biochem J* 318: 1065-1070
- Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati JB, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 28: 361-373
- Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T (1992) Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 979-985
- Liu CY, Lee CF, Wei YH (2009) Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associated with mitochondrial DNA mutations. *J Formos Med Assoc* 108: 599-611
- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC (1974) The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 2777-2781
- Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA (2002) Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol* 37: 1189-1196
- Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, Nakabeppu Y (1999) Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10: 1637-1652
- Singh KK, Sigala B, Sikder HA, Schwimmer C (2001) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* OGG1 DNA repair gene leads to an increased frequency of mitochondrial mutants. *Nucleic Acids Res* 29: 1381-1388
- Rachek LI, Grishko VI, Musiyenko SI, Kelley MR, LeDoux SP, Wilson GL (2002) Conditional targeting of the DNA repair enzyme hOGG1 into mitochondria. *J Biol Chem* 277: 44932-44937
- Bohr VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32: 804-812
- Kamiya HK, H. (2000) 2-Hydroxyadenine formation by reactive oxygen species and mutagenic effects. *Recent Res Dev Biochem* 2: 41-50
- Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, Fujiwara T, Nakabeppu Y (2000) Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* 28: 1355-1364
- Parker A, Gu Y, Lu AL (2000) Purification and characterization of a mammalian homolog of *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein from calf liver mitochondria. *Nucleic Acids Res* 28: 3206-3215
- Englander EW, Hu Z, Sharma A, Lee HM, Wu ZH, Greeley GH (2002) Rat MYH, a glycosylase for repair of oxidatively damaged DNA, has brain-specific isoforms that localize to neuronal mitochondria. *J Neurochem* 83: 1471-1480
- Isogawa A (2004) Functional cooperation of Ogg1 and Mutyh in preventing G: C→T: A transversions in mice. *Fukuoka Igaku Zasshi* 95: 17-30
- Luna L, Bjaras M, Hoff E, Rognes T, Seeberg E (2000) Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA. *Mutat Res* 460: 95-104
- Izumi T, Tatsuka M, Tano K, Asano M, Mitra S (1997) Molecular cloning and characterization of the promoter of the human N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) gene. *Carcinogenesis* 18: 1837-1839
- Kaguni LS (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 73: 293-320
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423
- Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC (2002) The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 30: 2817-2824
- Jarrett SG, Liang LP, Hellier JL, Staley KJ, Patel M (2008) Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. *Neurobiol Dis* 30: 130-138
- Ezekiel UR, Zassenhaus HP (1993) Localization of a cruciform cutting endonuclease to yeast mitochondria. *Mol Gen Genet* 240: 414-418
- LeDoux SP, Wilson GL, Beecham EJ, Stevnsner T, Wassermann K, Bohr VA (1992) Repair of mitochondrial DNA after various types

- of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 13: 1967-1973
43. Cullinane C, Bohr VA (1998) DNA interstrand cross-links induced by psoralen are not repaired in mammalian mitochondria. *Cancer Res* 58: 1400-1404
 44. Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M, Takeshige K (1995) Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270: 14659-14665
 45. Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A (2001) 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 104: 2883-2885
 46. Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 514-519
 47. Lee HC, Wei YH (2007) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* (Maywood) 232: 592-606
 48. Kang D, Hamasaki N (2002) Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet* 41: 311-322
 49. Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann NY Acad Sci* 854: 155-170
 50. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394: 694-697
 51. Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turrens J, Wilson G, Schaffer D, Schaffer SW (2008) Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C413-422
 52. Santos JH, Hunakova L, Chen Y, Bortner C, Van Houten B (2003) Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J Biol Chem* 278: 1728-1734
 53. Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G, Servi-dei S (2001) Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome *c* oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Cell Neurosci* 17: 696-705
 54. Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, Arenas J, Andreu AL (2005) Free radicals-mediated damage in trans-mitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett* 579: 6909-6913
 55. Jou MJ, Peng TI, Wu HY, Wei YH (2005) Enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species in cybrids containing 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Ann NY Acad Sci* 1042: 221-228
 56. Li J, Zhou K, Meng X, Wu Q, Li S, Liu Y, Wang J (2008) Increased ROS generation and SOD activity in heteroplasmic tissues of trans-mitochondrial mice with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Genet Mol Res* 7: 1054-1062
 57. de Grey AD (2005) Reactive oxygen species production in the mitochondrial matrix: implications for the mechanism of mitochondrial mutation accumulation. *Rejuvenation Res* 8: 13-17
 58. Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, Spelbrink JN, Wibom R, Jacobs HT, Larsson NG (2005) Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17993-17998
 59. Wei YH, Lee HC (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* (Maywood) 227: 671-682
 60. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Estivill X, Urbano-Marquez A, Nunes V (1997) Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Brain Res Mol Brain Res* 52: 284-289
 61. Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1-8

Oxidative damage of mitochondrial DNA: the result or consequence of enhanced generation of reactive oxygen species

Płoszaj Tomasz^{1,✉}, Robaszkiewicz Agnieszka², Witas Henryk¹

¹Department of Molecular Biology, Medical University of Lodz, Plac Hallera 1, 91-647 Lodz, Poland

²Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

✉e-mail: tomlodz@gmail.com

Key words: mtDNA, ROS, DNA damage

ABSTRACT

According to mitochondrial theory of ageing the ageing process results from accumulation of mitochondrial DNA (mtDNA) damage. Close vicinity of mtDNA molecule to the source of reactive oxygen species, electron transport chain, potentiates degradation of nucleic acid chemical components. The most common types of mtDNA damage generated are point mutations as a result of oxidative modifications of purines and pyrimidines (transitions as well as transversions), but also deletions and rarely insertions. Since mtDNA codes for subunits of respiratory chain enzymes, its lesions can alter homeostasis of the cell resulting in a decrease of intracellular ATP. Growing evidence indicates the role of mtDNA mutations in elevated production of reactive oxygen species, which in turn are proved to increase the number of mtDNA mutations. This mechanism gave the basis for theory of a vicious cycle: ROS ↔ mutations of mtDNA

Rola czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny

STRESZCZENIE

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 pełni kluczowe funkcje w ochronie komórek przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego. W normalnych warunkach Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie związanej z białkiem cytoszkieletu Keap1. Sytuacja zmienia się w warunkach stresowych, gdy elektrofile i/lub reaktywne formy tlenu (RFT) powodują oddysocjowanie Nrf2 z nieaktywnego kompleksu z Keap1, czego konsekwencją jest translokacja NRF do jądra i indukcja ekspresji wielu genów cytoprotekcyjnych zaangażowanych w rozkład RFT, deaktywację elektrofilowych metabolitów, detoksykację ksenobiotyków oraz stabilizację potencjału oksydoredukcyjnego komórki. Pośród ksenobiotyków wiele jest czynników mutagennych i kancerogennych. Ich inaktywacja i usunięcie z organizmu jest zadaniem enzymów I i II fazy. Wykazano, że selektywna indukcja enzymów II fazy jest skuteczną metodą ochrony komórki przed reaktywnymi metabolitami kancerogenów oraz RFT. Nrf2 indukując ekspresję genów enzymów II fazy stanowi więc potencjalny cel oddziaływania czynników chemoprewencyjnych w profilaktyce nowotworów. Podobnie w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, których patogenezą jest związana ze stresem oksydacyjnym, Nrf2 jest istotny dla ustalenia nowych strategii zapobiegawczych i terapeutycznych.

WPROWADZENIE

W organizmie reaktywne formy tlenu (RFT) mogą powstawać w wyniku działania zewnętrznych czynników fizycznych, takich jak promieniowanie nadfioletowe, promieniowanie jonizujące i ultradźwięki, na roztwory wodne. Istotniejsze, wewnątrzkomórkowe źródła RFT, obejmują przede wszystkim procesy jednoelektronowego utleniania zredukowanych form wielu związków przez tlen cząsteczkowy oraz szereg reakcji enzymatycznych [1]. Jednoelektronowemu utlenieniu mogą ulegać substancje obce dla organizmu zwane ksenobiotykami, w następstwie czego mogą powstawać reaktywne metabolity, elektrofile. Ksenobiotykami są niektóre składniki pożywienia, leki, środki produkowane przez przemysł, jak kosmetyki, środki niszczące szkodniki (pestycydy), konserwanty żywności, mykotoksyny i inne. Mechanizm toksyczności wielu z tych związków polega na wytwarzaniu reaktywnych form tlenu. Najważniejszym źródłem endogennych RFT są mitochondria. Ponieważ przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym nie jest całkowicie „uszczelniony”, pewna część elektronów może redukować tlen w procesie jednoelektronowym, w następstwie czego powstaje anionorodnik ponadtlenkowy. RFT uszkadzają wszystkie główne klasy składników komórek: związki niskocząsteczkowe, kwasy nukleinowe, białka i lipidy. Wśród efektów działania RFT na komórki i ich składniki należy wymienić uszkodzenia chromosomów, zasad DNA, powstawanie mutacji, peroksydację lipidów błon, zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} , zaburzenia struktury cytoszkieletu, inaktywację enzymów i transformację nowotworową komórek. Bazalne stężenie RFT i szybkość ich reakcji prowadzących do rozmaitych zaburzeń w komórce, zależą od poziomu równowagi pomiędzy szybkością wytwarzania RFT a stężeniami antyoksydantów i aktywnościami enzymów ochronnych. Zaburzenie takiej homeostazy na korzyść wzmożonej szybkości powstawania RFT (np. wskutek wprowadzenia ksenobiotyków) lub też zahamowania działania czynników chroniących organizm przed RFT nazywa się stresem oksydacyjnym [1]. Obecnie uważa się, że stres oksydacyjny występuje w przebiegu lub leży u podłoża wielu chorób. Zwiększanie obrony przed RFT jest przedmiotem licznych doświadczeń i otwiera możliwości opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Badania ostatnich lat wykazały, że czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear erythroid 2-related factor*) pełni kluczowe funkcje w ochronie komórek przed szkodliwymi skutkami stresu oksydacyjnego i chemicznego. I tak, w odpowiedzi na działanie oksydantów lub elektrofilów Nrf2 jest aktywowany i reguluje ekspresję wielu genów cytoprotekcyjnych, enzymów II fazy i enzymów antyoksydacyjnych.

Urszula Florczyk

Agnieszka Łoboda

Anna Stachurska

Alicja Józkowicz

Józef Dulak

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

[✉]Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; e-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl

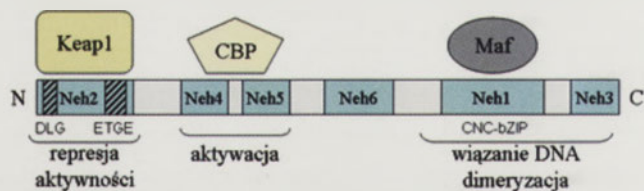
Artykuł otrzymano 14 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 22 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: czynnik transkrypcyjny Nrf2; stres oksydacyjny, oksigenaza hemowa 1, elektrofile, chemoprewencja

Wykaz skrótów: CBP (ang. *CREB binding protein*) – białko wiążące CREB; CREB (ang. *cAMP response element binding protein*) – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP; ER – siateczka śródplazmatyczna; GFP (ang. *green fluorescent protein*) – zielone białko fluorescencyjne; GSH (ang. *glutathione*) – glutation; HO-1 (ang. *heme oxygenase 1*) – oksigenaza hemowa 1; 4-HNE – 4-hydrokso-2,3-nonenal; IRES (ang. *internal ribosome entry site*) – sekwencja położona wewnątrz transkryptu, miejsce wiązania rybosomu; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny; NO – tlenek azotu; NQO1 (ang. *NAD(P)H quinone reductase 1*) – reduktaza NAD(P)H; chinonowa 1; PERK (ang. *RNA-dependent protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) – kinaza białkowa umiejscowiona w siateczce śródplazmatycznej; PI3K (ang. *phosphoinositide-3 kinase*) – kinaza fosfatydyloinozytolu; PKC (ang. *protein kinase C*) – kinaza białkowa C; RFT – reaktywne formy tlenu; tBHQ – tert-butylohydrochinon; 5'UTR (ang. *5'-untranslated region*) – region 5' nie ulegający translacji w mRNA

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektów badawczych N301 314837, N401 297835 i N301 144336 finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii jest beneficjentem funduszy strukturalnych w ramach grantów No: POIG.02.01.00-12-064/08, 01.01.02-00-109/09; 02.02.00-00-014/08.



Rycina 1. Struktura białka Nrf2.

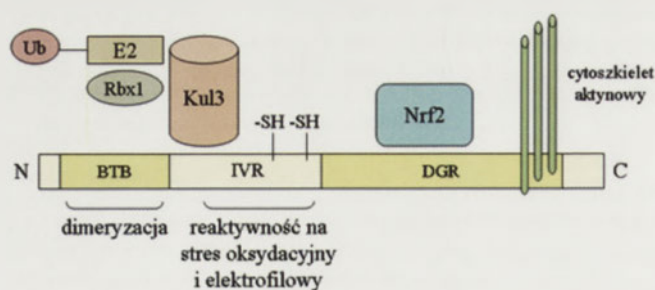
STRUKTURA BIAŁKA NRF2

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 zaliczany jest do rodziny białek 'Cap 'n' collar' (CNC) zawierających w swej strukturze motyw zamka leucynowego (bZip), umożliwiającą wiązanie się z jądrowym DNA. Członkami tej rodziny są także p45 NF-E2, Nrf1 i Nrf3 [2,3]. W budowie Nrf2 wyróżnia się 6 funkcjonalnych domen Neh [ang. *Nrf2-ECH (erythroid cell-derived protein with CNC homology) homology*], których sekwencja jest zachowana w ewolucji w różnych gatunkach. Domena Neh2 jest domeną N-końcową wiążącą dimer białka Keap1. Dla tego oddziaływania kluczowe są dwie sekwencje reszt aminokwasowych w obrębie Neh2, motyw ETGE oraz DLG. Neh4 i Neh5 to następne w kolejności regiony kwaśne zdolne do oddziaływania z białkiem wiążącym CREB, CBP (ang. *CREB – cAMP response element binding protein*) wzmagające aktywność transkrypcyjną Nrf2. Neh6 jest domeną bogatą w reszty seryny, która razem z Neh2 odgrywa również rolę w degradacji Nrf2. Kluczowa domena Neh1 obejmuje motywy CNC-bZip, umożliwiając wiązanie DNA i dimeryzację z małymi białkami Maf. Za domeną Neh1 znajduje się C-końcowa domena Neh3 (Ryc. 1) [4-7].

REGULACJA AKTYWNOŚCI NRF2

ODDZIAŁYWANIE NRF2 Z KEAP1

W normalnych, niestresowych warunkach Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie związanej z białkiem cytoszkieletu Keap1 (ang. *Kelch-like ECH associating protein 1*). Do oddziaływania pomiędzy tymi białkami dochodzi na poziomie domeny Neh2 w obrębie Nrf2 oraz domeny DGR (ang. *double glycine repeat; Kelch domain*) w Keap1 wiążącej ponadto białko cytoszkieletu, aktynę. Dimer Keap1 przyłącza się do cząsteczki Nrf2 poprzez motyw o wysokim powinowactwie wiązania, ETGE, oraz motyw o niskim powinowactwie, DLG. Wykazano, że mutacje w ETGE znacznie osłabiają wiązanie Keap1 również przez sekwencję DLG, sugerując, że ETGE pełni kluczową, nadrzędną rolę



Rycina 2. Struktura białka Keap1.

w wiązaniu Keap1 [7]. Oprócz domeny DGR w strukturze Keap1 wymienia się także: region N-końcowy, domenę BTB (ang. *broad complex Tramtrack-Brick-a-brack*) zaangażowaną w tworzenie dimerów, region interwencyjny (IVR, ang. *intervening region*), którego dwie reszty cysteinowe są kluczowe dla represyjnej aktywności Keap1, oraz region C-końcowy (Ryc. 2) [4,8].

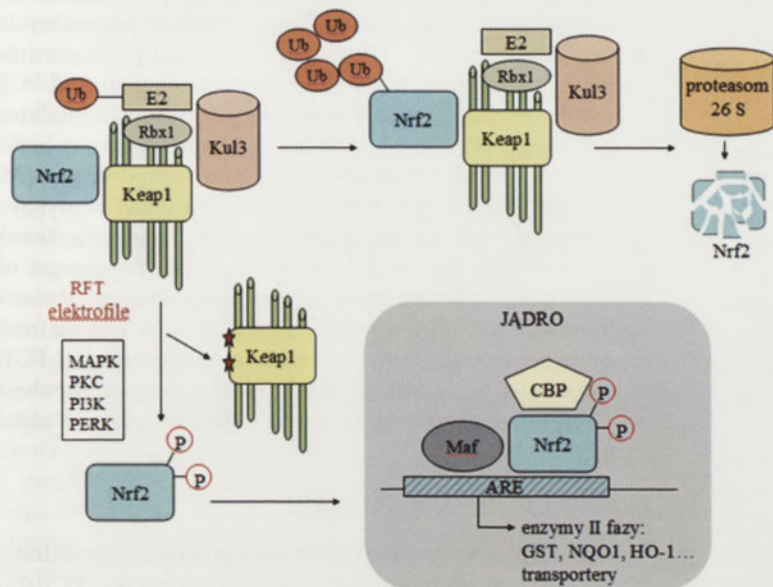
W następstwie wiązania przez Keap1, Nrf2 jest degradowany poprzez układ ubiquityna-proteasom. Do ubiquitylacji białka doprowadza sekwencyjne działanie trzech enzymów: enzymu (E1) aktywującego ubiquitynę (Ub), enzymu koniugującego i przenoszącego zaktywowaną ubiquitynę (E2) oraz ligazy ubiquitylowej (E3), która bierze udział w rozpoznawaniu substratu mającego ulec degradacji i dołączeniu do niego ubiquityny. Cząsteczka ubiquityny jest ostatecznie przenoszona z E2, bezpośrednio lub najczęściej przy udziale ligaz ubiquitylowych E3, na substrat. Przyłączony łańcuch co najmniej 4 reszty ubiquityny, jest rozpoznawany przez kompleks proteasomu, w efekcie czego białko ulega degradacji [9].

Zarówno domena BTB jak i region IVR białka Keap1 są kluczowe dla degradacji Nrf2, przyczyniając się do rekrutacji czynników kompleksu ligazy E3 (kulliny 3, Rbx1). Badania *in vivo* pokazały, że kullina 3, będąca podjednostką tego kompleksu, wiąże się bezpośrednio z Keap1 w regionie IVR. Ponadto, dwumiejscowe wiązanie Keap1 z Nrf2 (przez sekwencje ETGE i DLG) umożliwia ekspozycję miejsc przyłączania reszt ubiquityny. W ten sposób Keap1 pełniąc funkcję białka adaptorowego promuje ubiquitylację i proteosomalną degradację Nrf2, którego okres półtrwania w komórkach nie jest dłuższy niż 20 minut [7,10-12].

Wiązanie aktywny przez domenę DGR białka Keap1 i dimeryzacja przez jego domenę BTB przyczyniają się także do zatrzymywania Nrf2 w cytoplazmie [13,14]. Przy wykorzystaniu białka fuzyjnego powstałego poprzez połączenie zielonego białka fluorescencyjnego (GFP, ang. *green fluorescent protein*) z domeną Neh2 białka Nrf2 wykazano bowiem, że uszkodzenie szkieletu aktynowego przy użyciu cytochalazyny B promuje translokację Nrf2 do jądra [13]. Przeprowadzono także doświadczenia, w których mutacja, zachowanej w ewolucji, reszty seryny (S104A) w domenie BTB uniemożliwiła dimeryzację Keap1 i zniżyła zdolność Keap1 do wiązania Nrf2 w cytoplazmie, również prowadząc do jego translokacji do jądra i umożliwiając aktywność transkrypcji genów docelowych [14].

Badania ostatnich lat z zastosowaniem modelu myszy z niedoborem Keap1 potwierdziły, że białko Keap1 hamuje aktywność Nrf2 [15,16]. Pod nieobecność Keap1, Nrf2 jest konstytutywnie akumulowany w jądrze, co wskazuje, że Keap1 negatywnie reguluje Nrf2 przez zwiększanie jego degradacji oraz wpływ na lokalizację komórkową [15]. Ponadto, przy użyciu myszy z niedoborem Nrf2 wykazano, że represja aktywności Nrf2 jest głównym efektem działania Keap1 [15].

Sytuacja zmienia się w stresie oksydacyjnym, gdy regulacja ścieżki Nrf2-Keap1 jest kluczowa dla włączenia



Rycina 3. Regulacja aktywności czynnika Nrf2. W normalnych, niestresowych warunkach Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie związanej z białkiem cytoszkieletu Keap1. Keap1 bierze udział w rekrutacji czynników kompleksu ligazy E3 (kullina 3, Rbx1). Kullina 3 wiąże się bezpośrednio z Keap1 w jego regionie IVR. Wiązanie Keap1 z Nrf2 umożliwia ponadto ekspozycję miejsc przyłączania reszt ubikwityny (Ub). Łańcuch co najmniej 4 reszt ubikwityny przyłączony do Nrf2, rozpoznawany jest przez kompleks proteasomu 26S, w efekcie czego białko ulega degradacji. W ten sposób Keap1 pełniąc funkcje białka adaptorowego promuje ubikwitylację i proteasomalną degradację Nrf2. Sytuacja zmienia się w warunkach stresu oksydacyjnego. Wówczas elektrofile i/lub RFT powodują zerwanie wiązania pomiędzy Nrf2 i Keap1. U podłoża dysocjacji kompleksu Nrf2-Keap1 mogą leżeć zarówno zmiany konformacyjne białka Keap1 jak i fosforylacja białka Nrf2 przez kinazy takie jak MAPK, PKC, PI3K, PERK. Konsekwencją rozpadu nieaktywnego kompleksu jest uwalnianie Nrf2 z cytoplazmatycznej represji Keap1 i ochrona przed proteasomalną degradacją. W efekcie Nrf2 jest akumulowany w jądrze komórkowym i aktywuje transkrypcję wielu genów cytoprotekcyjnych, w następstwie dimeryzacji z białkami Maf i rozpoznania sekwencji ARE. Dodatkowo, oddziaływanie z białkiem CBP wzmacnia aktywność transkrypcyjną Nrf2.

mechanizmów obronnych komórki. W takich warunkach elektrofile i/lub reaktywne formy tlenu powodują zerwanie wiązania pomiędzy Nrf2 i Keap1, czego konsekwencją jest uwalnianie Nrf2 z cytoplazmatycznej represji Keap1 i ochrona przed degradacją proteasomalną [17]. W efekcie Nrf2 jest akumulowany w jądrze komórkowym i aktywuje transkrypcję wielu genów cytoprotekcyjnych (Ryc. 3). U podłoża dysocjacji kompleksu Nrf2-Keap1 mogą leżeć zarówno zmiany konformacyjne białka Keap1, jak i fosforylacja białka Nrf2. W pierwszym przypadku kluczowe znaczenie przypisywane jest resztom cysteiny w strukturze Keap1, których reaktywność jest modulowana przez wiązanie cynku [18]. Spośród 624 reszt aminokwasowych budujących to białko, 25 stanowią reszty cysteiny i są one zachowane w ewolucji u ludzi, szczurów i myszy. Cztery najbardziej reaktywne reszty są zlokalizowane w regionie IVR [4]. Wykazano, że wprowadzenie zmian konformacyjnych białka Keap1 lub samej domeny DGR, w wyniku modyfikacji (utleniania) grup tiolowych (-SH) reszt cysteiny przez induktor, może prowadzić do oddysocjowania Nrf2 i jego translokacji do jądra komórkowego, w którym pełni funkcje czynnika transkrypcyjnego [4,19]. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele związków naturalnych i syntetycznych, będących induktorami aktywności Nrf2, a działających poprzez modyfikację grup -SH. Należy do nich m.in. sulforafan i związek syntetyczny – oltipraz (patrz poniżej) [20].

Wśród najważniejszych mechanizmów aktywacji Nrf2, obok utleniania reszt cysteinowych białka Keap1, wymienia się fosforylację białka Nrf2 (Ryc. 3). Nrf2 może być fosforylowany za pośrednictwem kinaz zaangażowanych w przekazywanie sygnałów w komórce, takich jak kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*), kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinase*), kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide-3 kinase*), a także kinaza białkowa umiejscowiona w siateczce śródplazmatycznej (PERK, ang. *RNA-dependent protein kinase* (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) [21].

Istnieją badania demonstrujące, że kinaza PKC bierze udział w aktywacji Nrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny i elektrofile. I tak na przykład wykazano, że użycie selektywnych inhibitorów tej kinazy, staurosporyny i Ro-32-0432, hamuje translokację jądrową i aktywność transkrypcyjną Nrf2 indukowane przez octan mirystynianu forbolu (PMA) będący aktywatorem PKC. Reszta seryny umiejscowiona w regionie N-końcowym Nrf2, w domenie Neh2, oddziałuje z Keap1 i została zidentyfikowana jako miejsce fosforylacji PKC, w wyniku której Nrf2 oddysocjuje z kompleksu z Keap1. Dla potwierdzenia udziału PKC w odpowiedzi Nrf2 na stres oksydacyjny wykazano, że indukcja oksygenazy hemowej 1 (HO-1, ang. *heme oxygenase 1*) przez Nrf2 w następstwie działania foronu, obniżającego poziom glutationu (GSH), oraz końcowego produktu peroksydacji lipidów, 4-hydroksy-2,3-nonenalu (4-HNE), jest hamowana przez specyficzny inhibitor PKC, Ro-31-8220 [22-25].

Prowadzone są także badania nad innymi kinazami serynowo-treoninowymi, MAPK. Okazuje się, że mogą one łączyć sygnały chemiczne z Nrf2 i prowadzić do aktywacji genów zależnych od tego czynnika poprzez wiązanie się z sekwencją ARE (patrz poniżej) [21]. Doświadczenia na komórkach raka wątroby człowieka i myszy ujawniły, że *tert*-butylohydrochinon (tBHQ) i sulforafan, ksenobiotyki będące silnymi induktorami enzymów II fazy, stymulują aktywność kinazy regulowanej czynnikami zewnętrznymi (ERK2, ang. *extracellular signal-regulated protein kinase 2*) oraz kinazy MAPK. Wykazano, że zahamowanie kinazy MAPK przy użyciu inhibitora PD98058 znosi aktywację ERK2 znajdującej się w kaskadzie przekazywania sygnału bezpośrednio poniżej i blokuje wywołaną przez tBHQ i sulforafan indukcję enzymu II fazy, reduktazy NAD(P)H: chinonowej 1 (NQO1, ang. *NAD(P)H quinone reductase 1*) [26]. W innym doświadczeniu udowodniono rolę stresu oksydacyjnego w aktywacji MAPK przez tBHQ. Dowiedziono bowiem, że zmiatacze wolnych rodników, N-acetylo-L-cysteina (NAC) i glutation hamują aktywację ERK2 będącą wynikiem działania tego ksenobiotyku [27].

PI3K jest kinazą lipidową regulującą wzrost komórki, różnicowanie i apoptozę. W wyniku badań na komórkach nerwiaka niedojrzałego udowodniono również udział tej kinazy w regulacji genów indukowanych przez Nrf2 [28]. Wykazano między innymi, że PI3K reguluje translokację jądrową Nrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach raka wątroby [29] i jest kluczową kinazą w zależności od Nrf2 regulacji genów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na heminę w komórkach nerwiaka niedojrzałego [30]. Zaangażowanie kinaz MAPK, PKC i PI3K w regulację odpowiedzi Nrf2 na stres oksydacyjny nie budzi wątpliwości [31]. Z drugiej jednak strony, molekularne szczegóły aktywacji Nrf2 są nadal kontrowersyjne. Aby je wyjaśnić, niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych badań.

Siateczka śródplazmatyczna (ER) jest narażona na stres komórkowy wynikający m.in. z zachwiania równowagi metabolicznej i/lub procesów fałdowania białek. W takich warunkach, kinaza PERK jest jednym z głównych czynników inicjujących program regulacji transkrypcyjnej i translacyjnej zwany odpowiedzią na nieprawidłowo złożone białka (UPR, ang. *unfolded protein response*) i pełni kluczowe funkcje ochronne w ER. Konsekwencją takiego stresu jest akumulacja reaktywnych form tlenu, które promują stres oksydacyjny [32]. Badania ostatnich lat wykazały, że czynnik transkrypcyjny Nrf2 jest substratem dla PERK. Stwierdzono, że katalizowana przez tę kinazę fosforylacja Nrf2 powoduje jego oddysocjowanie od Keap1 i zwiększa transport jądrowy [33]. W ten sposób Nrf2 jest zaangażowany w odpowiedź ER na stres. Na dowód tego wykazano, że embrionalne fibroblasty myszy pozbawione genu Nrf2 są bardziej wrażliwe na tunikamycynę, co potwierdza, że Nrf2 zwiększa przeżycie komórek w warunkach stresu w ER [34].

ENDOGENNE INDUKTORY AKTYWNOŚCI NRF2

Oprócz egzogennych induktorów aktywności Nrf2 zidentyfikowano także endogenne związki chemiczne regulujące ścieżkę Nrf2-Keap1. Jednym z nich jest tlenek azotu (NO) regulujący m.in. procesy zapalne, apoptozę, odpowiedź immunologiczną i napięcie ściany naczyń krwionośnych oraz pełniący funkcje neuromodulatora i neuroprzekaźnika. Wykorzystując komórki śródbłonna i neuroblastomy (nerwiaka niedojrzałego) wykazano, że donory tlenu azotu wywołują translokację Nrf2 z cytoplazmy do jądra komórkowego, w wyniku czego dochodzi do indukcji ekspresji genów regulowanych przez Nrf2. W konsekwencji, komórki nerwiaka niedojrzałego stawały się odporne na apoptozę indukowaną przez NO. Te wyniki wskazują na rolę Nrf2 w utrzymywaniu homeostazy naczyń krwionośnych oraz cytoprotekcji neuronalnej [4]. W pierwszym przypadku niezwykle istotna jest także regulacja przez Nrf2 syntezy HO-1, enzymu pełniącego znaczącą rolę w procesach powstawania nowych naczyń krwionośnych [35]. Ponadto, oksygenaza hemowa-1 jest uznawana za jeden z najważniejszych cytoprotektantów o działaniu antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym [36,37].

Inną istotną cząsteczką sygnałową, zdolną do indukcji aktywności Nrf2, jest 15-deoksy- Δ 12,14-prostaglandyna J2 (15d-PGJ2) znana z silnego działania przeciwzapalnego.

Syntetyzowana z kwasu arachidonowego przy udziale cyklooksygenazy, PGJ2 została także poznana jako silny induktor enzymów fazy II. W badaniach nad procesami zapalnymi wykazano, że w mysich makrofagach 15d-PGJ2 aktywuje Nrf2 poprzez tworzenie adduktów z białkiem Keap1, czego skutkiem jest indukcja ekspresji genów białek przeciwzapalnych takich jak HO-1 i peroksyredoksyna [38]. Przy zastosowaniu modelu zapalenia płucnej u myszy z niedoborem Nrf2 zademonstrowano, że naciekanie tkanki przez neutrofile nie ustaje podczas procesu zapalnego, ale rekrutacja makrofagów jest znacznie opóźniona. Badania Yamamoto i wsp. [38] dowiodły, że Nrf2 pełni istotne funkcje w procesach zapalnych, będąc mediatorem 15d-PGJ2, biorąc udział w rekrutacji komórek do miejsca zapalenia oraz regulując ekspresję genów o działaniu przeciwzapalnym.

REGULACJA TRANSLACJI NRF2

W warunkach stresu oksydacyjnego poziom stabilnego białka Nrf2 w komórce dramatycznie wzrasta. W ostatnim czasie rośnie liczba dowodów, że ten wzrost może wynikać nie tylko z zahamowania ubikwitylacji i proteasomalnej degradacji napędzanej przez Keap1 [10], lecz także ze zwiększonej translacji mRNA Nrf2 [39]. Rozpoznaćie translacji w komórkach eukariotycznych jest regulowane głównie przez dwa mechanizmy: zależny i niezależny od czapeczki na końcu 5' mRNA. W pierwszym następuje skanowanie przez rybosom regionu-5' nieulegającego translacji (5'UTR, ang. *5'-untranslated region*) w mRNA. Drugi, to mechanizm translacji zależnej od sekwencji położonej wewnątrz transkryptu – wewnętrznego miejsca wiązania rybosomu (IRES, ang. *internal ribosome entry site*). Sekwencje IRES umożliwiają przyłączenie się rybosomów do sekwencji AUG (kodon inicjujący) bez konieczności skanowania regionu 5'UTR [40]. W normalnych, fizjologicznych warunkach faworyzowana jest translacja zależna od czapeczki [41]. Jednak, gdy komórka poddana jest działaniu rozmaitych stresów, poziom globalnej translacji białek zmniejsza się na korzyść zależnej od IRES translacji białek cytoprotekcyjnych [42].

W regionie 5'UTR transkryptu Nrf2 zidentyfikowano ostatnio funkcjonalną sekwencję IRES. Dowiedziono ponadto, że translacja zależna od IRES jest wrażliwa na stan redoks komórki. Traktowanie komórek nadtlenkiem wodoru i sulforafanem stymulowało bowiem mechanizm translacji z udziałem IRES. Tak więc, w następstwie działania oksydantów wzrasta poziom aktywnego białka Nrf2 nie tylko za sprawą zablokowania jego degradacji, ale również dzięki uruchomieniu mechanizmu wewnętrznej inicjacji translacji [43].

HIPOTETYCZNY MODEL REGULACJI AKTYWNOŚCI NRF2 W WARUNKACH STRESU OKSYDACYJNEGO

W ostatnim czasie pojawiła się nowa hipoteza regulacji aktywności Nrf2 w warunkach stresu oksydacyjnego. Coraz więcej dowodów wskazuje bowiem, że napędzana przez Keap1 ubikwitylacja Nrf2 jest bardzo wrażliwa na stan redoks komórki. Z drugiej strony, dysocjacja kompleksu Nrf2/Keap1 prawie nie zależy od warunków stresu oksydacyjnego. Słaba wrażliwość tego kompleksu

na stan redoks komórki czyni etap oddysocjowania Nrf2 w „starym” modelu mało prawdopodobnym. W dodatku, jądrowa traslokacja Nrf2 jest wysoce wrażliwa na zmiany redoks komórki. W oparciu o te doniesienia wysnuto „nową” hipotezę. Dimer Keap1 pełni funkcje białka adaptorowego, promując ubikwitylację Nrf2. W komórce są dwie pule białka Nrf2: niezwiązany (fNrf2, ang. *free floating*) i związany z białkiem Keap1 (kNrf2). W normalnych warunkach, kNrf2 wiąże się z Keap1 za pośrednictwem sekwencji ETGE i DLG. Dwumiejscowe wiązanie dimeru Keap1 umożliwia ekspozycję miejsc przyłączania reszt ubikwityny w Nrf2 i w konsekwencji proteasomalną degradację białka. W warunkach homeostazy występuje równowaga pomiędzy translacją i degradacją białka Nrf2. W efekcie, pula fNrf2 w komórce jest mała i przyczynia się do bazalnej aktywacji Nrf2 i regulacji ekspresji genów docelowych. W warunkach stresu oksydacyjnego, w wyniku wytworzenia wiązań disiarczkowych w dimerze Keap1, zmieniająca się konformacja tego białka uniemożliwia dwumiejscowe wiązanie z Nrf2. W konsekwencji, miejsca przyłączania reszt ubikwityny stają się niedostępne, blokując procesy ubikwitylacji i proteasomalnej degradacji. Wówczas Keap1 jest wysycany przez niezdegradowany kNrf2. Jednocześnie silnie zwiększa się translacja białka Nrf2 i pula wrażliwego na stan redoks fNrf2, które ulega translokacji do jądra. W tym modelu Keap1 determinuje wielkość puli fNrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny, nie powoduje jednak dysocjacji kNrf2 z nieaktywnego kompleksu (Ryc. 4) [7]. Weryfikacja powyższej hipotezy jest celem najnowszych badań.

ELEMENT ODPOWIEDZI ANTYOKSYDACYJNEJ

Regulacja ekspresji genów przez Nrf2 zachodzi w następstwie rozpoznania elementu odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE, ang. *antioxidant response element*) jądrowego DNA i jego wiązania za pośrednictwem motywu zamka leucynowego [44]. Okuda i wsp. jako pierwsi opisali sekwencję wzmacniacza, podobną do miejsca AP-1 (ang. *activator protein-1*) i elementu odpowiedzi na tkankowy antygen polipeptydowy TPA (TRE, ang. *TPA response element*) w genie szczurzej S-transferazy glutationowej (GST). Sekwencja ARE została później zdefiniowana jako 5'-TGACnnnGCA-3' w oparciu

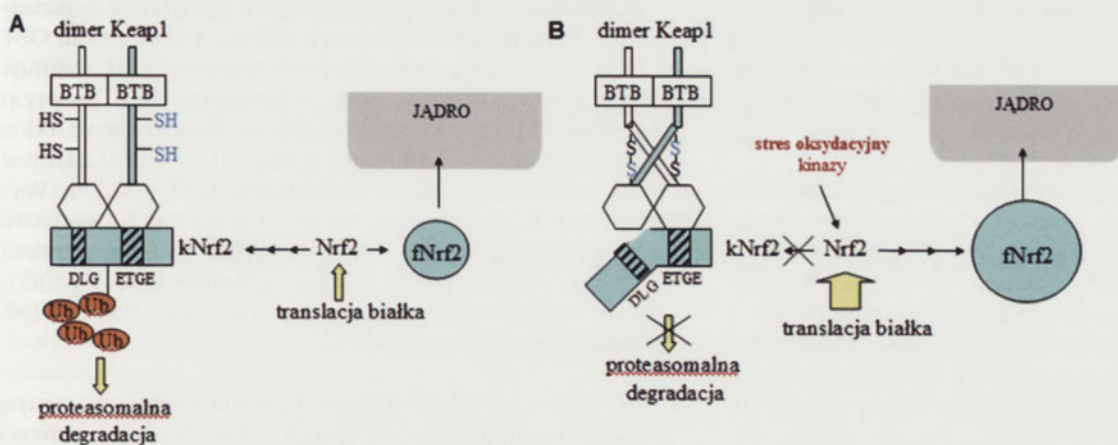
o analizy mutacyjne promotora genu GST A1. Element odpowiedzi antyoksydacyjnej został znaleziony w regionie 5' wielu genów enzymów detoksykacyjnych fazy II. W 1996 roku Venugopal i Jaiswal po raz pierwszy dowiedli istotnej roli Nrf2 w aktywacji ARE. Podobnie, Itoh i wsp. sugerowali, że pewne cząsteczki z rodziny białek CNC i/lub rodziny małych białek Maf mogą wiązać się z sekwencją ARE. Hipotezę tę oparli na fakcie, że sekwencja zgodności ARE jest podobna do sekwencji rdzeniowej miejsca wiązania białek Maf (MARE, ang. *Maf recognition element*, 5'-TGAGTCA-3') i miejsca wiązania NF-E2 (5'-GCTGAGTCA-3'). Wykazali również, że poziom syntezy GST i NQO1 jest obniżony u myszy z niedoborem Nrf2 w porównaniu z myszami typu dzikiego (piśmiennictwo w pracy [45]). Obecnie wiadomo, że specyficzne wiązanie DNA i indukcja transkrypcji genów przez Nrf2 są możliwe wówczas, gdy ulegnie dimeryzacji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Wśród nich do tej pory za najbardziej znaczące uważa się małe białka Maf [46], chociaż badania dowodzą także istnienia innych partnerów dla Nrf2 takich jak czynnik transkrypcyjny ATF4, który tworząc dimer z Nrf2 reguluje ekspresję genów HO-1 [47].

GENY REGULOWANE PRZEZ NRF2

Wiązanie Nrf2 do sekwencji ARE indukuje ekspresję wielu genów o działaniu cytoprotekcyjnym. W ostatnich latach wykazano, że w warunkach stresu oksydacyjnego i chemicznego Nrf2 odgrywa główną rolę w indukcji enzymów antyoksydacyjnych i odtruwających, tzw. enzymów II fazy (patrz poniżej) takich jak S-transferazy glutationowe, reduktaza NAD(P)H: chinon, UDP-glukuronylotransferaza, hydrolaza epoksydowa, syntetaza γ -glutamylcysteinowa i oksigenaza hemowa-1 [2]. Działanie ochronne powstałych białek obejmuje rozkład reaktywnych form tlenu, deaktywację metabolitów elektrofilowych, detoksykację ksenobiotyków oraz stabilizację potencjału oksydoredukcyjnego komórki (Ryc. 5).

Ponadto Nrf2 reguluje ekspresję genów przenośników komórkowych takich jak transporter wymienny cysteino-wo-glutaminianowy [48] oraz transporter ABCC1 (Mrp1, ang. *multidrug resistance-associated protein 1*), eksportujący metabolity ksenobiotyków [49]. W ten sposób Nrf2 koordynuje eliminację związków toksycznych oraz wspomaga działanie enzymów odtruwających [32].

Nrf2 aktywuje także transkrypcję genów kodujących pewne składniki proteasomu, jak również genów zaangażowanych w fałdowanie białek [50], prawdopodobnie dla zmniejszenia ilości błędnie sfa-



Rycina 4. Hipotetyczny model regulacji aktywności Nrf2 w warunkach stresu oksydacyjnego. A) warunki normalne; B) stres oksydacyjny (opis w tekście, zmodyfikowano wg [7]).



Rycina 5. Rola genów regulowanych przez Nrf2 w cytoprotekcji w warunkach stresowych (zmodyfikowano wg [62]).

dowanych lub zagregowanych białek w komórce. Stres oksydacyjny promuje bowiem rozmaite modyfikacje białek, włączając utlenianie, które mogą zaburzać właściwe ich funkcjonowanie [32].

Oprócz genów antyoksydacyjnych, Nrf2 reguluje ekspresję genów wpływających na wzrost i przeżywalność komórek, a także zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną. Te wyniki pozostają w zgodzie z faktem, iż 15d-PGJ2, cząsteczka o działaniu przeciwzapalnym, jest aktywatorem Nrf2 [32].

DROGA SYGNAŁOWA NRF2-ARE JAKO CEL ODDZIAŁYWANIA CZYNNIKÓW CHEMOPREWENCYJNYCH

Pośród ksenobiotyków wiele jest czynników mutagennych i kancerogennych. Ich przemiany (biotransformacja) mają na celu szybkie usunięcie tych substancji z organizmu lub zmianę ich działania biologicznego (inaktywację). Biotransformacja może obejmować różne procesy, które umownie podzielono na reakcje I i II fazy. Reakcje I fazy prowadzą do wytworzenia produktów pośrednich w procesach utleniania, redukcji i hydrolizy. Są więc prowadzone głównie przez oksydoreduktazy i hydrolazy. Metabolity enzymów I fazy są często wysoce elektrofilowe. Dzięki uzyskaniu polarności związki pośrednie mogą ulegać reakcjom drugiej fazy, które z kolei dają produkty końcowe. Enzymami II fazy są transferazy katalizujące reakcje sprzęgania np. UDP-glukuronylotransferaza czy GST.

Strategie zapobiegania chorobom degeneracyjnym, zwłaszcza nowotworom, stanowią ważną alternatywę dla ciągle niewystarczająco skutecznych terapii. Chemoprewencja ma na celu zahamowanie procesu kancerogenezy na jego możliwie najwcześniejszych etapach. Charakterystyczną cechą procesu indukcji nowotworów jest stosunkowo długi okres jaki upływa od chwili inicjacji (akumulacja mutacji) do rozwoju klinicznej postaci choroby, który stwarza wiele możliwości wczesnej interwencji. Prowadzone w ostatnich latach badania dostarczyły przekonujących dowodów, że selektywna indukcja enzymów II fazy może skutecznie chronić komórki przed od-

działaniem zarówno reaktywnych metabolitów związków kancerogennych jak i RFT, co daje mocne podstawy do jej wykorzystania jako strategii zapobiegania nowotworom. Dotyczy to szczególnie S-transferazy glutationowej i reduktazy NAD(P)H: chinon 1 [21]. Nrf2, będąc czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za działanie cytoprotekcyjne, głównie za sprawą indukcji enzymów II fazy, może być więc rozpatrywany jako potencjalny cel oddziaływania czynników chemoprewencyjnych w profilaktyce nowotworów.

W ostatnich latach uzyskano wiele dowodów na to, że modulacja ekspresji genów kodujących enzymy II fazy zmienia podatność na kancerogenezę. I tak na przykład, delecja genu GST π 1 lub NQO1 powodowała zwiększenie podatności myszy na rozwój nowotworu skóry indukowany przez policykliczne węglowodory aromatyczne (PWA) [19].

Obserwowano także zwiększone ryzyko raka przewodu pokarmowego, skóry, pęcherza moczowego czy też jamy ustnej i płuc w następstwie zablokowania genu jednego z izoenzymów GST [51].

Do związków chemoprewencyjnych działających poprzez indukcję enzymów II fazy zalicza się syntetyczne środki farmakologiczne, jak również wiele naturalnych składników diety, głównie tzw. nieodżywczych składników żywności. Spośród związków syntetycznych do tej pory najlepiej poznany jest oltipraz. Naturalne zaś to przede wszystkim organiczne związki siarki i roślinne związki fenolowe. Do pierwszej grupy należą izotiocyaniany takie jak m.in. izotiocyanian fenetylu (PEITC) oraz sulforafan mające największe znaczenie w badaniach nad chemoprewencją. Mechanizm działania izotiocyanianów opiera się na rozrywaniu wiązania między Nrf2 a białkiem Keap 1, czego konsekwencją jest oddysocjowanie Nrf2 z nieaktywnego kompleksu cytoplazmatycznego. Uwalnianie Nrf2 od Keap1 możliwe jest także dzięki aktywacji kinaz białkowych (MAPK, PKC, PI3K, PERK). W następstwie, wzrasta transkrypcja genów zawierających element ARE [52]. Organiczne izotiocyaniany, występujące powszechnie w diecie człowieka, głównie w musztardzie i chrzanie, są więc bardzo silnymi induktorami GST i NQO1. Dowiedziono, że w ten sposób PEITC hamuje różne postaci nowotworów indukowanych u zwierząt doświadczalnych przez chemiczne kancerogeny takie jak nitrozoaminy. Izolowany z brokułów sulforafan jest jednym z najsilniejszych induktorów GST i NQO1. Wykazano m.in., że związek ten hamuje rozwój nowotworu gruczołu piersiowego u szczura. Analogicznie, poprzez indukowanie enzymów II fazy, głównie GST i NQO1, działa wspomniany syntetyczny związek, oltipraz (piśmiennictwo w pracy [21]).

Roślinne związki fenolowe stanowią wyjątkową grupę związków chemoprewencyjnych, gdyż działają zarówno jako przeciwutleniacze jak i induktory enzymów detoksykacyjnych [53]. Tutaj wymienić należy: 1,4-difenole występujące w ekstraktach z zielonej herbaty, kwas pro-

tokatechowy w owocach, warzywach i orzeszkach ziemnych, flawonoidy w kwiatach i owocach oraz syntetyczne związki fenolowe takie jak butylohydroksyanizol (BHA). Wykazano, że mechanizmy chemoprewencyjne są uszkodzone u myszy z niedoborem Nrf2. Indukcja ekspresji genów kodujących enzymy II fazy w odpowiedzi na BHA jest znoszona u takich zwierząt [44]. Podobnie, przy braku Nrf2, sulforafan czy też oltipraz nie wykazują swoich chemoprotekcyjnych efektów, co potwierdza kluczowe znaczenie tego czynnika w ochronie przeciwko ksenobiotom [54,55].

NRF2 JAKO MODULATOR STRESU OKSYDACYJNEGO W NEURODEGENERACJI

Zwiększony stres oksydacyjny jest związany także ze śmiercią komórek nerwowych w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, płasawica Huntingtona czy też stwardnienie zanikowe boczne (choroba Lou Gehriga). Ponieważ Nrf2 pełni ważne funkcje ochronne w warunkach stresu oksydacyjnego, wielu naukowców podjęło próbę zbadania udziału Nrf2 w neuroprotekcji. Rzeczywiście, udowodniono, że komórki nerwowe z hodowli pierwotnej traktowane chemicznymi aktywatorami ścieżki Nrf2-ARE (tBHQ, sulforafan), są bardziej odporne na neurotoksyczność wywołaną stresem oksydacyjnym [56]. Z drugiej strony przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem myszy z niedoborem Nrf2. Neurony takich osobników były znacznie bardziej podatne na toksyczne działanie związków służących za model choroby Huntingtona, czyli inhibitorów II kompleksu mitochondrialnego: kwasu 3-nitropropionowego i malonianu [57,58]. Podobne zwiększenie wrażliwości myszy z niedoborem Nrf2 zaobserwowano w modelach choroby Parkinsona przy użyciu 6-hydroksydopaminy [59] oraz 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP) [60]. W badaniach *in vitro* wykazano także, że astrocyty ze zwiększoną ekspresją genu kodującego Nrf2, w następstwie podania wektorów adenowirusowych, mogą chronić komórki nerwowe przed skutkami stresu oksydacyjnego wywołanego przez nadtlenek wodoru [61]. Rola Nrf2 w astrocytach, neuronach i mechanizmach zaangażowanych w neuroprotekcję jest więc bardzo istotna dla ustalenia nowych strategii w profilaktyce i/lub terapii chorób neurodegeneracyjnych.

PODSUMOWANIE

W normalnych warunkach Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie związanej z białkiem cytoszkieletu Keap1. Sytuacja zmienia się w warunkach stresowych, kiedy to Nrf2 jest uwalniany z nieaktywnego kompleksu, ulega translokacji do jądra i aktywuje ekspresję wielu genów cytoprotekcyjnych. Jak pokazano na rycinie 5, powstające białka mogą chronić komórki przed działaniem ksenobiotyków i reaktywnych form tlenu [62], prowadząc do stabilizacji potencjału oksydoredukcyjnego.

Stres oksydacyjny oraz procesy zapalne generujące RFT, jak również wytwarzanie elektrofilowych metabolitów związków chemicznych zdolnych do uszkodzania makrocząsteczek komórkowych, są istotnym elementem pa-

togenezy wielu chorób degeneracyjnych [21]. Nrf2, będąc czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za działanie cytoprotekcyjne, głównie za sprawą indukcji enzymów II fazy, może być więc rozpatrywany jako potencjalny cel oddziaływania czynników chemoprewencyjnych w profilaktyce nie tylko nowotworów, lecz także chorób neurodegeneracyjnych czy chorób układu krążenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Bartosz G (2003) Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2. Yu X, Kensler T (2005) Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res* 591: 93-102
3. Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294: 1-12
4. Motohashi H, Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10: 549-557
5. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279: 31556-31567
6. Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2004) Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul* 44: 335-367
7. Li W, Kong AN (2009) Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 48: 91-104
8. Zhang DD, Hannink M (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23: 8137-8151
9. Grzelakowska-Sztartabert B, Rytka J (1968) Allosteric control of biological activity of some proteins. *Postepy Biochem* 14: 251-266
10. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24: 7130-7139
11. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003) Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 278: 2396-2402
12. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 278: 21592-21600
13. Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M (2004) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2046-2051
14. Zipper LM, Mulcahy RT (2002) The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem* 277: 36544-36552
15. Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, Yamamoto M (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 35: 238-245
16. Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M (2004) Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymol* 378: 273-286
17. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 275: 16023-16029

18. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Wakabayashi N (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 44: 6889-6899
19. Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD (2003) Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 43: 121-134
20. Kohle C, Bock KW (2006) Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 72: 795-805
21. Krajka-Kuzniak V (2007) Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig Med Dosw* 61: 627-638
22. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12475-12480
23. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 277: 42769-42774
24. Bloom DA, Jaiswal AK (2003) Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 278: 44675-44682
25. Numazawa S, Ishikawa M, Yoshida A, Tanaka S, Yoshida T (2003) Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C334-342
26. Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AN (1999) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 274: 27545-27552
27. Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandlekar S (2001) Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* 33: 255-271
28. Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276: 20011-20016
29. Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 62: 1001-1010
30. Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K, Nakashima K (2003) PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 546: 181-184
31. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-260
32. Cullinan SB, Diehl JA (2006) Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 317-332
33. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* 23: 7198-7209
34. Cullinan SB, Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279: 20108-20117
35. Dulak J, Loboda A, Zagorska A, Jozkowicz A (2004) Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6: 858-866
36. Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J (2008) Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10: 1767-1812
37. Dulak J, Loboda A, Jozkowicz A (2008) Effect of heme oxygenase-1 on vascular function and disease. *Curr Opin Lipidol* 19: 505-512
38. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M (2004) Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* 24: 36-45
39. Purdom-Dickinson SE, Sheveleva EV, Sun H, Chen QM (2007) Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Mol Pharmacol* 72: 1074-1081
40. Hellen CU, Sarnow P (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-1612
41. Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23: 3200-3207
42. Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 318-327
43. Li W, Thakor N, Xu EY, Huang Y, Chen C, Yu R, Holcik M, Kong AN (2010) An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res* 38: 778-788
44. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322
45. Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37: 139-143
46. Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH (1993) Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362: 722-728
47. He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* 276: 20858-20865
48. Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maebara K, Wang H, Tamba M, Itoh K, Yamamoto M, Bannai S (2002) Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* 277: 44765-44771
49. Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y (2003) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 824-829
50. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278: 8135-8145
51. Landi S (2000) Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 463: 247-283
52. Smiechowska A, Bartoszek A, Namiesnik J (2008) Przeciwrakotwórcze właściwości glukozyzolanów zawartych w kapuście (*Brassica oleracea var. capitata*) oraz produktów ich rozpadu. *Postępy Hig Med Dosw* 62: 125-140
53. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406
54. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7610-7615
55. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3410-3415
56. Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 61-69

57. Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH (2005) Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress *in vivo*. *J Biol Chem* 280: 22925-22936
58. Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, Chan K, Kan YW, Johnson JA (2005) Protection from mitochondrial complex II inhibition *in vitro* and *in vivo* by Nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 244-249
59. Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA (2007) Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 1144: 192-201
60. Burton NC, Kensler TW, Guilarte TR (2006) *In vivo* modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. *Neurotoxicology* 27: 1094-1100
61. Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA (2004) Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci* 24: 1101-1112
62. Osburn WO, Kensler TW (2008) Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* 659: 31-39

Role of Nrf2 transcription factor in cellular response to oxidative stress

Urszula Florczyk, Agnieszka Łoboda, Anna Stachurska, Alicja Józkwicz, Józef Dulak 

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

 e-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl

Key words: Nrf2 transcription factor; oxidative stress, heme oxygenase-1, electrophiles, chemoprevention

ABSTRACT

Nrf2 transcription factor plays a crucial role in protection of cells against oxidative stress. Under normal conditions Nrf2 is sequestered in cytoplasm by a cytoskeletal protein, Keap1. Situation is changed under stressful conditions, when electrophiles and/or reactive oxygen species (ROS) cause dissociation of Nrf2 from Keap1. As a consequence, Nrf2 is translocated to the nucleus, that leads to activation of cytoprotective genes involved in electrophile conjugation, excretion of xenobiotics, ROS scavenging and stabilization of cellular redox potential.

Amongst xenobiotics, there are many mutagenic and cancerogenic factors. Phase I and II enzymes are responsible for inactivation and removal of such compounds. It has been shown that induction of phase II enzymes confers protection upon insult by reactive metabolites of cancerogens or ROS. Since Nrf2 is an inducer of those enzymes it can be considered as a potential target for cancer chemoprevention. Similarly, in case of neurodegenerative disorders, which pathogenesis is connected to oxidative stress, Nrf2 may be important for therapeutical and preventive strategies

Nowe oblicza czynników indukowanych przez hipoksję – HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny

Anna Stachurska


Urszula Florczyk

Alicja Józkowicz

Józef Dulak

Agnieszka Łoboda 

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

 Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 64 12, e-mail: agnieszka.loboda@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 15 marca 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 24 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: niedotlenienie, hydroksylazy prolinowe, stres oksydacyjny, łańcuch oddechowy, reaktywne formy tlenu, tlenek azotu

Wykaz skrótów: FIH-1 (ang. *factor inhibiting HIF-1*) – czynnik hamujący HIF-1; HIF-1, 2, 3 (ang. *hypoxia inducible factor-2*) – czynnik indukowany przez hipoksję; HRE (ang. *hypoxia responsive element*) – element promotora odpowiadający na niedotlenienie; NO – tlenek azotu; ODD (ang. *oxygen dependent degradation domain*) – zależna od tlenu domena degradacyjna; PHDs (ang. *proline hydroxylases*) – hydroksylazy prolinowe; RFA – reaktywne formy azotu; RFT – reaktywne formy tlenu; TAD (ang. *transactivation domains*) – domeny transaktywacyjne; VHL (ang. *von Hippel-Lindau*) – białko von Hippel-Lindau; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektów badawczych N N401 297835 i N301 314837 finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii jest beneficjentem funduszy strukturalnych w ramach grantów No: POIG.02.01.00-12-064/08, 01.01.02-00-109/09; 02.02.00-00-014/08.

STRESZCZENIE

Badania mechanizmów adaptacyjnych do niekorzystnych warunków niedotlenienia doprowadziły do odkrycia czynników indukowanych przez hipoksję, HIF-1 i HIF-2. Czynniki te regulują ekspresję wielu genów umożliwiających dostosowanie komórek do zmian w stężeniu tlenu i przeciwdziałających skutkom występującego w niedotlenieniu stresu oksydacyjnego. Regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych HIF polega na uwarunkowanym dostępnością tlenu działaniu hydroksylaz prolinowych i wynikającej z tego zależnej od ubikwityny proteasomowej degradacji podjednostek HIF-1 α i HIF-2 α . Najnowsze badania wskazują na szczególną rolę reaktywnych form tlenu (RFT), produkowanych przez mitochondrialny łańcuch oddechowy w regulacji stabilności HIF. Wiadomo, że RFT wpływają również na poziom tlenku azotu (NO) w organizmie, prowadząc do zmniejszenia jego stężenia, ale generując reaktywne formy azotu (RFA), których efektem może być zwiększenie stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego. Regulacja aktywności czynników HIF przez RFT, NO i RFA jest obecnie obiektem wielu badań i wydaje się być mechanizmem zależnym od warunków (np. normoksja/hipoksja), czy stężeń poszczególnych stymulatorów (np. donorów NO).

WPROWADZENIE

Gospodarka tlenowa organizmu jest ściśle regulowana, ponieważ gaz ten jest niezbędny do produkcji ATP za pomocą mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Niemniej jednak tlen może być przekształcany w wysoce reaktywne pochodne, tzw. reaktywne formy tlenu (RFT), których źródłem może być zarówno mitochondrialny łańcuch oddechowy, jak i promieniowanie jonizujące czy też różne enzymy komórkowe.

RFT w komórkach to głównie anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻), nadtlenek wodoru (H₂O₂) oraz rodnik wodorotlenowy (\cdot OH). Związki te, jako bardzo reaktywne, mogą oddziaływać z białkami, lipidami oraz kwasami nukleinowymi, wpływając na ich strukturę oraz funkcję (w przypadku białek i lipidów), bądź prowadząc do powstawania mutacji (DNA). Dlatego też gospodarka RFT jest ściśle regulowana za pomocą wielu enzymów antyoksydacyjnych zmiatających wolne rodniki. Enzymy te m.in. przekształcają rodnik ponadtlenkowy do nadtlenu wodoru (dysmutazy ponadtlenkowe), jak również rozkładają nadtlenek wodoru (katalaza, peroksydaza glutationu, peroksyredoksyny). Głównymi źródłami RFT w komórkach są mitochondria, a właściwie elementy łańcucha oddechowego, gdzie w mitochondrialnym transporcie elektronów dochodzi do wyciekania elektronów i powstawania anionu ponadtlenkowego.

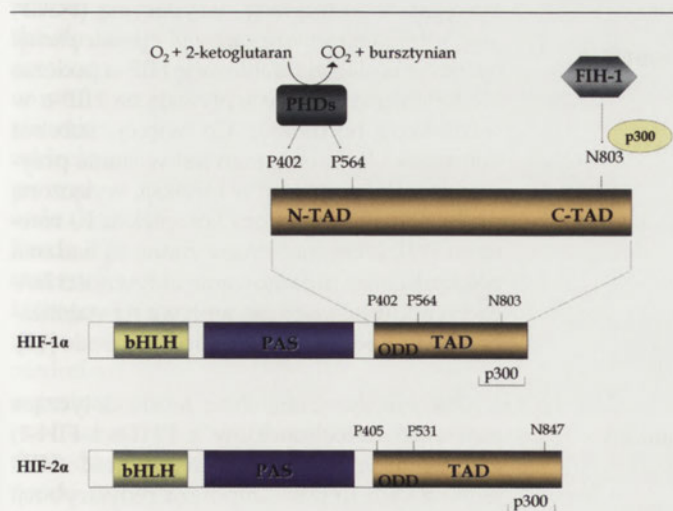
Z drugiej strony, wiele stanów patologicznych, takich jak choroby kardiologiczne (np. zawał serca), neurologiczne (np. udar mózgu), czy rozwój nowotworów, cechuje występowanie niedotlenienia (hipoksji), czyli stanu niedoboru tlenu we krwi lub w tkankach, wynikającego z dysproporcji między zapotrzebowaniem a zaopatrzeniem w tlen. Tlen jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu i aby zniwelować szkodliwe skutki niedotlenienia, rozwinęły się złożone mechanizmy obronne.

Dostosowanie do obniżonej dostępności tlenu wymaga zmian w ekspresji genów, które mogą prowadzić do zmniejszenia zużycia tlenu, promować dostawę tlenu oraz zwalczają negatywne skutki niedotlenienia. Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulującymi te procesy, są czynniki indukowane przez niedotlenienie, tzw. czynniki HIF. Oprócz roli w walce z niedotlenieniem, czynniki te mogą zapewniać ochronę przed stresem oksydacyjnym tworzącym się podczas niedotlenienia, ponieważ wiele produktów ekspresji genów regulowanych przez HIF-1 i HIF-2 może mieć działanie antyoksydacyjne.

BUDOWA CZYNNIKÓW HIF

Białka indukowane przez niedotlenienie (HIF, ang. *hypoxia inducible factor*) będące heterodimerami złożonymi z podjednostek α (o masie cząsteczkowej 120 kDa) i β (o masie cząsteczkowej 91–94 kDa) są kluczowymi czynnikami odpowiedzialnymi za regulację ekspresji genów zależnych od hipoksji. Istnieją trzy izoformy podjednostki α (HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α) oraz trzy paralogi podjednostek β (Arnt1, Arnt2 i Arnt3) [1]. Z wymienionych izoform, HIF-1 α i HIF-2 α odgrywają szczególną rolę w odpowiedzi komórki na brak tlenu i są w stanie tworzyć kompleks z podjednostką HIF-1 β . Aktywne kompleksy HIF-1 i HIF-2, choć podobne strukturalnie, mogą mieć różne właściwości, charakteryzują się odmiennym wzorem ekspresji i mogą oddziaływać z różnymi kofaktorami. Ostatnie badania pokazują również, że spektrum genów docelowych regulowanych przez te dwa czynniki może być odmienne.

Podjednostki α i β zbudowane są z dwóch charakterystycznych domen: motywu bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) oraz domeny PAS (ang. *Per-AHR-ARNT-Sim*) (Ryc. 1). Domeny te są wymagane do dimeryzacji białka i wiązania się z DNA. Podjednostka HIF-1 α zawiera również inne charakterystyczne domeny, jak zależną od tlenu domenę degradacyjną ODD (ang. *oxygen dependent degradation domain*), odgrywającą kluczową rolę w regulacji stabilności HIF-1 α oraz dwie domeny transaktywacyjne C-TAD i N-TAD (ang. *C- i N-transactivation domains*). Ponadto, HIF-1 α zawiera dwa sygnały lokalizacji jądrowej, NLS (ang. *nuclear localization signals*), N-NLS i C-NLS, które kierują HIF-1 α do jądra komórkowego [1]. Struktura podjednostki HIF-2 α jest podobna do struktury podjednostki HIF-1 α , różnice wiążą się jedynie z budową domeny N-TAD (Ryc. 1). To właśnie ta domena wpływa na specyficzność izoform HIF-1 α i HIF-2 α . Rola białka HIF-3 α jest mniej zrozumiała, ale sugeruje się,



Rycina 1. Budowa czynników HIF-1 α oraz HIF-2 α . HIF-1 α zbudowany jest z 826, a HIF-2 α z 870 reszt aminokwasowych. W N-końcowym fragmencie znajdują się domeny bHLH oraz PAS. W C-końcowej części występuje domena transaktywacyjna (TAD) z wyróżniającymi się sekwencjami N-TAD i C-TAD. Zaznaczono również domenę ODD, w obrębie której znajdują się specyficzne reszty proliny, które w warunkach normalnego stężenia tlenu są hydroksylowane przez PHDs i stanowią sygnał do zależnej od ubikwityny degradacji w proteasomach. Ponadto, hydroksylacja reszty asparaginy (N803/N847) w domenie C-TAD przez czynnik hamujący (FIH-1) hamuje oddziaływanie z koaktywatorem CBP/ p300.

że alternatywne formy splicingowe HIF-3 α hamują aktywność transkrypcji HIF-1 α .

GENY DOCELOWE REGULOWANE PRZEZ IZOFORMY HIF-1 I HIF-2

Związanie czynników HIF-1 oraz HIF-2 ze specyficzną sekwencją DNA (5'-(A/G) CGTG-3'), tzw. elementem odpowiedzi na niedotlenienie (HRE, ang. *hypoxia responsive element*), oraz przyłączenie szeregu kofaktorów uruchamia transkrypcję wielu genów, których produkty białkowe są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy tlenu i ułatwiają adaptację komórek do hipoksji (Ryc. 2). Wśród nich można wyodrębnić geny, których produkty białkowe utrzymują optymalną dostawę tlenu poprzez nasilenie erythropoezy, czyli powstawania czerwonych krwinek. Warto podkreślić, iż czynnik HIF-1 został odkryty w 1992 roku jako czynnik aktywujący ekspresję genu dla erytropoetyny [2]. HIF-1 nasila również ekspresję genów ceruloplazminy, transferyny, i receptora transferyny, białek, które ułatwiają dostawy żelaza do różnych tkanek, co pozwala m.in. na syntezę hemu. Druga grupa czynników reprezentowana jest przez białka zaangażowane w rozwój i funkcjonowanie układu naczyniowego, między innymi stymulatory procesu angiogenezy (np. czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*, i jego receptor VEGFR1/Flt-1) lub modulowanie napięcia ściany naczyń krwionośnych (np. indukowana syntaza tlenku azotu, iNOS, ang. *inducible nitric oxide synthase*; oksygenaza hemowa-1, HO-1, ang. *heme oxygenase-1*; endotelina-1). Trzecią grupę stanowią geny, których produkty biorą udział w metabolizmie energetycznym komórki i powodują uruchomienie procesu glikolizy jako głównego mechanizmu pozyskiwania energii. Na przykład, HIF-1 aktywuje transkrypcję genów kodujących białka transportujące glukozę do wnętrza komórek, enzymy biorące udział w konwersji glukozy do pirogronianu jak również redukujące pirogronian do kwasu mlekowego. Czwarta grupa obejmuje geny, których produkty są odpowiedzialne za kontrolę proliferacji i żywotności komórek. Oprócz tych czterech głównych grup, HIF-1 reguluje transkrypcję innych genów, co prowadzi np. do hamowania różnicowania (inhibitor wiązania z DNA, ID2, ang. *inhibitor of DNA binding-2*), regulacji oporności na chemioterapeutyki (glikoproteina P, P-gp), syntezy katecholamin (hydroksylaza tyrozyny) czy wpływu na metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej (metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2, MMP2, ang. *matrix metalloproteinase 2*). Łącznie ocenia się, że HIF-1 odpowiada w istotny sposób za regulację ponad 100 genów.

REGULACJA AKTYWNOŚCI HIF

Podjednostki HIF- α jak i HIF- β ulegają konstytutywnej ekspresji, ale ich czas półtrwania w warunkach normalnego stężenia tlenu jest różny. Poziom HIF- β jest stały, natomiast czas półtrwania HIF- α wynosi mniej niż 5 minut [3]. Labilność HIF- α i jego degradacja jest blokowana, kiedy spada dostępność tlenu. Skomplikowana regulacja aktywności obu izoform HIF- α odbywa się głównie na poziomie posttranslacyjnym i związana jest z zależną od ubikwityny degradacją w proteasomach w warunkach normoksji. Dodatkowo, do pełnej aktywności białko HIF wymaga obecności

wielu kofaktorów, wśród których niektóre są wspólne dla obu podjednostek HIF-1 α oraz HIF-2 α , a inne specyficzne dla poszczególnych izoform.

STABILIZACJA HIF W WARUNKACH NIEDOTLENIEŃ

Ostatnie badania ujawniły dokładny molekularny mechanizm stabilizacji HIF-1 α przez hipoksję. W warunkach normalnego stężenia tlenu kluczowym procesem jest hydroksylacja reszt proliny (Pro 402, Pro 564) przez trzy specyficzne hydroksylazy prolinowe (PHDs 1-3) (Ryc. 1). Do pełnej aktywności enzymatycznej hydroksylazy wymagają obecności tlenu i α -ketoglutaranu, będących substratami reakcji, oraz kofaktorów: żelaza i askorbinianu [4]. Hydroksylowany HIF-1 α jest rozpoznawany przez białko pVHL, produkt genu supresorowego von Hippela-Lindaua oraz kompleks ligazy E3. Białko pVHL odgrywa szczególną rolę w ubikwitylacji HIF-1, poprzez domenę β oddziałuje bezpośrednio z domeną ODD czynnika HIF-1 α i jest rozpoznawane przez kompleks ligazy E3 oraz przez inne białka wchodzące w skład kompleksu: elonginę B i C oraz Rbx-1 [1]. Wynikiem tych przemian jest zależna od ubikwityny proteasomowa degradacja HIF-1 α . Ponadto, sygnałem do degradacji HIF-1 α w proteasomach jest acetylacja lizyny [5]. Regulacja stabilności białka HIF-2 α jest podobna jak dla izoformy HIF-1 α i opiera się na zależnej od dostępności tlenu degradacji przez PHDs/pVHL. Różnice dotyczą jedynie specyficznej budowy izoformy HIF-2 α , bowiem w tym przypadku, hydroksylacji ulegają reszty proliny Pro405 i Pro531 (Ryc. 1).

ODDZIAŁYWANIE Z KOFAKTORAMI TRANSKRYPCYJNYMI

Zahamowanie hydroksylacji reszt prolinowych przez PHDs nie jest warunkiem wystarczającym do pełnej aktywności HIF-1. Aby nastąpiło związanie się HIF-1 z DNA (z

sekwencją HRE) i aktywacja ekspresji genów docelowych, konieczny jest udział kofaktorów, między innymi p300/CBP (ang. *p300/Creb-binding protein*), TIF-2 (ang. *transcription intermediary factor 2*) czy SRC-1 (ang. *steroid-receptor co-activators*) i ich związanie z domeną C-TAD HIF- α [1].

Najważniejszymi z wymienionych kofaktorów są białka p300 i CBP, bowiem stabilizują one kompleks inicjacji transkrypcji zawierający polimerazę RNA II, a także posiadają aktywność acetylotransferazy histonów. Stanowią centralny regulator, współdziałający z pozostałymi kofaktorami, zarówno uniwersalnymi dla różnych izoform jak i oddziałującymi specyficznie z określonymi izoformami białek HIF. Inny kofaktor, NEMO (ang. *NF- κ B essential modulator*), jest unikatowy dla HIF-2 α i zwiększa aktywność transkrypcji genów regulowanych przez tę izoformę [6]. Podobnie czynnik transkrypcyjny Ets1 oddziałuje jedynie z HIF-2 α i nasila transkrypcję receptora dla VEGF (VEGFR-2) [7].

Regulacja wiązania kofaktorów jest kontrolowana przez hydroksylazę asparaginową, zwaną także czynnikiem hamującym HIF-1 (FIH-1, ang. *factor inhibiting HIF-1*), która hydroksyluje resztę asparaginy (N803 w HIF-1 α oraz N851 w HIF-2 α), umiejscowioną w domenie C-TAD (Ryc. 1), co prowadzi do zablokowania wiązania p300/CBP i dalszych kofaktorów.

WPLYW RFT GENEROWANYCH PRZEZ MITOCHONDRIA NA HIF

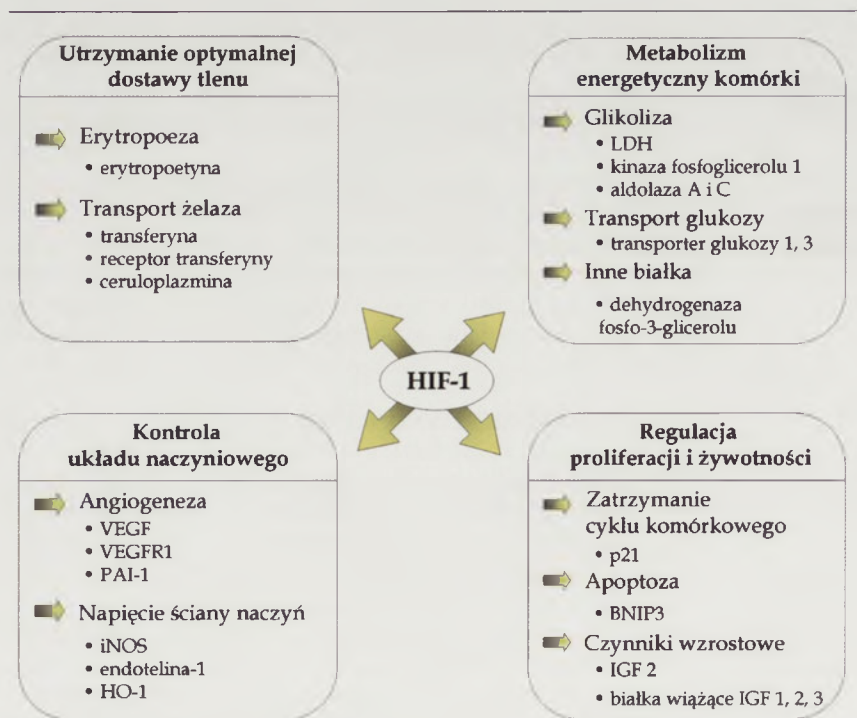
Za zwiększoną produkcję RFT w hipoksji odpowiedzialne są mitochondrialne kompleksy I oraz III [8]. Niemniej jednak sugeruje się, że do aktywacji HIF w niedotlenieniu wymagane są RFT generowane przez mitochondrialny kompleks III [9,10]. Inhibitory łańcucha transportu elektronów: rotenon (kompleks I), malonian (kompleks II), antymycyna A (kompleks III), azydek sodu (kompleks IV) i związek rozsprzęgający fosforylację oksydacyjną (FCCP, ang. *p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone*) osłabiają stabilizację HIF- α podczas niedotlenienia, ale nie wpływają na HIF- α w warunkach normoksji. Co więcej, substrat kompleksu II, bursztynian jest w stanie przywrócić stabilizację HIF w hipoksji, wyłączoną przez dodanie inhibitora kompleksu I - rotenonu [11]. Z drugiej strony znane są badania pokazujące, że zahamowanie aktywności łańcucha oddechowego nie wpływa na stabilizację HIF indukowaną przez niedotlenienie [12].

Obecnie dominują dwie teorie dotyczące powiązań mitochondriów z PHDs i FIH-1, enzymami regulującymi aktywność HIF. Jedną z nich to tzw. „hipoteza redystrybucji tlenu” (ang. *the oxygen redistribution hypothesis*), a druga to „hipoteza RFT” (ang. *the ROS hypothesis*) (Ryc. 3).

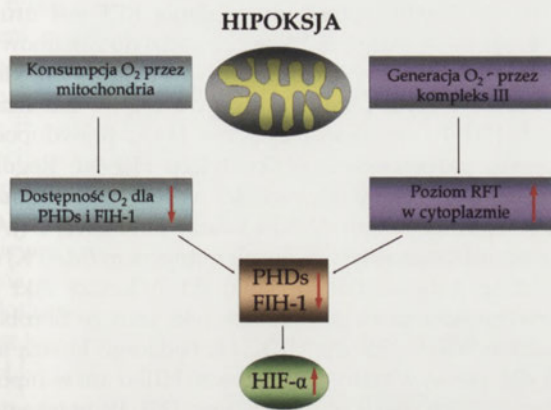
Obecnie dominują dwie teorie dotyczące powiązań mitochondriów z PHDs i FIH-1, enzymami regulującymi aktywność HIF. Jedną z nich to tzw. „hipoteza redystrybucji tlenu” (ang. *the oxygen redistribution hypothesis*), a druga to „hipoteza RFT” (ang. *the ROS hypothesis*) (Ryc. 3).

HIPOTEZA REDYSTRYBUCJI TLENU

Jak wspomniano wcześniej, głównym źródłem RFT w komórce są mitochondria, a



Rycina 2. Główne grupy genów, których ekspresja jest regulowana przez HIF-1.



Rycina 3. Dwie teorie dotyczące wpływu mitochondriów na stabilizację HIF podczas hipoksji. Hipoteza redestrybucji tlenu zakłada, iż mitochondrialna oksydaza cytochromowa mająca większe powinowactwo do tlenu niż do PHDs i FIH-1 w warunkach hipoksji zmniejsza dostępność tlenu dla tych enzymów, hamując ich aktywność, co prowadzi do stabilizacji HIF- α . Hipoteza RFT zakłada, iż zwiększenie produkcji O_2^- przez mitochondrialny kompleks III podczas hipoksji prowadzi do zwiększenia poziomu cytoplazmatycznych RFT, które hamują aktywność PHDs i FIH-1 zwiększając poziom HIF- α .

właściwie składniki łańcucha oddechowego znajdujące się w błonie mitochondrialnej. Mitochondria są też głównym konsumentem tlenu, który jest niezbędny do aktywności enzymów regulujących stabilność czynnika HIF- α . Hipoteza kładąca nacisk na rolę tlenu w aktywacji HIF podczas niedotlenienia została opracowana przez Hagena i współpracowników [13]. Bazuje ona na fakcie, iż enzymy modyfikujące HIF- α , zarówno PHDs jak i FIH-1, do swego działania wykorzystują tlen cząsteczkowy. Głównym miejscem konsumpcji tlenu są mitochondria, a w nich oksydaza cytochromowa. Sugeruje się, że to właśnie ta podjednostka łańcucha oddechowego w warunkach niedotlenienia wykorzystuje większość dostępnego tlenu, a ilość tlenu pozostała w cytosolu dostępna dla PHDs i FIH-1, mających mniejsze powinowactwo do tlenu niż enzym mitochondrialny, nie jest wystarczająca do prawidłowego działania enzymów modyfikujących HIF- α . Niedobór tlenu prowadzi do braku modyfikacji białek HIF- α , co w konsekwencji prowadzi do ich stabilizacji. Hipoteza ta została opracowana na podstawie badań nad wpływem zahamowania oddychania mitochondrialnego pokazujących, iż inhibitory łańcucha oddechowego takie jak rotenon (inhibitor kompleksu I), antimycyna A (kompleks II), myksotiazol (kompleks III), azydek sodu (kompleks IV) oraz donor NO: NOC-18 odwracają stabilizację HIF-1 wywołaną 1% O_2 . Za pomocą pomiaru bioluminescencji enzymu lucyferazy pochodzącej z *Renilla reniformis*, którego aktywność jest zależna od stężenia tlenu, pokazano, iż po zahamowaniu oddychania mitochondrialnego w stanie niedotlenienia tlen jest przenoszony w kierunku enzymów nie uczestniczących w oddychaniu tlenowym, a których aktywność zależy od tlenu, takich jak PHDs i FIH-1. Dostarczenie tlenu do PHDs i FIH-1 prowadzi do przywrócenia ich aktywności i degradacji HIF- α [13].

Hipoteza ta została również potwierdzona przez Doege i współpracowników w naczyniach plastikowych badań komórek hodowanych w naczyniach plastikowych przepuszczalnych (brak gradientu stężenia tlenu), jak również nieprzepuszczalnych dla tlenu (tworzony jest gradient stężenia tlenu). Stosując hodowle w gradiencie stężenia tlenu wykazano, że 0,1% O_2 powodował stabilizację HIF-1 niezależną od zahamo-

wania łańcucha oddechowego, podczas gdy efekt 3% O_2 był słabszy i odwracany przez inhibitory łańcucha oddechowego. W przypadku komórek rosnących przy braku gradientu stężenia tlenu zahamowanie łańcucha oddechowego nie miało wpływu na stabilizację HIF-1 α . Doświadczenia te pokazują, że zahamowanie konsumpcji tlenu w mitochondriach zmniejsza gradient stężenia O_2 , prowadząc do zwiększenia stężenia tlenu w komórkach i nasilenia degradacji HIF-1 [14]. Co ciekawe, sugeruje się, że w komórkach z upośledzonym działaniem mitochondriów HIF nie jest stabilizowany w hipoksji, co jest spowodowane nie tyle brakiem wytwarzania RFT przez mitochondria, ale zmienionym rozmieszczeniem tlenu w komórce, który w rezultacie jest łatwiej dostępny dla PHDs prowadząc do degradacji HIF- α [13,15].

HIPOTEZA REAKTYWNYCH FORM TLENU

Hipoteza dotycząca roli RFT produkowanych przez mitochondria w aktywacji HIF w niedotlenieniu została zaproponowana przez Chandela, Schumackera i współpracowników w 1998 roku [16]. Pokazali oni, iż aktywacja transkrypcji genów regulowanych przez HIF-1 podczas hipoksji (erytropoetyna, enzymy glikolityczne, VEGF) odwracana jest przez antyoksydanty: ditiokarbaminian pirolidyny oraz ebselen. Ciekawym modelem doświadczalnym wykorzystanym w tych badaniach były komórki rho(0), pozbawione mitochondrialnego DNA. Brak mitochondrialnego DNA powoduje upośledzenie funkcjonowania mitochondriów i zmniejsza generację RFT w hipoksji. Co więcej, w komórkach rho(0) w warunkach niedotlenienia nie występuje aktywacja ekspresji genów regulowanych przez HIF [16]. Dalsze badania tej grupy pokazały, iż nadprodukcja katalazy, enzymu zmiatającego H_2O_2 , zmniejsza wiązanie się HIF z sekwencją HRE podczas niedotlenienia. Co więcej, dodanie H_2O_2 do komórek typu dzikiego jak i do komórek rho(0) stabilizuje HIF-1 α zarówno w normoksji jak i w hipoksji. W izolowanych mitochondriach niedotlenienie powoduje natomiast wzrost produkcji RFT [17].

Rola produkowanych przez mitochondria RFT w indukowanej przez niedotlenienie stabilizacji HIF- α została potwierdzona w komórkach nie posiadających kluczowych elementów łańcucha oddechowego (cytochrom *c*, żelazo-siarkowe białka Rieskego), po zastosowaniu inhibitorów kompleksu I (rotenon) i kompleksu III (jak myksotiazol i stigmatelina) lub genetycznej delecji kompleksu I [18].

Wykazano także, iż zmiatacze RFT oraz inhibitory łańcucha oddechowego całkowicie hamują stabilizację HIF-1 α indukowaną przez trombopoetynę (TPO) [19]. Ponadto, mitoubichinon (MitoQ) będący przeciwutleniaczem gromadzącym się i działającym w mitochondriach blokuje produkcję RFT i stabilizację HIF-1 α w warunkach niedotlenienia, ale nie wpływa na stabilność HIF-1 α w warunkach normoksji [20], zaś otrzymany z glonów pigment, kaulerpina, hamuje oddychanie mitochondrialne na poziomie kompleksu I blokując transport elektronów na kompleks III i w ten sposób blokuje stabilizację HIF- α zależną od RFT podczas niedotlenienia [21].

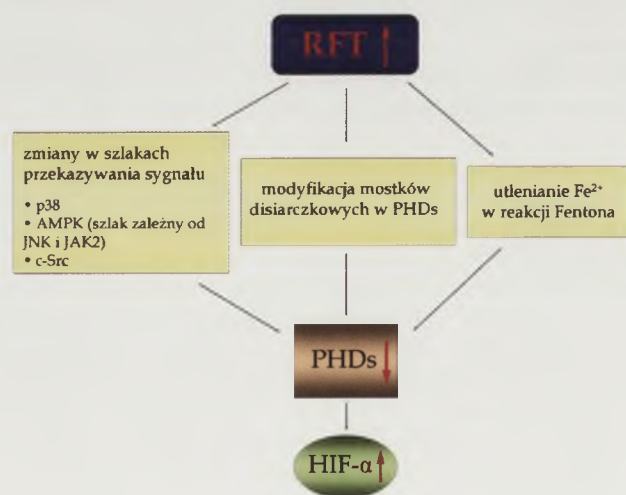
Nasze badania pokazujące, że zwiększenie poziomu H_2O_2 na skutek nadprodukcji SOD-1 indukuje transkrypcję VEGF zależną od aktywacji HIF-1, również potwierdzają rolę RFT w stabilizacji HIF-1 α [22]. W innych doświadczeniach poka-

zono, że w fibroblastach pobranych od pacjentów z syndromem Leigh, które wykazują szcążkowy poziom aktywności łańcucha oddechowego, ale które nie są zdolne do fosforylacji oksydacyjnej, niedotlenienie prowadzi do stabilizacji HIF-1 α . Sugeruje to, że stabilizacja HIF- α jest zależna od produkcji RFT przez mitochondria, ale nie od fosforylacji oksydacyjnej [23].

Wpływ niedotlenienia na produkcję RFT nie jest jednak jednoznacznie określony, ponieważ wiele grup pokazało zwiększenie poziomu RFT podczas hipoksji, podczas gdy inni opisują efekt wręcz przeciwny. Rozbieżności mogą być spowodowane nie tylko różnicami w typach komórek czy różnicami międzygatunkowymi, ale mogą wynikać z odmiennego wpływu różnych czasów trwania hipoksji na produkcję RFT [15].

MECHANIZM WPŁYWU REAKTYWNYCH FORM TLENU NA STABILIZACJĘ HIF- α

Wśród innych teorii dotyczących roli RFT w stabilizacji HIF- α należy zwrócić uwagę na bezpośredni wpływ RFT na aktywność enzymu PHD2. Zaproponowano kilka hipotez dotyczących mechanizmu regulacji aktywności PHDs przez RFT (Rys. 4). Pierwsza z nich sugeruje istotną rolę jonów żelaza. Nadtlenek wodoru uczestniczy w reakcji Fentona, której drugim substratem są właśnie jony żelaza Fe²⁺. W reakcji tej Fe²⁺ jest utleniane do Fe³⁺ i dodatkowo powstają rodnik wodorotlenowy i anion wodorotlenkowy. Ponieważ Fe²⁺ jako kofaktor jest niezbędny do działania PHDs, utlenianie Fe²⁺ powoduje zahamowanie aktywności PHDs, co w konsekwencji prowadzi do stabilizacji HIF- α [15]. Rolę żelaza w stabilizacji HIF- α potwierdzają badania z wykorzystaniem deferoksaminy (DFO), związku będącego chelatorem jonów Fe²⁺, który właśnie dzięki tej właściwości prowadzi do stabilizacji HIF- α w warunkach normoksji [24]. Pokazano również, iż RFT poprzez zahamowanie czynnika transkrypcyjnego JunD i zmniejszenie ekspresji genów antyutleniających powodują inaktywację PHD2 na skutek utlenienia Fe²⁺ w domenie katalitycznej tego enzymu. Sugeruje się także, iż RFT mogą wpływać na wiązania S-S w PHD2 i w ten sposób zmieniać aktywność enzymatyczną.



Rycina 4. Hipotezy dotyczące wpływu RFT na stabilność HIF- α poprzez zahamowanie PHDs. ROS mogą wpływać na szlaki przekazywania sygnałów prowadząc do potranslacyjnych modyfikacji PHDs, mogą modyfikować mostki disiarczkowe w PHDs albo też utleniać Fe²⁺ hamując aktywność PHDs.

Innym możliwym sposobem działania RFT jest uruchomienie kaskady sygnałowej, która prowadzi do zahamowania potranslacyjnych modyfikacji PHDs [9]. Pokazano, iż kinaza aktywowana 5'-AMP (AMPK) odgrywa rolę w stabilizacji i aktywacji HIF-1 α indukowanej przez H₂O₂, prawdopodobnie poprzez zahamowanie ubikwitylacji HIF-1 α . Regulacja HIF-1 α przez AMPK w odpowiedzi na RFT jest zależna od N-końcowej kinazy c-jun (JNK) i kinazy Janusowej 2 (JAK2) [25], ale nie od kinaz aktywowanych mitogenem (MAPK) oraz szlaku kinaz 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3)/kinazy Akt [26]. Inne prace wskazują na rolę kinazy p38, jako że fibroblasty pozbawione białek p38 lub MKK3/6, będącego kinazą aktywującą p38, nie są w stanie stabilizować HIF- α ani w hipoksji, ani w warunkach stresu oksydacyjnego [27]. W przekazywaniu sygnału od RFT prowadzącego do stabilizacji HIF-1 α w hipoksji pośredniczy również c-Src [28]. Co więcej, na stabilizację HIF-1 α podczas niedotlenienia ma wpływ poziom utlenienia glutationu [29-30].

REAKTYWNE FORMY TLENU, HIF A NRF2

Jak wiadomo, zbyt wysoki poziom RFT prowadzi do powstawania zmian niekorzystnych dla komórki, jednak produkcja RFT w warunkach niedotlenienia wydaje się być na tyle niska, że nie wywołuje stanów patologicznych. Wiadomo, iż znaczne zwiększenie poziomu RFT powoduje uruchomienie odpowiedzi antyutleniającej, w której istotną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear erythroid 2-related factor*). Nasze ostatnie badania wykazały, iż ekspresja i aktywność tego czynnika jest zmniejszona w stanach niedotlenienia wraz z równoczesną indukcją ekspresji genu czynnika Bach1, który jest represorem aktywności Nrf2. Co więcej, nadprodukcja HIF-1 α obniża syntezę Nrf2 i indukuje mRNA Bach1 [31], reoksygenacja natomiast powoduje aktywację Nrf2 [32].

STABILIZACJA HIF- α W ANOKSJI

Co ciekawe, badania sugerują, iż mechanizm stabilizacji HIF- α w hipoksji i anoksji (całkowity brak tlenu) przebiega inaczej. W komórkach rho(0), w których nie ma stabilizacji HIF-1 α w warunkach niedotlenienia, podczas anoksji dochodzi do zwiększenia jego poziomu. Stymulacja tych komórek deferoksaminą powoduje stabilizację HIF-1 α , co sugeruje, że proces stabilizacji HIF przez PHDs jest prawidłowy. Dodatkowo, rotenon (inhibitor kompleksu I) hamuje stabilizację HIF-1 α w hipoksji, ale nie w anoksji, sugerując rolę mitochondrialnego łańcucha oddechowego w warunkach obniżonego stężenia tlenu ale nie przy jego całkowitym braku [18]. Z drugiej strony, w komórkach nie posiadających kluczowych elementów łańcucha oddechowego, zdolność do stabilizacji HIF w anoksji jest przywrócona. Możliwe jest, że w anoksji do stabilizacji HIF-1 α dochodzi poprzez zahamowanie aktywności PHDs wywołane całkowitym brakiem tlenu.

ROLA KOMPLEKSU III W STABILIZACJI HIF

Klimova i Chandel [33] zaproponowali hipotezę dotyczącą szczególnej roli kompleksu III w stabilizacji HIF- α podczas niedotlenienia. Mimo, iż zarówno kompleks I, II i III mogą generować anionorodnik ponadtlenkowy, to dwa pierwsze kompleksy uwalniają go do macierzy mitochondrialnej, podczas

gdy tylko kompleks III może go uwalniać zarówno do przestrzeni międzymbłonowej jak i do macierzy mitochondrialnej. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla większości drobnocząsteczkowych związków, co powoduje, iż anionorodniki ponadtlenkowe uwalniane do macierzy mitochondrialnej nie są przenoszone do cytosolu, tylko dysmutowane do H_2O_2 i O_2 przez SOD-2. Zupełnie inaczej dzieje się z rodnikami uwalnianymi do przestrzeni międzymbłonowej, ponieważ zewnętrzna błona mitochondrialna jest przepuszczalna dla drobnocząsteczkowych związków. W warunkach niedotlenienia anionorodniki ponadtlenkowe są uwalniane przez kompleks III do cytosolu, gdzie ulegają przekształceniu do H_2O_2 [33].

Niezbędność funkcjonalnego kompleksu III do stabilizacji HIF-1 α w warunkach niedotlenienia została pokazana dzięki wykorzystaniu zahamowania ekspresji białek Rieskiego kompleksu III za pomocą siRNA, który powodował obniżenie stabilizacji HIF-1 α i produkcji RFT indukowanych przez hipoksję. Sugeruje to rolę mitochondriów jako sensora poziomu O_2 , który poprzez uwalnianie RFT do cytoplazmy powoduje stabilizację HIF-1 α podczas hipoksji [34]. Co więcej, używając komórek pozbawionych cytochromu *b* udowodniono, że to miejsce Q_o w kompleksie III zwiększa poziom RFT prowadząc do stabilizacji HIF-1 α podczas niedotlenienia. Komórki bez cytochromu *b* generują RFT stabilizując HIF- α , ale dodatkowe zahamowanie w nich białek żelazowo-siarkowych Rieskiego kompleksu III za pomocą siRNA zmniejsza generację RFT w miejscu Q_o kompleksu III. Traktowanie komórek typu dzikiego stigmateliną (inhibitor kompleksu III) również hamuje generację RFT w miejscu Q_o kompleksu III [35]. Rolę kompleksu III w regulacji odpowiedzi na niedotlenienie potwierdzają też badania z wykorzystaniem nadekspresji oraz wyciszenia przez siRNA podjednostki UQCRB mitochondrialnego kompleksu III [36]. Heterozygotyczne myszy z mutacją *Mcl1*(+/-), białka mitochondrialnego niezbędnego do biosyntezy ubichinonu, wykazują zwiększony poziom podstawowego jak i indukowanego przez niedotlenienie HIF-1 α , a komórki z wyłączonym genem *Mcl1* charakteryzują się zwiększoną produkcją RFT w mitochondriach oraz podniesionym poziomem HIF-1 α . Wykorzystanie peptydów antyoksydacyjnych specyficznych dla mitochondriów potwierdziło znaczenie zmienionego metabolizmu RFT dla stabilizacji HIF-1 α w niedotlenieniu [37].

METABOLIZM KWASU CYTRYNOWEGO A HIF

Mitochondria mogą regulować aktywność HIF nie tylko przez RFT, ale również poprzez związki uczestniczące w cyklu kwasu cytrynowego, który ma miejsce w macierzy mitochondrialnej. Produkty przejściowe tego cyklu mogą regulować aktywność PHDs, stabilność HIF i odpowiedź komórki na niedobór tlenu. Bursztynian (jeden z produktów reakcji katalizowanej przez PHDs) działa jako inhibitor kompetywny PHDs [38]. Dodanie α -ketoglutaranu (jeden z substratów PHDs) odwraca zahamowanie aktywności PHDs wywołane przez bursztynian. Inny metabolit cyklu, fumaran, również obniża aktywność PHDs podnosząc poziom HIF [39]. Analog α -ketoglutaranu – dimetylooksoalilloglicyna (DMOG), hamuje aktywność PHDs i stabilizuje HIF [31]. Inne metabolity glukozy, jak szczawiooctan, także wpływają na aktywność PHDs [40]. Szczawiooctan i pirogronian wiążą się z miejscem wiązania ketoglutaranu w PHDs inaktywując hydroksylację HIF-1 α .

Ponieważ HIF-1 promuje glikolizę, indukcja HIF-1 przez metabolity glukozy może stanowić nowy mechanizm stabilizacji tego czynnika w rozwoju nowotworów [41].

MITOCHONDRIA A HIF-2

Większość badań skupia się na określeniu wpływu mitochondriów na HIF-1. Jednak coraz częściej pojawiają się prace dążące do zbadania procesów stabilizacji HIF-2 w warunkach niedotlenienia. Doświadczenia prowadzone przez Browna i Nurse'a [42] dotyczące powiązań HIF-2 α i aktywności mitochondrialnej pokazały zależną od czasu i stężenia tlenu stabilizację HIF-2 α w hipoksji. Dodatkowo wyciszenie przy pomocy siRNA żelazowo-siarkowych białek Rieskiego (element kompleksu III), oksydazy cytochromu *c* (kompleks IV) lub brak funkcjonalnych mitochondriów (komórki rho(0)) blokowało stabilizację HIF-2 α podczas hipoksji. Farmakologiczne inhibitory kompleksu I (rotenon), kompleksu III (myksotiazol, antymycyna A) oraz kompleksu IV (cyjanek) również blokowały stabilizację HIF-2 α . Co ciekawe, inhibitory te wpływały na poziom HIF-2 α tylko w przypadku łagodnej i umiarkowanej hipoksji (2–6% O_2), ale nie w przypadku niższego stężenia tlenu. Zmiany poziomu RFT uzyskane za pomocą zmiataczy wolnych rodników, jak N-acetylocysteina (NAC) czy troloks, jak również dostarczenie H_2O_2 , nie wpływały na stabilizację HIF-2 α , co sugeruje, iż to raczej konsumpcja tlenu przez mitochondria, a nie produkcja RFT przez te organelle uczestniczy w stabilizacji HIF-2 α podczas niedotlenienia [42]. Wyniki innej grupy badaczy sugerują natomiast, iż produkcja RFT przez mitochondria jest konieczna do stabilizacji zarówno HIF-1 α jak i HIF-2 α w warunkach niedotlenienia (1,5% O_2). Pokazali oni, iż brak cytochromu *c* uniemożliwia stabilizację HIF- α w hipoksji. Co więcej dostarczenie H_2O_2 lub anoksja prowadzi do stabilizacji HIF- α mimo braku funkcjonalnych mitochondriów (brak cytochromu *c*) [43]. Badania dotyczące roli RFT powstałych nie w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, ale generowanych na skutek aktywacji NOX4 (jednej z izoform oksydazy NADPH), pokazują, iż RFT generowane przez NOX4 zwiększają poziom HIF-2 α poprzez zmniejszenie wiązania pVHL. Nadprodukcja NOX4 nasila aktywność domen N-TAD i C-TAD HIF-2 α , a dodanie askorbinianu (przeciwutleniacz) lub mutacja miejsc hydroksylacji HIF-2 α zapobiega temu efektowi [44]. Brak NOX4 powoduje również obniżenie poziomu HIF-1 α oraz zmniejsza ekspresję genu docelowego, VEGF [45]. Wyniki te sugerują, iż RFT produkowane nie tylko przez mitochondria mogą powodować zmiany w stabilności HIF-2 α .

Rola mitochondriów i RFT w stabilizacji zarówno HIF-1 α jak i HIF-2 α podczas niedotlenienia nie jest do końca poznana. Złożony sposób regulacji HIF-1 α i HIF-2 α zależny od czasu trwania i poziomu niedotlenienia sprawia, iż wzajemne powiązanie gospodarki redoks i stabilizacji HIF- α wymaga dalszych badań.

INNE MECHANIZMY REGULUJĄCE STABILNOŚĆ HIF-1 α

Obok niedotlenienia i generowanych RFT, również tlenek azotu (NO) i powstające z niego w wyniku przemian metabolicznych reaktywne formy azotu (RFA) mogą modulować aktywność HIF-1. Co ciekawe, działanie NO jest odmienne w warunkach normoksji i hipoksji, prowadząc odpowiednio do stabilizacji i destabilizacji czynnika HIF-1 α .

TLENEK AZOTU STABILIZUJE HIF-1 α W NORMOKSJI

Wiele niezależnych badań przeprowadzonych na różnych rodzajach komórek wskazuje, że chemiczne donory NO, indukcja syntaz NO oraz produkcja NO w kulturach komórkowych zwiększa stabilizację białka HIF-1 α oraz indukuje transkrypcję genów docelowych w warunkach normoksji [46-47]. Również prace naszej grupy pokazały, iż ekspresja VEGF jest indukowana przez NO w komórkach śródbłonna czy komórkach mięśni gładkich [48].

W badaniach wpływu NO używano wielu donorów NO. Najbardziej fizjologicznym donorem jest GSNO (S-nitrozoglutation), którego czas półtrwania wynosi kilka godzin. Dostępne są również związki o bardzo długim okresie półtrwania (np. 18 h dla NOC-18), jak i donory o krótkim czasie półtrwania (np. 20 min dla NOC-5) [46]. Chociaż w wielu badaniach używano również nitroprusydku sodu jako donora NO, należy pamiętać o innych produktach jego rozpadu (jony żelaza, cyjanek), które mogą wywierać działanie niezależne od NO.

Badania mechanizmu molekularnego działania NO na HIF-1 już dość wcześnie wykluczyły udział cykazy guanylowej (CG) i 3',5'-cyklicznego guanozyny monofosforanu (cGMP), czyli głównych mediatorów NO w układzie naczyniowym [49]. Doświadczenia pokazały, że antagoniści CG i analogi cGMP ani nie osłabiają ani nie zwiększają akumulacji HIF-1 α . Obserwowano natomiast zmniejszenie ubikwitylacji HIF-1 α i zahamowanie wiązania białka pVHL do HIF-1 α [47], co sugeruje, że NO w sposób bezpośredni hamuje hydroksylację HIF-1 α . Rzeczywiście, w badaniach *in vitro* wykazano zależność od użytej dawki hamowanie aktywności hydroksylaz prolinowych przez GSNO (0,1 do 1 mM). Ponadto, badania w obecności innego donora NO, NOC-18, wykazały zwiększenie syntezy HIF-1 α na drodze zależnej od PI3K oraz kinaz z rodziny MAPK [50]. Autorzy obserwowali jednak, że efekt różnych donorów NO na oddziaływanie HIF-1 α z białkiem pVHL jest odmienny (NOC-18 nie zaburzał oddziaływania, a GSNO powodował osłabione oddziaływanie), co wynika z generowania różnych RFA pod wpływem donorów NO.

TLENEK AZOTU DESTABILIZUJE HIF-1 α W HIPOKSJI

Około 10 lat temu obserwacje kilku grup wykazały, że w warunkach niedotlenienia wpływ NO na HIF-1 jest zupełnie odmienny, niż ten obserwowany w warunkach normalnego stężenia tlenu, bowiem odnotowano hamujący wpływ RFA na indukowaną niedotlenieniem akumulację HIF-1 α [51-53]. Sogawa i wsp. podkreślili, że donory NO hamują wiązanie się HIF-1 α z DNA w warunkach niedotlenienia lub po traktowaniu CoCl₂ [51]. Liu i wsp. poinformowali, że NO osłabia wiązanie HIF-1 z DNA, a w zahamowaniu produkcji genu regulowanego przez HIF-1, VEGF przez NO pośredniczy cGMP [52]. Zaobserwowano również, że NO zapobiega akumulacji HIF-1 α w warunkach niedotlenienia działając na domenę ODD w HIF-1 α i to właśnie obecność tej domeny jest niezbędna do odwrócenia stabilizacji HIF-1 α w warunkach hipoksji pod wpływem RFA [53]. Wyniki te zostały potwierdzone przez Hagena i wsp., którzy wykazali, że mutacja w miejscach kodujących reszty proliny odpowiedzialne za wiązanie białka pVHL (P402A/P564A-HIF-1 α) powoduje, że

poziom HIF-1 α nie ulega zmianie pod wpływem NOC-18 w warunkach niedotlenienia [13].

Mechanizm działania NO w hipoksji może być związany z redystrybucją tlenu, gdyż NO, jako inhibitor kompleksu IV łańcucha oddechowego, hamuje zużycie tlenu w mitochondriach. Powoduje to wzrost dostępności tlenu dla innych enzymów, m.in. dla PHDs, które pomimo występującej hipoksji, kierują HIF-1 α na drogę degradacji.

WPLYW TLENKU AZOTU NA PHDs/ FIH-1 W NORMOKSJI I HIPOKSJI

Ostatnio stwierdzono, że wpływ NO na aktywację HIF-1 w warunkach normoksji jest wynikiem zahamowania hydroksylacji reszt proliny [47], a zatem PHDs mogą stanowić bezpośrednie lub pośrednie cele NO. Oddziaływanie pomiędzy NO i jonami żelaza mogą być jednym z mechanizmów, poprzez który dochodzi do hamowania PHDs, ponieważ NO bezpośrednio wiąże się z jonami Fe²⁺ w hemie lub w białkach niehemowych, zawierających żelazo. Hydroksylazy prolinowe zawierają Fe²⁺ w domenie katalitycznej, dlatego NO może konkurować z tlenem cząsteczkowym o miejsce katalityczne i hamować aktywność enzymu [47].

Pierwsze dowody na to, że NO może bezpośrednio oddziaływać z PHDs wynikały z pracy Metzen i wsp. [47]. Autorzy dowiedli, że akumulacja HIF-1 α pod wpływem NO była niezależna od transkrypcji genu lub translacji białka HIF-1 α lecz została spowodowana przez zahamowanie degradacji HIF-1. Donor NO, GSNO hamował oddziaływanie HIF-1 α -pVHL i znacznie zmniejszał ubikwitylację HIF-1 α . Dane te sugerują, że nagromadzenie aktywnego HIF-1 α wynika z bezpośredniego hamowania PHD1, 2 lub 3 [47], ale izoforma PHD2 odgrywa w tym procesie kluczową rolę [54].

Oprócz hamowania aktywności PHDs, NO zmniejsza również aktywność FIH-1, ale do tego celu konieczne są wyższe stężenia NO ze względu na większe powinowactwo FIH-1 do O₂ w porównaniu do PHDs [55]. Bezpośrednie hamowanie PHDs i FIH-1 przez NO wyjaśnia zarówno zwiększoną akumulację HIF-1 α jak i nasiloną ekspresję zależnych od HIF-1 genów docelowych takich jak VEGF.

W warunkach niedotlenienia aktywność PHDs wydaje się być regulowana przez NO w sposób zależny od użytej dawki. Wysokie stężenia NO (> 1 μ M) stabilizują HIF-1 α niezależnie od stężenia tlenu, podczas gdy niskie stężenia NO (<0.4 μ M) destabilizują HIF-1 α w warunkach niedotlenienia. Podobny efekt obserwowano, podczas użycia wysokich lub niskich stężeń NO stosując NOC-18 (odpowiednio 500-1000 μ M i 50-100 μ M) [56].

PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów aktywacji czynników transkrypcyjnych w warunkach hipoksji stanowi coraz częstszy temat badań. Spośród tych czynników najistotniejszy wydaje się HIF-1, ale stopniowo rośnie również zainteresowanie czynnikiem HIF-2. Niemniej jednak nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Jest to spowodowane niekiedy brakiem właściwych narzędzi badawczych, jak np. sond pozwalających na pomiar poziomu RFT w poszczególnych przedziałach ko-

mórkowych, a w szczególności w mitochondriach. Kolejnym problemem jest sprawdzenie roli mitochondriów oraz stresu oksydacyjnego w aktywacji HIF w układach bardziej złożonych: tkankach oraz całych organizmach. Mimo, iż mitochondria wydają się odgrywać istotną rolę w stabilizacji HIF- α podczas hipoksji, to dokładna rola generowanych przez nie RFT i RFA oraz mechanizm ich działania wymaga dalszych badań. Dogłębne zrozumienie mechanizmów fizjologicznej aktywacji HIF i roli stresu oksydacyjnego w tym procesie, a także poznanie różnic w aktywacji i aktywności oraz wzajemnych powiązań obu izoform może przyczynić się do wyjaśnienia przyczyn rozwoju chorób, w których HIF odgrywa ważną rolę i do opracowania właściwej strategii leczenia. Oczywiście podczas hipoksji aktywowane są również inne czynniki, jak NF- κ B, a oddziaływania między tymi czynnikami, HIF a stresem oksydacyjnym podczas niedotlenienia również stanowią interesujący temat badań.

PIŚMIENNICTWO

- Zagorska A, Dulak J (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 51: 563-85
- Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-54
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514
- Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J (2006) The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7: 41-45
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36: 1-12
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ (2005) Activity of hypoxia-inducible factor 2 α is regulated by association with the NF- κ B essential modulator. *J Biol Chem* 280: 14240-14251
- Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I (2003) Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 278: 7520-7530
- Poyton RO, Ball KA, Castello PR (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 332-340
- Cash TP, Pan Y, Simon MC (2007) Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med* 43: 1219-1225
- Lin X, David CA, Donnelly JB, Michaelides M, Chandel NS, Huang X, Warrior U, Weinberg F, Tormos KV, Fesik SW, Shen Y (2008) A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 174-179
- Baby SM, Roy A, Lahiri S (2005) Role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor-1 α in the rat carotid body glomus cells. *Histochem Cell Biol* 124: 69-76
- Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ (2001) Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98: 296-302
- Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 α . *Science* 302: 1975-1978
- Doerge K, Heine S, Jensen I, Jelkmann W, Metzen E (2005) Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact. *Blood* 106: 2311-2317
- Taylor CT (2008) Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 409: 19-26
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11715-11720
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275: 25130-25138
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS (2002) Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L922-931
- Yoshida K, Kirito K, Yongzhen H, Ozawa K, Kaushansky K, Komatsu N (2008) Thrombopoietin (TPO) regulates HIF-1 α levels through generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Hematol* 88: 43-51
- Sanjuan-Pla A, Cervera AM, Apostolova N, Garcia-Bou R, Victor VM, Murphy MP, McCreath KJ (2005) A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 α . *FEBS Lett* 579: 2669-2674
- Liu Y, Morgan JB, Coothankandaswamy V, Liu R, Jekabsons MB, Mahdi F, Nagle DG, Zhou YD (2009) The Caulerpa pigment caulerpin inhibits HIF-1 activation and mitochondrial respiration. *J Nat Prod* 72: 2104-2109
- Grzenkiewicz-Wydra J, Cisowski J, Nakonieczna J, Zarebski A, Udilova N, Nohl H, Jozkowicz A, Podhajska A, Dulak J (2004) Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell Biochem* 264: 169-181
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 1: 409-414
- Callapina M, Zhou J, Schnitzer S, Metzen E, Lohr C, Deitmer JW, Brune B (2005) Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1 α accumulation—implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res* 306: 274-284
- Jung SN, Yang WK, Kim J, Kim HS, Kim EJ, Yun H, Park H, Kim SS, Choe W, Kang I, Ha J (2008) Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 α protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29: 713-721
- Lee M, Hwang JT, Lee HJ, Jung SN, Kang I, Chi SG, Kim SS, Ha J (2003) AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem* 278: 39653-39661
- Emerling BM, Platanius LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS (2005) Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol Cell Biol* 25: 4853-4862
- Sato H, Sato M, Kanai H, Uchiyama T, Iso T, Ohyama Y, Sakamoto H, Tamura J, Nagai R, Kurabayashi M (2005) Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 67: 714-722
- Haddad JJ, Olver RE, Land SC (2000) Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 21130-21139
- Tajima M, Kurashima Y, Sugiyama K, Ogura T, Sakagami H (2009) The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol* 606: 45-49
- Loboda A, Stachurska A, Florczyk U, Rudnicka D, Jazwa A, Wegrzyn J, Kozakowska M, Stalinska K, Poellinger L, Levonen AL, Yla-Herttuala S, Jozkowicz A, Dulak J (2009) HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 expression in human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 11: 1501-1517
- Leonard MO, Kieran NE, Howell K, Burne MJ, Varadarajan R, Dhakshinamoorthy S, Porter AG, O'Farrelly C, Rabb H, Taylor CT (2006) Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription fac-

- tor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 20: 2624-2626
33. Klimova T, Chandel NS (2008) Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 15: 660-666
 34. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1: 401-408
 35. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GR, Chandel NS (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 177: 1029-1036
 36. Jung HJ, Shim JS, Lee J, Song YM, Park KC, Choi SH, Kim ND, Yoon JH, Mungai PT, Schumacker PT, Kwon HJ (2010) Terpestacin inhibits tumor angiogenesis by targeting UQCRCB of mitochondrial complex III and suppressing hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *J Biol Chem* 285: 11584-11595
 37. Wang D, Malo D, Hekimi S (2010) Elevated mitochondrial reactive oxygen species generation affects the immune response via hypoxia-inducible factor-1alpha in long-lived Mcl1+/- mouse mutants. *J Immunol* 184: 582-590
 38. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-1alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7: 77-85
 39. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J, Ratcliffe PJ, Linehan WM, Neckers L (2005) HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8: 143-153
 40. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, Rudenko V, Chan DA, Giaccia AJ, Simon MC (2007) Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol* 27: 912-925
 41. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A (2005) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 280: 41928-41939
 42. Brown ST, Nurse CA (2008) Induction of HIF-2alpha is dependent on mitochondrial O2 consumption in an O2-sensitive adrenomedullary chromaffin cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1305-1312
 43. Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC (2005) Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-1alpha activation. *Cell Metab* 1: 393-399
 44. Diebold I, Flugel D, Becht S, Belaiba RS, Bonello S, Hess J, Kietzmann T, Gorrach A (2010) The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxid Redox Signal* 15: 425-436
 45. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH (2007) Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 67: 10823-10830
 46. Brune B, Zhou J (2003) The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem* 10: 845-55
 47. Metzén E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B (2003) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14: 3470-3481
 48. Dulak J, Jozkowicz A (2003) Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal* 5: 123-32
 49. Takabuchi S, Hirota K, Nishi K, Oda S, Oda T, Shingu K, Takabayashi A, Adachi T, Semenza GL, Fukuda K (2004) The inhibitory effect of sodium nitroprusside on HIF-1 activation is not dependent on nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 417-423
 50. Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J, Adachi T, Semenza GL, Hirota K (2004) Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem* 279: 2550-2558
 51. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y (1998) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7368-7373
 52. Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S (1998) Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* 273: 15257-15262
 53. Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF (1999) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 274: 9038-9044
 54. Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Trinidad B, Oehme F, Yamac H, Wotzlaw C, Flamme I, Fandrey J (2008) Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 283: 31745-31753
 55. Park YK, Ahn DR, Oh M, Lee T, Yang EG, Son M, Park H (2008) Nitric oxide donor, (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine, stabilizes transcriptional hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibiting von Hippel-Lindau recruitment and asparagine hydroxylation. *Mol Pharmacol* 74: 236-245
 56. Mateo J, Garcia-Lecce M, Cadenas S, Hernandez C, Moncada S (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 376: 537-544

The new face of factors induced by hypoxia – HIF-1 and HIF-2 and oxidative stress

Anna Stachurska, Urszula Florczyk, Alicja Józkwicz, Józef Dulak, Agnieszka Łoboda[✉]

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

[✉]e-mail: agnieszka.loboda@uj.edu.pl

Key words: hypoxia, prolyl hydroxylases, oxidative stress, respiratory chain, reactive oxygen species, nitric oxide

ABSTRACT

Studies on the mechanisms of adaptation to adverse hypoxic conditions led to the discovery of hypoxia inducible factors, HIF-1 and HIF-2. These factors regulate the expression of many genes which allow cells to adapt to changes in oxygen concentration and counteract the effects of oxidative stress developing in hypoxia. Regulation of HIF activity is dependent on the prolyl hydroxylases activity and results in its degradation under normoxic conditions by the ubiquitin-dependent proteasome pathway. Recent studies indicate a specific role of reactive oxygen species (ROS) generated by the mitochondrial respiratory chain in regulation of HIF stability. ROS affect also the level of nitric oxide (NO), leading to a reduction in its concentration by forming reactive nitrogen species (RNS), which may cause the increase in oxidative and nitrosative stress. Regulation of HIF activity by ROS, NO and RNS is currently the subject of many studies and seems to be a mechanism dependent on conditions (eg. normoxia/hypoxia), or concentrations of individual stimulators (eg. NO donor used).

STRESZCZENIE

Białko adaptorowe p66Shc już od ponad dekady stanowi przedmiot zainteresowania wielu grup badawczych na całym świecie. Prowadzone w ostatnim czasie badania przyczyniły się do poznania jego budowy oraz scharakteryzowania podstawowych funkcji jakie może pełnić w komórce. Pomimo niewątpliwie ogromnego postępu w badaniach nad p66Shc, do wyjaśnienia pozostaje mechanizm potencjalnego wpływu tego białka na metabolizm mitochondriów, a tym samym na stan energetyczny komórki. Niezwykle interesująca jest kwestia czy p66Shc jest kluczowym elementem odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny, co może w efekcie mieć wpływ na długość życia organizmu. Fosforylacja reszty serynowej 36 białka p66Shc uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzących do zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w komórce. Sformułowana przez Harmana, w latach 50-tych ubiegłego stulecia, wolnorodnikowa teoria starzenia się organizmów zakłada, że „niekontrolowany” wzrost poziomu RFT może prowadzić do uszkodzeń białek, lipidów, a także DNA. Kumulacja takich uszkodzeń w komórkach może z czasem negatywnie wpływać na funkcje tkanek i narządów, prowadząc do powstawania stanów patologicznych, a czasami nawet do przedwczesnej śmierci organizmu. Potwierdzona doświadczalnie wiedza o udziale białka p66Shc w produkcji RFT oraz jego wpływie na długość życia organizmu pozostaje niekompletna i ciągle jeszcze wymaga wielu dodatkowych badań, które umożliwią lepsze poznanie mechanizmów rządzących procesami starzenia oraz powstawania rozmaitych patologii związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego. Niniejsza praca jest próbą usystematyzowania istniejącej wiedzy na temat białka p66Shc, jego budowy oraz funkcji. Zwrócono także uwagę na najciekawsze aspekty i wyniki badań w różnych modelach *in vivo* i *in vitro* w kontekście stresu oksydacyjnego i związanych z nim patologii oraz starzenia.

WPROWADZENIE – RODZINA BIAŁEK Shc

Badania prowadzone na początku lat 90-tych ubiegłego wieku doprowadziły do poznania sekwencji kodującej białka Shc. Znalaziono wówczas dwa transkrypty będące prawdopodobnie produktami tego genu, co wskazywało na istnienie dwóch kodonów inicjacji transkrypcji. Odkryto wtedy sekwencje kodujące białka p46Shc oraz p52Shc [1]. Trzecia izoforma Shc (białko p66Shc) została zidentyfikowana nieco później, bo dopiero w 1997 roku. Jak się wtedy okazało, chociaż sekwencja kodująca to białko zajmuje ten sam locus co sekwencja kodująca białka p42/p52 Shc, to znajduje się ona pod kontrolą alternatywnego promotora transkrypcji [2]. Pomimo, że regulacja syntezy białek Shc była jeszcze wtedy niejasna, wnioskowano, że regulacja promotora właściwego dla sekwencji kodującej daną izoformę umożliwi ich tkankowo-specyficzną syntezę [1,2]. Z doniesień grupy Pelliciego wynikało, że ekspresja genu kodującego białko p66Shc jest regulowana na drodze modyfikacji epigenetycznych, głównie przez deacetylację histonów i metylację sekwencji CpG [3,4].

Interesujące wydaje się, że wspólny motyw, charakterystyczny dla wszystkich białek Shc jest obecny nawet u bezkręgowców, co może wskazywać na wspólnego przodka genu kodującego białka z rodziny Shc. Mimo to białka różnych organizmów zostały zaklasyfikowane do odmiennych grup. Właściwą grupę tworzą białka Shc człowieka oraz myszy, homologiczne do nich są: białka Rai (człowieka oraz myszy) oraz białka Sli (człowieka, myszy i szczura). W innej grupie znalazły się homologi odnajdywane u *Drosophila* (dShc), a także białka homologiczne do Shc u ryby *Fugu rubripes* [5].

Tkankowo-specyficzna synteza białek Shc stała się podstawą ich podziału na trzy podrodziny A, B i C. Aby uporządkować systematykę białek Shc przyjęto, że grupa ShcA to właściwe białka Shc, natomiast ShcB to białka Sli, a ShcC to białka Rai [5]. Białka ShcA odnajdujemy w komórkach prawie wszystkich typów, jednakże w komórkach hemopoetycznych, limfocytach krwi obwodowej, neuronach mózgu oraz niektórych komórkach nowotworowych ich poziom jest stosunkowo niski [6]. Powyższe dane są nieco nieprecyzyjne, jako że zostały oparte wyłącznie na badaniach poziomu mRNA, co nie zawsze koreluje z poziomem tych białek w komórkach poszczególnych typów. Nasze ostatnie badania [7] wskazują, że białko p66Shc występuje w większości narządów i tkanek oprócz ośrodkowego układu

Magdalena Lebedzińska

Jan Suski

Jerzy Duszyński

Mariusz R. Więckowski[✉]

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

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

Artykuł otrzymano 24 marca 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 27 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: p66Shc, mitochondria, stres oksydacyjny

Wykaz skrótów: MAM (ang. *mitochondria associated membranes*) – błony związane z mitochondriami, PAM (ang. *plasma membrane associated membranes*) – błony związane z błoną plazmatyczną, RFT – reaktywne formy tlenu

Podziękowanie: Niniejsze opracowanie oraz opisane w nim prace doświadczalne autorów zostały sfinansowane przez projekty badawcze: Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N301 092 32/3407 i N407 075 137 oraz stypendium dla Jana Suskiego z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP), UE, Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego i Programu Operacyjnego „Innowacyjna Gospodarka” (PO IG).

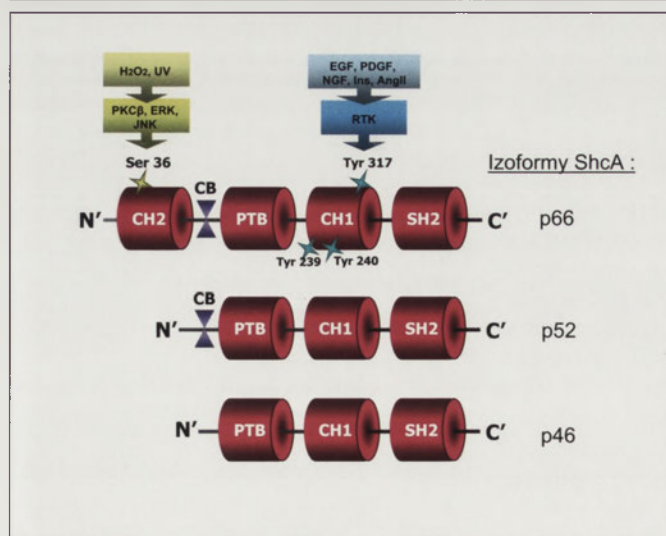
nerwowego. Potwierdziło to tym samym doniesienia włoskich naukowców mówiące o tym, że w trakcie rozwoju komórek nerwowych, pod wpływem odpowiednich sygnałów następuje zmiana profilu ekspresji genów, co prowadzi do wyciszenia genów kodujących białka ShcA, w tym p66Shc. Zjawisku temu towarzyszy natomiast aktywacja genów kodujących białka z podrodziny ShcB i ShcC [8,9], które są charakterystyczne dla komórek nerwowych [10].

BUDOWA BIAŁEK Z PODRODZINY ShcA

Wszystkie białka ShcA łączy wspólny schemat budowy (Ryc. 1). Zbudowane są one z trzech funkcjonalnie identycznych domen: domeny SH2 (ang. *Src homology domain 2*) na C-końcu, centralnie położonej domeny CH1 (ang. *Collagen Homology domain 1*) i domeny PTB (ang. *Phosphotyrosine binding domain*) położonej w przypadku p46Shc i p52Shc na N-końcu [5]. Domeny PTB oraz SH2 mają zdolność wiązania fosfotyrozyny, lecz różnią się od siebie sekwencją aminokwasową oraz strukturą przestrzenną [2]. To, co odróżnia białko p66Shc od pozostałych dwóch izoform (p46Shc, p52Shc), to obecność na N-końcu dodatkowej, bogatej w reszty glicyny i proliny, domeny CH2 (ang. *Collagen Homology domain*). Zawiera ona w pozycji 36 resztę seryny, której fosforylacja ma istotne znaczenie dla proapoptotycznych właściwości tego białka i odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny wywoływany różnymi czynnikami np. reperfuzyją następującą po okresie niedotlenienia lub działaniem promieniowania UV [11,12]. Dodatkowo pomiędzy domenami CH2 i PTB białka p66Shc znajduje się region CB (ang. *Cytochrome c Binding domain*) odpowiedzialny za wiązanie cytochromu c [13].

ROLA BIAŁKA p66Shc W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

W warunkach fizjologicznych białka z rodziny Shc są substratami dla białkowych kinaz tyrozynowych związanych



Rycina 1. Schemat budowy białek z podrodziny ShcA. UV – promieniowanie ultrafioletowe, PKC β – kinaza białkowa C β , EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu, PDGF – płytkowy czynnik wzrostu, NGF – nerwowy czynnik wzrostu, Ins – Insulina, Ang II – angiotensyna II, TRK – receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, CB – region wiążący cytochrom c (ang. *Cytochrome c Binding domain*), CH – domena CH (ang. *Collagen Homology domain*), PTB – domena wiążąca fosfotyrozynę (ang. *Phosphotyrosine binding domain*), SH2 – domena SH2 (ang. *Src homology domain 2*).

z receptorami błonowymi, takimi jak EGFR, PDGFR, erbB-2R, InsR, FGFR, NGFR, a także wielu innych, co świadczy o uniwersalności szlaku przekazywania sygnałów z udziałem tych białek. Białka Shc są przekaźnikami sygnału od tychże receptorów do białka Ras, które związane jest ze ścieżką sygnałową odpowiedzialną między innymi za regulację proliferacji komórki [2]. W niektórych przypadkach białka Shc mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału od receptorów cytoplazmatycznych posiadających aktywność kinaz tyrozynowych [14,15]. Fosforylacja tyrozyn w domenie CH1 białka p66Shc zachodzi również w przypadku przekazywania sygnału do receptorów cytokin i hormonów, a także tych związanych z białkiem G.

Domena SH2 pełni kluczową rolę w oddziaływaniu białek z rodziny ShcA z receptorami błonowymi o aktywności kinaz tyrozynowych (TRK), np. receptorem nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF). Podczas aktywacji receptora EGF, białko p66Shc podobnie jak p46Shc i p52Shc ulega fosforylacji w resztach tyrozynowych obecnych w domenie CH1 [1]. Ufosforylowane białka p46Shc i p52Shc (przed wszystkim reszty Tyr317) mają zdolność wiązania się z cytosolowym białkiem adaptorowym Grb2, które występuje w kompleksie z białkiem Sos (ang. *Son of sevenless exchange protein*). Ich oddziaływanie z kompleksem Grb2-Sos przez przyłączenie cząsteczki GTP aktywuje białko Ras [2,16]. Z aktywacją ścieżki Ras w komórce wiąże się szereg różnych procesów począwszy od indukcji proliferacji, przez adaptacyjne zmiany ekspresji genów, aż do stanów patologicznych związanych z rozwojem nowotworów [17]. Dostępne w literaturze dane wskazują, że do aktywacji białka Ras wcale nie musi być konieczne oddziaływanie białka Grb2 z p46shc lub p52Shc. Sugeruje się tym samym, że oddziaływanie tych białek z Grb2 ma za zadanie wzmacnianie sygnału pochodzącego od receptora. Ufosforylowane w domenie CH1 białko p66Shc także może wiązać się z białkiem Grb2, jednakże w tym przypadku nie dochodzi do aktywacji białka Ras. Uważa się, że białko p66Shc konkurując z p46Shc i p52Shc o wiązanie się z Grb2, zmniejsza aktywność ścieżki przekazywania sygnału, co z kolei przekłada się na zahamowanie proliferacji [2,18]. O tym, jak istotne białka Shc są dla funkcjonowania komórki może świadczyć fakt, iż usunięcie kodującego je genu skutkuje śmiercią organizmu w okresie embrionalnym [19]. Natomiast zwiększenie poziomu białek Shc skutkuje przyspieszeniem proliferacji po stymulacji komórek EGF, GM-CSF lub trombiną [1].

ODPOWIEŹ KOMÓRKI NA STRES OKSYDACYJNY – ROLA BIAŁKA p66Shc

Od 1999 roku badania nad białkiem p66Shc uzyskały zupełnie nowy wymiar poznawczy. Ukazanie się przełomowej pracy grupy prof. Pelliciego z Mediolanu doprowadziło do wzrostu zainteresowania wśród badaczy proapoptotycznymi właściwościami tego białka [20]. Jako model w swoich badaniach grupa włoska wykorzystywała myszy pozbawione genu kodującego białko p66Shc (p66Shc^{-/-}). Ich badania pokazały, że brak białka p66Shc może znacząco wydłużać życie myszy. Żyją one aż 30–40% dłużej niż myszy o dzikim fenotypie. Interesujący jest także fakt, iż takie myszy rozmnażają się i rozwijają normalnie. Nie obserwuje się u nich zwiększonej tendencji do powstawania nowotworów czy zaburzeń hormonalnych. Dodatkowo, myszy p66Shc^{-/-} mają zwiększoną odporność na stres

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA BIAŁKA p66Shc

Jeszcze w 2004 roku postulowano, że białko p66Shc (poza cytosolem) obecne jest także w macierzy mitochondrialnej, gdzie oddziałuje z mitochondrialnym białkiem szoku cieplnego mtHSP70 [22,33]. Jednakże rok później, ta sama grupa opublikowała kolejną przełomową pracę dotyczącą białka p66Shc [13]. Autorzy nadal wskazywali na istotny związek tego białka z mitochondriami, jednakże nie podtrzymywali wcześniejszych stwierdzeń i przekonywali, że mitochondrialne p66Shc obecne jest głównie w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, lub też może być związane z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Niestety, sytuacja stała się bardziej skomplikowana, gdy badania przeprowadzone na izolowanych mitochondriach pokazały, że białko p66Shc nie ma możliwości przedostawania się do mitochondriów poprzez zewnętrzną błonę mitochondrialną [34]. Dowodem na to mogłyby być doświadczenia pokazujące, że rekombinowane białko p66Shc wywołuje pęcznienie tylko mitochondriów, których zewnętrzną błonę mitochondrialną jest uprzepuszczalna. W tym kontekście, interesujące wydają się także wyniki badań pokazujące, że białka Shc mogą być związane z siateczką śródplazmatyczną, a aktywacja specyficznego receptora (m.in. dla nabłonkowego czynnika wzrostu, EGF) powoduje ich przemieszczenie na peryferie komórki [16].

Na podstawie powyższych badań przyjęto, że w komórce obecne są dwie pule białka p66Shc, cytosolowa i mitochondrialna. Mimo wielu kontrowersji mitochondrialna lokalizacja białka p66Shc może mieć logiczne uzasadnienie, jeżeli przyjąć prawdziwość tezy przedstawionej przez grupę prof. Pelliciego, że zarówno *in vitro* jak i *in vivo* białko p66Shc ma zdolność utleniania cytochromu *c* oraz, że temu procesowi towarzyszy powstawanie nadtlenu wodoru [13]. Jak już wcześniej wspomniano, za wiązanie cytochromu *c* odpowiada region CB, obejmujący 52 reszty aminokwasowe pomiędzy domenami CH2 i PTB. Szczególnie istotne dla właściwości oksydoredukcyjnych p66Shc w tym fragmencie są: kwas glutaminowy (E125, E132, E133) oraz tryptofan (W134, W148). Mutacje zmieniające reszty aminokwasowe w tych pozycjach powodują utratę zdolności utleniania cytochromu *c* przez białko p66Shc, co jednakże nie wiąże się ze zmianą pozostałych funkcji i właściwości p66Shc [13]. Dodatkowo, za mitochondrialną lokalizacją białka p66Shc może przemawiać odkrycie zlokalizowanej wewnętrznie skwencji kierującej to białko do mitochondriów [34].

Także ostatnie badania wykonane przez nasz zespół przyczyniły się do zweryfikowania dotychczasowych poglądów dotyczących wewnątrzkomórkowej lokalizacji p66Shc. Zastosowanie metody izolacji frakcji komórkowych o wysokiej czystości pokazało, że białko p66Shc związane jest z takimi frakcjami błon komórkowych, które stanowią miejsca oddziaływania mitochondriów odpowiednio z błoną plazmatyczną – frakcja błon PAM (ang. *plasma membrane-associated membranes*) i siateczką śródplazmatyczną – frakcja błon MAM (ang. *mitochondria-associated membranes*) [33,35].

Wszystkie modele opisujące wpływ p66Shc na metabolizm komórki oraz produkcję reaktywnych form tlenu zakładają przemieszczenie tego białka do mitochondriów. Opisywana mitochondrialna lokalizacja białka p66Shc nadal więc pozostaje

oksydacyjny wywołany podaniem parakwatu oraz są bardziej odporne na uszkodzenia będące skutkiem ischemii i hypercholesterolemii [20,21]. Komórki pozbawione białka p66Shc trudniej ulegają apoptozie wywołanej przez nadtlenuk wodoru, UV, staurosporynę, jonofory wapniowe oraz brak czynników wzrostu [20,22,23]. Zjawisko zwiększonej oporności na stres oksydacyjny komórek i zwierząt pozbawionych białka p66Shc było także przedmiotem badań Nemoto i Finkel [12]. Wykazali oni, że podczas stresu oksydacyjnego w fibroblastach pozbawionych białka p66Shc wzrasta poziom katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2). Według badaczy, to właśnie wyższy poziom enzymów antyoksydacyjnych może nadawać komórkom p66Shc^{-/-} wysoką oporność na stres oksydacyjny.

Odpowiedź komórki na stres oksydacyjny jest procesem złożonym i wieloetapowym. Jak już wcześniej wspomniano, podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do ufosforylowania reszty serynowej w pozycji 36 białka p66Shc przez jedną z kinaz serynowo-treoninowych. Le i wsp. wykazali, że w przypadku promieniowania UV może to być kinaza JNK [24]. Co ciekawe, nie zaobserwowano fosforylacji reszty serynowej białka p66Shc po działaniu na komórki promieniowaniem γ . Dotychczas udało się wykazać, że reszta Ser36 białka p66Shc może być fosforylowana także przez kinazę białkową C β (PKC β) [25] oraz kinazę ERK [26]. Badania embrionalnych fibroblastów myszy bez p66Shc, (MEF p66Shc^{-/-}), do których wprowadzono plazmid kodujący p66Shc, niezawierający reszty serynowej w pozycji 36 pokazały, że komórki takie są odporne na stres oksydacyjny podobnie jak fibroblasty w których brak jest syntezy białka p66Shc [20]. Obserwacje te potwierdziły, że fosforylacja reszty Ser 36 w białku p66Shc jest kluczową modyfikacją, która może decydować o życiu lub śmierci komórki.

W fosforylację p66Shc zaangażowane mogą być także szlaki związane z kinazą ASK1 [27] oraz p38 MAPK [28], która jest wrażliwa na szereg czynników zwiększających poziom produkcji RFT w komórce takich jak: szok osmotyczny i termiczny, anizomycyna, H₂O₂, UV, cytokiny prozapalne, interleukina 1 oraz LPS [28]. Aktywowany receptor TGF- β typu I także jest zdolny do fosforylacji zarówno reszt tyrozynowych jak i serynowych w białkach ShcA, przy czym przeważająca fosforylacja reszt seryny zmniejsza udział ścieżki związanej z kinazami ERK i MAPK [29]. Ciekawostką jest, że zależna od Rac1 fosforylacja reszt aminokwasowych p66Shc, Ser54 i Thr386 prowadzi do zwiększenia stabilności białka p66Shc (poprzez obniżenie możliwości jego ubiquitylacji) [30].

Konsekwencją fosforylacji jest izomeryzacja białka p66Shc katalizowana przez izomerazę prolylową 1 (Pin1). Jest to izomeraza peptydylo-prolylowa katalizująca izomeryzację wiązań cis-trans reszt Ser/Thr-Pro ufosforylowanych białek. Zmiana konformacji ufosforylowanego p66Shc umożliwia jego defosforylację przeprowadzaną przez fosfatazę 2A (PP2A) i przemieszczenie się białka p66Shc do mitochondriów [25]. Związane z mitochondriami białko p66Shc zaburza ich strukturę, homeostazę wapniową, a także może wpływać na ich metabolizm [31,32]. Kluczową rolą p66Shc w tym procesie jest to, że przyczynia się ono do zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu [25]. Białko p66Shc ma zdolność utleniania cytochromu *c* zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, czemu towarzyszy powstawanie nadtlenu wodoru [13].

staje kwestią sporną. Jednakże w ogólnych rozważaniach na ten temat przyjmuje się, że po wspomnianych powyżej modyfikacjach i zmianach konformacyjnych p66Shc przemieszcza się do frakcji błon związanych z mitochondriami (np. frakcja błon MAM) i oddziałuje z białkami zewnętrznej błony mitochondrialnej [25,33,35]. W literaturze pojawiały się także prace pokazujące brak istotnej translokacji p66Shc z puli cytosolowej do mitochondriów [22], a także, że białko to może występować w kompleksie z białkami TIM-TOM odpowiedzialnymi za import białek do mitochondriów [36]. Dane dotyczące lokalizacji białka p66Shc w mitochondrialnej przestrzeni międzymbłonowej i jego oddziaływanie z cyt c [13] są jednak sprzeczne z wynikami badań przeprowadzonymi na izolowanych mitochondriach, które pokazały, że p66Shc nie przenika poprzez zewnętrzną błonę mitochondrialną, gdyż rekombinowane białko p66Shc wywołuje pęcznienie wyłącznie mitochondriów z uprzepuszczalną błoną zewnętrzną [34]. Mimo tak wielu kontrowersji badacze nie mają wątpliwości, że fosforylacja reszty Ser36 białka p66Shc powiązana jest ze zwiększonym wewnątrzkomórkowym poziomem RFT, który może prowadzić do zmian strukturalnych i bioenergetycznych mitochondriów (nawet do otwarcia mitochondrialnego megakanalu) [13]. Zwiększony poziom wolnych rodników, nawet jeśli w tym przypadku nie od razu wywoła apoptozę (zależną od białka p53) [37], to przyczynia się do wtórnych uszkodzeń w komórce, takich jak, peroksydacja lipidów, karbonylacja białek czy uszkodzenia DNA, co znajduje odzwierciedlenie w rozwijających się z czasem stanach patologicznych.

WPLYW p66Shc NA POZIOM ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH

W świetle ostatnich badań, wyniki Nemoto i Finkel [12], wydają się potwierdzać, że wysoki poziom białka p66Shc z ufosforylowaną resztą Ser36 przyczynia się do inaktywacji czynników transkrypcyjnych FKHRL (ang. *forkhead transcription factors*), a w szczególności FKHRL 1 (FOXO3a), regulującego ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne takie jak: katalaza [38] i SOD2, która odpowiada za ochronę przed anionorodnikiem ponadtlenkowym powstającym w macierzy mitochondrialnej. Komórki pozbawione białka p66Shc charakteryzują się zwiększoną aktywnością czynnika transkrypcyjnego FKHRL1, a tym samym wyższym poziomem enzymów antyoksydacyjnych [12], co czyni je bardziej opornymi na stres oksydacyjny [25].

Niezwykle interesująca wydaje się sieć zależności pomiędzy fosforylacją reszty serynowej w pozycji 36 białka p66Shc, indukowaną przez RFT ścieżką apoptozy oraz aktywacją białka p53. Nie w każdym jednak warunkach taka zależność występuje, bowiem w komórkach nie posiadających p53 również obserwuje się apoptozę związaną ze szlakiem p66Shc [39]. Niezależność szlaków inicjacji apoptozy zależnej od p66Shc i p53 może tłumaczyć obserwowany przez grupę Pelliciego brak większej częstości w pojawianiu się stanów nowotworowych u myszy bez białka p66Shc [37]. Sieć zależności występująca pomiędzy p53 i p66Shc wydaje się więc zawiadywać ochroną antyoksydacyjną, a także stanem redoks komórki [37]. Możemy zatem przypuszczać, że podczas stresu oksydacyjnego rola białka p66Shc polega nie tylko na zwiększaniu produkcji reaktywnych form tlenu i inicjowaniu zależnego od mitochondriów szlaku apoptozy, ale także na obniżaniu zdol-

ności usuwania RFT przez systemy antyoksydacyjne komórki [7]. Mechanizm ten może mieć za zadanie bezwzględna eliminację komórek zmienionych na skutek szkodliwego działania stresu oksydacyjnego (promieniowania UV lub RFT), aby nie dopuścić np. do ewentualnego procesu nowotworzenia [40].

BIAŁKO p66Shc A STARZENIE SIĘ ORGANIZMU

Starzenie komórki i organizmu to procesy ściśle powiązane z powstawaniem i działaniem RFT na komórki. Uszkodzenia przez nie wywoływane takie jak: peroksydacja lipidów, karbonylacja białek, mutacje w DNA, kumulują się z wiekiem prowadząc do uszkodzenia komórek, upośledzenia funkcjonowania tkanek i narządów, a w końcu do zaburzenia homeostazy oraz wzrostu prawdopodobieństwa śmierci organizmu. O takiej zależności mówi powszechnie akceptowana po dzień dzisiejszy, a zaproponowana w 1956 przez Harmana, wolnorodnikowa teoria starzenia się organizmu [41-43]. W świetle tej teorii sytuacja przeciwna, a zatem obniżenie produkcji reaktywnych form tlenu i wzmocnienie ochrony antyoksydacyjnej powinno mieć pozytywny wpływ na kondycję organizmu i przedłużyć się na wydłużenie jego życia. Dowody potwierdzające takie założenie odnaleźć można w badaniach na bezkręgowcach. Stwierdzono, że podniesienie w ich komórkach poziomu enzymów antyoksydacyjnych skutkuje wydłużeniem życia, np. u *D. melanogaster* [44,45]. W przypadku ludzi efektów wydłużających okres młodości upatruje się w stosowaniu diety bogatej w antyoksydanty (np. witaminę C i E) oraz związki pochodzenia roślinnego, np. resweratrol [46,47]. Skutecznym sposobem może być także restrykcja kaloryczna, zastosowanie której przedłuża życie zwierząt laboratoryjnych nawet o ok. 30% (podobnie jak w przypadku braku p66Shc). Jednak podobna dieta u człowieka wiązałaby się z ogromnymi trudnościami w utrzymaniu prawidłowego poziomu składników odżywczych, witamin i mikroelementów [48]. Wszystkie stosowane dotychczas strategie mające na celu przedłużenie życia mają za zadanie modyfikację metabolizmu w kierunku obniżenia produkcji reaktywnych form tlenu. Podobnie jest u myszy bez białka p66Shc, gdzie obserwuje się zmniejszony metabolizm tlenowy, przy jednoczesnym zwiększeniu udziału glikolizy w produkcji ATP [31].

Najnowsze badania prowadzone w naszej pracowni wskazują na istotne zmiany w poziomie białka p66Shc w narządach i tkankach starzejących się myszy. Wraz z wiekiem osobniczym badanych myszy obserwowaliśmy wyższą produkcję RFT i obniżenie poziomu p66Shc, któremu towarzyszył wzrost zawartości ufosforylowanej formy białka (w Ser36). Jeżeli wierzyć, że przyczyną starzenia są reaktywne formy tlenu wywołujące uszkodzenia kumulujące się z wiekiem, to obniżenie zdolności antyoksydacyjnej w komórkach będzie przyspieszało ten nieuchronny proces. W jednej z naszych ostatnich prac pokazaliśmy, że w wybranych narządach i tkankach myszy poziom enzymów antyoksydacyjnych obniża się z wiekiem, pogłębiając tym samym, obserwowany u starych zwierząt, zwiększony stres oksydacyjny [7]. Interesujący wydaje się fakt, że wraz z wiekiem zmienia się także wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka p66Shc. U zwierząt młodych więcej p66Shc znajduje się we frakcji błon PAM, gdzie bierze ono udział w regulacji szlaku przekazywania sygnału od receptora wzrostu do białka Ras, a mniej we frakcji błonowej MAM. U zwierząt starych obserwowana jest tendencja odwrotna. W tym przy-

Tabela 1. Białko p66Shc w patologii i starzeniu.

Patofizjologia	p66Shc/Ser36-P-p66Shc	Piśmien- nictwo
rak piersi	wzrost zawartości białka p66Shc	[72]
rak prostaty	wzrost zawartości białka p66Shc	[77,78]
cukrzyca (model myszy)	wzrost zawartości białka p66Shc	[79]
cukrzyca (pacjenci)	wzrost zawartości białka p66Shc	[80]
wymuszone stresem oksydacyjnym starzenie bydłych fibroblastów	wzrost zawartości białka p66Shc	[81]
choroby tarczycy: gruczolak tarczycy z komórek Hürthlego choroba Gravesa-Basedowa rak pęcherzykowy rak brodawkowy	wzrost zawartości białka p66Shc	[82]
fibroblasty osób długo żyjących	wzrost zawartości mRNA p66Shc	[50]
wysoki poziom cholesterolu	wzrost zawartości białka p66Shc	[83]
stres oksydacyjny wywołany etanolem	wzrost zawartości białka p66Shc	[57]
ischemia/reperfuzja	wzrost zawartości ufosforylowanego p66Shc	[84]
podwyższony poziom utlenionych kwasów tłuszczowych w przewodzie pokarmowym	wzrost zawartości białka p66Shc	[85]
proapoptotyczna stymulacja limfocytów T	wzrost zawartości białka p66Shc	[65]
choroba Alzheimera	wzrost poziomu białka p66Shc	[86]
przewlekła białaczka limfatyczna	spadek poziomu białka p66Shc w limfocytach B	[87]
choroby mitochondrialne (dysfunkcje fosforylacji oksydacyjnej)	wzrost poziomu białka p66Shc zwiększenie fosforylacji Ser36 p66Shc	[56]
nadciśnienie tętnicze (szczury)	znaczny wzrost poziomu ufosforylowanego p66Shc	[88]

padku więcej białka p66Shc jest we frakcji błon MAM, gdzie z kolei białko p66Shc może być zaangażowane w produkcję RFT i przyczynić się do pogłębiania stresu oksydacyjnego [7]. Wskazuje to na jakże odmienną rolę jaką może pełnić to białko w zależności od wieku zwierzęcia.

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane w badaniach z wykorzystaniem myszy pozbawionych białka p66Shc wydawałoby się, że długowieczność może być związana z obniżoną syntezą białka p66Shc [20,49]. Jednakże tak jak i w przypadku wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka p66Shc, także i ta kwestia wzbudza kontrowersję. Otóż, w fibroblastach stulat-
ków stwierdzono podwyższony poziom mRNA dla białka p66Shc [50].

ROLA p66Shc W ROZWOJU STANÓW PATOLOGICZNYCH

Jak już wspomniano, stres oksydacyjny nieodłącznie towarzyszy wielu stanom patologicznym. W literaturze dostępne są liczne, dobrze udokumentowane dane, że białko p66Shc może odgrywać istotną rolę w takich chorobach jak cukrzyca [51] oraz choroba Alzheimera [52], a także może być zaangażowane w powstawanie otyłości [53], uszkodzenia nerek i wątroby wywołane epizodami ischemii i reperfuzji [54,55], choroby mitochondrialne [56] oraz uszkodzenia wątroby wywołane etanolem [57] (Tabela 1). Badania białek Shc (p46Shc, p52Shc oraz p66Shc) dowiodły również, że białka te mogą być wykorzystywane jako markery w diagnostyce nowotworów piersi [58]. Poniżej przedstawiono wybrane stany patologiczne, w których przebiegu białko p66Shc odgrywa istotną rolę.

środki farmakologiczne. Leczenie w takich przypadkach ogranicza się wyłącznie do łagodzenia skutków zaburzeń poprzez podawanie antyoksydantów i suplementów diety [60]. Badania przeprowadzone na hodowlach fibroblastów pobranych od pacjentów z chorobami mitochondrialnymi wskazują na istotny udział ścieżki związanej z fosforylacją białka p66Shc w patologii tych chorób. W takich fibroblastach, poziom ufosforylowanego w Ser36 p66Shc jest znacznie podniesiony w stosunku do fibroblastów kontrolnych. Komórki pacjentów charakteryzują się zwiększoną produkcją RFT, podniesionym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz znacząco niższym poziomem SOD2 [56]. Zastosowanie hispidyny, inhibitora PKC β , obniża poziom ufosforylowanego w Ser36 p66Shc i poprawia parametry bioenergetyczne mitochondriów oraz zmniejsza produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach [56].

CUKRZYCA

Reaktywne formy tlenu i związane z nimi stres oksydacyjny ściśle towarzyszą rozwojowi cukrzycy i wynikającym z niej stanom patologicznym, takim jak nadciśnienie, uszkodzenie układu sercowo-naczyniowego oraz retinopatia. Hiperglikemia powoduje powstanie wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego [61] a tym samym zwiększa fosforylację białka p66Shc w Ser36 i przemieszczanie się p66Shc do mitochondriów. Natomiast przywrócenie prawidłowego poziomu glukozy prowadzi do zmniejszenia zawartości ufosforylowanego p66Shc w komórkach. Także obniżenie poziomu p66Shc w komórkach mezangialnych zapobiega glikooksydacyjnej

regulacji czynnika transkrypcyjnego FOXO3a promując w ten sposób szlaki sygnalizacyjne sprzyjające przeżyciu komórek [62]. Dzięki temu, białko p66Shc może być uważane za rodzaj molekularnego przełącznika, wrażliwego na poziom glukozy [63] stanowiąc tym samym potencjalny cel dla leków w terapii przeciwcukrzycowej. Interesująca w tym kontekście jest rola białka p66Shc w komórkach tkanki tłuszczowej [53]. Dowiedziano także, że brak białka p66Shc u myszy utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej, chroni komórki naczyń krwionośnych przed uszkodzeniami wywoływanymi przez podniesiony poziom RFT [64]. Powyższe wyniki mogą wskazywać, że reaktywne formy tlenu generowane przez białko p66Shc regulują wpływ insuliny na metabolizm energetyczny myszy i sugerują, że wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny może przyspieszyć starzenie, faworyzując odkładanie się tłuszczu, które może prowadzić do powstawania kolejnych zaburzeń.

CHOROBY AUTOIMMUNOLOGICZNE

Ostatnie dane literaturowe donoszą o istotnym udziale białka p66Shc w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego. Limfocyty o fenotypie p66Shc^{-/-} wykazują zwiększoną proliferację w odpowiedzi na zaangażowanie receptora dla antygeny *in vitro* i bardziej zdecydowaną odpowiedź immunologiczną zarówno w przypadku szczepień, jak i uczuleń *in vivo*. U organizmów pozbawionych białka p66Shc może zatem następować rozwój chorób autoimmunologicznych, gdyż brak p66Shc, pełniącego rolę negatywnego regulatora aktywacji limfocytów, prowadzi do załamania tolerancji immunologicznej [65]. Z drugiej strony Tomilov i wsp. pokazali, że obniżona produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w fagocytach myszy pozbawionych p66Shc wpływa na zmniejszenie liczby epizodów powstawania stanów zapalnych, co według nich może tłumaczyć długowieczność tych myszy [66].

USZKODZENIA WĄTROBY WYWOŁANE ETANOLEM

Białko p66Shc może mieć również związek z uszkodzeniami wątroby wywoływanymi przez alkohol. U myszy o fenotypie p66Shc^{+/-}, którym podawano etanol, zaobserwowano obecność zmian morfologicznych, podniesienie poziomu enzymów wskaźnikowych uszkodzenia wątroby w osoczu krwi, np. takich jak aminotransferaza alaninowa (ALT) oraz wzrost poziomu stłuszczenia wątroby. Powyższe zmiany nie występowały u zwierząt bez białka p66Shc, u których zaobserwowano jednocześnie zwiększoną ochronę antyoksydacyjną przejawiającą się podwyższonym poziomem SOD2 [57].

CHOROBY NOWOTWOROWE

p66Shc jest białkiem, które poprzez wpływ na produkcję RFT może pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów wzrostowych we wrażliwych na androgeny komórkach raka prostaty człowieka. W badaniach przeprowadzonych przez Veramani i wsp., stymulacji wzrostu komórek rakowych przez 5 α -dihydrotestosteron (DHT) towarzyszył wzrost poziomu białka p66Shc oraz zwiększona produkcja RFT. O tyle, o ile wzrost produkcji RFT mógł zostać zniwelowany poprzez dodanie antyoksydantów, to transkrypcyjna aktywność receptora androgenów (AR) pozostawała zaburzona. W tych warunkach AR był niezdolny do zablokowania indukowanej przez DHT ekspresji specyficznego względem prostaty antygeny, co

prowadziło do zależnej od AR progresji nowotworu. Ponadto, zwiększona synteza białka p66Shc prowadzi do wzrostu tempa proliferacji komórek nowotworowych. DHT zwiększał także przemieszczanie się p66Shc do mitochondriów. Rzucił to nowe światło na produkcję RFT z udziałem białka p66Shc w procesie nowotworzenia [67] gdzie dodatkowo obserwuje się hiperfosforylację białek ShcA [68,69].

Białko p66Shc odgrywa również istotną rolę w procesach angiogenezy i powstawaniu przerzutów. Badania wykazały, że związany z integryną $\alpha\beta 3$ szlak przekazywania sygnałów od czynnika wzrostu śródbłonki naczyniowego (VEGF, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), prowadzi do indukcji wzrostu zarówno nowotworów prostaty jak i piersi. Fosforylacja p66Shc jest ważnym krokiem w zależnym od $\alpha\beta 3$ zwiększeniu ekspresji genu VEGF, które prowadzi do unaczynienia nowotworu [70]. Natomiast represja p66Shc *in vivo* prowadzi do obniżenia aktywności VEGF, a co za tym idzie do zahamowania angiogenezy i wzrostu nowotworu [71]. Dowiedziano również istotny udział białka p66Shc w rozprzestrzenianiu się nowotworów, a w szczególności jego rolę na wczesnych etapach tego procesu związanego z ruchliwością komórek nowotworowych. Zwiększoną produkcję białka p66Shc zaobserwowano we wczesnych etapach powstawania przerzutów zarówno w przypadku raka prostaty, jak i raka piersi [72].

CHOROBY NEURODEGENERACYJNE

Jak już wspomniano na początku tego opracowania, pomimo danych literaturowych mówiących, że poziom białka p66Shc jest bardzo niski w centralnym układzie nerwowym, istnieje szereg doniesień świadczących o pośrednim lub bezpośrednim wpływie tego białka na procesy zachodzące podczas rozwoju mózgu [73], jego funkcjonowania, a także neurodegeneracji. Jak wykazały badania, podwyższony poziom białka p66Shc w embrjonalnych komórkach macierzystych (ES) hamuje aktywację kinazy GSK-3 β i zwiększa stabilność oraz aktywność transkrypcyjną β -katechin i prowadzi do przyspieszonego różnicowania neuronów [74]. Badania prowadzone przez Berry i wsp. wykazały, że brak białka p66Shc u myszy poprawia wydajność w teście na orientację w przestrzeni (labirynt wodny Morrisa), zmniejsza poziom markerów stresu oksydacyjnego oraz podnosi poziom neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w hipokampie [75]. Autorzy wnioskują, że istnieje powiązanie między ekspresją genu *p66Shc*, a określonymi szlakami przekazywania sygnałów związanych z behawioralną adaptacją do warunków stresowych w procesie starzenia. Ta sama grupa naukowców zbadała także aktywność lokomotoryczną oraz nocycepcję u myszy pozbawionych p66Shc. Uzyskane wyniki wskazują, że wrażliwość na ból u myszy dzikiego typu wzrasta wraz z wiekiem, podczas gdy delecja genu *p66Shc* powodowała podniesienie tego progu. Różnice między mutantami, a myszami o fenotypie dzikim stawały się bardziej wyraziste wraz z wiekiem zwierzęcia [74].

Dodatkowo w literaturze dostępne są doniesienia, że białko p66Shc może przyczyniać się do potęgowania toksyczności β -amyloidu podczas rozwoju choroby Alzheimerera. Np., Smith i wsp. zaproponowali, że w komórkach nerwiaka (SH-SY5Y) oraz w komórkach linii PC12, β -amyloid (A β) poprzez produkcję RFT prowadzi do aktywacji kinazy JNK, co z kolei

powoduje fosforylację białka p66Shc w Ser36. Ufosforylowane p66Shc, jak już wcześniej wspomniano, prowadzi do inaktywacji czynnika transkrypcyjnego FKHRL1, co skutkuje obniżeniem poziomu enzymów antyoksydacyjnych (np. SOD2), zwiększając tym samym stres oksydacyjny. Autorzy sugerują, że szlaki, w których uczestniczą JNK, FKHRL1 oraz białko p66Shc mogą być potencjalnym celem dla leków przeciwko chorobie Alzheimera oraz w terapii innych zaburzeń związanych z wiekiem [76].

PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmu regulacji syntezy i funkcji białka p66Shc w fizjologii komórki, tkanki i organizmu jest niezwykle ważne w kontekście ochrony przed destruktywnym działaniem reaktywnych form tlenu i jest w chwili obecnej jednym z intensywniej badanych zagadnień biologii molekularnej. Opisane powyżej właściwości i funkcje białka p66Shc czynią je oraz ścieżkę sygnałową prowadzącą do jego fosforylacji w Ser36, potencjalnym elementem docelowym dla różnych związków farmakologicznych stosowanych w celu obniżenia wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego. Dalsze badania tego zagadnienia mogą przybliżyć nas do lepszego zrozumienia funkcji mitochondriów w fizjologii i patologii komórki, a w szerszym wymiarze – takich procesów jak stres oksydacyjny towarzyszący starzeniu się organizmu oraz wielu stanom patologicznym.

PIŚMIENNICTWO

- Pellicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Pawson T, Pellicci PG (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70: 93-104
- Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pellicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfrancone L, Pellicci PG (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J* 16: 706-716
- Pezzicoli A, Ulivieri C, Capitani N, Ventura A, Pellicci P, Baldari CT (2006) Expression in T-cells of the proapoptotic protein p66SHC is controlled by promoter demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 322-328
- Ventura A, Luzi L, Pacini S, Baldari CT, Pellicci PG (2002) The p66Shc longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter. *J Biol Chem* 277: 22370-22376
- Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pellicci PG (2000) Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev* 10: 668-674
- Pellegrini M, Pacini S, Baldari CT (2005) p66SHC: the apoptotic side of Shc proteins. *Apoptosis* 10: 13-18
- Lebiedzinska M, Duszynski J, Rizzuto R, Pinton P, Wieckowski MR (2009) Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch Biochem Biophys* 486: 73-80
- Conti L, De Fraja C, Gulisano M, Migliaccio E, Govoni S, Cattaneo E (1997) Expression and activation of SH2/PTB-containing ShcA adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8185-8190
- Conti L, Sipione S, Magrassi L, Bonfanti L, Rigamonti D, Pettirossi V, Peschanski M, Haddad B, Pellicci P, Milanese G, Pellicci G, Cattaneo E (2001) Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nat Neurosci* 4: 579-586
- Pellicci G, Dente L, De Giuseppe A, Verducci-Galletti B, Giuli S, Mele S, Vetriani C, Giorgio M, Pandolfi PP, Cesareni G, Pellicci PG (1996) A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene* 13: 633-641

- Faisal A, el-Shemerly M, Hess D, Nagamine Y (2002) Serine/threonine phosphorylation of ShcA. Regulation of protein-tyrosine phosphatase-binding and involvement in insulin signaling. *J Biol Chem* 277: 30144-30152
- Nemoto S, Finkel T (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295: 2450-2452
- Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pellicci PG (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122: 221-233
- Crowe AJ, McGlade J, Pawson T, Hayman MJ (1994) Phosphorylation of the SHC proteins on tyrosine correlates with the transformation of fibroblasts and erythroblasts by the v-sea tyrosine kinase. *Oncogene* 9: 537-544
- McGlade J, Cheng A, Pellicci G, Pellicci PG, Pawson T (1992) Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8869-8873
- Lotti LV, Lanfrancone L, Migliaccio E, Zoppetta C, Pellicci G, Salcini AE, Falini B, Pellicci PG, Torrisi MR (1996) Shc proteins are localized on endoplasmic reticulum membranes and are redistributed after tyrosine kinase receptor activation. *Mol Cell Biol* 16: 1946-1954
- Marshall MS (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9: 1311-1318
- Bonfini L, Migliaccio E, Pellicci G, Lanfrancone L, Pellicci PG (1996) Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci* 21: 257-261
- Ravichandran KS (2001) Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20: 6322-6330
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pellicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pellicci PG (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402: 309-313
- Zaccagnini G, Martelli F, Fasanaro P, Magenta A, Gaetano C, Di Carlo A, Biglioli P, Giorgio M, Martin-Padura I, Pellicci PG, Capogrossi MC (2004) p66ShcA modulates tissue response to hindlimb ischemia. *Circulation* 109: 2917-2923
- Orsini F, Migliaccio E, Moroni M, Contursi C, Raker VA, Piccini D, Martin-Padura I, Pelliccia G, Trinei M, Bono M, Puri C, Tacchetti C, Ferrini M, Mannucci R, Nicoletti I, Lanfrancone L, Giorgio M, Pellicci PG (2004) The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem* 279: 25689-25695
- Pacini S, Pellegrini M, Migliaccio E, Patrussi L, Ulivieri C, Ventura A, Carraro F, Naldini A, Lanfrancone L, Pellicci P, Baldari CT (2004) p66SHC promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Mol Cell Biol* 24: 1747-1757
- Le S, Connors IJ, Maroney AC (2001) c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 276: 48332-48336
- Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pellicci PG, Rizzuto R (2007) Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 315: 659-663
- Hu Y, Wang X, Zeng L, Cai DY, Sabapathy K, Goff SP, Firpo EJ, Li B (2005) ERK phosphorylates p66shcA on Ser36 and subsequently regulates p27kip1 expression via the Akt-FOXO3a pathway: implication of p27kip1 in cell response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* 16: 3705-3718
- Li M, Chiou KR, Kass DA (2007) Shear stress inhibition of H(2)O(2) induced p66(Shc) phosphorylation by ASK1-JNK inactivation in endothelium. *Heart Vessels* 22: 423-427
- Yannoni YM, Gaestel M, Lin LL (2004) P66(ShcA) interacts with MAPKAP kinase 2 and regulates its activity. *FEBS Lett* 564: 205-211
- Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R (2007) TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26: 3957-3967
- Khanday FA, Yamamori T, Mattagajasingh I, Zhang Z, Bugayenko A, Naqvi A, Santhanam L, Nabi N, Kasuno K, Day BW, Irani K (2006)

- Rac1 leads to phosphorylation-dependent increase in stability of the p66shc adaptor protein: role in Rac1-induced oxidative stress. *Mol Biol Cell* 17: 122-129
31. Nemoto S, Combs CA, French S, Ahn BH, Fergusson MM, Balaban RS, Finkel T (2006) The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J Biol Chem* 281: 10555-10560
 32. Pellegrini M, Finetti F, Petronilli V, Olivieri C, Giusti F, Lupetti P, Giorgio M, Pelicci PG, Bernardi P, Baldari CT (2007) p66SHC promotes T cell apoptosis by inducing mitochondrial dysfunction and impaired Ca²⁺ homeostasis. *Cell Death Differ* 14: 338-347
 33. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P (2009) Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* 4: 1582-1590
 34. Ventura A, Maccarana M, Raker VA, Pelicci PG (2004) A cryptic targeting signal induces isoform-specific localization of p46Shc to mitochondria. *J Biol Chem* 279: 2299-2306
 35. Lebedzinska M, Szabadkai G, Jones AW, Duszynski J, Wieckowski MR (2009) Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1805-1816
 36. Francia P, Cosentino F, Schiavoni M, Huang Y, Perna E, Camici GG, Luscher TF, Volpe M (2009) p66(Shc) protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link. *J Mol Med* 87: 885-891
 37. Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, Petronilli V, Minucci S, Bernardi P, Lanfrancone L, Pelicci PG (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 3872-3878
 38. Purdom S, Chen QM (2003) Linking oxidative stress and genetics of aging with p66Shc signaling and forkhead transcription factors. *Biogerontology* 4: 181-191
 39. Tiberi L, Faisal A, Rossi M, Di Tella L, Franceschi C, Salvioli S (2006) p66(Shc) gene has a pro-apoptotic role in human cell lines and it is activated by a p53-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 503-508
 40. Pani G, Koch OR, Galeotti T (2009) The p53-p66shc-Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1002-1005
 41. Gruber J, Schaffer S, Halliwell B (2008) The mitochondrial free radical theory of ageing—where do we stand? *Front Biosci* 13: 6554-6579
 42. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
 43. Sanz A, Stefanatos RK (2008) The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. *Curr Aging Sci* 1: 10-21
 44. Aigaki T, Seong KH, Matsuo T (2002) Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 123: 1531-1541
 45. Arking R (2001) Gene expression and regulation in the extended longevity phenotypes of *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci USA* 928: 157-167
 46. Mattson MP (2008) Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Res Rev* 7: 43-48
 47. de la Lastra CA, Villegas I (2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 49: 405-430
 48. Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63
 49. Sagi O, Wolfson M, Utiko N, Muradian K, Fraifeld V (2005) p66ShcA and ageing: modulation by longevity-promoting agent aurointricarboxylic acid. *Mech Ageing Dev* 126: 249-254
 50. Pandolfi S, Bonafe M, Di Tella L, Tiberi L, Salvioli S, Monti D, Sorbi S, Franceschi C (2005) p66(shc) is highly expressed in fibroblasts from centenarians. *Mech Ageing Dev* 126: 839-844
 51. Natalicchio A, De Stefano F, Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, Caccioppoli C, Quagliara A, Melchiorre M, Leonardini A, Conserva A, Giorgino F (2009) Involvement of the p66Shc protein in glucose transport regulation in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E228-237
 52. Smith MA, Nunomura A, Lee HG, Zhu X, Moreira PI, Avila J, Perry G (2005) Chronological primacy of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 26: 579-580
 53. Berniakovich I, Trinei M, Stendardo M, Migliaccio E, Minucci S, Bernardi P, Pelicci PG, Giorgio M (2008) p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J Biol Chem* 283: 34283-34293
 54. Arany I, Faisal A, Clark JS, Vera T, Baliga R, Nagamine Y (2010) p66SHC-mediated mitochondrial dysfunction in renal proximal tubule cells during oxidative injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F1214-F1221
 55. Haga S, Terui K, Fukai M, Oikawa Y, Irani K, Furukawa H, Todo S, Ozaki M (2008) Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66(shc) ablation: up-regulation of anti-oxidant and anti-apoptotic proteins. *J Hepatol* 48: 422-432
 56. Lebedzinska M, Karkucinska-Wieckowska A, Giorgi C, Karczmarewicz E, Pronicka E, Pinton P, Duszynski J, Pronicki M, Wieckowski MR (2010) Oxidative stress-dependent p66Shc phosphorylation in skin fibroblasts of children with mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 1797: 952-960
 57. Koch OR, Fusco S, Ranieri SC, Maulucci G, Palozza P, Larocca LM, Cravero AA, Farre SM, De Spirito M, Galeotti T, Pani G (2008) Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab Invest* 88: 750-760
 58. Davol PA, Bagdasaryan R, Elfenbein GJ, Maizel AL, Frackelton AR, Jr. (2003) Shc proteins are strong, independent prognostic markers for both node-negative and node-positive primary breast cancer. *Cancer Res* 63: 6772-6783
 59. Zeviani M, Di Donato S (2004) Mitochondrial disorders. *Brain* 127: 2153-2172
 60. Orsucci D, Filosto M, Siciliano G, Mancuso M (2009) Electron transfer mediators and other metabolites and cofactors in the treatment of mitochondrial dysfunction. *Nutr Rev* 67: 427-438
 61. Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625
 62. Chintapalli J, Yang S, Opawumi D, Goyal SR, Shamsuddin N, Malhotra A, Reiss K, Meggs LG (2007) Inhibition of wild-type p66ShcA in mesangial cells prevents glycoxidant-dependent FOXO3a regulation and promotes the survival phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F523-530
 63. Malhotra A, Vashistha H, Yadav VS, Dube MG, Kalra SP, Abdellatif M, Meggs LG (2009) Inhibition of p66ShcA redox activity in cardiac muscle cells attenuates hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H380-388
 64. Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P, Condorelli M, Sica G, De Rosa G, Pelicci P (2003) Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2112-2116
 65. Finetti F, Pellegrini M, Olivieri C, Savino MT, Paccagnini E, Ginanneschi C, Lanfrancone L, Pelicci PG, Baldari CT (2008) The proapoptotic and antimitogenic protein p66SHC acts as a negative regulator of lymphocyte activation and autoimmunity. *Blood* 111: 5017-5027
 66. Tomilov AA, Bicocca V, Schoenfeld RA, Giorgio M, Migliaccio E, Ramsey JJ, Hagopian K, Pelicci PG, Cortopassi GA (2010) Decreased superoxide production in macrophages of long-lived p66Shc knock-out mice. *J Biol Chem* 285: 1153-1165
 67. Veeramani S, Yuan TC, Lin FF, Lin MF (2008) Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells. *Oncogene* 27: 5057-5068
 68. Biscardi JS, Belsches AP, Parsons SJ (1998) Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. *Mol Carcinog* 21: 261-272
 69. Stevenson LE, Frackelton AR, Jr. (1998) Constitutively tyrosine phosphorylated p52Shc in breast cancer cells: correlation with ErbB2 and p66Shc expression. *Breast Cancer Res Treat* 49: 119-128

70. De S, Razorenova O, McCabe NP, O'Toole T, Qin J, Byzova TV (2005) VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7589-7594
71. Rajendran M, Thomes P, Zhang L, Veeramani S, Lin MF (2010) p66Shc – a longevity redox protein in human prostate cancer progression and metastasis : p66Shc in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29: 207-222
72. Jackson JG, Yoneda T, Clark GM, Yee D (2000) Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential. *Clin Cancer Res* 6: 1135 -1139
73. Zuccato C, Conti L, Reitano E, Tartari M, Cattaneo E (2005) The function of the neuronal proteins Shc and huntingtin in stem cells and neurons: pharmacologic exploitation for human brain diseases. *Ann N Y Acad Sci USA* 1049: 39-50
74. Papadimou E, Moiana A, Goffredo D, Koch P, Bertuzzi S, Brustle O, Cattaneo E, Conti L (2009) p66(ShcA) adaptor molecule accelerates ES cell neural induction. *Mol Cell Neurosci* 41: 74-84
75. Berry A, Greco A, Giorgio M, Pelicci PG, de Kloet R, Alleva E, Minghetti L, Cirulli F (2008) Deletion of the lifespan determinant p66(Shc) improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice. *Exp Gerontol* 43: 200-208
76. Smith WW, Norton DD, Gorospe M, Jiang H, Nemoto S, Holbrook NJ, Finkel T, Kusiak JW (2005) Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins mediates Abeta toxicity. *J Cell Biol* 169: 331-339
77. Lee MS, Igawa T, Chen SJ, Van Bommel D, Lin JS, Lin FF, Johansson SL, Christman JK, Lin MF (2004) p66Shc protein is upregulated by steroid hormones in hormone-sensitive cancer cells and in primary prostate carcinomas. *Int J Cancer* 108: 672-678
78. Veeramani S, Igawa T, Yuan TC, Lin FF, Lee MS, Lin JS, Johansson SL, Lin MF (2005) Expression of p66(Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells. *Oncogene* 24: 7203-7212
79. Camici GG, Schiavoni M, Francia P, Bachschmid M, Martin-Padura I, Hersberger M, Tanner FC, Pelicci P, Volpe M, Anversa P, Luscher TF, Cosentino F (2007) Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5217-5222
80. Pagnin E, Fadini G, de Toni R, Tiengo A, Calo L, Avogaro A (2005) Diabetes induces p66shc gene expression in human peripheral blood mononuclear cells: relationship to oxidative stress. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1130-1136
81. Favetta LA, Robert C, King WA, Betts DH (2004) Expression profiles of p53 and p66shc during oxidative stress-induced senescence in fetal bovine fibroblasts. *Exp Cell Res* 299: 36-48
82. Park YJ, Kim TY, Lee SH, Kim H, Kim SW, Shong M, Yoon YK, Cho BY, Park DJ (2005) p66Shc expression in proliferating thyroid cells is regulated by thyrotropin receptor signaling. *Endocrinology* 146: 2473-2480
83. Bosutti A, Grassi G, Zanetti M, Aleksova A, Zecchin M, Sinagra G, Bio G, Guarnieri G (2007) Relation between the plasma levels of LDL-cholesterol and the expression of the early marker of inflammation long pentraxin PTX3 and the stress response gene p66ShcA in pacemaker-implanted patients. *Clin Exp Med* 7: 16-23
84. Carpi A, Menabo R, Kaludercic N, Pelicci P, Di Lisa F, Giorgio M (2009) The cardioprotective effects elicited by p66(Shc) ablation demonstrate the crucial role of mitochondrial ROS formation in ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 1787: 774-780
85. Giovannini C, Scazzocchio B, Matarrese P, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Casciani S, Dessi MR, Straface E, Malorni W, Masella R (2008) Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J Nutr Biochem* 19: 118-128
86. Russo C, Dolcini V, Salis S, Venezia V, Zambrano N, Russo T, Schettini G (2002) Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein *via* an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277: 35282-35288
87. Capitani N, Lucherini OM, Sozzi E, Ferro M, Giommoni N, Finetti F, De Falco G, Cencini E, Raspadori D, Pelicci PG, Lauria F, Forconi F, Baldari CT (2010) Impaired expression of p66Shc, a novel regulator of B-cell survival, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115: 3726-3736
88. Percy CJ, Brown L, Power DA, Johnson DW, Gobe GC (2009) Obesity and hypertension have differing oxidant handling molecular pathways in age-related chronic kidney disease. *Mech Ageing Dev* 130: 129-138

Role of the p66Shc protein in physiological state and in pathologies

Magdalena Lebedzińska, Jan Suski, Jerzy Duszyński and Mariusz R. Więckowski[✉]

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

[✉]e-mail: m.wieckowski@nencki.gov.pl

Key words: p66Shc, mitochondria, oxidative stress

ABSTRACT

The p66Shc adaptor protein has been in the spotlight of many research groups around the world for over a decade. Experiments conducted in recent years unraveled its structure and enabled the recognition of basic cellular functions. Despite an undoubtedly tremendous progress in the characterization of p66Shc, mechanisms through which this protein potentially impacts the metabolism of mitochondria, and thus the cellular energetics are still waiting to be elucidated. Particularly interesting and profoundly studied is the concept that p66Shc may be a key component of the cell response to oxidative stress which may effectively contribute to the lifespan of the organism. p66Shc phosphorylation at serine 36 triggers a cascade of events leading to an increase in reactive oxygen species (ROS) production. The widely accepted free radical theory of ageing, proposed by Harman in the 1950s, assumes that an uncontrolled increase of ROS may lead to oxidation of fundamental cellular components such as proteins and phospholipids and cause DNA damage. Accumulation of such lesions in cells may unfavorably affect the functions of tissues and organs, leading to pathologies or even sometimes premature death of the organism. Although well experimentally established, knowledge regarding the involvement of the p66Shc protein in the production of ROS and its impact on the lifespan of organisms remains insufficient and requires a lot of additional research. Further investigation will permit a better understanding of the mechanisms governing the processes of aging and the emergence of various pathologies associated with oxidative stress. This work is an attempt to systematize the existing knowledge about the p66Shc protein structure and functions. Another objective was to draw attention to the most interesting aspects and results of *in vivo* and *in vitro* studies in different models in the context of oxidative stress-associated pathologies and in aging.

Andonis Karachitos

Hanna Gałgańska

Hanna Kmita ✉

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

✉ Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: (61) 829 59 02, e-mail: kmita@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 26 lutego 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 11 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: choroba Huntingtona, huntingtyna, stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów

Wykaz skrótów: Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*); Bcl_{XL} (ang. *B cell lymphoma leukemia-1*) – białko Bcl_{XL}; BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) – neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego; CREB (ang. *cAMP response element-binding*) – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP; CuZnSOD – zależna od miedzi i cynku dysmutaza ponadtlenkowa; GPX1 – peroksydaza glutationowa 1; Htt – białko huntingtyna; mHtt – zmutowana wersja białka huntingtyny; MMP (ang. *mitochondrial membrane permeabilization*) – permeabilizacja błon mitochondrialnych; MnSOD – zależna od manganu dysmutaza ponadtlenkowa; NMDA – N-metylo-D-asparaginian; p53 (ang. *tumor suppressor p53*); PGC-1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- γ coactivator 1 α*) – koaktywator receptora PPAR- γ ; PI-3K – kinaza-3 fosfatydoinozytolu; PKB – kinaza białkowa B; RFT (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; UCP – białko rozprzęgające; VDAC – zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej; $\Delta\psi$ – potencjał transbłonowy

STRESZCZENIE

Choroba Huntingtona to choroba neurodegeneracyjna, dziedziczona autosomalnie dominująco, której objawy kliniczne nasilają się z czasem i obejmują między innymi demencję, zaburzenia funkcji poznawczych i płasawicę. Przyczyną choroby jest mutacja genu kodującego białko huntingtynę (Htt), polegająca na zwiększeniu liczby kodonów kodujących glutaminę (powyżej 35) w obszarze końca aminowego (mHtt). Kliniczne objawy są wynikiem narastającej w czasie utraty neuronów, głównie w obszarze prążkowiec, ale także kory mózgowej. Obecnie wzrastająca liczba danych doświadczalnych wskazuje na kluczową rolę dysfunkcji mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona, przy czym upośledzenie funkcji mitochondriów poprzedza prawdopodobnie pojawienie się objawów klinicznych. W niniejszej pracy omówiono proponowane mechanizmy udziału mHtt w dysfunkcji mitochondriów, obejmujące zmiany na poziomie regulacji transkrypcji genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne bądź bezpośrednie oddziaływanie mHtt z białkami mitochondrialnymi. Jednocześnie przedstawiono możliwe strategie terapeutyczne choroby Huntingtona, oparte na przeciwdziałaniu dysfunkcji mitochondriów.

WPROWADZENIE

Choroba Huntingtona to choroba neurodegeneracyjna, dziedziczona autosomalnie dominująco, o częstości występowania 5–10 przypadków na 100 tysięcy. W przebiegu choroby Huntingtona dochodzi do narastającej w czasie utraty neuronów, głównie w obszarze prążkowiec i głębszych warstw kory mózgowej. Kliniczne objawy choroby Huntingtona obejmują płasawicę, utratę masy ciała, demencję oraz zaburzenia psychiczne, takie jak depresja, stany lękowe i nadpobudliwość. Zaliczana jest ona do chorób ekspansji glutaminowych, ponieważ jej przyczyną jest mutacja zachodząca w rejonie kodującym koniec aminowy białka zwanego huntingtyną (Htt), polegająca na zwiększeniu liczby kodonów kodujących glutaminę (CAG) z 6–35 do ponad 35. Powstaje w ten sposób zmutowana wersja białka (mHtt), z wydłużonym ciągiem reszt glutaminy w obszarze końca aminowego. Objawy kliniczne pojawiają się zwykle między 30 i 40 rokiem życia, przy czym jeśli liczba reszt glutaminy ulegnie zwiększeniu do 60 i więcej, objawy te mogą pojawić się wcześniej. Istnieje zatem związek między liczbą reszt glutaminy w rejonie końca aminowego mHtt a czasem wystąpienia i stopniem nasilenia objawów, przy czym dostępne dane wskazują na czas wystąpienia objawów od wczesnego dzieciństwa do 80 roku życia. Do tej pory nie udało się opracować strategii terapeutycznej, która opóźniałaby lub istotnie zwalniała postęp choroby, a stosowane sposoby leczenia zmniejszają jedynie intensywność objawów, przy czym równocześnie wywołują poważne skutki uboczne [1–3].

Huntingtyna jest białkiem charakterystycznym dla kręgowców [4], zlokalizowanym głównie w cytoplazmie, wykazującym aktywność antyapoptotyczną i zdolność oddziaływania z wieloma białkami oraz uczestniczącym w transporcie pęcherzyków w obrębie komórki i czynników transkrypcyjnych między cytoplazmą i jądrem komórkowym [5–7]. W rozwoju choroby Huntingtona dochodzi do ekspresji obu alleli, bez mutacji i z mutacją [7]. Uważa się zatem, że przyczyną pojawienia się objawów chorobowych może być zarówno pojawienie się nowej funkcji mHtt, utrata funkcji przez mHtt, jak i utrata funkcji przez Htt w wyniku oddziaływania z mHtt [1,2]. Toksyczne działanie mHtt wiąże się przede wszystkim z funkcjonowaniem kaspaz i uwolnieniem fragmentu z końca aminowego, zawierającego wydłużony ciąg reszt glutaminy [1,8]. Dlatego w wielu badaniach dotyczących patogenezy choroby Huntingtona wykorzystuje się fragment genu kodującego mHtt, obejmujący tylko ekson 1 [9]. Uzyskane dotychczas dane pozwalają na wskazanie następujących mechanizmów toksycznego działania mHtt: modulacja transkrypcji, agregacja białek, ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, upośledzenie proteolizy i działania proteosomu, uruchomienie apoptozy lub autofagii i dysfunkcja mitochondriów [1,2,10].

DYSFUNKCJA MITOCHONDRIÓW W CHOROBIE HUNTINGTONA

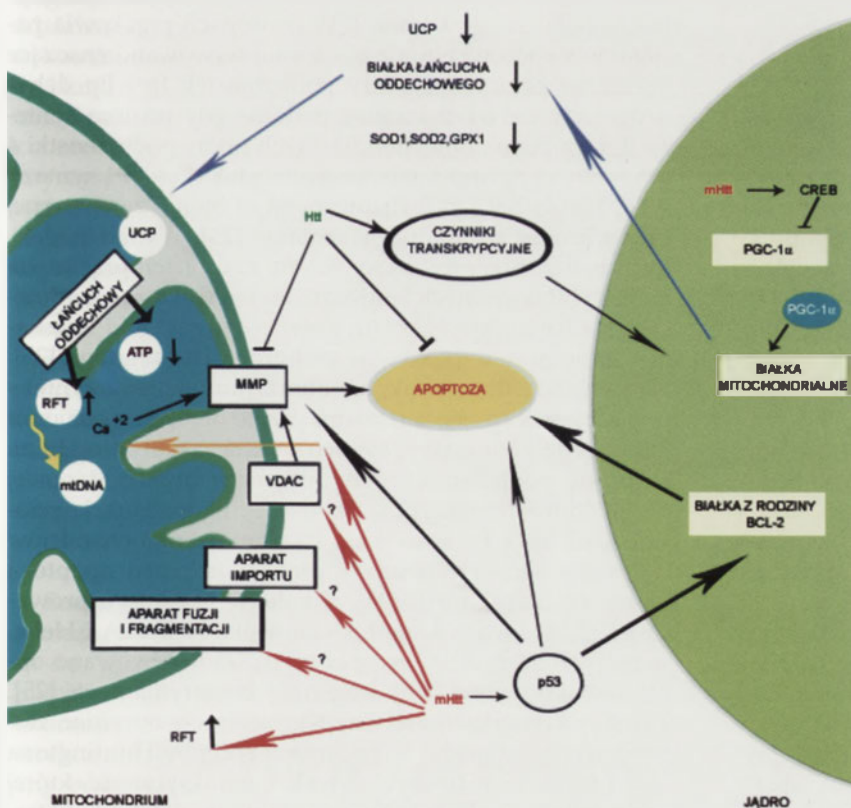
Badania dotyczące roli dysfunkcji mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona prowadzone są od ponad 30 lat. Nie ulega wątpliwości, iż prawidłowe funkcjonowanie neuronów wymaga przede wszystkim ogromnego zasilania energetycznego, realizowanego przez mitochondria. Co więcej, mitochondria uczestniczą także w regulacji stężenia jonów wapnia, które są niezbędne dla regulacji procesu egzocytozy przekaźników nerwowych, jak i w regulacji ekspresji genów. Z drugiej strony, mitochondria są źródłem reaktywnych form tlenu oraz uczestniczą w egzekucji apoptozy. Zatem, prawidłowo funkcjonujące mitochondria są gwarancją „zdrowia” neuronów. O istotnej roli mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona świadczą między innymi utrata masy ciała jak i zwiększenie intensywności glikolizy w obszarach mózgu objętych zmianami chorobowymi [2,10]. Istnieją także doniesienia wskazujące, iż upośledzenie funkcji mitochondriów zapoczątkowuje zmiany prowadzące do pojawienia się objawów chorobowych [10,11]. Badania wykorzystujące genetycznie modyfikowane zwierzęta pozwoliły zidentyfikować następujące zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów, które, co istotne, poprzedzają w czasie inne zmiany chorobowe występujące w patogenezie choroby Huntingtona: (1) od-

ziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną, (2) zmniejszenie syntezy ATP, (3) zmiana wrażliwości na jony wapnia, (4) zwiększona podatność na permeabilizację błon mitochondrialnych (MMP; ang. *mitochondrial membrane permeabilization*) [10]. Zatem, istnieją dane doświadczalne wskazujące na kluczową rolę dysfunkcji mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona. Jednak mechanizm molekularny pojawiających się zmian jest nadal dyskutowany. Sugeruje się, iż są one skutkiem oddziaływania mHtt na mitochondria, które może mieć charakter bezpośredni lub pośredni i polegać na uruchamianiu modyfikacji białek mitochondrialnych lub modyfikacji ekspresji genów kodujących białka kierowane do mitochondriów [10] (Ryc. 1).

mHtt A REGULACJA TRANSKRYPCJI GENÓW JĄDROWYCH KODUJĄCYCH BIAŁKA MITOCHONDRIALNE

Wiadomo, że biogeneza mitochondriów, w tym import białek do błon i macierzy mitochondrialnej są kontrolowane przez liczne, jądrowe czynniki transkrypcyjne i koaktywatory transkrypcji [12]. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują na dysfunkcję mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona jako wtórny skutek zaburzeń na poziomie regulacji transkrypcji genów jądrowych kodujących białka importowane do mitochondriów.

Na przykład wykazano, że mHtt wiąże się z koaktywatorem CBP (białkiem wiążącym białko CREB, ang. *CREB-binding protein*), regulującym m.in. produkcję białek łańcucha oddechowego (oksydaza cytochromowa, cytochrom *c*), zmieniając tym samym funkcjonowanie mitochondriów [13,14]. Obecność mHtt obniża poziom ekspresji, pozostającego pod kontrolą białka CREB, transkrypcyjnego koaktywatora PGC-1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- γ coactivator 1 α*), który pełni kluczową rolę w biogenezie mitochondriów [15,16]. PGC-1 α wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za regulację ekspresji genów jądrowych, kodujących białka mitochondrialne takie jak, cytochrom *c* i podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego. Zwiększona ekspresja genu kodującego PGC-1 α skorelowana jest ze zwiększoną syntezą białek biorących udział w mechanizmach obronnych przed stresem oksydacyjnym w komórce, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD i CuZnSOD), peroksydaza glutationowa (Gpx) i katalaza (Ryc. 1). Co więcej, badania z wykorzystaniem techniki „*PGC-1 α -gene knockdown*” pozwalającej na obniżenie poziomu ekspresji genu kodującego białko PGC-1 α wykazały znaczne obniżenie syntezy CuZnSOD i MnSOD, a także zwiększoną wrażliwość neuronów na toksyczność, indukowaną poprzez 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydynę (MPTP), kwas kainowy oraz agonistów receptorów glutaminergicznych [10,17].



Rycina 1. Schemat podsumowujący udział huntingtyny (Htt) i jej zmutowanej wersji (mHtt) w funkcjonowaniu mitochondriów. Skróty: CREB – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP; GPX1 – peroksydaza glutationowa I; Htt – białko huntingtyna; mHtt – zmutowana wersja białka huntingtyny; MMP – permeabilizacja błon mitochondrialnych; PGC-1 α – koaktywator receptora PPAR- γ ; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD1 – zależna od miedzi i cynku dysmutaza ponadtlenkowa; SOD2 – zależna od manganu dysmutaza ponadtlenkowa; UCP – białko rozprężające; VDAC – zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej. Znaki zapytania oznaczają możliwy mechanizm oddziaływania, wymagający jednak weryfikacji doświadczalnej. Opis w tekście.

Inne badania pokazały również, że PGC-1 α wpływa na ekspresję genów kodujących białka rozprzęgające (UCP, ang. *uncoupling proteins*). Białka rozprzęgające zlokalizowane są w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie obniżają gradient elektrochemiczny $\Delta\mu H^+$. Ich działanie polega zatem na osłabianiu sprzężenia między łańcuchem oddechowym a syntezą ATP [18]. Aktywacja białka UCP1 (termogeniny) w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej ssaków prowadzi do uwalniania dużej ilości ciepła, natomiast UCP2 i UCP3 mogą obniżać produkcję RFT w mitochondriach, a więc chronić komórki przed stresem oksydacyjnym [19]. Obniżenie syntezy PGC-1 α , obniża również syntezę obecnego w komórkach układu nerwowego białka UCP2, o postulowanych właściwościach neuroprotektoryjnych [17]. Poza tym, obecność mHtt powoduje obniżenie poziomu syntezy białka UCP-1, a w transgenicznym mysich modelach choroby Huntingтона zaobserwowano hipotermię, co tylko potwierdza wpływ mHtt na syntezę białek z rodziny UCP [18]. Zatem, obniżenie poziomu białka PGC-1 α w neuronach, zwiększa ryzyko uruchomienia dysfunkcji mitochondriów w wyniku upośledzenia działania białek UCP (Ryc. 1), a w konsekwencji, procesów neurodegeneracyjnych. Na uwagę zasługuje również zaobserwowana w przypadku mysich modeli choroby Huntingтона obniżona synteza białka PGC-1 α w neuronach prądkowia, co może częściowo wyjaśniać mechanizm wybiórczej utraty neuronów w chorobie Huntingтона [3].

mHtt A EGZEKUCJA APOPTOZY

Jedną z funkcji Htt jest prawdopodobnie regulacja apoptozy podczas rozwoju organizmu, natomiast mHtt, może tę istotną funkcję upośledzać [5]. Htt jest substratem dla kinazy białkowej B (PKB), której efektem działania jest zwiększenie proliferacji i zahamowanie apoptozy [20]. PKB może działać w obrębie szlaku sygnalizacyjnego obejmującego także kinazę-3 fosfatydyloinozytolu (PI-3K), który stanowi istotną część mechanizmów antyapoptotycznych. W wyniku aktywacji tego szlaku ulega zwiększeniu poziom syntezy czynników antyapoptotycznych, takich jak białko Bcl_{XL} (*B cell lymphoma leukemia-XL*) lub neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *brain-derived neurotrophic factor*), natomiast synteza białek proapoptotycznych, takich jak Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), ulega osłabieniu. Co ciekawe, wykazano, że szlak obejmujący kinazy PI-3K i PKB przeciwdziała apoptozie neuronów prądkowia [20].

Stwierdzono również, że Htt zapobiega aktywacji kaspazy. Na przykład, Htt wiąże się z białkiem HIP1 (ang. *huntingtin interactor protein-1*), odpowiedzialnym za aktywację kaspazy 3 [21]. Ekspansja poliglutaminowa w mHtt przypuszczalnie ogranicza zdolność wiązania się tego białka z HIP1, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia poziomu tego białka w formie niezwiązanej z Htt i zwiększenia aktywacji kaspazy 3. Co więcej, białko HIP1 niezwiązane z Htt może się wiązać z białkiem Hipp1 (ang. *HIP1 protein interactor*) i tym samym aktywować kaspazę 8, która uczestniczy w proteolitycznej aktywacji białka Bid (ang. *BH3 interacting domain death agonist*). Białko Bid w postaci aktywnej przemieszcza się do mitochondriów, co prowadzi zwykle

do uwolnienia cytochromu c [21]. Htt jest zatem białkiem przeciwdziałającym zjawisku MMP (Ryc. 1).

Wyniki badań wykorzystujących linie komórek człowieka, jak i badań *post mortem* wskazują na wiązanie się mHtt z białkiem p53 i zwiększenie jego syntezy [23]. Obecność mHtt, a co za tym idzie, akumulacja białka p53 w jądrze komórkowym, prowadzi do zwiększonej syntezy proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, w tym Puma (ang. *p53 up-regulated modulator of apoptosis*) oraz Bax, co sprzyja uruchomieniu mitochondrialnej drogi apoptozy, tym samym stanowić może istotny element neurodegeneracji w patogenezie choroby Huntingтона. Co więcej, białko p53 może bezpośrednio oddziaływać na mitochondria i uruchamiać uwolnienie cytochromu c (Ryc. 1) [22]. Obniżenie poziomu syntezy białka p53 przy wykorzystaniu siRNA bądź w wyniku delekcji kodującego go genu, chroni przed neurodegeneracją wywołaną przez mHtt [23].

DEHYDROGENAZA BURSZTYNIANOWA JAKO CEL DZIAŁANIA mHtt

Dehydrogenaza bursztynianowa (kompleks II mitochondrialnego łańcucha oddechowego), zasila proces fosforylacji oksydacyjnej, a także uczestniczy w cyklu Krebsa. Dlatego upośledzenie działania dehydrogenazy bursztynianowej prowadzi do znacznego zmniejszenia syntezy ATP i tym samym do dramatycznego w skutkach deficytu energetycznego komórki. W neuronach prądkowia pacjentów z chorobą Huntingтона zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu syntezy podjednostek Ip i Fp dehydrogenazy bursztynianowej, podczas gdy poziom syntezy innych białek mitochondrialnych (m.in. podjednostki 4 oksydazy cytochromowej, podjednostek części F1 syntazy ATP, białka Bcl_{XL} zlokalizowanego w błonie zewnętrznej i cytochromu c), nie ulegał zmianie [25]. Wyniki podobnych badań przeprowadzonych na neuronach prądkowia szczura infekowanych lentiwirusowym wektorem kodującym koniec aminowy mHtt, potwierdziły wyniki uzyskane dla neuronów pacjentów z chorobą Huntingтона [25]. Na uwagę zasługuje fakt, że obniżeniu poziomu syntezy podjednostek Ip i Fp nie towarzyszyło obniżenie poziomu odpowiednich transkryptów, co wyklucza wpływ mHtt na ekspresję podjednostek dehydrogenazy bursztynianowej na poziomie transkrypcji. Co więcej, nadprodukcja podjednostek Ip i Fp hamowała dysfunkcję mitochondriów i chroniła szczurze neurony prądkowia przed apoptozą wywołaną przez mHtt [24]. Z kolei w badaniach prowadzonych na liniach komórek człowieka Neuro2A i HeLa, w których zachodziła synteza mHtt, zaobserwowano obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej [25]. Także w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, stosowanych jako model w badaniach choroby Huntingтона [26], obecność mHtt wywoływała cytotoksyczność, której przyczyną była głównie zmiana aktywności dehydrogenazy bursztynianowej [9].

W badaniach nad znaczeniem zmian w obrębie dehydrogenazy bursztynianowej w rozwoju choroby Huntingтона na szczególną uwagę zasługuje kwas 3-nitropropionowy (3-NP), nieodwracalny inhibitor tego kompleksu enzymatycznego, od dawna stosowany jako kluczowy element do-

świadczalnego modelu choroby Huntingtona [27]. Systematyczne podawanie 3-NP szczurom i ssakom naczelnym wywołuje wybiórczą utratę neuronów w obszarze prądkowia oraz zaburzenia ruchowe i psychiczne, typowe dla choroby Huntingtona [27,28]. Oprócz podobnego fenotypu, badania toksyczności 3-NP i mHtt ujawniły wspólne mechanizmy patogenezы związane z dysfunkcją mitochondriów, do których należy zaburzona gospodarka wapniowa i aktywacja kaspaz [28]. Jednakże w badaniach toksyczność 3-NP nie zaobserwowano typowych dla mHtt zmian na etapie transkrypcji, podobnych do tych, które obserwuje się w transgenicznych szczurzych modelach choroby Huntingtona [30,31].

ZABURZENIA UDZIAŁU MITOCHONDRIOW W REGULACJI GOSPODARKI WAPNIOWEJ JAKO SKUTEK DZIAŁANIA mHtt

Toksyczność pobudzeniowa (ekscytotoksyczność) towarzysząca chorobie Huntingtona jest wywołana zwiększonym napływem jonów wapnia do komórki na skutek nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA [32]. W warunkach wysokiego stężenia jonów wapnia w cytosolu mitochondria akumulują jony wapnia dzięki obecności w błonie wewnętrznej uniportera wapniowego, transportującego je do macierzy mitochondrialnej zgodnie z gradientem stężenia, co z kolei wymaga obecności potencjału transbłonowego, ($\Delta\psi$) [33]. Dostępne dane wskazują, że upośledzenie udziału mitochondriów w regulacji poziomu jonów wapnia w komórce stanowi istotny czynnik w patogenezы choroby Huntingtona (Ryc. 1). Wyniki badań prowadzonych na mitochondriach limfoblastów pochodzących od pacjentów z chorobą Huntingtona ujawniły znaczny spadek $\Delta\psi$ i depolaryzację wewnętrznej błony w obecności znacznie niższych stężeń Ca^{2+} niż potrzebne do wywołania takiego samego efektu w mitochondriach kontrolnych [34]. Podobne wyniki uzyskano badając mitochondria transgenicznych myszy, u których zachodziła synteza całego białka mHtt, i u których zaburzenia zależnej od mitochondriów gospodarki wapniowej zaobserwowano jeszcze przed wystąpieniem objawów chorobowych [34]. Z kolei wyniki innych doświadczeń [35] świadczą o tym, że mitochondria z mięśni szkieletowych transgenicznych myszy, u których zachodzi synteza mHtt, charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na stres wapniowy, co prowadzi do deficytu energetycznego komórek i w rezultacie zaniku mięśni.

Badania prowadzone na szczurach, u których zachodziła synteza mHtt, pozwoliły na zaobserwowanie destabilizacji $\Delta\psi$, wolniejszego napływu jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej, obniżoną zdolność mitochondriów do akumulacji Ca^{2+} , a także ich obniżone stężenie progowe potrzebne do aktywacji megakanalu mitochondrialnego (PTP, ang. *permeability transition pore*) [36]. Co więcej w obecności mHtt mitochondria neuronów prądkowia są bardzo wrażliwe na indukowany Ca^{2+} spadek $\Delta\psi$, co zwiększa szansę zajścia zjawiska MMP [37]. Podanie inhibitorów deacetylaz białek histonowych (trichostatyna A, maślan sodu) zniósło upośledzenie mitochondrialnej regulacji stężenia Ca^{2+} , co sugeruje, iż wywołane działaniem mHtt upośledzenie udziału mitochondriów w regulacji gospodarki wapniowej obejmuje także etap transkrypcji [38].

ODDZIAŁYWANIE mHtt Z ZEWNĘTRZNĄ BŁONĄ MITOCHONDRIALNĄ

Oddziaływanie mHtt z czynnikami transkrypcyjnymi i koaktywatorami oraz z białkami wewnętrznej błony mitochondrialnej, nie wyjaśnia wszystkich mechanizmów dysfunkcji mitochondriów proponowanych dla patogenezы choroby Huntingtona. Łańcuch oddechowy jest kluczowym elementem umożliwiającym realizację metabolicznych i energetycznych funkcji mitochondriów. Jego funkcjonowanie wymaga sprawnego przebiegu dwóch podstawowych procesów; importu białka i transportu metabolitów. Zatem, dysfunkcja łańcucha oddechowego może być konsekwencją upośledzenia importu białka i/lub transportu metabolitów. Jednym z podstawowych narzędzi wymiany metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą jest kanał VDAC (ang. *voltage dependent anion selective channel*), nazywany również poryną mitochondrialną. Prowadzone od wielu lat badania dotyczące znaczenia kanału VDAC wskazują, iż uczestniczy on w dystrybucji ATP, homeostazie Ca^{2+} i egzekucji apoptozy [39-43]. Co więcej, dzięki wykorzystaniu układu modelowego opartego na drożdżach *S. cerevisiae*, wykazano, iż kanał VDAC pośredniczy w determinacji stanu oksydacyjno-redukcyjnego cytosolu, który z kolei jest istotnym czynnikiem determinującym poziom syntezy białek eliminujących anionorodnik ponadtlenkowy (MnSOD i CuZnSOD), jak i białek wchodzących w skład kompleksów importowych zewnętrznej błony mitochondrialnej [44-46]. W mitochondriach różnych organizmów stwierdzono występowanie izoform białka VDAC, różniących się aktywnością kanałową i prawdopodobnie odgrywających różną rolę [47]. Na przykład, w mitochondriach człowieka występują trzy izoformy białka VDAC, VDAC1, VDAC2 i VDAC3, tworzące funkcjonalne kanały. Syntetyzowane są one w różnych tkankach i narządach, w tym w mózgu, przy czym najniższy ale równocześnie najbardziej jednorodny poziom syntezy występuje w przypadku izoformy VDAC3. Poziom syntezy izoformy VDAC2 jest najwyższy, przy czym równocześnie poziom jej syntezy, podobnie jak w przypadku izoformy VDAC1, jest zróżnicowany, także w przypadku mózgu (<http://biogps.gnf.org>). Co ciekawe, badania proteomiczne mysiego modelu choroby Huntingtona pozwoliły stwierdzić, iż w przebiegu dysfunkcji leżących u podstaw tej choroby dochodzi do intensywnej modyfikacji oksydacyjnej kilku białek, w tym białka VDAC [48]. Zatem, kanał VDAC może odgrywać ważną rolę w mechanizmie śmierci komórek nerwowych, leżącym u podstaw choroby Huntingtona (Ryc. 1).

Co więcej, istnieją doniesienia wskazujące na bezpośrednie oddziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną, prowadzące do powstania agregatów tego białka [34,49,50]. Inne badania wykazały, że koniec aminowy mHtt wpływa bezpośrednio na wyizolowane mitochondria, zaburzając generację $\Delta\psi$ oraz homeostazę wapniową [49-52]. Przypuszcza się więc, że oddziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną może prowadzić do destabilizacji błony i zwiększenia podatności mitochondriów na zjawisko MMP pod wpływem wysokiego poziomu jonów wapnia lub innych czynników proapoptotycznych. Oddziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną może również modyfikować działanie aparatu importu białka do

mitochondriów (Ryc. 1), co mogłoby tłumaczyć obniżenie poziomu podjednostek dehydrogenazy bursztynianowej, przy niezmiennym poziomie mRNA [53]. Zatem, oddziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną może uruchamiać zmiany strukturalne białek mitochondrialnych, co zwiększa ich podatność na modyfikację lub też w miejscach akumulacji mHtt dochodzi do generacji stanu stresu oksydacyjnego [54].

Mitochondria są organellami niezwykle dynamicznymi, zmieniającymi swój kształt, podlegającymi fuzji i fragmentacji [55]. Fuzja, czyli łączenie się mitochondriów, jest procesem niezbędnym dla komunikacji między mitochondriami, ułatwiającym ich przemieszczanie się i dystrybucję w komórce. Fragmentacja umożliwia odnowę, redystrybucję i zwiększenie liczby mitochondriów. Oba procesy podlegają ścisłej kontroli i regulacji poprzez liczne białka występujące w cytosolu i mitochondriach. Do białek zlokalizowanych w zewnętrznej błonie mitochondrialnej należą między innymi błonowe GTPazy – mitofuzyny (MFN1 i MFN2), które uczestniczą w regulacji fuzji, a także białko Fis1, regulujące proces fragmentacji mitochondriów [55]. Coraz częściej sugeruje się, iż zaburzenia w procesach fuzji i fragmentacji mitochondriów mogą inicjować kaskady neurodegeneracyjne [56]. Mocnym argumentem dla tej hipotezy mogą być wyniki badań dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych u człowieka. Przykładem może być tu choroba Charcot-Marie-Tootha typu 2A, dziedziczna neuropatia ruchowo-czuciowa, której przyczyną jest mutacja genu kodującego białko MFN2 [57]. W związku z powyższym zaproponowano [2], że zaburzenia procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów są ściśle związane z dysfunkcją mitochondriów w rozwoju choroby Huntingtona (Ryc. 1). Zatem, Htt przypuszczalnie reguluje procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów poprzez wiązanie się z białkami zaangażowanymi w te procesy, natomiast mHtt może powodować nieprawidłowe działanie tych białek. Co ciekawe, inne badania pozwoliły wykazać, że mHtt wiąże się z białkiem MFN2, najprawdopodobniej zmieniając jego działanie i zwiększając proces fragmentacji mitochondriów prowadząc do apoptozy komórki [58].

STRATEGIE TERAPEUTYCZNE UWZGLĘDNIAJĄCE MITOCHONDRIA – OD TEORII DO ZASTOSOWAŃ

Dostępne dane pozwalają wnioskować, iż istotnym elementem toksycznego działania mHtt jest bezpośrednie bądź pośrednie oddziaływanie tego białka na mitochondria, uruchamiające prawdopodobnie zmiany w obrębie błon mitochondrialnych, prowadzące do zwiększonej produkcji RFT i dysfunkcji łańcucha oddechowego [9]. Teoretycznie, jeżeli zaburzenia prowadzące do dysfunkcji mitochondriów u pacjentów i w zwierzęcych modelach choroby Huntingtona leżą u podstaw uszkodzeń i apoptozy neuronów, można z dużą pewnością stwierdzić, że próby zniwelowania tych zaburzeń mogą przynieść pozytywne skutki terapeutyczne. Podczas gdy szereg badań nad dysfunkcją mitochondriów w chorobie Huntingtona wskazuje na istnienie licznych potencjalnych celów terapeutycznych (np. PGC-1 α lub dehydrogenaza bursztynianowa), niezbędne są przedkliniczne badania, które określą możliwość modulacji działania tych białek *in vivo*. Z praktycznego punktu widzenia, potrzeba

jeszcze wielu lat na opracowanie skutecznej terapii, jednakże już od dawna proponuje się obiecujące strategie terapeutyczne.

W neuronach, w których zachodzi synteza mHtt stwierdzono funkcjonowanie mitochondrialnego szlaku apoptotycznego indukowanego poprzez podlegające akumulacji białko p53 [23]. Redukcja akumulacji białka p53 poprzez wyciszenie ekspresji genu lub z wykorzystaniem farmakologicznego inhibitora PFT (z ang. *pifithrin-a*) eliminowała depolaryzację mitochondrialnej błony wewnętrznej, co przeciwdziałało uruchomieniu apoptozy [23]. W przypadku transgenicznych myszy u których zachodzi synteza mHtt, PFT przywracała prawidłową aktywność mitochondrialnego łańcucha oddechowego [23]. Można zatem przypuszczać, że leki o podobnym działaniu mogą być skuteczne w neuroprotekcji.

Upośledzenie mitochondrialnej regulacji stężenia Ca²⁺ w komórce, obserwowane w liniach komórek człowieka oraz w komórkach mysich modeli choroby Huntingtona, mogłoby być poddane terapii z zastosowaniem inhibitorów deacetylaz białek histonowych (HDAC, ang. *histone deacetylases*), takich jak trichostatyna A lub maślan sodu [38]. Biorąc pod uwagę związek pomiędzy syntezą mHtt a zaburzeniami na poziomie transkrypcji niektórych białek mitochondrialnych, taka terapia mogłaby się okazać bardzo skuteczna [38]. Ku tym założeniom skłaniają również wyniki badań prowadzonych na mysich modelach choroby Huntingtona, w przypadku których kuracja inhibitorami HDAC spowalniała wystąpienie zaburzeń motorycznych oraz zanik neuronów w obrębie prążkowiec [59,60]. Na uwagę zasługuje również inhibitor aktywacji megakanalu mitochondrialnego (PTP), cyklosporyna A, która zapobiega otwarciu się PTP w odpowiedzi na zmiany stężenia Ca²⁺ lub stres oksydacyjny [61]. Badania wykorzystujące transgeniczne myszy syntetyzujących mHtt, wykazały neuroprotektoryjne działanie cyklosporyny A, która chroniła przed wybiórczą utratą neuronów prążkowiec, indukowaną nadmierną aktywacją receptora NMDA [62].

Interesującym kierunkiem badań w poszukiwaniu skutecznej strategii terapeutycznej wydaje się również poszukiwanie odpowiedzi na pytania dotyczące roli upośledzenia funkcji kanału VDAC w patogenezie choroby Huntingtona i określenie tejże zmiany jako wczesnej czy późnej. Prowadzone przez nas badania, we współpracy z zespołem prof. J. Jordana (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Hiszpania), pozwoliły stwierdzić, że zmiany w aktywności kanału VDAC mogą stanowić ważny element neuroprotekcji [63].

Innym, ciekawym kierunkiem badań zmierzających do ustalenia skutecznej terapii w chorobie Huntingtona, jest próba dobrania odpowiednich suplementów, które mogłyby poprawić metabolizm energetyczny neuronów pacjentów z chorobą Huntingtona. Najbardziej obiecująca wydaje się być kreatyna, związek powstający w organizmie endogennie, ale również łatwo wchłaniany przez układ pokarmowy [64]. Suplementacja diety kreatyną w przypadku myszy, u których zachodziła synteza końca aminowego mHtt, zwiększała przeżywalność myszy, zmniejszała zaburzenia

ruchowe oraz zanik neuronów prążkowania [65]. Kreatyna jest dobrze tolerowana przez pacjentów z chorobą Huntingtona. Zaobserwowano również obniżony, w stosunku do pacjentów nie podlegających suplementacji kreatyną, poziom markera stresu oksydacyjnego, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) we krwi [66]. Dalsze, kilkuletnie badania kliniczne wykażą, czy uzupełnienie diety w kreatynę może spowolnić przebieg choroby Huntingtona.

Bezsprzeczny udział w patogenezie choroby Huntingtona przypisuje się również zwiększonemu wytwarzaniu RFT w komórkach [54,67]. Prowadzone w ostatnich latach badania na zwierzęcych modelach choroby Huntingtona z wykorzystaniem związków o działaniu antyoksydacyjnym przyniosły obiecujące wyniki. Na przykład, podawanie askorbinianu myszom, stanowiącym zwierzęcy model choroby Huntingtona spowalniało wystąpienie zaburzeń behawioralnych [68], natomiast terapia z zastosowaniem lipofilnego przeciwutleniacza BN82451 znacznie zwiększała przeżywalność myszy [69]. Najbardziej obiecującym przeciwutleniaczem jest jednak koenzym Q10, który oprócz antyoksydacyjnych właściwości, pełni kluczową rolę w transporcie elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym [70]. Duże ilości koenzymu Q10 podawane myszom, stanowiącym zwierzęcy model choroby Huntingtona, zwiększały ich przeżywalność, hamowały zaburzenia ruchowe, utratę masy oraz zanik neuronów prążkowania [71].

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że mitochondria pełnią kluczową rolę w patogenezie choroby Huntingtona. Istnieje wiele czynników warunkujących toksyczne działanie mHtt, zarówno na poziomie ekscytotoksyczności jak i na poziomie regulacji transkrypcji genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne. Liczne badania wskazują również na bezpośrednie oddziaływanie mHtt z białkami mitochondrialnymi. Co więcej, coraz częściej zauważa się powiązanie pomiędzy dysfunkcją mitochondriów, powodowaną toksycznym działaniem mHtt a selektywnym ubytkiem neuronów prążkowania. Pełne zrozumienie tych mechanizmów jest niezwykle potrzebne dla znalezienia skutecznych strategii terapeutycznych, które opóźniłyby lub istotnie zwalniały postęp choroby. Żadna z dotychczas podjętych prób terapii choroby Huntingtona nie okazała się skuteczna. Dlatego kontynuacja badań skupiających się na oddziaływaniu mHtt na mitochondria to istotny kierunek w poszukiwaniach skutecznej terapii choroby Huntingtona.

PIŚMIENNICTWO

1. Hersch SM, Rosas HD (2008) Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics* 5: 226-236
2. Bossy-Wetzell E, Petrilli A, Knott AB (2008) Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 31: 609-616
3. Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, Calabresi P (2009) Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 151-161
4. Truant R, Atwal RS, Desmond C, Munsie L, Tran T (2008) Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases. *FEBS J* 275: 4252-4262
5. Reiner A, Dragatsis I, Zeitlin S, Goldowitz D (2003) Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol* 28: 259-276
6. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 919-930
7. Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N, DiFiglia M (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 277: 7466-7476
8. Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 22: 7862-7872
9. Solans A, Zambrano A, Rodriguez M, Barrientos A (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Hum Mol Genet* 15: 3063-3081
10. Browne SE (2008) Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann NY Acad Sci USA* 1147: 358-382
11. Saft C, Zange J, Andrich J, Müller K, Lindenberg K, Landwehrmeyer B, Vorgerd M, Kraus PH, Przuntek H, Schöls L (2005) Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov Disord* 20: 674-679
12. Scarpulla RC (2008) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann NY Acad Sci USA* 1147: 321-334
13. Gopalakrishnan L, Scarpulla RC (1994) Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression. *J Biol Chem* 269: 105-113
14. Riley BE, Orr HT (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20: 2183-2192
15. McGill JK, Beal MF (2006) PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* 127: 465-468
16. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127: 59-69
17. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127: 397-408
18. Weydt P, Soyak SM, Gellera C, Didonato S, Weidinger C, Oberkofler H, Landwehrmeyer GB, Patsch W (2009) The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol Neurodegener* 4: 3
19. Jarmuszkiwicz W, Woyda-Ploszczyca A (2008) Mitochondrialne białka rozprzęgające: regulacja i rola fizjologiczna. *Postepy Biochem* 54: 179-187
20. Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278: 50514-50522
21. Majumder P, Chattopadhyay B, Mazumder A, Das P, Bhattacharyya NP (2006) Induction of apoptosis in cells expressing exogenous Hippi, a molecular partner of huntingtin-interacting protein Hip1. *Neurobiol Dis* 22: 242-256
22. Baptiste N, Prives C (2004) p53 in the cytoplasm: a question of overkill? *Cell* 116: 487-489
23. Bae BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward SD, Moran TH, Montell C, Ross CA, Snyder SH, Sawa A (2005) p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47: 29-41

24. Bouchou A, Trioulier Y, Zala D, Gaillard MC, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Dégion N, Brouillet E (2006) Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell* 17: 1652-1663
25. Majumder P, Raychaudhuri S, Chattopadhyay B, Bhattacharyya NP (2007) Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cell Mol Neurobiol* 27: 1127-1145
26. Bocharova N, Chave-Cox R, Sokolov S, Knorre D, Severin F (2009) Protein aggregation and neurodegeneration: clues from a yeast model of Huntington's disease. *Biochemistry (Mosc)* 74: 231-234
27. Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT (1993) Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem* 61: 1147-1150
28. Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59: 427-468
29. Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95: 1521-1540
30. Lee JM, Ivanova EV, Seong IS, Cashorali T, Kohane I, Gusella JF, MacDonald ME (2007) Unbiased gene expression analysis implicates the huntingtin polyglutamine tract in extra-mitochondrial energy metabolism. *PLoS Genet* 3: e135
31. Strand AD, Baquet ZC, Aragaki AK, Holmans P, Yang L, Cleren C, Beal MF, Jones L, Kooperberg C, Olson JM, Jones KR (2007) Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration. *J Neurosci* 27: 11758-11768
32. Fan MM, Raymond LA (2007) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81: 272-293
33. Gunter KK, Gunter TE (1994) Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26: 471-485
34. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5: 731-736
35. Gizatullina ZZ, Lindenberg KS, Harjes P, Chen Y, Kosinski CM, Landwehrmeyer BG, Ludolph AC, Striggow F, Zierz S, Gellerich FN (2006) Low stability of Huntington muscle mitochondria against Ca²⁺ in R6/2 mice. *Ann Neurol* 59: 407-411
36. Gellerich FN, Gizatullina Z, Nguyen HP, Trumbeckaite S, Vielhaber S, Seppet E, Zierz S, Landwehrmeyer B, Riess O, von Hörsten S, Striggow F (2008) Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca²⁺ in transgenic Huntington disease rats. *J Biol Chem* 283: 30715-30724
37. Milakovic T, Johnson GV (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 280: 30773-30782
38. Oliveira JM, Chen S, Almeida S, Riley R, Gonçalves J, Oliveira CR, Hayden MR, Nicholls DG, Ellerby LM, Rego AC (2006) Mitochondrial-dependent Ca²⁺ handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 26: 11174-11186
39. Colombini M (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257: 107-115
40. Lemasters JJ, Holmuhamedov E (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor – thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta* 1762: 181-190
41. Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signaling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 12: 2249-2270
42. Mannella CA, Kinnally KW (2008) Reflections on VDAC as a voltage-gated channel and a mitochondrial regulator. *J Bioenerg Biomembr* 40: 149-155
43. Rostovtseva TK, Bezrukov SM (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr* 40: 163-170
44. Budzinska M, Galganska H, Wojtkowska M, Stobienia O, Kmita H (2007) Effects of VDAC isoforms on CuZn-superoxide dismutase activity in the intermembrane space of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 1065-1070
45. Galganska H, Budzinska M, Wojtkowska M, Kmita H (2008) Redox regulation of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: possible role of VDAC. *Arch Biochem Biophys* 479: 39-45
46. Galganska H, Karachitos A, Wojtkowska M, Stobienia O, Budzinska M, Kmita H (2010) Communication between mitochondria and nucleus: Putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1276-1280
47. Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* 52: 113-118
48. Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA (2006) Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 4: 1849-1861
49. Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome *c* release. *Hum Mol Genet* 13: 1407-1420
50. Orr AL, Li S, Wang CE, Li H, Wang J, Rong J, Xu X, Mastroberardino PG, Greenamyre JT, Li XJ (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci* 28: 2783-2792
51. Bezprozvanny I, Hayden MR (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1310-1317
52. Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinás R, Kristal BS, Hayden MR, Bezprozvanny I (2005) Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2602-2607
53. Damiano M, Galvan L, Dégion N, Brouillet E (2010) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802: 52-61
54. Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45: 667-678
55. Cheung EC, McBride HM, Slack RS (2007) Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. *Apoptosis* 12: 979-992
56. Knott AB, Bossy-Wetzell E (2008) Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci USA* 1147: 283-292
57. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 116: 23-27
58. Wang H, Lim PJ, Karbowski M, Monteiro MJ (2009) Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum Mol Genet* 18: 737-752
59. Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 23: 9418-9427
60. Hockley E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA, Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2041-2046
61. Petersen A, Castilho RF, Hansson O, Wieloch T, Brundin P (2000) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res* 857: 20-29

62. Fernandes HB, Baimbridge KG, Church J, Hayden MR, Raymond LA (2007) Mitochondrial sensitivity and altered calcium handling underlie enhanced NMDA-induced apoptosis in YAC128 model of Huntington's disease. *J Neurosci* 27: 13614-13623
63. Garcia-Martinez EM, Sanz-Blasco S, Karachitos A, Bandez MJ, Fernandez-Gomez FJ, Perez-Alvarez S, de Mera RM, Jordan MJ, Aguirre N, Galindo MF, Villalobos C, Navarro A, Kmitya H, Jordan J (2010) Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. *Biochem Pharmacol* 79: 239-250
64. Ryu H, Rosas HD, Hersch SM, Ferrante RJ (2005) The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. *Pharmacol Ther* 108: 193-207
65. Dedeoglu A, Kubilus JK, Yang L, Ferrante KL, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ (2003) Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* 85: 1359-1367
66. Hersch SM, Gevorkian S, Marder K, Moskowitz C, Feigin A, Cox M, Como P, Zimmerman C, Lin M, Zhang L, Ulug AM, Beal MF, Matson W, Bogdanov M, Ebbel E, Zaleta A, Kaneko Y, Jenkins B, Hevelone N, Zhang H, Yu H, Schoenfeld D, Ferrante R, Rosas HD (2006) Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. *Neurology* 66: 250-252
67. Browne SE, Beal MF (2006) Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8: 2061-2073
68. Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM, Collins K (2003) Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport* 14: 1263-1265
69. Klivenyi P, Ferrante RJ, Gardian G, Browne S, Chabrier PE, Beal MF (2003) Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 86: 267-272
70. Young AJ, Johnson S, Steffens DC, Doraiswamy PM (2007) Coenzyme Q10: a review of its promise as a neuroprotectant. *CNS Spectr* 12: 62-68
71. Smith KM, Matson S, Matson WR, Cormier K, Del Signore SJ, Hagerty SW, Stack EC, Ryu H, Ferrante RJ (2006) Dose ranging and efficacy study of high-dose coenzyme Q10 formulations in Huntington's disease mice. *Biochim Biophys Acta* 1762: 616-626

The role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease

Andonis Karachitos, Hanna Gałgańska, Hanna Kmitya 

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

e-mail: kmitya@amu.edu.pl

Key words: Huntington's disease, huntingtin, oxidative stress, mitochondrial dysfunction

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal-dominant neurodegenerative hereditary disorder that gradually robs affected individuals of memory, cognitive skills and normal movements. It is originated by the mutation of the gene encoding the huntingtin-protein (Htt). Htt with an abnormal stretch of above 35 glutamines in the N terminus (mHtt) results in HD. The observed symptoms result from the selective loss of neurons within the central nervous system, mainly in the striatum but also in the cortex. At present increasing numbers of data indicate that mitochondrial functioning is affected by mHtt and the resulting mitochondrial impairments may occur early enough to contribute to mHtt-induced toxicity and the HD pathogenic mechanism. Here, we review how mHtt might cause mitochondrial dysfunction by either perturbing transcription of nuclear-encoded mitochondrial proteins or by direct interaction with mitochondrial proteins. In addition, we discuss therapeutic opportunities for HD based on protection against mitochondrial dysfunction.

Reaktywne formy tlenu w roślinach – powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału

Renata Szymańska

Kazimierz Strzałka✉

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

✉Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 65 09, e-mail: kazimierzstrzalka@gmail.com

Artykuł otrzymano 12 lutego 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 25 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: antyoksydanty, chloroplasty, przekazywanie sygnału, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny

Wykaz skrótów: AOX – oksydaza alternatywna; APX – peroksydaza askorbinianowa; Asc – askorbinian; CAT – katalaza; Chl – chlorofil; GSH – glutation; GPX – peroksydaza glutationowa; HSPs – białka szoku cieplnego; LHC – kompleksy antenowe; NAD(H) – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; NADP(H) – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; PCD – programowana śmierć komórki; PQ – plastochinon; PSI – fotosystem I; PSII – fotosystem II; qE – zależne od energii niefotochemiczne wygaszanie; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

STRESZCZENIE

Reaktywne formy tlenu (RFT) są stale produkowane w komórkach roślinnych jako uboczne produkty wielu reakcji metabolicznych, związanych z fotosyntezą, fotorespiracją oraz oddychaniem komórkowym. Powstające RFT jako toksyczne dla komórki są usuwane przez szereg komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych, zarówno enzymatycznych jak i nieenzymatycznych. Stres oksydacyjny występuje wówczas, kiedy dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy produkcją RFT a szybkością ich neutralizacji. RFT prowadzą do zniszczeń w obrębie komórki, utleniając tak ważne biocząsteczki jak: lipidy błon komórkowych, białka czy DNA. RFT uczestniczą także w przekazywaniu sygnału poprzez uruchamianie kaskady reakcji w odpowiedzi na czynniki stresowe, bądź wpływając na ekspresję genów. Niniejsza praca stanowi przegląd najnowszej literatury dotyczącej lokalizacji centrów wytwarzania RFT w obrębie chloroplastów, mechanizmów antyoksydacyjnych oraz udziału RFT w przekazywaniu sygnału w komórce roślinnej.

WPROWADZENIE

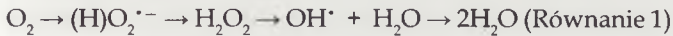
Reaktywne formy tlenu (RFT; ang. *reactive oxygen species*) są wytwarzane w komórkach jako produkt uboczny reakcji zachodzących podczas procesów fotosyntezy, fotorespiracji czy oddychania komórkowego. Wytwarzanie RFT jest wzmożone pod wpływem środowiskowych czynników stresowych takich jak: wysokie natężenie światła, susza, zbyt niska lub zbyt wysoka temperatura, wysokie zasolenie, niedobory mikro- i makroelementów, atak patogenów, działanie herbicydów, obecność metali ciężkich, na które rośliny są narażone w czasie swojego życia. Ponieważ wysoki poziom RFT jest szkodliwy dla komórek, rośliny wykształciły odpowiednie mechanizmy obronne (enzymy antyoksydacyjne, endogenne antyutleniacze). Niebezpieczna sytuacja pojawia się wtedy, kiedy zostaje zachwiana równowaga pomiędzy wytwarzaniem RFT a ich neutralizacją. Szacuje się, że w warunkach stresowych, poziom RFT wzrasta od 3 do 10 razy [1]. Nadmiar RFT powoduje, że obecne w komórkach mechanizmy antyutleniające nie są w stanie obniżyć ich zawartości do bezpiecznego dla komórki poziomu. Dochodzi do niebezpiecznego stanu, określanego mianem stresu oksydacyjnego (ang. *oxidative stress*) [1]. RFT jako cząsteczki reaktywne, powodują utlenienie biocząsteczek takich jak: lipidy, białka, barwniki oraz DNA [2]. Wzmożona peroksydacja lipidów błonowych występuje wówczas, gdy RFT reagują z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, będącymi składnikiem lipidów błon komórkowych, co prowadzi do zniszczenia struktury błony, utraty turgoru komórek, a w efekcie do znacznego rozluźnienia struktury całej tkanki i jej obumarcia [1]. RFT oddziałując z białkami powodują modyfikacje aminokwasów, fragmentację łańcuchów polipeptydowych, ich dalszą agregację lub wytwarzanie wiązań pomiędzy nimi. Oddziaływanie RFT z białkami może także prowadzić do ich proteolizy [1]. RFT generują także uszkodzenia w DNA, powodując utlenienie zasad azotowych, uszkodzenia reszt cukrowych, rozerwanie wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy, co w efekcie prowadzi do pęknięcia nici kwasów nukleinowych i mutacji [3,4].

Odkrycia ostatnich dekad pokazują jednak, że RFT mają dwa oblicza. Jedno z nich jest niebezpieczne, prowadzące do zniszczeń, a nawet śmierci komórki, drugie objawia się istotnym udziałem w przekazywaniu sygnału i kontroli ważnych procesów takich jak: wzrost czy rozwój roślin.

RODZAJE REAKTYWNYCH FORM TLENYCH GENEROWANYCH W KOMÓRCIE ROŚLINNEJ

Życie w atmosferze bogatej w tlen niesie ze sobą potencjalne ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego. Tlen w stanie podstawowym nie stanowi problemu dla komórki, ponieważ jest on stosunkowo mało reaktywny w porównaniu z pochodnymi, jakie tworzy: nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), anionorodnikiem

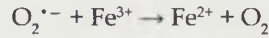
ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$) oraz rodnikiem hydroksylowym ($\cdot OH$). Ten relatywnie stabilny stan podstawowy tlenu jest jego stanem tripletowym, z dwoma niesparowanymi elektronami zlokalizowanymi na różnych orbitalach antywiązących (π^*). Tlen w stanie tripletowym może utleniać inne cząsteczki, jednak pomimo swojej wysokiej reaktywności termodynamicznej, reakcje te są wolne ze względu na ograniczenia spinowe [5]. Tlen cząsteczkowy może zostać przekształcony w formy bardziej aktywne chemicznie albo poprzez transfer energii (wytwarza się wówczas tlen singletowy) albo poprzez reakcje elektronowe, co prowadzi do wytworzenia anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru oraz rodnika hydroksylowego. W czasie redukcji tlenu cząsteczkowego (O_2) (Równanie 1) generowane są RFT [6]. Pierwszy etap tej łańcuchowej reakcji wymaga inicjacji, podczas gdy pozostałe trzy stadia są egzotermiczne i mogą zachodzić spontanicznie, niezależnie od tego czy są katalizowane czy nie [2].



W pierwszym etapie redukcji O_2 powstaje relatywnie krótko żyjący i słabo dyfundujący rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}) oraz anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$. Te tlenowe rodniki są reaktywne, mogą tworzyć hydroksynadtlenki reagując z dienami, jak również utleniać aminokwasy (np. histydynę, metioninę i tryptofan) [2].

Dalsza redukcja O_2 generuje nadtlenek wodoru (H_2O_2), który ma relatywnie długi okres półtrwania (1 ms) [2]. Biologiczna toksyczność H_2O_2 wiąże się z utlenianiem grup tiolowych ($-SH$) oraz utlenianiem jonów metali przejściowych (np. Fe^{2+} do Fe^{3+} , Cu^+ do Cu^{2+}). Utlenianie jonów metali przejściowych prowadzi do powstawania rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$). Schemat reakcji Fentona, w czasie której

Fe^{2+} jest utleniany do Fe^{3+} oraz wytwarza się $\cdot OH$ przedstawiają poniższe równania:



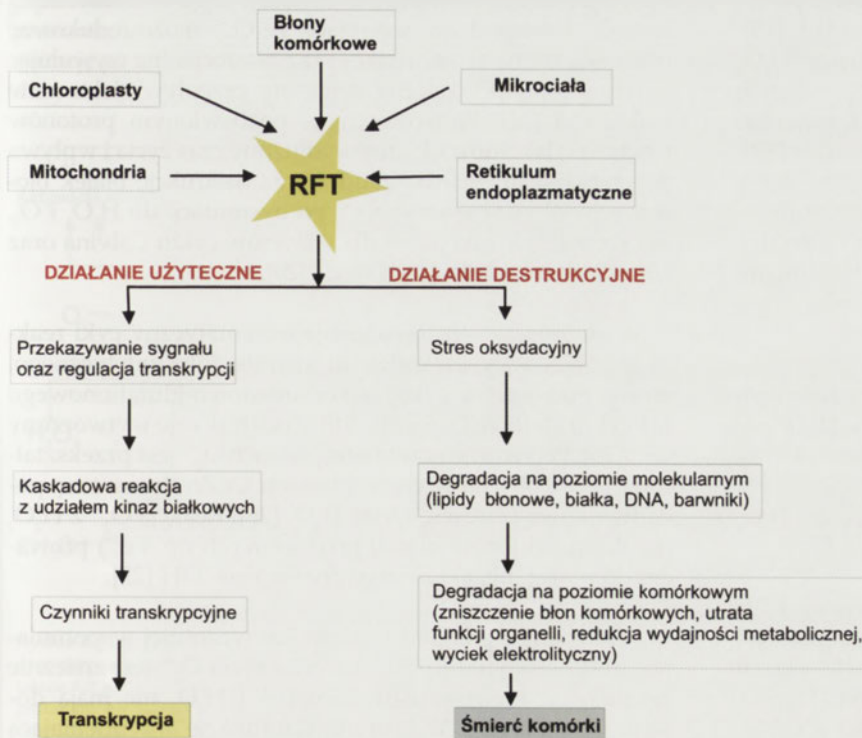
Rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) to jeden z najbardziej reaktywnych utleniaczy znanych obecnie. Jego wysoki potencjał redoks (2,31 V) wskazuje na bardzo silne właściwości utleniające oraz na możliwość reakcji praktycznie ze wszystkimi substancjami występującymi w organizmie [4]. Co więcej, obecnie nie jest znany żaden enzym, zdolny do usuwania tej niezwykle aktywnej chemicznie formy RFT.

Innym rodzajem reaktywnej formy tlenu jest tlen singletowy (1O_2). Jest to cząsteczka tlenu będąca w pierwszym wzbudzonym stanie elektronowym [7]. Powstaje ona w wyniku fotoaktywacji i łatwo utlenia wiele ważnych z biologicznego punktu widzenia cząsteczek, przez co jest toksyczna dla komórek [7]. Tlen singletowy ma krótki okres półtrwania w komórkach – ok. 200 ns [5], przez co reaguje głównie z biocząsteczkami w najbliższym otoczeniu. Obliczono, że 1O_2 może dyfundować na odległość ok. 10 nm [8].

WYTWARZANIE RFT W KOMÓRCIE ROŚLINNEJ ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM CHLOROPLASTÓW

Głównymi miejscami wytwarzania RFT w komórce roślinnej są: mitochondria, chloroplasty, peroksysomy, błony komórkowe oraz apoplast (Ryc. 1) [1]. W przeciwieństwie do mitochondriów zwierzęcych, udział mitochondriów roślinnych w produkcji całkowitej puli RFT w komórce jest niewielki [9]. Może być to związane z obecnością w roślinach alternatywnej oksydazy (AOX; ang. *alternative oxidase*), która tworzy boczne odgałęzienie szlaku cytochromowego na poziomie ubichinonu (UQ) i przenosi elektrony z ubichinolu (UQH_2) wprost na tlen, z pominięciem kompleksów III i IV [9]. Oksydaza alternatywna współzawodniczy zatem z kompleksem cytochromu *bc*, o elektrony, tym samym ograniczając produkcję RFT. Potwierdzeniem tego faktu są dane wykazujące, że H_2O_2 indukuje syntezę AOX [10], z kolei nadprodukcja AOX zmniejsza produkcję RFT, natomiast obniżony poziom AOX prowadzi do 5-krotnego wzrostu poziomu RFT [11].

RFT produkowane są także w peroksysomach gdzie przebiega część reakcji procesu fotooddychania, podczas których generowany jest H_2O_2 . Ponadto w peroksysomach, H_2O_2 powstaje jako produkt uboczny β -oksydacji kwasów tłuszczowych [1]. Trzecim źródłem RFT w peroksysomach jest aktywność oksydazy ksantynowej, która produkuje $O_2^{\cdot-}$ w czasie katabolizmu puryn [1]. Wykazano także, że $O_2^{\cdot-}$ jest wytwarzany w błonach peroksysomów grochu w wyniku indukcji przez NADH lub NADPH [1].



Rycina 1. Miejsca tworzenia RFT w komórce roślinnej oraz fizjologiczne konsekwencje ich obecności.

W siateczce śródplazmatycznej $O_2^{\cdot -}$ wytwarzany jest jako wynik reakcji detoksyfikacyjnych katalizowanych przez cytochrom P450 [1]. RFT są także wytwarzane w błonach komórkowych przez oksydazy NADPH [1] zarówno w warunkach stresu biotycznego jak i abiotycznego [12].

W apoplacie RFT generowane są przez pH-zależne peroksydazy ścian komórkowych, oksydazy szczawianowe i oksydazy aminowe [1]. Wytworzony w apoplacie H_2O_2 może być utylizowany w czasie lignifikacji i wzrostu ściany komórkowej przez związane ze ścianą peroksydazy [3].

Pomimo wielu źródeł RFT w komórce roślinnej, kluczowym miejscem ich wytwarzania są chloroplasty. RFT powstają w czasie przepływu elektronów przez łańcuch fotosyntetyczny, zlokalizowany w błonach tylakoidowych [13]. W jego obrębie miejscami szczególnie aktywnymi w wytwarzaniu RFT są: fotosystem I (PSI) oraz fotosystem II (PSII) [14]. PSII jest nie tylko miejscem gdzie produkowane są RFT, lecz przede wszystkim wytwarzany jest tlen cząsteczkowy. RFT w obrębie PSII tworzą się zarówno w warunkach redukujących (po stronie akceptorowej PSII) jak i utleniających (po stronie donorowej) i są to: $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 oraz $\cdot OH$ [15]. Istnieją dane doświadczalne pokazujące, że w określonych warunkach, np. w przypadku braku lub niecałkowitej redukcji puli plastochinonu po stronie akceptorowej PSII, tlen cząsteczkowy jest redukowany do $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 i $\cdot OH$ [15]. Przenośnikami elektronów, które potencjalnie mogą przeprowadzać redukcję O_2 w tym szlaku są: feofityna (anion feofitynowy; Pheo \cdot) oraz pierwotny chinonowy akceptor elektronowy Q_A^- [15]. Są także doniesienia wskazujące na udział plastochinonu oraz cytochromu b_{559} w redukcji O_2 w obrębie PSII [16,17].

W wyniku dysmutacji $O_2^{\cdot -}$ wytworzonego po akceptorowej stronie PSII powstaje wolny (niezwiązany) H_2O_2 [15]. Dane doświadczalne wskazują, że oprócz wolnego H_2O_2 w czasie oświetlania PSII tworzy się także H_2O_2 w formie związanej [18]. Przypuszczalnie taka forma H_2O_2 powstaje w wyniku interakcji $O_2^{\cdot -}$ z centrami metali obecnymi w PSII. Mogą to być: kompleks manganowy rozkładający wodę (OEC; z ang. *oxygen evolving complex*), cytochrom b_{559} lub żelazo niehemowe [18]. W dalszej kolejności z H_2O_2 na drodze jednoelektronowej reakcji Fentona powstaje $\cdot OH$. Jonami metali katalizującymi tę reakcję w obrębie PSII mogą być: Fe^{2+} , Cu^+ lub Mn^{2+} [15].

Strona donorowa PSII również może być producentem RFT. Wykazano, że błony tylakoidowe poddawane takim zabiegom jak: odpłukiwanie roztworami soli, zmiany pH czy traktowanie wysoką temperaturą, cechują się zwiększonym powstawaniem H_2O_2 [15]. Wytworzony w ten sposób H_2O_2 może być utleniany do $O_2^{\cdot -}$ lub redukowany do $\cdot OH$ [15].

Oprócz produkcji wymienionych wyżej rodzajów RFT, PSII jest głównym miejscem wytwarzania tlenu singletowego (1O_2). Po raz pierwszy powstawanie 1O_2 w tylakoidach pod wpływem światła wykazali Kautsky i Bruijn [19]. 1O_2 powstaje w czasie przechodzenia wzbudzonego stanu tripletonowego cząsteczki chlorofilu ($^3Chl^*$) do stanu singletowego ($^1Chl^*$). Ponieważ $^3Chl^*$ jest cząsteczką relatywnie dłużej ży-

jącą ($\sim 10^{-3}$ s) niż $^1Chl^*$ ($\sim 10^{-8}$ s), zwiększa to prawdopodobieństwo zajścia jego reakcji z tlenem cząsteczkowym (którego stan podstawowy jest stanem tripletonowym), w wyniku której produkowany jest 1O_2 [19]. Głównymi miejscami powstawania 1O_2 w obrębie chloroplastu są: centrum reakcji PSII oraz kompleksy antenowe LHC (ang. *light-harvesting antenna complexes*) [19]. Wytwarzany w tym miejscu 1O_2 może reagować z białkami, barwnikami oraz lipidami prowadząc do utraty aktywności PSII przez degradację białka D1 (białka znajdującego się w centrum reakcji PSII) oraz utlenianie barwników fotosyntetycznych [5]. O ile wytwarzanie tlenu singletowego w obrębie PSII zostało dobrze udokumentowane, to wydaje się, że ta reaktywna forma tlenu nie jest produkowana w obrębie fotosystemu I (PSI) [19].

Fotosystem I jest odpowiedzialny za redukcję O_2 z udziałem światła (tzw. fotoredukcję) [20]. Reakcja przeniesienia elektronu z PSI bezpośrednio na O_2 z wytworzeniem $O_2^{\cdot -}$, znana jest szerzej pod nazwą reakcji Mehlera [21]. Głównym składnikiem biorącym udział w generacji $O_2^{\cdot -}$ oprócz PSI, w warunkach silnego natężenia światła w nienaruszonych chloroplastach, jest reduktaza monodehydroaskorbinianowa (MDHAR), zawierająca FAD jako kofaktor [22]. Enzym ten jest luźno związany z błoną tylakoidu i nie występuje w izolowanych tylakoidach [22]. W związku z tym zasugerowano, że w obrębie PSI $O_2^{\cdot -}$ jest produkowany w aprotocycznym, hydrofobowym wnętrzu błony tylakoidowej z udziałem centrów żelazo-siarkowych Fe-S: F_x oraz $F_{A/B}$ [20]. Dodatkowo, jak wykazał Kruk i współaut. [20] w produkcji $O_2^{\cdot -}$ pośredniczy także witamina K1, będąca jednym ze składników PSI. Ponadto, podczas intensywnie przebiegającej fotosyntezy ferrodoksyna utrzymuje się w stanie zredukowanym i nadmiar elektronów może być bezpośrednio przeniesiony z ferredoksyny na O_2 , wytwarzając w efekcie $O_2^{\cdot -}$ [23]. Utworzony w wyniku tych procesów $O_2^{\cdot -}$ dyfunduje na powierzchnię błony, gdzie ulega protonacji i dysmutacji dając w efekcie H_2O_2 oraz O_2 . Istnieją dane sugerujące, że $O_2^{\cdot -}$ może redukować utlenioną formę cytochromu f oraz plastocjaninę wywołując w ten sposób $O_2^{\cdot -}$ -zależny cykliczny przepływ elektronów wokół PSI [24]. Wytworzony w pozbawionym protonów wnętrzu tylakoidów $O_2^{\cdot -}$ ma wydłużony czas życia i wpływa na szybkość utleniania lipidów oraz destrukcję białek błonowych. W fazie wodnej, $O_2^{\cdot -}$ po dysmutacji do H_2O_2 i O_2 , jest szczególnie toksyczny dla enzymów cyklu Calvina oraz kompleksu rozkładającego wodę [20].

W chloroplastach funkcjonuje enzymatyczny cykl reakcji zapobiegający uszkodzeniu aparatu fotosyntetycznego, znany pod nazwą cyklu askorbinianowo-glutationowego lub cyklu Halliwell-Asady, który neutralizuje wytworzony $O_2^{\cdot -}$ [25]. Wytworzony w chloroplastach $O_2^{\cdot -}$ jest przekształcany przez obecną w chloroplastach $CuZn$ -dysmutazę ponadtlenkową ($ZnCuSOD$) do H_2O_2 [26]. Reakcja $O_2^{\cdot -}$ z H_2O_2 (w obecności jonów metali przejściowych np. Fe^{2+}) prowadzi do powstania aktywnego chemicznie $\cdot OH$ [27].

We wnętrzu tylakoidu, gdzie, jak wcześniej wspomniano, środowisko jest lipofilne, a czas życia $O_2^{\cdot -}$ jest znacznie wydłużony, enzymy usuwające $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 nie mają dostępu do tych RFT. W tym miejscu funkcję antyutleniającą pełnią hydrofobowe związki takie jak: plastochinol (PQH_2), α -tokoferol oraz α -tokoferolochinol [20].

Dane literaturowe wskazują również, że 1O_2 jest generowany przez izolowane kompleksy cytochromowe b_6/f poddane oświetlaniu [28]. Przepuszczalnie w obrębie kompleksu cytochromu b_6/f , miejscem odpowiedzialnym za wytwarzanie 1O_2 nie są cytochromy, a jest nim klaster Fe-S w centrum Rieskiego [28]. Jednakże wpływ 1O_2 produkowanego w tym miejscu na fotohamowanie PSII jest niejasny i wymaga dalszych badań. Co więcej, nieznana jest też funkcja obecnej w kompleksie b_6/f cząsteczki chlorofilu. Być może uczestniczy ona także w wytwarzaniu 1O_2 w tym miejscu i działa jako fotosensybilizator [5].

W chloroplastach występują trzy typy procesów, w których tlen cząsteczkowy jest metabolizowany. Procesy te są ściśle związane z fotosyntezą i są to: i) utleniająca aktywność karboksylazy/oxygenazy rybulozo 1,5-bisfosforanu (Rubisco) w czasie fotooddychania; ii) chlororespiracja; oraz omówiona wyżej iii) reakcja Mehlera czyli bezpośrednia redukcja O_2 przez PSI [9]. W warunkach wysokiej temperatury lub kiedy stężenie wewnątrzkomórkowego CO_2 jest bardzo niskie (np. na skutek bardzo intensywnej fotosyntezy) Rubisco katalizuje reakcje utlenienia, która prowadzi do utworzenia glikolanu, który jest następnie transportowany z chloroplastów do peroksisomów. W peroksisomach oksydaza glikolanowa z udziałem O_2 utlenia glikolan do kwasu glioksalowego, uwalniając H_2O_2 [9].

Chlororespiracja jest alternatywnym procesem przeniesienia elektronów obejmującym redukcję plastochinonu z udziałem dehydrogenazy NAD(P)H oraz utlenianie zredukowanego PQ przez terminalną oksydazę z równoczesnym wytworzeniem wody. Istnienie chlororespiracji wykazano u glonów oraz roślin wyższych. Uważa się, że jest to jeden z mechanizmów fotoprotekcyjnych, który wypełnia swoją funkcję przez utlenianie reduktorów pochodzących ze stromy [29]. Do przenośników elektronowych zaangażowanych w chlororespirację należą, oprócz dehydrogenazy NAD(P)H oraz oksydazy terminalnej, także przenośniki wspólne z fotosyntetycz-

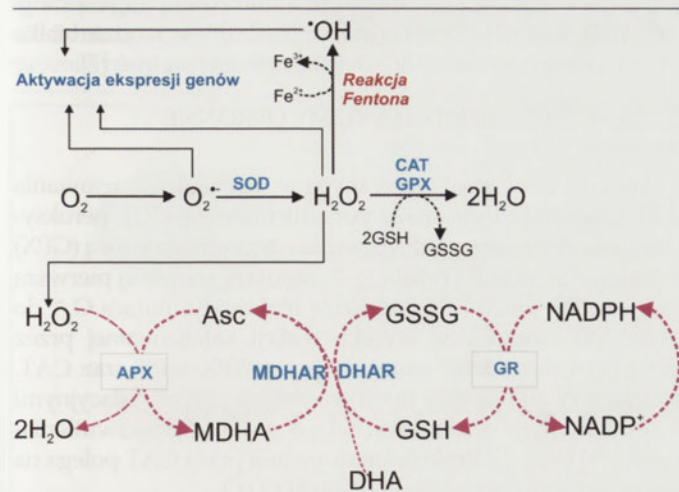
nym łańcuchem transportu elektronów, takie jak: cytochromy $c-553$, b_6 oraz PQ. Wspólne przenośniki są wykorzystywane w ciemności do chlororespiracji, a na świetle do fotosyntezy [30].

MECHANIZMY OBRONNE

NIEENZYMATYCZNE MECHANIZMY OBRONNE

Do nieenzymatycznych antyoksydantów zalicza się dwa bardzo ważne bufony redoks: askorbinian (Asc, witamina C) i glutation (GSH), a także: tokoferole (witamina E), flawonoidy, alkaloidy oraz karotenoidy [9]. O tym jak istotną rolę w zmiataniu RFT pełnią GSH oraz Asc, świadczy znacznie podwyższona podatność na uszkodzenia wywołane różnymi rodzajami stresu u mutantów z obniżonym poziomem Asc oraz zmienioną zawartością GSH [31,32]. Asc bierze udział w cyklu reakcji rozkładających H_2O_2 (cykl Halliwell-Asady). Z całkowitej puli Asc występującego w komórce, aż 30–40% zlokalizowane jest w chloroplastach [33]. Asc jest także skutecznym wygaszaczem 1O_2 [34]. Reakcja Asc z 1O_2 prowadzi do powstania dehydroaskorbinianu (DHA) oraz H_2O_2 , który wchodzi w cykl przemian Halliwell-Asady (Ryc. 2) [33]. Mutant *vtc2 Arabidopsis thaliana*, który posiada tylko 10–30% zawartości Asc występującego u typu dzikiego jest światło-wrażliwy, a także nasiloną jest u niego peroksydacja lipidów [7]. Mutant *vtc2* zaaklimatyzowany do wysokiego natężenia światła wykazuje podwyższony poziom GSH, co może świadczyć o próbie kompensacji przez GSH niedoborów Asc. Jednakże w porównaniu z Asc, GSH posiada znacznie mniejszą zdolność do wygaszania 1O_2 , czym można tłumaczyć występowanie u mutantu *vtc2* chronicznych objawów stresu oksydacyjnego [33]. Jednakże trudno wiązać niedobór witaminy C jedynie z obniżoną zdolnością do dezaktywacji 1O_2 , ponieważ jak wspomniano wcześniej, Asc bierze udział w wielu mechanizmach antyoksydacyjnych takich jak: fotokonwersja wiolaksantyna/zeaksantyna, regeneracja rodnika tokoferolowego, czy cykl Halliwell-Asady [33].

Karotenoidy mają największe znaczenie w wygaszaniu 1O_2 , choć ich rola w likwidacji innych RFT także została potwierdzona [7]. W PSII, który jest głównym miejscem tworzenia 1O_2 , występują liczne ksantofile, tj. luteina, wiolaksantyna, neoksantyna i zeaksantyna. Wykazano, że występująca w największych ilościach luteina (ok. 60% wszystkich ksantofili) jest niezbędna do wydajnego wygaszania $^3Chl^*$ oraz 1O_2 w LHCII [7]. Izolowane anteny LHCII z pozbawionego luteiny mutantu *lut2 Arabidopsis thaliana* poddawane stresowi świetlnemu były znacznie bardziej podatne na uszkodzenia, niż LHCII izolowane z typu dzikiego [35]. Co ciekawe, całe rośliny mutantu *lut2* w warunkach stresu świetlnego nie wykazywały różnic w odniesieniu do kontroli [35]. To zjawisko tłumaczone jest działaniem kompensacyjnym zeaksantyny, która akumuluje się w liściach mutantu *lut2* i prawdopodobnie to ona przejmuje funkcje antyoksydacyjne luteiny [35]. Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, że podwójny mutant, pozbawiony zarówno luteiny jak i zeaksantyny, jest niezmiernie wrażliwy na stres świetlny [35]. Spośród karotenoidów biorących udział w fotoprotekcji, kluczową rolę pełni zeaksantyna. Tworzy się ona na świetle z wiolaksantyny przy udziale deepoksydazy wiolaksantyny w tzw. cyklu ksantofilowym [36]. Cykl ksantofilowy jest jednym z



Rycina 2. Schemat powstawania RFT, aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz aktywacja ekspresji genów. SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; CAT – katalaza; GPX – peroksydaza glutationowa, GSH – glutation; GSSG – utleniony glutation; APX – peroksydaza askorbinianowa; Asc – askorbinian; MDHA – monodehydroaskorbinian; DHA – dehydroaskorbinian; MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa; DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa; GR – reduktaza glutationowa; NADPH – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy.

elementów niefotochemicznego wygaszania (qE; ang. *energy-dependent non-photochemical quenching*) [7]. Poza cyklem ksantofilowym, zeaksantyna pełni także funkcję antyoksydacyjną: wygasza RFT oraz chroni lipidy przed utlenieniem [7]. Innym karotenoidem, zaangażowanym w działalność antyoksydacyjną jest neoksantyna. Wyniki badań sugerują, że bierze ona udział w ochronie PSII przed $O_2^{\cdot-}$, dyfundującym z tylakoidów stromy do gran [37].

Innymi skutecznymi przeciwutleniaczami są tokoferole. Należą one wraz z tokotrienolami do kompleksu witaminy E. Wykazano, że w roślinach tokoferole i tokotrienole usuwają rodnikowe produkty utleniania lipidów, wygaszają 1O_2 oraz usuwają RFT [38,39]. Tokoferole i tokotrienole neutralizują powstające w czasie utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) rodniki nadtlenkowe lipidów, poprzez przeniesienie atomu wodoru ze swojej grupy -OH, który przyłącza się do rodnika lipidowego. W wyniku przeniesienia atomu wodoru tworzą się rodniki tokoferoksyłowe lub tokotrienoksyłowe, które są regenerowane przez Asc do form wyjściowych [39]. Jedną z form tokoferoli – α -tokoferol jest efektywnym wygaszczem 1O_2 wytworzonego w PSII [34]. α -Tokoferol jest także zaangażowany w chemiczną reakcję usuwania 1O_2 [34]. W czasie tej reakcji powstaje epoksyd tokoferylchinonu oraz α -tokoferylchinon. Ten ostatni w postaci zredukowanej (jako α -tokoferylchinol), także posiada silne właściwości przeciwutleniające [40,41].

Związkiem o charakterze antyoksydacyjnym jest także zredukowana forma plastochinonu, plastochinol (PQH₂) [41]. Wygaszanie 1O_2 przez PQH₂ jest prawie równie efektywne jak wygaszanie przez α -tokoferol [34]. Kruk i współaut. [42] wykazali, że PQH₂, podobnie jak tokoferol, pełni rolę ochronną w stosunku do PSII w warunkach stresu świetlnego przez wygaszanie 1O_2 generowanego przez $^3Chl^*$ w centrum reakcji. PQH₂ jest ponadto głównym prenylochinonem wytwarzanym w odpowiedzi na stres świetlny w *Arabidopsis thaliana* [43].

Dane literaturowe ostatnich lat wykazują, że skutecznym wygaszczem 1O_2 jest także witamina B₆ (pirydoksyna) [44]. Po raz pierwszy udział witaminy B₆ w tym procesie wykazano u grzybów z rodzaju *Cercospora*. Ponadto dowiedziano, że gen *PDX1 Arabidopsis* kodujący syntazę pirydoksyny jest zaangażowany w tolerancję rośliny na warunki stresowe [7].

MECHANIZMY ZAPOBIEGAJĄCE POWSTAWANIU TLENU SINGLETOWEGO

Tlen singletowy może reagować z białkami, barwnikami oraz lipidami i prawdopodobnie jest najgroźniejszą formą RFT prowadzącą do utraty aktywności PSII przez degradację białka D1 oraz niszczenie barwników fotosyntetycznych [5]. Sądzi się, że degradacja białka D1 jest fizjologiczną ochroną przed niekontrolowanym zniszczeniem całego kompleksu PSII. Kontrolowana destrukcja białka D1 jest uważana za swoisty „zawór bezpieczeństwa” detoksykujący 1O_2 w miejscu jego wytworzenia [45]. Uszkodzone białko D1 jest degradowane, a jego miejsce w PSII zajmuje nowo syntetyzowane białko D1 [5,19]. W komórkach roślinnych istnieje kilka ochronnych mechanizmów zapobiegających

powstawaniu 1O_2 . Głównym zadaniem tych mechanizmów jest likwidacja potencjalnych źródeł 1O_2 , czyli cząsteczek chlorofilu we wzbudzonej formie trypletowej ($^3Chl^*$) i singletowej ($^1Chl^*$). Kiedy energia wzbudzenia absorbowana przez anteny chloroplastowe przewyższa fotochemiczne zapotrzebowanie, czas życia $^1Chl^*$ zostaje wydłużony, co z kolei zwiększa prawdopodobieństwo jego konwersji do $^3Chl^*$, a to w efekcie sprzyja produkcji 1O_2 [19]. Aby zredukować do minimum ten niepożądany proces, rośliny wytworzyły specyficzny, natychmiastowo indukowany mechanizm wygaszający $^1Chl^*$ w antenach PSII, w momencie kiedy energia zostanie zaabsorbowana w nadmiarze [7]. W tym zależnym od energii niefotochemicznym wygaszaniu (qE) dochodzi do bezpromienistej dezaktywacji cząsteczek $^1Chl^*$, czego efektem jest emisja nadmiaru energii w postaci ciepła [7].

Innym sposobem na zapobieżenie powstawaniu 1O_2 jest likwidacja powstałego już $^3Chl^*$. Odbywa się to poprzez fizyczne wygaszenie $^3Chl^*$ przez karotenoidy obecne w LHC. W wyniku tego oddziaływania powstają trypletowe formy karotenoidów, które powracają do stanu podstawowego emitując ciepło [7]. Jednakże, podstawowym warunkiem wygaszania $^3Chl^*$ przez karotenoidy jest ich bliski kontakt, ponieważ przeniesienie energii stanu trypletowego następuje na zasadzie mechanizmu wymiennego, którego efektywność maleje wykładniczo wraz z odległością [7].

Mechanizmem ograniczającym produkcję 1O_2 w obrębie chloroplastu jest również likwidacja niezwiązanego (wolnego) chlorofilu oraz jego prekursorów, które są niekontrolowanymi generatorami 1O_2 [7]. Istnieje kilka fizjologicznych sytuacji powodujących pojawienie się chlorofilu w wolnej formie: zieleń etiolowanych siewek, przekształcanie chloroplastów w chromoplasty podczas dojrzewania owoców czy uwalnianie wolnego chlorofilu przez fotosystem w warunkach stresu świetlnego. Rośliny wykształciły mechanizm wychwytyjący uwolniony chlorofil, a przez to zabezpieczający komórki przed 1O_2 , poprzez produkcję białek specyficznie wiążących barwniki (PBP; z ang. *pigment-binding protein*). Do białek funkcjonujących jako zmiataacze wolnego chlorofilu należą: ELIP (z ang. *early light-induced proteins*) oraz rozpuszczalne w wodzie białko WSCP (z ang. *water-soluble chlorophyll-binding protein*) [7].

ENZYMATYCZNE MECHANIZMY OBRONNE

Do enzymów zaangażowanych w mechanizmy usuwania RFT zaliczamy: dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), peroksydazę askorbinianową (APX), peroksydazę glutationową (GPX) oraz katalazę (CAT) (Tabela 1). Dysmutazy stanowią pierwszą linię obrony przed RFT, katalizują reakcję dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 . Wytworzony w wyniku reakcji katalizowanej przez SOD H_2O_2 jest z kolei usuwany przez APX, GPX oraz CAT. Katalazy (CAT) są głównymi enzymami antyoksydacyjnymi i nieodzownym składnikiem całego systemu przeciwutleniającego [1] (Ryc. 2). Reakcja katalizowana przez CAT polega na bezpośrednim rozkładzie H_2O_2 do H_2O i O_2 .

Reakcje przeprowadzane z udziałem APX oraz GPX są bardziej skomplikowane i wymagają sprawnego systemu regeneracji Asc oraz GSH [9]. Wytworzony w chloroplastach H_2O_2 jest usuwany przez peroksydazę askorbinianową (APX), z którą współdziałają reduktaza dehydroaskorbi-

Tabela 1. Rodzaje enzymów antyoksydacyjnych i reakcje przez nie katalizowane

Enzym	Numer EC	Katalizowana reakcja
dysmutaza ponadtlenkowa	1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
katalaza	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
peroksydaza glutationowa	1.11.1.12	$2GSH + R-OOH \rightarrow GSSG + R-OH + 2H_2O$
peroksydaza askorbinianowa	1.11.1.11	$Asc + H_2O_2 \rightarrow DHA + 2H_2O$
reduktaza monodehydroaskorbinianowa	1.6.5.4	$NADH + 2MDHA \rightarrow NAD^+ + 2Asc$
reduktaza dehydroaskorbinianowa	1.8.5.1	$2GSH + DHA \rightarrow GSSG + Asc$
reduktaza glutationowa	1.6.4.2	$NADPH + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$

nianiowa regenerująca Asc kosztem utlenienia GSH, a także reduktaza glutationowa przeprowadzająca regenerację GSH kosztem NADPH [1,4]. Cykl sprzężonych reakcji katalizowanych przez te enzymy nosi nazwę cyklu Halliwell-Asady [15,26]. Lokalizacja APX oraz innych enzymów antyoksydacyjnych wskazuje, że chloroplasty redukują H_2O_2 z udziałem APX wykorzystując elektrony pochodzące z rozkładu wody w obrębie PSII [14]; inna nazwa dla cyklu tych reakcji to cykl woda-woda [15,25,26].

UDZIAŁ RFT W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW

Początkowo RFT traktowane były tylko jako toksyczne, uboczne produkty tlenowego metabolizmu, które dzięki obecności antyutleniaczy i enzymów antyutleniających są skutecznie usuwane z komórki. Dzięki badaniom ostatnich lat udało się odkryć nową, niezmiernie ważną funkcję RFT – udział w przekazywaniu sygnałów w komórce roślinnej, co z kolei przekłada się na kontrolę tak istotnych procesów jak: wzrost, rozwój, cykl komórkowy, ruchy aparatów szparkowych, odpowiedź na stres biotyczny i abiotyczny oraz programowana śmierć komórki (PCD, ang. *programmed cell death*) [1,46,47]. Ta dualistyczna funkcja RFT możliwa jest dzięki istnieniu równowagi pomiędzy ich produkcją a zmiataniem. W kontrolę nad utrzymaniem takiej sytuacji zaangażowana jest ogromna liczba genów, określanych jako „sieć genów zaangażowanych w kontrolę RFT” (z ang. *ROS gene network*) [48]. Przykładowo, w *Arabidopsis thaliana* w regulację produkcji/wygaszania RFT zaangażowanych jest ponad 150 genów [49]. W utrzymaniu komórkowej homeostazy RFT oprócz białek i enzymów, niezmiernie ważną rolę pełnią również niskocząsteczkowe

przeciwutleniacze jak np. askorbinian, glutation czy tokoferol. Antyutleniacze te zachowują się jak bufory stanu redoks komórki i mogą wpływać na ekspresję genów związanych ze stresem biotycznym i abiotycznym [46].

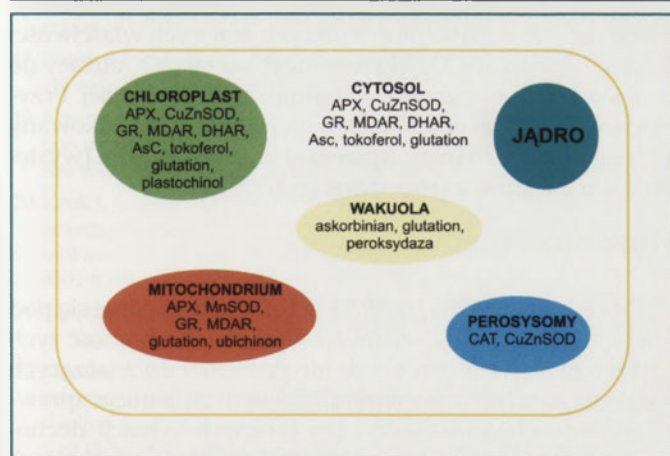
Potwierdzeniem udziału RFT w regulacji takich procesów jak: wzrost, rozwój, ruchy aparatów szparkowych, odpowiedź na stres biotyczny i abiotyczny są wyniki eksperymentów przeprowadzonych z użyciem mutantów pozbawionych katalazy (CAT) 1 i 2, peroksydazy askorbinianowej 1 (APX1), tylakoidowej peroksydazy askorbinianowej APX (tAPX), alternatywnej oksydazy mitochondrialnej (AOX), CuZn-dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD) oraz oksydaz NADPH [50-54].

Z kolei doświadczenia z użyciem mikromacierzy przeprowadzone na mutantach pozbawionych enzymów antyoksydacyjnych wykazały, że 1O_2 , $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 zaangażowane są w regulację ekspresji wielu genów [52,55-57]. Co więcej, identyfikacja roślinnego homologu oksydaz NADPH związanych z wybuchem tlenowym (Rboh, ang. *respiratory burst NADPH oxidases*) wykazała, że komórki roślinne są w stanie inicjować lub wzmacniać wytwarzanie RFT na potrzeby przekazywania sygnałów [47].

Swoją rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce roślinnej RFT mogą pełnić poprzez: i) receptory białkowe (jak dotąd niezidentyfikowane); ii) redoks-wrażliwe czynniki transkrypcyjne, jak np. czynniki transkrypcyjne szoku cieplnego (HSPs) oraz iii) bezpośrednie hamowanie fosfataz przez RFT [48]. W tym ostatnim przypadku przekazywanie sygnałów, w którym pośredniczą RFT odbywa się z udziałem heterotrimerycznego białka G, fosforylacji białek regulowanych przez specyficzne kinazy MAP oraz białkowe fosfatazy tyrozynowe [46]. Podstawy biochemiczne i strukturalne aktywacji kinaz przez RFT są nadal w sferze badań, jednakże wydaje się, że kluczową rolę pełni tu utlenianie grup tiolowych [58].

Czynniki transkrypcyjne szoku cieplnego (HSP) kodowane są w roślinach przez liczną rodzinę genów. W *Arabidopsis thaliana* jak dotąd stwierdzono 21 genów HSP, a w ryżu i soi nawet więcej [59]. HSP są nie tylko aktywowane w czasie stresu cieplnego, ale także w odpowiedzi na wiele innych rodzajów stresów abiotycznych oraz biotycznych. Szacuje się, że różne HSP są aktywowane w odpowiedzi na różne rodzaje warunków stresowych [1,59]. Wykazano, że kilka HSP jest zaangażowanych w aktywację sieci genów zaangażowanych w kontrolę RFT w czasie warunków stresowych. Na przykład nadekspresja HSPA1b w roślinach powoduje zwiększenie poziomu APX w czasie stresu cieplnego [60]. Ponadto HSPA2, HSPA4a, HSPA8, które są zdolne do aktywacji genów, mogą także odgrywać rolę czujników H_2O_2 [61].

Pomimo, że bardzo trudno jest testować biologiczną aktywność każdej z RFT z osobna, istnieją dane sugerujące, że każda z nich może mieć inny udział w przekazywaniu sygnałów w roślinach [27]. Na poziomie transkrypcyjnym geny aktywowane przez 1O_2 u mutantu kontrolowanej fluorescencji *flu Arabidopsis thaliana* poddanego cykлом ciemność/światło,



Rycina 3. Lokalizacja antyoksydantów w komórce roślinnej. SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; CAT – katalaza; APX – peroksydaza askorbinianowa; Asc – askorbinian; MDHA – monodehydroaskorbinian; MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa; DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa; GR – reduktaza glutationowa.

różnią się od genów, które aktywowane są w warunkach nagromadzenia $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 [27,62]. Wyniki te wyraźnie wskazują, że odpowiedź rośliny na stres, w której pośrednikiem jest 1O_2 , jest różna od tej, w której uczestniczy $O_2^{\cdot -}$ oraz H_2O_2 [62]. W komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* hodowanych w warunkach stresu świetlnego, kiedy produkcja 1O_2 przewyższa możliwości jego wygaszania, dyfunduje on na zewnątrz chloroplastów i aktywuje mechanizm sygnałowy poprzez indukcję syntezy peroksydazy glutationowej kodowanej w jądrze [63]. Zaproponowana ostatnio teoria zakłada, że sygnał stresowy z chloroplastów może być przekazywany do jądra poprzez wspólne działanie dwóch białek: EXECUTER1 (odpowiedzialnego za percepcję 1O_2 w chloroplastach) oraz EXECUTER2 (kontrolującego aktywność EXECUTER1) [64,65].

Śmierć komórki jest nieodzownym zjawiskiem w cyklu życiowym roślin. Proces ten jest realizowany na dwa sposoby: poprzez tzw. programowaną śmierć komórki (PCD) oraz nekrozę. PCD, w przeciwieństwie do nekrozy, jest kontrolowana na poziomie genetycznym [2,66]. Pierwszy bezpośredni dowód na udział RFT w indukowaniu śmierci komórek roślinnych poprzez inicjację szlaku przekazywania sygnałów, przyniosły eksperymenty z wykorzystaniem kultur komórkowych soi [2]. Nadtlenuk wodoru w stężeniu 5 mM zapoczątkowywał proces śmierci komórkowej [2]. Gen *LS1* (ang. *lesion-stimulating disease*) jest jednym z głównych genów regulujących proces PCD. U *Arabidopsis thaliana* ze zmutowanym tym genem (mutant *lsd1*) to $O_2^{\cdot -}$, a nie H_2O_2 indukuje kaskadę reakcji prowadzących do PCD [67], co świadczy, że obie te formy mają udział w programowanej śmierci komórki.

Prace ostatnich lat wykazały również inne, nowe funkcje RFT. Okazało się, że RFT pośredniczą w indukowanym kwasem abscysynowym (ABA) zamykaniu aparatów szparkowych. ABA jest fitohormonem, który akumuluje się w komórkach w odpowiedzi na stres wodny. U *Arabidopsis thaliana* w komórkach szparkowych, w przekazywanie sygnałów zależne od ABA zaangażowany jest H_2O_2 . Akumulacja RFT stymulowana przez ABA prowadzi do zamykania aparatów szparkowych poprzez aktywację kanałów wapniowych w błonie komórkowej [68].

Oprócz udziału w zamykaniu aparatów szparkowych, RFT partycypują także w przekazywaniu sygnałów zależnym od auksyn i grawitropizmie korzeni u kukurydzy [69]. Okazało się również, że rośliny pasożytnicze wykorzystują RFT do rozpoznawania rośliny – gospodarza [70]. Ponadto wykazano, że $O_2^{\cdot -}$ produkowany przez oksydazę NADPH bierze udział w regulacji wydłużania się korzeni [58]. Korzenie mutantu *RHD2 Arabidopsis thaliana* (z ang. *root hair defective2*) pozbawione białka AtrbohC (*RDH2*) niezbędnego w procesie wydłużania się korzeni, wykazują zwiększony poziom RFT o 20% oraz znaczne zmniejszenie ich długości w porównaniu z typem dzikim [71]. Wiele wskazuje również na udział RFT produkowanych przez oksydazę NADPH, w kontroli wzrostu innych organów. Pokazano, że odpowiednie stężenie RFT (głównie H_2O_2) w strefie elongacyjnej liści kukurydzy (*Zea mays*) jest warunkiem koniecznym ich powiększania się. Zahamowanie produkcji RFT z użyciem difenylenojodoniny (inhibitora enzymów zawierających flawiny, w tym oksydazy NADPH) hamowało także w znacznym stopniu ich wzrost [72]. Co więcej, transge-

niczne rośliny z antysensownym konstruktem dla oksydazy NADPH nie tylko wykazywały jej obniżoną aktywność oraz niski poziom RFT, ale także posiadały wiele morfologicznych defektów, jak np. ograniczony wzrost wierzchołkowy prowadzący do rozgałęziania się, zmiany kształtu liści i zwijania się blaszek liściowych [73]. Dane te sugerują, że RFT wpływają nie tylko na wzrost komórek, ale także wiele innych procesów, choć mechanizm ich działania w wielu przypadkach pozostaje nadal tajemnicą [58].

UDZIAŁ RFT W ODPOWIEDZI ROŚLINY NA ATAK PATOGENÓW

RFT odgrywają znaczącą rolę w indukowaniu mechanizmów obronnych w warunkach stresu biotycznego oraz abiotycznego [2] (patrz rozdział: *Mechanizmy obronne*). Najlepiej znanym przykładem jest udział RFT w odpowiedzi rośliny na atak patogenów. Podczas infekcji, błonowa oksydaza NADPH jest aktywowana i wytwarza anionorodniki ponadtlenkowe, które poprzez spontaniczną reakcję dysmutacji lub katalizowaną przez SOD tworzą H_2O_2 . Udział H_2O_2 w ochronie rośliny podczas ataku patogenów odbywa się na trzy sposoby: i) wysoki poziom H_2O_2 jest toksyczny zarówno dla patogenu jak i komórek roślinnych – zabijane są komórki zaatakowane oraz otaczające miejsce infekcji w celu zahamowania rozprzestrzeniania się patogenu [74]; ii) H_2O_2 może służyć jako substrat dla krzyżowych reakcji prekursorów ligninowych, przez co wzmocnieniu ulega ściana komórkowa i w ten sposób spowalnia rozprzestrzenianie się patogenu i utrudnia ponowną infekcję; iii) ponieważ H_2O_2 jest dość stabilną cząsteczką i łatwo dyfunduje przez błony (w przeciwieństwie do $O_2^{\cdot -}$), jest odpowiednim czynnikiem dla pełnienia roli cząsteczki sygnałowej w czasie odpowiedzi rośliny na stres (w tym przypadku ataku mikroorganizmu) i uruchomienia kaskady reakcji obronnych [2].

Nie tylko H_2O_2 bierze udział w reakcjach rośliny na atak patogenów. W komórkach roślinnych w interakcje roślin-patogen zaangażowany jest także 1O_2 . Odpowiedzią rośliny na atak patogenu jest produkcja fitoaleksyn, jak na przykład chromoforów fenalenonowych, które są fotosensybilizatorami wykorzystującymi 1O_2 do produkcji fototoksyn, niszczących patogeny [75]. Niektóre gatunki roślin stale produkują różne rodzaje metabolitów wtórnych mających właściwości fotosensybilizujące. Dzięki temu wytwarzają 1O_2 służący do zwiększenia skuteczności ich obrony antybakteryjnej. Przykładem tego rodzaju fototoksyn są: psolaren (produkowany przez gatunki z rodziny *Apiaceae*) oraz hiperycyna (występująca u dziurawca (*Hypericum* sp.)) [75].

PODSUMOWANIE

Produkcja i wygaszanie RFT w roślinach znajduje się pod ścisłą kontrolą. W normalnych warunkach obecność tych reaktywnych form tlenowych nie prowadzi do znaczących uszkodzeń, gdyż w komórkach roślinnych istnieje sprawny system ich neutralizacji. Do groźnych sytuacji dochodzi wówczas, gdy wytwarzanie RFT znacznie przewyższa możliwości ich usuwania. Dlatego niezwykle ważne jest, aby roślina stale utrzymywała tę równowagę. Odkrycia ostatnich dekad zmieniły nieco pogląd na temat RFT. Okazuje się, że oprócz niszczycielskiej działalności mają one

także dobrowolne działanie, które przejawia się udziałem w kaskadowych reakcjach przekazywania sygnałów czy reakcjach obronnych w czasie ataku patogenów. Choć obecnie posiadamy rozległą wiedzę na temat RFT, to z pewnością wiele aspektów dotyczących tego tematu czeka na odkrycie.

PIŚMIENNICTWO

- Ahmad P, Sarwat M, Dharma S (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J Plant Biol* 51: 167-173
- Van Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inzé D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161: 405-414
- Srivalli B, Chinnusamy V, Khanna-Chopra R (2003) Antioxidant defense in response to abiotic stress in plants. *J Plant Biol* 30: 121-139
- Bartosz G (2008) Druga twarz tlenu. PWN Warszawa
- Krieger-Liszczay A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56: 337-346
- Hippeli S, Heiser I, Elstner EF (1999) Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plany Physiol Biochem* 37: 167-178
- Triantaphylides CH, Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14: 219-228
- Sies H, Menck CF (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* 275: 367-375
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399
- Wagner AM (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett* 368: 339-342
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8271-8276
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355-364
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396
- Pospisil P (2009) Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1151-1160
- Kruk J, Strzałka K (1999) Dark reoxidation of the plastoquinone-pool is mediated by the low potential form of cytochrome *b*-559 in spinach thylakoids. *Photosynth Res* 62: 273-279
- Kruk J, Strzałka K (2001) Redox changes of cytochrome *b*559 in the presence of plastoquinones. *J Biol Chem* 276: 86-91
- Pospisil P, Arato A, Krieger-Liszczay A, Rutherford AW (2004) Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry* 43: 6783-6792
- Krieger-Liszczay A, Fufezan C, Trebst A (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res* 95: 551-564
- Kruk J, Jemiola-Rzemińska M, Burda K, Schmid GH, Strzałka K (2003) Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes. *Biochemistry* 42: 8501-8505
- Garstka M (2007) Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy. *Postępy Biol Kom* 34: 445-476
- Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S, Asada K (1998) The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol* 39: 821-829
- Hsu SY, Kao CH (2003) The protective effect of free radical scavengers and metal chelators on polyethylene glycol-treated leaves. *Biol Plant* 46: 617-619
- Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol* 21: 1295-1307
- Asada K (2000) The water-water cycle as an alternative photon and electron sinks. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 1419-1431
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Kuźniak E, Niewiadomska E, Miszalski Z, Karpinski S (2009) The role of chloroplasts and redox status in holistic regulation of stress response in plants. Compartmentation of responses to stresses in higher plants. True or False. Eds. Waldemar Maksymiec, Transworld Research Network, Kerala India.
- Suh HJ, Kim CS, Jung J (2000) Cytochrome *b*_f complex as an indigenous photodynamic generator of singlet oxygen in thylakoid membranes. *Photochem Photobiol* 71: 100-109
- Bennoun P (2002) The present model for chlororespiration. *Photosynth Res* 73: 273-277
- Kanervo E, Suorsa M, Aro E-M (2005) Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membranes. *Photochem Photobiol Sci* 4: 1072-1080
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9970-9974
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11: 1277-1292
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- Kruk J, Hollander-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J Plant Physiol* 162: 749-757
- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R (2006) Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *BMC Plant Biol* 6: 32
- Latowski D, Grzyb J, Strzałka K (2004) The xanthophyll cycle – molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiol Plant* 26: 197-212
- Dall'Osto L, Cazzaniga S, North H, Marion-Poll A, Bassi R (2007) The *Arabidopsis* *aba4-1* mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* 19: 1048-1064
- Szymańska R, Kruk J (2007) Występowanie oraz funkcja tokochromanolu u zwierząt, roślin i u człowieka. *Postępy Biochem* 53: 174-181
- Munne-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162: 743-748
- Kruk J, Strzałka K (1995) Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *J Plant Physiol* 145: 405-409
- Kruk J, Schmid GH, Strzałka K (1994) Antioxidant properties of plastoquinol and other biological prenylquinones in liposomes and solution. *Free Radic Res* 21: 409-416
- Kruk J, Szymańska R, Krupinska K (2008) Tocopherol quinone content of green algae and higher plants revised by a new high-sensitive fluorescence detection method using HPLC – Effects of high light stress and senescence. *J Plant Physiol* 165: 1238-1247
- Szymańska R, Kruk J (2008). The effect of high-light stress on the level of prenyllipid antioxidants. *Photosynth Res* 91: 313-314
- Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF, Daub ME (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B₆ biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9374-9378
- Trebst A, Depka B, Hollander-Czytko H (2003) Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch* 58c: 609-620
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Bailey-Serred J, Mittler R (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 141: 131

48. Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plantarum* 133: 481-489
49. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plant. *Plant Trends Sci* 9: 490-498
50. Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, Hegie A, Koussevitzky S, Mittler R (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiol* 144: 1777-1785
51. Baier M, Noctor G, Foyer CH, Dietz KJ (2000) Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiol* 124: 823-832
52. Pneuili L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx-1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J* 34:187-203
53. Torres MA, Dangl JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8: 397-403
54. Umbach AL, Fiorani F, Siedow JN (2005) Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiol* 139: 1806-1820
55. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 268-281
56. Lee KP, Kim C, Landgraf F, Apel K (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10270-10275
57. Vandenebeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Lengebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39: 45-58
58. Gapper C, Dolan L (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141: 341-345
59. Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10: 310-316
60. Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F (2002) Heat stress- and heat-shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 838-853
61. Miller G, Mittler R (2006) Could heat shock transcription factor function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot (Lond)* 98: 279-288
62. Laloi CH, Przybyla D, Apel K (2006) A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 57: 1719-1724
63. Fischer BB, Krieger-Liszkay A, Hideg E, Snyrychova I, Wiesendanger M, Eggen RIL (2007) Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 581: 5555-5560
64. Wagner D, Przybyla D, op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee K, Wursch M, Laloi C, Nater M, Hideg E, Apel K (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 306: 1183-1185
65. Przybyla D, Gobel C, Imboden A, Hamburg M, Feussner I, Apel K (2008) Enzymatic, but not non-enzymatic, O₂⁻¹-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the flu mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 54: 236-248
66. Van Breusegem F, Dat JE (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141: 384-390
67. Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-1856
68. Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
69. Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126: 1055-1060
70. Tomilov A, Tomilova N, Shin D, Jamison D, Torres M, Reagan R, Mcgray H, Horning M, Truong R, Nava AJ, Nava A, Yoder J (2006) Chemical signaling between plants. W: Dicke M, Takken "Chemical Ecology: from gene to ecosystem" 55-69; Springer Netherlands
71. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Midema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446
72. Rodriguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL (2002) Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiol* 129: 1627-1632
73. Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* 16: 616-628
74. Levine A, Parnell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 6: 427-437
75. Flors C, Nonell S (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenolone phytoalexins. *Acc Chem Res* 39: 293-300

Reactive oxygen species in plants – production, deactivation and role in signal transduction

Renata Szymańska, Kazimierz Strzałka 

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

e-mail: kazimierzstrzalka@gmail.com

Key words: antioxidants, chloroplasts, signal transduction, reactive oxygen species, oxidative stress

ABSTRACT

Reactive oxygen species (RFT) are continuously produced in plants as byproducts of many metabolic reactions, connected with photosynthesis, photorespiration and cellular respiration. RFT species are highly toxic and rapidly detoxified by various cellular enzymatic and nonenzymatic mechanisms. Oxidative stress occurs when there is a serious imbalance between the production of RFT and antioxidative defense. RFT cause cellular damage by oxidizing biocompounds such as: membrane lipids, proteins and DNA. RFT participate in signal transduction by initialization a chain reaction in response to stress conditions or influence gene expression. An overview of the latest literature is presented in terms of RFT production, antioxidant free radical scavenging and redox signaling in plant cells.

Stres oksydacyjny wywołany działaniem metali ciężkich na rośliny

STRESZCZENIE

Stres oksydacyjny jest jednym z przejawów toksycznego działania metali ciężkich na rośliny. W obecności jonów metali wzrasta w komórkach poziom reaktywnych form tlenu takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy czy nadtlenek wodoru. Częsteczki te mogą wchodzić w reakcje ze związkami budującymi strukturę komórkową i w konsekwencji zaburzać przebieg procesów metabolicznych i ograniczać żywotność komórek. Metale ciężkie należą do czynników przyczyniających się do wzrostu peroksydacji lipidów, modyfikacji białek i uszkodzeń DNA. W toku ewolucji rośliny wykształciły enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy obronne pozwalające na obniżenie zawartości reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach. W reakcji roślin na metale wzrasta aktywność enzymów antyoksydacyjnych (m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej) oraz poziom niskocząsteczkowych antyoksydantów (tokoferolu, glutationu i askorbinianu). Pomimo tego, że zmniejszenie ilości reaktywnych form tlenu jest konieczne dla ograniczenia toksycznych efektów działania metali ciężkich, cząsteczki te nie mogą być całkowicie eliminowane z komórek. Rośliny wykorzystują bowiem reaktywne formy tlenu jako wtórne przekaźniki sygnałów w różnorodnych procesach fizjologicznych.

WPROWADZENIE

Metale ciężkie, których zawartość w glebie zwiększa się w dużym stopniu na skutek działania czynników antropogenicznych, stanowią obecnie jedno z zanieczyszczeń środowiska, które najsilniej ogranicza wzrost i plonowanie roślin [1]. Wśród głównych przyczyn toksyczności metali wymienia się: (i) ich zdolność do bezpośredniej reakcji z białkami (związaną z powinowactwem metali do grup tiolowych, histydylowych i karboksylowych) prowadzącą do przyłączania jonów metali do elementów strukturalnych komórek, miejsc katalitycznych enzymów oraz białek uczestniczących w transporcie komórkowym; (ii) zastępowanie przez metale pierwiastków niezbędnych dla metabolizmu np. wapnia przez kadm w centrum reakcji fotosystemu II, co prowadzi do zahamowania procesu fotosyntezy; (iii) udział metali w zwiększaniu produkcji reaktywnych form tlenu oraz modyfikowaniu aktywności systemu antyoksydacyjnego [1-7]. W niniejszej pracy podjęto próbę omówienia najnowszych wyników badań dotyczących reakcji roślin na stres oksydacyjny wywołany działaniem jonów metali ciężkich.

METALE CIĘŻKIE

Terminem metale ciężkie określamy te pierwiastki, których gęstość jest większa od umownie przyjętej granicy 5 g cm^{-3} , a liczba atomowa przekracza 20. Wśród 90 pierwiastków występujących naturalnie w przyrodzie do metali ciężkich zaliczamy 53, ale tylko nieliczne z nich mają znaczenie biologiczne [3]. Ze względu na występowanie w formie jonowej w warunkach fizjologicznych, 17 spośród metali ciężkich może być pobierane przez żywe komórki, a przez to wpływać na metabolizm organizmów oraz funkcjonowanie ekosystemów. W grupie tej znajdują się metale zaliczane do mikroelementów takie jak: Fe, Mo, Mn, Zn, Ni, Cu, V, Co, W i Cr. Zarówno ich nadmiar, jak i niedobór może być szkodliwy dla wzrostu i rozwoju organizmu. Inne np. Hg, Ag, Sb, Cd, Pb U oraz metaloid (półmetal) As, nie pełnią funkcji jako substancje mineralne i wydają się być w mniejszym lub większym stopniu toksyczne dla roślin i mikroorganizmów [3].

MECHANIZM TWORZENIA REAKTYWNYCH FORM TLENU W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH W OBECNOŚCI JONÓW METALI CIĘŻKICH

Do reaktywnych form tlenu należą produkty jedno- (anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\bullet-}$), dwu- (nadtlenek wodoru H_2O_2) i trójelektronowej (rodnik hydroksylowy HO^{\bullet}) redukcji cząsteczki tlenu oraz tlen singletowy [8,9]. Do grupy RFT, obok wymienionych cząsteczek, które są główną przyczyną toksyczności tlenu dla organizmów żywych, należą m. in. ozon (O_3) lub wolne rodniki sub-

Renata Rucińska-Sobkowiak✉

Zakład Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

✉ Zakład Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza; ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań, tel.: (61) 829 58 08, e-mail: renatar@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 29 stycznia 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 12 lutego 2010 r.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, stres oksydacyjny, rośliny, enzymy antyoksydacyjne

Wykaz skrótów: 8-OH-dG – 8-hydroksy-2'-deoksygwanozyna; APX (ang. *ascorbate peroxidase*) – peroksydaza askorbinianowa; CAT (ang. *catalase*) – katalaza; DHAR (ang. *dehydroascorbate reductase*) – reduktaza dehydroaskorbinianowa; GR (ang. *glutathione reductase*) – reduktaza glutationowa; JA (ang. *jasmonic acid*) – kwas jasmonowy; LOX (ang. *lipoxygenase*) – lipoksygenaza; MDA (ang. *malondialdehyde*) – dialdehyd malonowy; MDHAR (ang. *monodehydroascorbate reductase*) – reduktaza monodehydroaskorbinianowa; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa

Podziękowanie: Pragnę podziękować prof. Joannie Deckert i prof. Edwardowi A. Gwoździowi za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu

stancji organicznych. Wśród RFT wyróżnia się wolne rodniki, które z definicji są atomami (lub cząsteczkami) zdolnymi do samodzielnego istnienia, mającymi jeden lub więcej niesparowanych elektronów np. $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , NO^{\bullet} czy rodniki organiczne. Pojęciem stresu oksydacyjnego określa się zaburzenia homeostazy prowadzące do zwiększania stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu [8,9].

Tworzenie RFT w komórkach roślinnych pod wpływem jonów metali ciężkich przedstawiono na rycinie 1. Metale należące do pierwiastków przejściowych, takie jak Fe lub Cu, mogą uczestniczyć w tworzeniu reaktywnych form tlenu w reakcjach utleniania i redukcji zgodnie ze wzorem $Cu^+ \leftrightarrow Cu^{2+} + e^-$ oraz $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + e^-$ [7-9]. Biorą one udział w tworzeniu HO^{\bullet} z H_2O_2 w reakcji Fentona (mogą katalizować reakcję Habera-Weissa) oraz inicjują niespecyficzną peroksydację lipidów [7]. Wykazano, że wzrost siewek soi (*Glycine max*) w obecności podwyższonego stężenia Fe prowadzi do zwiększenia poziomu $O_2^{\bullet-}$ i HO^{\bullet} w korzeniach tych roślin [10]. Poziom reaktywnych form tlenu takich jak: HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 zwiększał się istotnie w liściach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) eksponowanych na Cu [11,12]. Szybkie tworzenie $O_2^{\bullet-}$ (w ciągu 1-6 godz.) miało miejsce w korzeniach pszenicy (*Triticum durum*) traktowanych Cu [13]. Wzrost zawartości $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 pod wpływem Cu odnotowano również w liściach *Withania somnifera* hodowanych w warunkach *in vitro* [14].

Obecność RFT w komórkach może prowadzić do oksydacyjnego uszkodzenia enzymów szlaku antyoksydacyjnego. Przykładami mogą tu być katalaza, której aktywność jest hamowana bezpośrednio przez $O_2^{\bullet-}$ [15] lub Mn-SOD która jest inaktywowana przez nadtlenoazotyn [16]. Zmiany zachodzące w strukturze tych enzymów mogą wtórnie

prowadzić do zwiększenia puli H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$ w komórkach roślin traktowanych Fe lub Cu [3].

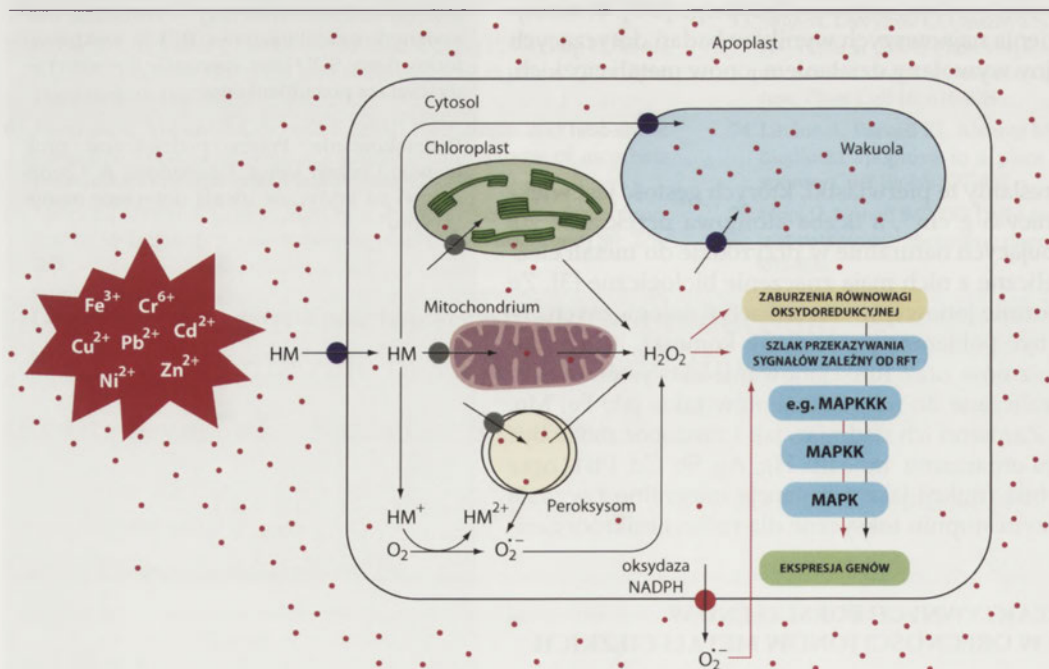
Pojawienie się reaktywnych form tlenu oraz uszkodzeń wywołanych przez ich obecność było obserwowane również w roślinach poddanych działaniu metali nie biorących bezpośrednio udziału w reakcjach Habera-Weissa i Fentona takich jak Cd i Pb [1-7]. W przypadku tej grupy metali istnieje kilka mechanizmów indukcji stresu oksydacyjnego.

Tworzenie reaktywnych form tlenu może zachodzić za pośrednictwem metali o silnych właściwościach utleniających. W doświadczeniach na izolowanych liściach ryżu (*Oryza sativa*) wykazano, że stres oksydacyjny spowodowany działaniem jonów Cd może być ograniczany przez podanie chelatorów wiążących jony Fe i Cu [17].

Wzrost poziomu RFT w tkankach fotosyntetyzujących [4] może być wynikiem zmian w strukturze chloroplastów prowadzących m. in. do inaktywacji centrum reakcji fotosytemu II (Cd) [18], przzerwania transportu elektronów (Zn) [19] lub hamowania fotolizy wody i wydzielania tlenu w wyniku substytucji Mn przez Zn [20].

Ważnym źródłem tworzenia RFT jest mitochondrialny łańcuch transportu elektronów. Badania prowadzone na mitochondriach izolowanych z korzeni grochu (*Pisum sativum* L.) traktowanego jonami Cr^{6+} wykazały zahamowanie transportu elektronów, któremu towarzyszyło zwiększenie puli $O_2^{\bullet-}$ [21]. Jony Cr zaburzały przepływ elektronów na tlen zarówno z NADH, jak i bursztynianu. Wzrost poziomu $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 pod wpływem Cr obserwowano również w korzeniach ryżu [22]. Badania wykonane na korzeniach grochu (*Pisum sativum*) traktowanych Pb wskazują, że w

przypadku tego metalu mitochondria i peroksyzomy są głównym miejscem tworzenia dodatkowych ilości H_2O_2 [23]. Zwiększenie ilości H_2O_2 w siewkach łubinu (*Lupinus luteus*) widoczne było zarówno w korzeniach traktowanych Pb jak i organach nadziemnych, oddalonych od miejsca podawania metalu [24]. We wcześniejszych doświadczeniach z wykorzystaniem techniki elektronowego rezonansu pramagnetycznego (EPR), wykryto akumulację rodnika chinonowego w korzeniach łubinu eksponowanych na Pb [25]. Przypuszcza się, że miejscem powstawania rodnika chinonowego w reakcji na ołów mogą być mitochondria [26].



Rycina 1. Tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach roślinnych pod wpływem jonów metali ciężkich (HM ang. *heavy metals*). RFT w obecności jonów metali powstają bezpośrednio na drodze reakcji oksydoredukcyjnych oraz pośrednio, poprzez zmiany w przebiegu procesów metabolicznych. Istotne znaczenie w procesach generowania RFT odgrywa błonowa oksydaza NADPH. Nadmiar reaktywnych form tlenu prowadzi do zachwiania równowagi oksydoredukcyjnej oraz uruchomienia szlaku przekazywania sygnałów (takich jak szlaki MAPK). Czerwone kropki na rycinie symbolizują rozmieszczenie metali ciężkich w protoplasmie i apoplasmie (wg [7] – zmienione).

Istotne znaczenie w procesach generowania RFT odgrywa błonowa oksydaza NADPH. Wyniki badań z zastosowaniem specyficznych inhibitorów sugerują, że enzym ten uczestniczy w tworzeniu $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 w roślinach grochu (*Pisum sativum*) eksponowanych na Cd [27]. Analizy wewnątrzkomórkowej lokalizacji RFT w liściach wskazują, że miejscem akumulacji H_2O_2 był rejon błony cytoplazmatycznej komórek transferowych, mezofilu oraz epidermy, natomiast $O_2^{\bullet-}$ wykrywany był w rejonie błony cytoplazmatycznej komórek mezofilu [27]. Oksydaza NADPH bierze udział w tworzeniu $O_2^{\bullet-}$ w korzeniach: pszenicy (*Triticum durum* D) traktowanej Ni [28], grochu (*Pisum sativum*) poddanego działaniu Cd [29] oraz fasoli (*Vicia faba*) eksponowanej na Pb [30]. Również śmierć komórek zawiesiny tytoniu (*Nicotiana tabacum* BY-2), indukowana przez jony Cd, poprzedzona była akumulacją H_2O_2 powstającego z udziałem oksydazy NADPH [31]. Następstwem akumulacji H_2O_2 u tytoniu traktowanego Cd był wzrost ilości $O_2^{\bullet-}$ w mitochondriach oraz wzmoczenie peroksydacji lipidów błonowych [31]. Aktywność tego enzymu w obecności Cd [29,32] i Pb [30] regulowana była za pośrednictwem jonów wapnia oraz specyficznych kinaz białkowych.

USZKODZENIA OKSYDACYJNE W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH WYWOŁANE DZIAŁANIEM JONÓW METALI CIĘŻKICH

LIPIDY

Peroksydacja lipidów to wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w którym powstają nadtlarki tych związków [8,9]. Ten wieloetapowy proces kończy się powstaniem kilku-kilkunastowęglowych fragmentów, wśród których dialdehyd malonowy (MDA) jest najczęściej wykorzystywany jako wskaźnik uszkodzeń lipidów w układach biologicznych. Istnieje szereg danych literaturowych świadczących o tym, że nadmiar metali prowadzi do powstania uszkodzeń oksydacyjnych lipidów [3,14,33-39].

Inicjacja peroksydacji lipidów może zachodzić na drodze bezpośredniej reakcji wielonienasyconego kwasu tłuszczowego np. z HO^{\bullet} lub HO_2^{\bullet} [8,9]. Może ona być również katalizowana przez enzym lipoksygenazę (LOX, E.C. 1.13.11.12) uczestniczącą we wbudowywaniu cząsteczki tlenu w określona pozycję cząsteczki kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstają nadtlarki kwasów tłuszczowych [8,9]. Wzrost aktywności LOX np. u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) w reakcji na Cd i Cu [40,41], łąbinu (*Lupinus luteus*) pod wpływem Pb [42] lub *Withania somnifera* w odpowiedzi na Cu [14] sugeruje, że peroksydacja lipidów pod wpływem metali może być indukowana przez ten enzym. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja LOX w liściach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) traktowanych Cu wskazuje na obecność tego enzymu w cytoplazmie i chloroplastach [43].

BIAŁKA

Reakcje RFT z białkami prowadzą do modyfikacji reszt aminokwasowych, modyfikacji grup prostetycznych oraz agregacji lub fragmentacji cząsteczek białkowych [8,9]. Najczęściej stosowanym parametrem do określania oksydacyj-

nych uszkodzeń białek jest zawartość grup karbonylowych. Zdecydowana większość badań dotyczących wzrostu zawartości grup karbonylowych w reakcji na metale odnosi się do jonów Cd. Uszkodzenia białek widoczne są zarówno w korzeniach traktowanych Cd [36,44,45], jak i łodygach oraz liściach czyli organach oddalonych od miejsca podawania metalu [36,46,47], a także zawieszinach komórkowych hodowanych w warunkach *in vitro* [48].

KWASY NUKLEINOWE

W wyniku reakcji RFT z kwasami nukleinowym dochodzi do uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowcowych lub rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy czyli powstawania pęknięć nici kwasów nukleinowych [8,9]. Jednym z produktów utleniania zasad purynowych jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG), najczęściej wykorzystywana jako wskaźnik uszkodzeń DNA przez RFT. Istotny wzrost uszkodzenia DNA obserwowany był w pędach topoli białej (*Populus alba*), traktowanych Cu w warunkach *in vitro* [49]. Poziom 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) zwiększał się 20-krotnie w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Analizę poziomu uszkodzeń DNA prowadzono również u roślin transgeniczných tego gatunku, z dodatkowym genem kodującym białka podobne do metalotionein. W obecności Cu zawartość 8-OH-dG malała nawet 8-krotnie w porównaniu do roślin nietransformowanych [49]. Niewykluczone, że RFT stanowią również przyczynę uszkodzeń DNA wykrytą metodą kometkową w komórkach zawiesiny soi (*Glycine max*) eksponowanych na Cd [50] oraz korzeniach siewek łąbinu (*Lupinus luteus*) traktowanych Pb [51].

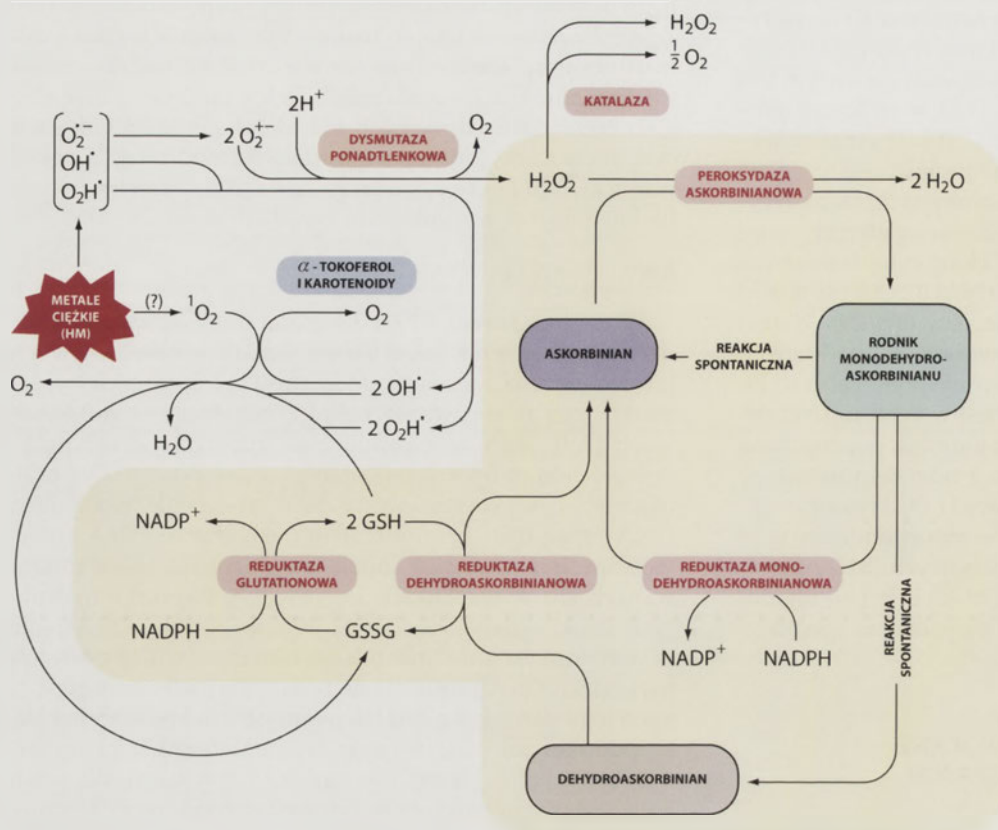
Kwestią otwartą pozostaje określenie czy uszkodzenia powstające na skutek działania reaktywnych form tlenu mają charakter pierwotny czy wtórny, co pozwoliłoby na odróżnienie molekularnych mechanizmów związanych z obroną i tolerancją na metale od tych, które stanowią wtórną i niespecyficzną reakcję na stres.

ANTYOKSYDACYJNE MECHANIZMY OBRONNE W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH TRAKTOWANYCH JONAMI METALI CIĘŻKICH

W toku ewolucji rośliny wykształciły szereg enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych mających za zadanie utrzymać RFT na poziomie niskim, nieszkodliwym dla komórek [52-57]. System obrony antyoksydacyjnej u roślin poddanych działaniu jonów metali ciężkich przedstawiono na Ryc. 2.

MECHANIZMY ENZYMATYCZNE

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, E.C. 1.15.1.1) jest enzymem występującym w cytosolu, chloroplastach i mitochondriach. Ze względu na rodzaj metalu obecnego w centrum aktywnym możemy wyróżnić trzy klasy SOD: miedziowo-cynkową (Cu,Zn-SOD), manganową (Mn-SOD) oraz żelazową (Fe-SOD). Enzym ten katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$), która prowadzi do powstania nadtlarku wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego (O_2). Nadtlarek wodoru (H_2O_2) ule-



Rycina 2. System obrony antyoksydacyjnej u roślin poddanych działaniu jonów metali ciężkich (HM). Anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ usuwany jest w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), która prowadzi do powstania nadtlenu wodoru (H_2O_2) i tlenu cząsteczkowego (O_2). Powstający w reakcji H_2O_2 ulega dalszej enzymatycznej dysmutacji do wody (H_2O) i tlenu (O_2) z udziałem katalazy (CAT) lub jest redukowany do wody przez peroksydazę askorbinianową (APX), która wykorzystuje askorbinian jako drugi substrat w tej reakcji. Powstały monodehydroaskorbinian (MDHA) jest redukowany enzymatycznie do askorbinianu przy udziale reduktazy monodehydroaskorbinianowej (MDHAR). MDHA może ulegać również spontanicznej dysmutacji do dehydroaskorbinianu (DHA), który redukowany jest dalej do askorbinianu przez reduktazę dehydroaskorbinianową (DHAR) kosztem utlenienia glutationu (GSH). Utleniona forma glutationu (GSSG) regenerowana jest przez reduktazę glutationową (GR) w reakcji z NADPH. Cykl askorbinianowo-glutationowy zaznaczono na rycinie żółtym tłem. Tlen singletowy 1O_2 oraz $HO\bullet$ usuwane są w reakcji z niskocząsteczkowymi antyoksydantami takimi jak: GSH, tokoferol czy karotenoidy (zmodyfikowane wg [106]).

ga w peroksysomach dalszej enzymatycznej dysmutacji do wody (H_2O) i tlenu (O_2) z udziałem katalazy (CAT, E.C. 1.11.1.6). Związek ten jest również substratem dla peroksydaz, które redukują go do wody, utleniając różne związki występujące w komórkach w formie zredukowanej. U roślin szczególną rolę pełni peroksydaza askorbinianowa (APX, E.C. 1.11.1.11), która występuje w chloroplastach oraz cytoplazmie i wykorzystuje askorbinian jako specyficzny dla niej donor elektronów. Z enzymem tym współdziałają reduktazy: monodehydroaskorbinianowa (MDHAR, E.C. 1.1.5.4) i dehydroaskorbinianowa (DHAR, E.C. 1.8.5.1) regenerująca askorbinian kosztem utlenienia glutationu oraz reduktaza glutationowa (GR, EC 1.6.4.2) odtworząca zredukowany glutation w reakcji utleniania NADPH [8]. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w roślinach poddanych działaniu jonów metali ciężkich wzrasta, pozostaje niezmienną lub obniża się w zależności od gatunku rośliny, rodzaju zastosowanego jonu, jego stężenia i czasu ekspozycji (zebrane w pracach przeglądowych [3,5] oraz Tabeli 1). Reakcje enzymatyczne, pomimo istniejącego zróżnicowania, odzwierciedlają zmiany w statusie oksydoredukcyjnym komórek roślin poddanych działaniu jonów metali ciężkich [7,58].

Jak dotąd nie jest wyjaśnione, czy eliminacja RFT przez enzymy antyoksydacyjne odbywa się przez zwiększenie ekspresji genów kontrolujących ich biosyntezę oraz/lub wzrost aktywności enzymów znajdujących się już na terenie komórki [4]. Akumulacji utlenionej formy glutationu (GSSG) w liściach rzodkiewnika (*Abidopsis thaliana*) towarzyszyło obniżenie poziomu mRNA kodującego reduktazę glutationową, natomiast aktywność tego enzymu rosła proporcjonalnie do zawartości Cd w pożywce [59]. W przypadku soi (*Glycine max*) wzrost aktywności Cu,Zn-SOD skorelowany był z poziomem mRNA tego enzymu w korzeniach siewek traktowanych Cd, natomiast zależności takiej nie odnotowano u roślin tego gatunku eksponowanych na Pb [60]. Transgeniczne trawy (*Festuca arundinacea*) z nadekspresją genów chloroplastowych kodujących Cu,Zn-SOD i APX traktowane jonami Cu, Cd i As charakteryzowały się wyższą, w stosunku do roślin kontrolnych, aktywnością badanych enzymów antyoksydacyjnych [61]. U roślin tych stwierdzono również niższą peroksydację lipidów i zmniejszoną degradację chlorofilu, co sugeruje, że podwyższona ekspresja genów

Cu,Zn-SOD i APX przyczynia się do ograniczenia poziomu RFT w odpowiedzi na stres wywołany działaniem metali ciężkich.

MECHANIZMY NIEENZYMATYCZNE HYDROFILOWE

Glutation (GSH) jest istotnym czynnikiem biorącym udział w utrzymaniu równowagi oksydoredukcyjnej w komórce, ponieważ jest niskocząsteczkowym antyoksydantem, działa jako forma transportowa zredukowanej siarki, a ponadto uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego [8,55-57]. Wysoki, konstytutywny poziom biosyntezy GSH u różnych gatunków tobołków (*Thlaspi*) jest czynnikiem warunkującym tolerancję na podwyższone stężenie Ni [62]. Jednakże u innych roślin takich jak: *Silene cucubalus* [63] i *Pteris vittata* [64], tolerancyjnych na Cu i As nie stwierdzono wysokiego, konstytutywnego poziomu GSH, co świadczy o tym, że znaczenie tego antyoksydanta jest zależne od gatunku.

Szybkie, zachodzące w ciągu 6 godz. tworzenie RFT, któremu towarzyszyło obniżenie zawartości glutationu (GSH), od-

Tabela 1. Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych u różnych gatunków roślin wywołane działaniem jonów metali ciężkich

Nazwa enzymu	Metal	Aktywność enzymu	
		Zwiększona	Zmniejszona
Dysmutaza ponadtlenkowa	As	koniczyna (łodyga) [78]	
	Cd	groch (liście) [107], łubin (korzenie) [90], soja (zawiesina) [48, 108], rzodkiewnik (liście) [11], pszenica (korzenie, łodyga) [37], ogórek (siewki) [44], gorczyca (liście) [74]	ryż (odcięte liście) [17], groch (korzenie) [107], groch (liście) [46], ryż (pędy) [109], łubin (korzenie) [90], soja (zawiesina) [48,108]
		fasola (liście) [79]	
	Co	tytoń (zawiesina) [33], rzodkiewnik (liście) [12], łubin (korzenie, liście) [110]	<i>Withania somnifera</i> (liście) [14]
	Cu		
	Cr		ryż (korzenie) [22]
	Fe		tytoń (zawiesina) [33]
	Mn	tytoń (zawiesina) [33]	
	Ni	kukurydza (korzenie, łodyga) [38], <i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]	
Pb	łubin (korzenie) [90], pszenica (korzenie, łodyga) [37], groch (korzenie) [67]		
Zn	<i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]	tytoń (zawiesina) [33]	
Katalaza	Cd	groch (korzenie, liście) [107], ryż (korzenie, pędy) [109], łubin (korzenie) [90], soja (zawiesina) [108], słonecznik (liście i kallus) [111], ogórek (siewki) [44], gorczyca (liście) [74],	groch (korzenie, liście) [107], groch (liście) [46], ryż (korzenie, pędy) [109], soja (zawiesina) [108], słonecznik (liście i kallus) [111], rzodkiewnik (liście) [11], pszenica (korzenie, łodyga) [37], ogórek (siewki) [44], fasola (liście) [79]
	Co		
	Cu	rzęsa wodna [70]	rzodkiewnik (liście) [12], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14], łubin (korzenie, liście) [110]
	Fe	tytoń (zawiesina) [33]	
	Ni		kukurydza (korzenie, łodyga) [38], <i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]
	Pb	łubin (korzenie) [90], groch (korzenie) [67]	pszenica (korzenie, łodyga) [37], <i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73], pszenica (korzenie, liście) [72]
Zn			
Peroxysydaza	As	koniczyna (łodyga) [78]	
	Cd	jęczmień (korzenie) [112], ryż (korzenie, pędy) [109], łubin (korzenie) [90], soja (zawiesina) [108], słonecznik (liście i kallus) [111], fasola (liście) [35], pszenica (łodyga) [37]	groch (liście) [46], łubin (korzenie) [90], rzodkiewnik (liście) [11], słonecznik (liście i kalus) [111], pszenica (korzenie) [37]
	Co		fasola (liście) [79]
	Cu	rzęsa wodna [70], rzodkiewnik (liście) [12], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14], łubin (korzenie, liście) [110]	
	Ni	<i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73], kukurydza (korzenie, łodyga) [38]	
Pb	łubin (korzenie) [90]	pszenica (korzenie, łodyga) [37]	
Zn	<i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]	pszenica (korzenie, liście) [72]	
Peroxysydaza askorbinianowa	Cd	groch (korzenie, liście) [107], jęczmień (korzenie, liście) [112], fasola (liście) [35], kukurydza (korzenie, łodyga) [36], rzodkiewnik (liście) [11], gorczyca (liście) [74], pszenica (korzenie) [45]	ryż (odcięte liście) [17], groch (korzenie, liście) [107], rzodkiewnik (liście) [11], ogórek (siewki) [44]
	Co	fasola (liście) [79]	
	Cu	fasola (liście) [71], tytoń (zawiesina) [33], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14]	rzęsa wodna [70]
	Hg	kukurydza (korzenie, łodyga) [36]	
Pb	groch (korzenie) [67]		
Reduktaza monodehydro-askorbinianowa	Cd	rzodkiewnik (liście) [11], pszenica (korzenie) [45]	rzodkiewnik (liście) [11]
	Cu	fasola (liście) [71], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14]	
Reduktaza dehydro-askorbinianowa	Cd	pszenica (korzenie) [45]	ryż (odcięte liście) [17], rzodkiewnik (liście) [11]
	Cu	fasola (liście) [71], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14]	
Reduktaza glutationowa	Cd	groch (korzenie, liście) [107], fasola (liście) [35], gorczyca (liście) [74], pszenica (korzenie) [45]	groch (korzenie, liście) [107], rzodkiewnik (liście) [11]
	Cu	fasola (liście) [71]	rzęsa wodna [70], <i>Withania somnifera</i> (liście) [14]
	Ni	<i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]	
	Zn	<i>Cajanus cajan</i> (korzenie, łodyga) [73]	

notowano u sosny (*Pinus sylvestris*) pod wpływem Cd [3,65]. U lucerny (*Medicago sativa*) traktowanej jonami Cd i Hg przez 6–24 godz. obserwowano również akumulację RFT połączoną z obniżeniem poziomu glutationu (GSH) i homoglutationu (hGSH) [66]. Innym przykładem tego zjawiska może być wzrost poziomu $O_2^{\bullet-}$ po 2 godz. oraz H_2O_2 po 8 godz. traktowania grochu (*Pisum sativum*) jonami Pb, skorelowany z obniżeniem poziomu GSH [67]. Znaczne obniżenie puli GSH w początkowej fazie działania stresu wydaje się wspólną reakcją roślin na działanie różnych metali ciężkich [3]. Wynika ono częściowo z faktu, że GSH jest wykorzystywany do syntezy fitochelatyn wiążących jony metali i biorących udział w ich transporcie do wakuoli [68,69] oraz hamowania aktywności reduktazy glutationowej przez metale [3,11,14,70], które mogą redukować mostki disiarczkowe pomiędzy resztami cysteiny tego enzymu [3].

Wydłużenie czasu ekspozycji roślin na metale np.: Cu [71] i Pb [67] lub zwiększanie ich stężenia np. Cr [22] i Zn [72] prowadziło do wzrostu zawartości GSH. W obecności różnych metali (Cu, Cd, Zn, Ni) obserwowano również wzrost aktywności reduktazy glutationowej świadczący o możliwości odtwarzania zredukowanej formy glutationu przez komórki [35,45,71,73,74].

Askorbinian ze względu na silne właściwości redukcyjne uczestniczy w eliminacji m.in. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} i tlenu singletowego [8,55-57]. Kwas askorbinowy jest również substratem dla peroksydazy askorbinianowej (APOX E.C. 1.11.1.11) usuwającej z komórek H_2O_2 przy współdziałaniu enzymów: reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR, E.C. 1.8.5.1) oraz reduktazy glutationowej (GR, EC 1.6.4.2). Przejściowy wzrost poziomu askorbinianu odnotowano u kilku gatunków roślin: łąbinu (*Lupinus luteus*) [75] traktowanego jonami Pb oraz ogórka (*Cucumis sativus*) [44] i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) [76] eksponowanych na Cd. Zwiększenie puli askorbinianu u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) było proporcjonalne do czasu działania Cu [76], natomiast u pszenicy (*Triticum durum*) [45] zależało od stężenia Cd. Inkubacja siewek pszenicy z prekursorem biosyntezy askorbinianu (L-galaktono- γ -laktonem) prowadziła do ograniczenia symptomów stresu oksydacyjnego w korzeniach tych roślin [45].

MECHANIZMY NIEENZYMATYCZNE HYDROFOBOWE

Tokoferole są składnikami błon biologicznych, uczestniczącymi w usuwaniu wtórnych wolnych rodników organicznych i terminacji reakcji peroksydacji lipidów. W grupie tej α -tokoferol posiada najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne [8,53]. Wzrost zawartości α -tokoferolu skorelowany ze spadkiem ilości produktów peroksydacji lipidów wykazano w reakcji korzeni łąbinu hodowanych w obecności jonów Pb [75]. Badania na rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*) potwierdziły akumulację tokoferolu w liściach roślin eksponowanych na działanie Cu i Cd [76]. Wykazano, że poziom mRNA kodujących wybrane enzymy szlaku biosyntezy α -tokoferolu wzrastał w reakcji na działanie obu metali. Ponadto mutanty pozbawione możliwości syntezy α -tokoferolu były znacznie bardziej wrażliwe na Cu i Cd niż rośliny typu dzikiego [76].

Karotenoidy są efektywnymi wygaszczaczami tlenu singletowego, reagują również z wolnymi rodnikami organicznymi powstającymi w procesie peroksydacji lipidów [8,53]. Akumulacja karotenoidów uważana jest za jeden z przejawów odpowiedzi roślin na działanie różnych stresów abiotycznych [4]. W przypadku takich metali jak: Cu, Co, Cd oraz As karotenoidy okazały się być wrażliwe na stres oksydacyjny wywołany działaniem tych metali [77-80]. Najwyższy poziom odporności na utlenianie wykazywał β -karoten [81].

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁÓW W ROŚLINACH ROSNĄCYCH W OBECNOŚCI METALI CIĘŻKICH

Metale ciężkie takie jak Cu, Pb, Zn i Cu modyfikują przepływ sygnałów z udziałem szlaku kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (kinaz MAP) [82,32]. W komórkach roślinnych, w reakcji na metale ciężkie, wzrasta również poziom innych cząsteczek sygnałowych: kwasu jasmonowego (JA), kwasu salicylowego, etylenu czy tlenku azotu (NO) [29,44,83,84]. Znaczenie tych hormonów w obronie przed stresem oksydacyjnym wywołanym jonami metali ciężkich nie jest jednoznaczne. Kwas salicylowy pośredniczy, poprzez aktywację systemu antyoksydacyjnego, w zmniejszeniu toksycznego działania Cd u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [83] i grochu (*Pisum sativum*) [85] oraz Mn u ogórka (*Cucumis sativus*) [86]. Z drugiej strony wzrost tworzenia H_2O_2 , stymulowany kwasem salicylowym, cechował reakcję rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) na Cd [87]. Ograniczenie syntezy JA u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) traktowanych Cu spowodowało obniżenie poziomu produktów peroksydacji lipidów, co sugeruje, że kwas jasmonowy zwiększa wrażliwość rzodkiewnika na działanie tego metalu [88]. W analogicznych badaniach przeprowadzonych dla Cd stwierdzono, że obniżeniu zawartości kwasu jasmonowego towarzyszy wzrost utleniania lipidów [88]. Badania z zastosowaniem egzogenego kwasu jasmonowego wykazały, że u rośliny wodnej *Wolffia arrhiza*, rosnącej w obecności Pb, prooksydacyjna i antyoksydacyjna rola kwasu jasmonowego jest ściśle związana ze stężeniem tego hormonu [89]. Podanie donora tlenku azotu w doświadczeniach na siewkach łąbinu (*Lupinus luteus*) traktowanych Pb lub Cd spowodowało zmniejszenie toksycznego działania tych pierwiastków na wzrost i morfologię korzeni [90]. Ochronna rola NO może wiązać się ze stymulacją aktywności SOD i/lub bezpośrednim zmiataniem $O_2^{\bullet-}$ przez tlenek azotu [48,90]. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach wykonanych na pszenicy (*Triticum aestivum*), w przypadku której hamowanie wzrostu korzeni przez Cd było skorelowane z dodatkową syntezą NO [91]. Znaczenie substancji sygnałowych takich jak Ca^{2+} , cGMP i NO w regulacji ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne zostało opisane dla długotrwałego działania jonów Cd na rośliny grochu (*Pisum sativum*) [92].

ZNACZENIE OBRONY ANTYOKSYDACYJNEJ W TOLERANCJI NA METALE CIĘŻKIE

Utrzymanie równowagi pomiędzy tworzeniem i usuwaniem RFT m.in. na drodze enzymatycznej wydaje się być kluczowe dla zapewnienia podwyższonej tolerancji roślin

na metale [58]. Niska wrażliwość glonu *Dunaliella tertiolecta* na Cu w porównaniu z *Dunaliella salina* związana była z wysoką, konstytutywną aktywnością APX [93]. Badania prowadzone na dwóch klonach wierzby (*Salix viminalis*), charakteryzujących się różną wrażliwością na Cd, Cu i Zn, pozwoliły stwierdzić, że w tym przypadku wysoka aktywność SOD jest typowa dla klonu tolerancyjnego na wymienione metale [94]. Chińska paproć (*Pteris vittata*), która jest hiperakumulatorem As [95,96], nie wykazywała symptomów toksyczności w reakcji na podwyższone stężenia As. Wykazano, że u tej paproci As wywołuje wzrost aktywności SOD, CAT i APX, czego nie obserwowano u innych, wrażliwych gatunków. Badania na trzech genotypach lepnicy (*Silene paradoxa*) poddanych działaniu Ni [97] oraz czterech genotypach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) traktowanych Cd [98] dowodzą, że zasadnicze znaczenie dla tolerancji na metal może mieć brak obniżenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych. U roślin *Holcus lanatus* wrażliwych na As aktywność SOD była hamowana przez As i Cu, w przeciwieństwie do roślin tolerancyjnych na te metale [99]. Hiperakumulator Ni *Alyssum bertolonii* [100] oraz dwa gatunki hiperakumulatorów Cd *Thlaspi caerulescens* [101,102] i *Brasica juncea* [102], charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością SOD i CAT w porównaniu z tytoniem (*Nicotiana tabacum*). U wymienionych gatunków obserwowano ograniczenie symptomów stresu oksydacyjnego w komórkach. Wydaje się, że w przypadku tobołka (*Thlaspi caerulescens*), reakcja systemu antyoksydacyjnego na Cd, jak i na Zn, zależy od populacji wytypowanej do przeprowadzenia doświadczeń [103].

Zastosowanie techniki mikromacierzy pozwoliło udokumentować zwiększoną ekspresję genów kodujących m.in. APX i MDAR u rzodkiewnika (*Arabidopsis halleri*), hiperakumulatora Zn i Cd [104]. Z drugiej strony, analizy wykonane tą samą techniką, dowiodły, że w przypadku topoli (*Populus deltoides*) tolerancyjnej na jony Cu, poziom ekspresji genów kodujących peroksydazę, Cu,Zn-SOD i katalazę był obniżony pod wpływem działania tego metalu [105].

Znaczenie obrony antyoksydacyjnej w dostosowaniu roślin do wzrostu w warunkach stopniowego zwiększania stężenia metalu określano u ziemniaka (*Lycopersicon esculentum*) [105]. Pomimo zwiększania stężenia Cd do 1 mM, w czasie całego okresu wegetacyjnego roślin, nie odnotowano ograniczenia suchej masy oraz wzrostu peroksydacji lipidów, tak jak to miało miejsce w przypadku jednorazowego podania 1 mM Cd. Nie wykazano również zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych w korzeniach i liściach, choć w przypadku roślin, które od początku doświadczenia miały kontakt z wysokim stężeniem Cd, efekt wzrostu aktywności był wyraźnie widoczny. Wydaje się, że w reakcji stopniowej adaptacji uczestniczyć muszą inne mechanizmy obronne, nie związane wyłącznie z enzymami antyoksydacyjnymi.

PODSUMOWANIE

Wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi przyczynia się do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach, co prowadzi do zaburzenia integralności struktur komórkowych oraz w istotny sposób

wpływa na przebieg procesów metabolicznych. Intensywne badania prowadzone m.in. z zastosowaniem roślin transgenicznych pozwalają na lepsze poznanie odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego na działanie jonów metali. Wiedza ta może być wykorzystana do poszukiwania gatunków roślin tolerancyjnych na metale lub prowadzenia modyfikacji genetycznych w celu uzyskania odmian lepiej przystosowanych do wzrostu na terenach zanieczyszczonych metalami. Rośliny takie mogą być potencjalnie wykorzystywane do fitoremediacji, poszerzając tradycyjne możliwości oczyszczania skażonego środowiska.

PIŚMIENNICTWO

- Ahsan N, Renaut J, Komatsu S (2009) Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 9: 2602-2621
- Dat J, Vandennebeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53: 1351-1365
- Bertrand M, Poirier I (2005) Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43: 345-353
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32: 481-494
- Sharma SS, Dietz K-J (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57: 711-726
- Sharma SS, Dietz K-J (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43-50
- Bartosz G (2003) Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322
- Caro A, Puntarulo S (1996) Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochim Biophys Acta* 1291: 245-251
- Skórzyńska-Polit E, Drązkiewicz M, Krupa Z (2004) The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant* 47: 71-78
- Drązkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17: 379-387
- Sgherri C, Quartacci MF, Navari-Izzo F (2007) Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *J Plant Physiol* 164: 1152-1160
- Khatun S, Ali MB, Hahn E-J, Paek K-Y (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environ Exp Bot* 64: 279-285
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37: 1613-1622
- Chien H-F, Wang J-W, Lin CC, Kao CH (2001) Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* 33: 205-213
- Voigt J, Nagel K (2002) The donor side of photosystem II is impaired in a Cd²⁺-tolerant mutant strain of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Plant Physiol* 159: 941-950
- Vaillant N, Monnet F, Hitmi A, Sallanon H, Coudret A (2005) Comparative study of responses in four *Datura species* to a zinc stress. *Chemosphere* 59: 1005-1013

20. Ralph PJ, Burchett MD (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environ Pollut* 103: 91-101
21. Dixit V, Pandey V, Shyam R (2002) Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation *in vivo* in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell Environ* 25: 687-693
22. Panda SK (2007) Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *J Plant Physiol* 164: 1419-1428
23. Małecka A, Derba-Maceluch M, Kaczorowska K, Piechalak A, Tomaszewska B (2009) Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: mitochondrial and peroxisomal level. *Acta Physiol Plant* 31: 1065-1075
24. Przymusiński R, Rucińska-Sobkowiak R, Iłska B, Gwóźdź EA (2007) Organospecific responses of lupin seedlings to lead. Localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity. *Acta Physiol Plant* 29: 411-416
25. Gwóźdź EA, Przymusiński R, Rucińska R, Deckert J (1997) Plant cell responses to heavy metals: Molecular and physiological aspects. *Acta Physiol Plant* 19: 459-465
26. Rucińska R, Waplak S, Gwóźdź EA (1999) Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol Bioch* 37: 187-194
27. Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122-1134
28. Hao F, Wang X, Chen J (2006) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Sci* 170: 151-158
29. Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ* 29: 1532-1544
30. Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guisresse M, Pinelli E (2008) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J Plant Physiol* 165: 571-579
31. Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel J-P, Blein J-P, Ranjeva R, Montillet J-L (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* 29: 1956-1969
32. Yeh C-M, Chien P-S, Huang H-J (2007) Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J Exp Bot* 58: 659-671
33. Bueno P, Piqueras A (2002) Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. *Plant Growth Regul* 36: 161-167
34. Gallego S, Benavides M, Tomaro M (2002) Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regul* 36: 267-273
35. Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Van Laere A, Vangronsveld J (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol Bioch* 43: 437-444
36. Rellán-Álvarez R, Ortega-Villasante C, Álvarez-Fernández A, Campo FFD, Hernández LE (2006) Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant Soil* 279: 41-50
37. Dey SK, Dey J, Patra S, Pothal D (2007) Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant Physiol* 19: 53-60
38. Kumar P, Tewari RK, Sharma PN (2007) Excess nickel-induced changes in antioxidative processes in maize leaves. *J Plant Nutr Soil Sci* 170: 796-802
39. Tamás L, Dudíková J, Ďurčėková K, Halušková L, Huttová J, Mistrik I, Ollé M (2008) Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J Plant Physiol* 165: 1193-1203
40. Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2003) The activity of lipoxygenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh – A preliminary study. *Cell Mol Biol Lett* 8: 279-284
41. Montillet J-L, Cacas J-L, Garnier L, Montané M-H, Douki T, Bessoule J-J, Polkowska-Kowalczyk L, Maciejewska U, Agnel J-P, Vial A, Triantaphylidés C (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses. *Plant J* 40: 439-451
42. Rucińska R, Gwóźdź EA (2005) Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots. *Biol Plant* 49: 617-619
43. Skórzyńska-Polit E, Pawlikowska-Pawłęga B, Szczuka E, Drązkiewicz M, Krupa Z (2006) The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stresses. *Plant Growth Regul* 48: 29-39
44. Goncalves JF, Becker AG, Cargnelutti D, Tabaldi LA, Pereira LB, Battisti V, Spanevello RM, Morsch VM, Nicoloso FT, Schetinger MRC (2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Braz J Plant Physiol* 19: 223-232
45. Paradiso A, Berardino R, De Pinto MC, Sanità Di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L (2008) Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol* 49: 362-374
46. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, Del Río LA (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* 52: 2115-2126
47. Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677-686
48. Kopyra M, Stachon-Wilk M, Gwóźdź EA (2006) Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiol Plant* 28: 525-536
49. Balestrazzi A, Botti S, Zelaso S, Biondi S, Franchin C, Calligari P, Racchi M, Turchi A, Lingua G, Berta G, Carbonera D (2009) Expression of the PsMTA1 gene in white poplar engineered with the MAT system is associated with heavy metal tolerance and protection against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated-DNA damage. *Plant Cell Reports* 28: 1179-1192
50. Sobkowiak R, Deckert J (2004) The effect of cadmium on cell cycle control in suspension culture cells of soybean. *Acta Physiol Plant* 26: 335-344
51. Rucińska R, Sobkowiak R, Gwóźdź EA (2004) Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell Mol Biol Lett* 9: 519-528
52. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
53. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91: 179-194
54. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
55. Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28: 1056-1071
56. Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
57. Fedoroff N (2006) Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Ann Bot* 98: 289-300
58. Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459-481
59. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Bellegem F, Horemans N, Schat H, Vangronsveld J (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol Plant* 129: 519-528
60. Pawlak S, Firych A, Rymer K, Deckert J (2009) Cu,Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings. *Acta Physiol Plant* 31: 741-747

61. Lee S-H, Ahsan N, Lee K-W, Kim D-H, Lee D-G, Kwak S-S, Kwon S-Y, Kim T-H, Lee B-H (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J Plant Physiol* 164: 1626-1638
62. Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16: 2176-2191
63. De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol* 98: 853-858
64. Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2002) Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytol* 156: 27-31
65. Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heysler R, Godbold DL, Polle A (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in *Scots pine* roots. *Plant Physiol* 127: 887-898
66. Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* 56: 2239-2251
67. Małecka A, Piechalak A, Tomaszewska B (2009) Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: The whole roots level. *Acta Physiol Plant* 31: 1053-1063
68. Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719
69. Rausch T, Gromes R, Liedschulte V, Müller I, Bogs J, Galovic V, Wachter A (2007) Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. *Plant Biol* 9: 565-572
70. Teisseire H, Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci* 153: 65-72
71. Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2000) Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol Plant* 110: 512-517
72. Sanità di Toppi L, Castagna A, Andreozzi E, Careri M, Predieri G, Vurro E, Ranieri A (2009) Occurrence of different inter-varietal and inter-organ defence strategies towards supra-optimal zinc concentrations in two cultivars of *Triticum aestivum* L. *Environ Exp Bot* 66: 220-229
73. Madhava Rao KV, Sresty TVS (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci* 157: 113-128
74. Mobin M, Khan NA (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 164: 601-610
75. Rucińska-Sobkowiak R, Pukacki PM (2006) Antioxidative defense system in lupin roots exposed to increasing concentrations of lead. *Acta Physiol Plant* 28: 357-364
76. Collin VC, Eymery F, Genty B, Rey P, Havaux M (2008) Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant Cell Environ* 31: 244-257
77. Backor M, Vaczi P (2002) Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Environ Exp Bot* 48: 11-20
78. Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002) Arsenate toxicity: Effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci* 163: 961-969
79. Tewari RK, Kumar P, Sharma PN, Bisht SS (2002) Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci* 162: 381-388
80. Aravind P, Prasad MNV (2003) Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: A free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiol Bioch* 41: 391-397
81. Wiśniewski L, Dickinson NM (2003) Toxicity of copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a copper-rich soil. *Environ Exp Bot* 50: 99-107
82. Jonak C, Nakagami H, Hirt H (2004) Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* 136: 3276-3283
83. Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz K-J (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* 132: 272-281
84. Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz AL, Radkiewicz S, Mar-darowicz M, Krupa Z (2005) The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 162: 1338-1346
85. Popova LP, Maslenskova LT, Yordanova RY, Ivanova AP, Krantev AP, Szalai G, Janda T (2009) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Bioch* 47: 224-231
86. Shi Q, Zhu Z (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ Exp Bot* 63: 317-326
87. Zawoznik MS, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2007) Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 173: 190-197
88. Maksymiec W, Wójcik M, Krupa Z (2007) Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* 66: 421-427
89. Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Żilkiewicz B, Czerpak R, Kamińska M (2009) Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environ Exp Bot* 66: 507-513
90. Kopyra M, Gwóźdź EA (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Bioch* 41: 1011-1017
91. Groppa MD, Rosales EP, Iannone MF, Benavides MP (2008) Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69: 2609-2615
92. Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* 164: 1346-1357
93. Nikoogar K, Moradshahi A, Hosseini L (2005) Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol Eng* 22: 141-146
94. Landberg T, Greger M (2002) Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *J Plant Physiol* 159: 69-75
95. Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409: 579
96. Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S (2005) Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *J Exp Bot* 56: 1335-1342
97. Gonnelli C, Galardi F, Gabbriellini R (2001) Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiol Plant* 113: 507-514
98. Wu F, Zhang G, Dominy P (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: Lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ Exp Bot* 50: 67-78
99. Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA (2001) Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ* 24: 713-722
100. Boominathan R, Doran PM (2002) Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol* 156: 205-215
101. Boominathan R, Doran PM (2003) Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng* 83: 158-167
102. Wang Z, Zhang Y, Huang Z, Huang L (2008) Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil* 310: 137-149

103. Wójcik M, Skórzyńska-Polit E, Tukiendorf A (2006) Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. *Plant Growth Regul* 48: 145-155
104. Chiang H-C, Lo J-C, Yeh K-C (2006) Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA microarray. *Environ Sci Technol* 40: 6792-6798
105. Guerra F, Duplessis S, Kohler A, Martin F, Tapia J, Lebed P, Zamudio F, González E (2009) Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. *Environ Exp Bot* 67: 335-344
106. Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL (2001) *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland
107. Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot* 52: 1101-1109
108. Sobkowiak R, Rymer K, Rucińska R, Deckert J (2004) Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta Biochim Pol* 51: 219-222
109. Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161: 1135-1144
110. Mourato MP, Martins LL, Campos-Andrada MP (2009) Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. *Biol Plant* 53: 105-111
111. Azevedo H, Pinto CGG, Santos C (2005) Cadmium effects in sunflower: Membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses. *J Plant Nutr* 28: 2233-2241
112. Hegedüs A, Erdei S, Horváth G (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160: 1085-1093

Oxidative stress in plants exposed to heavy metals

Renata Rucińska-Sobkowiak 

Laboratory of Plant Ecophysiology, Adam Mickiewicz University, Faculty of Biology, 89 Umultowska St., 61-614 Poznań, Poland

*e-mail address: renatar@amu.edu.pl

Key words: heavy metals, oxidative stress, plants, antioxidant enzymes

ABSTRACT

Oxidative stress has been involved in the toxicity of heavy metals in different plant species. Exposure to metal ions can intensify the production of reactive oxygen species (ROS) such as: superoxide radicals, hydroxyl radicals or hydrogen peroxide. These species can react with cellular components (lipids, proteins, nucleic acids) and cause lipid peroxidation, membrane damage and inactivation of enzymes thus affect many physiological processes as well as cell viability. Plants have evolved a complex array of mechanisms to maintain low ROS level and avoid the detrimental effects of excessively high ROS concentrations. This antioxidant network includes numerous soluble (ascorbate, glutathione) and membrane (tocopherol) compounds as well as enzymes involved in ROS scavenging (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase). ROS must be efficiently detoxified to ameliorate the harmful effects of heavy metals in the cells. However they cannot be eliminated completely because plants use ROS as second messengers in signal transduction cascades in diverse physiological processes.

Markery kwasu chlorowego (I) w układach biologicznych – identyfikacja i właściwości

STRESZCZENIE

Reaktywnym formom tlenu i azotu przypisuje się rolę w inicjowaniu i pośredniczeniu w przebiegu wielu chorób. Wykazanie zwiększonej aktywności mieloperoksydazy oraz zwiększonego poziomu chlorotyrozyny w takich chorobach jak miażdżycza tętnic, choroby nerek czy chroniczne stany zapalne zwróciło uwagę na rolę biologiczną innego, silnego oksydanta – podchlorynu, którego oznaczenie w układach *in vivo* i *in vitro* jest niezwykle trudne ze względu na jego wysoką reaktywność. Wśród specyficznych produktów reakcji podchlorynu z cząsteczkami biologicznymi wyróżnia się takie jak: chlorohydryny, sulfonamid glutationu, chloraminy, 3- i 3,5-dichlorotyrozynę oraz chlorowane zasady azotowe (8-chloroadenina, 8-chloroguanina, 5-chlorocytozyna, 5-dichlorocytozyna, 5-chlorouracyl) i z tą grupą związków, przy użyciu czułych metod detekcji, wiąże się nadzieję na znalezienie biologicznego markera podchlorynu, co jest szczególnie ważne z klinicznego punktu widzenia.

WPROWADZENIE

Chlor i jego pochodne są naturalnie występującymi składnikami Ziemi. Poniżej w formie cząsteczkowej chlor jest wysoce reaktywny, udział tej formy w całkowitej puli chloru w przyrodzie jest niski. Chlor występuje w organizmach żywych zarówno w związkach organicznych, jak i nieorganicznych. W organizmie człowieka zaliczany jest do makroelementów, a jego zawartość nie przekracza 1% suchej masy. Żywe organizmy wytwarzają ponad 2000 chloropochodnych organicznych o często unikatowych właściwościach (np. wankomycyna – antybiotyk chroniący przed infekcjami *Staphylococcus*). Związki chloru obecne *in vivo* pełnią wiele różnych funkcji (jon chlorkowy jest ważnym składnikiem płynów ustrojowych biorącym udział w regulowaniu równowagi osmotycznej, kwas chlorowy (I) (dawniej: kwas podchlorawy) bierze udział w ochronie organizmu przed atakiem patogenów, kwas solny wykorzystywany jest w procesie trawienia). Część związków chloru charakteryzująca się stosunkowo wysoką aktywnością biologiczną, zaliczana jest do grupy tzw. reaktywnych form chloru. Wiele związków należących do tej grupy wykazuje właściwości prooksydacyjne, niektóre z nich mogą być donorami atomu chloru w reakcjach międzycząsteczkowego transferu chloru. Wraz ze wzrostem ilości doniesień wskazujących na udział reaktywnych form chloru w przebiegu wielu chorób wzrosło zainteresowanie tą grupą związków.

WYBUCH TIENOWY – ŹRÓDŁO REAKTYWNYCH FORM CHLORU *IN VIVO*

Wybuch tlenowy jest zachodzącym w pobudzonych fagocytach procesem znacznego zwiększenia spożycia tlenu i wytwarzania dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego [1]. W trakcie jego przebiegu dochodzi do powstawania reaktywnych oksydantów: anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenku wodoru, rodnika hydroksylowego, tlenu singletowego, a w przypadku neutrofilów także kwasu chlorowego (I). Towarzyszy temu kilkudziesięciokrotne zwiększenie zużycia tlenu i NADPH oraz aktywacja cyklu pentozofosforanowego w tych komórkach [2].

OKSYDAZY NADPH

Oksydazy NADPH (NOX, ang. *NADPH Oxidase*) są rodziną białek, posiadających zdolność do jednoelektronowej redukcji tlenu, która prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego [3]. Dla prawidłowego funkcjonowania enzymu niezbędna jest obecność białek regulatorowych. Dotychczas zidentyfikowano pięć izoenzymów oksydazy NADPH, występujących w różnych tkankach: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 oraz NOX5. Obecna wewnątrz fagocytów izoforma NOX2 (znana także jako białko gp91^{phox}) została znaleziona również w limfocytach B, neuronach, kardiomiocytach mięśniach szkieletowych i gładkich,

Agnieszka Robaszkiewicz[✉]

Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

[✉]Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel./faks: (42) 635 44 76, e-mail: agnieszka.robaszkiewicz@gmail.com

Artykuł otrzymano 7 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 21 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: mieloperoksydaza, podchloryn, chlorohydryny, chloraminy, marker biologiczny

Wykaz skrótów: HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową; LC – chromatografia cieczowa; LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości; mAbD3 – przeciwciało monoklonalne rozpoznające 5-dichloro i 5-dibromocytydynę; MPO – mieloperoksydaza; NOX – oksydaza NADPH; MS – spektrometria mas

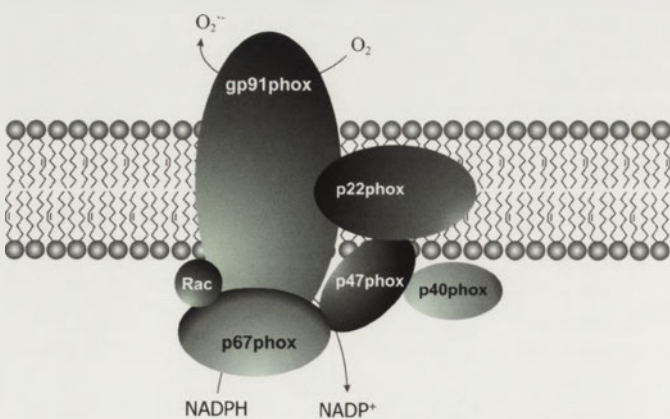
śródbłonku naczyniowym, komórkach macierzystych oraz hepatocytach [4], jakkolwiek w tych komórkach jest dużo niższa niż w fagocytach.

W neutrofilach centrum kompleksu enzymatycznego stanowi cytochrom *b558* (flawohemoproteina zbudowana z dwóch podjednostek: *gp91^{phox}* i *p22^{phox}*) wbudowany w błonę komórkową lub błonę fagosomu (Ryc. 1). W skład enzymu wchodzi także podjednostki, które zlokalizowane są na terenie cytoplazmy do chwili pojawienia się sygnału aktywującego fagocyt. Należą do nich białka: *p40^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* oraz białko Rac. W chwili uruchomienia kaskady sygnałowej łączą się one ze składnikami (białkami) błonowymi w aktywny kompleks enzymatyczny zdolny do transportu elektronów. Przepływ elektronów odbywa się zgodnie ze wzrostem potencjałów redoks kolejnych elementów kompleksu: $\text{NADPH} \rightarrow \text{cytochrom } b558 \rightarrow \text{O}_2$.

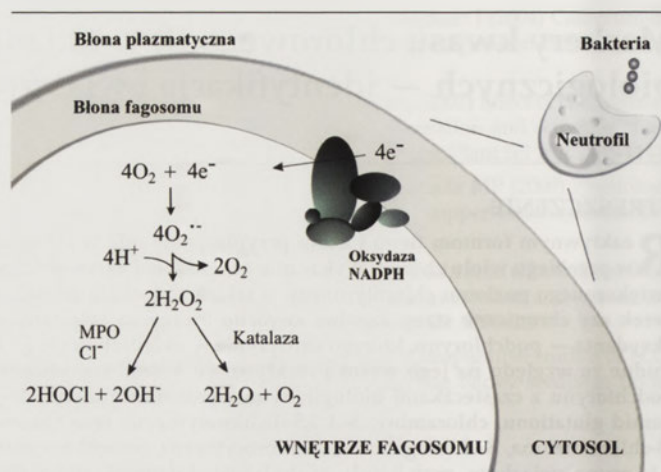
Wewnątrz fagosomu aktywna forma enzymu redukuje tlen cząsteczkowy do anionorodnika ponadtlenkowego, który ulega następnie reakcji dysproporcjonowania: spontanicznego lub katalizowanego przez dysmutazę ponadtlenkową, w wyniku czego powstaje tlen cząsteczkowy i nadtlenek wodoru (Ryc. 2). Nadtlenek wodoru z kolei jest rozkładany przez katalazę do H_2O i tlenu cząsteczkowego lub jest wykorzystywany przez mieloperoksydazę jako substrat do utlenienia jonów chlorkowych do HOCl .

MIELOPEROKSYDAZA (EC 1.11.1.7)

Zawartość mieloperoksydazy (MPO) w neutrofilach człowieka jest wysoka; enzym ten stanowi około 2-5% wszystkich białek tych komórek [5]. Monocyty człowieka również zawierają mieloperoksydazę, jednak w znacznie mniejszej ilości. Enzym ten, należący do grupy peroksydaz hemowych, zlokalizowany jest w peroksosomach. Mieloperoksydaza jest kodowana przez pojedynczy gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17 (q12-24). Jest syntetyzowana jako proenzym, ulegający potranslacyjnym modyfikacjom (glikozylacja grup aminowych, wbudowanie układu hemowego, usunięcie peptydu sygnałowego) [6]. Funkcjonalny enzym jest glikozylowanym, zasadowym białkiem zbudowanym z dwóch par dimerów połączonych mostkiem disiarczkowym. Każdy dimer składa się z podjednostki ciężkiej, zawierającej w swojej strukturze układ



Rycina 1. Skład kompleksu aktywnej oksydazy NADPH (NOX2) wewnątrz fagocytu.



Rycina 2. Wybuch oddechowy.

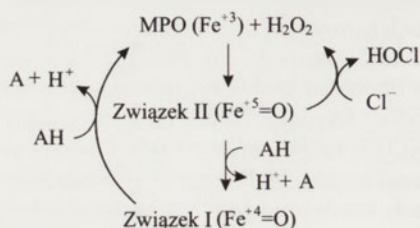
hemowy (~60 kDa) oraz z podjednostki lekkiej (~15 kDa). Mieloperoksydaza w formie dimeru występuje zarówno w neutrofilach, jak i monocytach. Podobnie, pewne podtypy makrofagów posiadają zdolność do ekspresji genu kodującego mieloperoksydazę. Dowiedziono, że mieloperoksydaza jest wydzielana przez komórki fagocytujące do macierzy pozakomórkowej w formie proenzymu (monomeru), który wykazuje identyczne właściwości enzymatyczne jak potranslacyjnie zmodyfikowany dimer. Może być transportowana na powierzchni makrofagów dzięki zdolności wiązania się z receptorem mannozowym tych komórek [7].

Dwie grupy hemowe mieloperoksydazy połączone są z większymi podjednostkami za pomocą wiązania amidowego. Enzym występuje w pięciu formach, zdefiniowanych na podstawie stopnia utlenienia żelaza [8]: ferro-MPO, (Fe^{+2}); ferri-MPO, (Fe^{+3}); związek I, (Fe^{+4}); związek II, (Fe^{+5}); związek III, (Fe^{+6}). Mieloperoksydaza oscylując pomiędzy różnymi stanami utlenienia żelaza katalizuje reakcję, w której (w zależności od rodzaju obecnego jonu) powstaje HOCl / HOBr / HOSCN (Ryc. 3) [9].

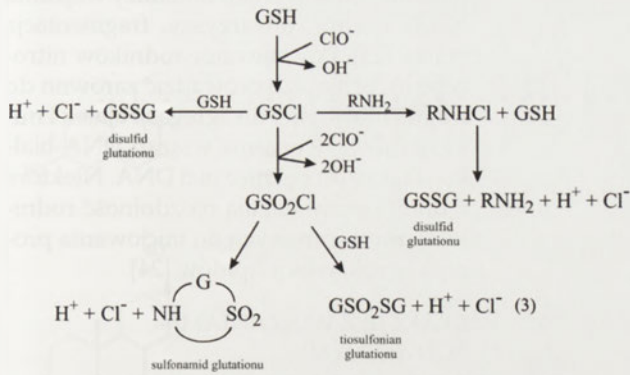
Obecny w fagosomach nadtlenek wodoru powoduje dwueletronowe utlenienie żelaza hemowego mieloperoksydazy. Jony chlorkowe następnie są utleniane w trakcie powrotu żelaza z +5 do +3 stopnia utlenienia. Produktami reakcji są: kwas chlorowy (I) i woda [10]. Mieloperoksydaza oprócz zdolności do utleniania halogenków, charakteryzuje się aktywnością typową dla peroksydazy utleniającej również inne substraty [6].

WŁAŚCIWOŚCI HOCl I CELE JEGO ATAKU *IN VITRO* I *IN VIVO*

HOCl , częściowo zdysocjowany w pH obojętnym ($\text{pK}_a \sim 7,54$), jest związkiem silnie reaktywnym, biorącym udział w



Rycina 3. Schemat tworzenia kwasu chlorowego I przez mieloperoksydazę.

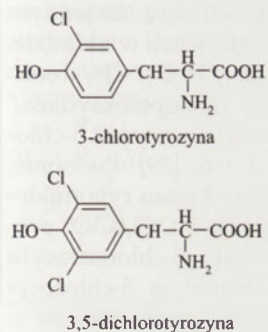


Rycina 4. Schemat utleniania glutationu przez HOCl.

reakcjach utleniania i chlorowania. Standardowy potencjał redoks układu HOCl/Cl⁻ (1,49 V) jest niższy od potencjału redoks układu O₃/O₂ (2,07 V) i H₂O₂/H₂O (1,77 V), ale wyższy w porównaniu z potencjałem par Cl₂/Cl⁻ (1,36V) i ClO₂⁻/Cl⁻ (0,95 V). Badania *in vitro* wykazały, że HOCl/ClO⁻ i układ mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl⁻ wywołują podobne efekty w układach biologicznych, co dodatkowo potwierdziło udział podchlorynu w uszkodzeniach wywołanych aktywacją neutrofilów. W stanach patologicznych stężenie HOCl może być wysokie, osiągając w miejscach objętych stanem zapalnym nawet 200 μM [11]. Najbardziej podatne na utlenianie przez HOCl są grupy tiolowe cysteiny oraz tioeterowe metioniny, a także askorbinian, tryptofan i kwas moczowy. Reakcjom chlorowania ulegają natomiast grupy aminowe białek i aminokwasów, reszty tyrozyny, nukleotydy purynowe i pirymidynowe oraz nienasycone lipidy i cholesterol [12].

UTLENIANIE GRUP TIOLOWYCH

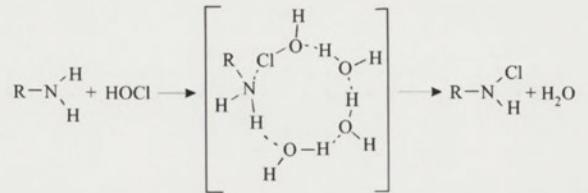
Podchloryn, dzięki stosunkowo wysokiemu potencjałowi redoks, posiada zdolność utleniania reszt cysteinowych białek i glutationu oraz tioeterów, prowadząc do powstania wewnątrz- i międzycząsteczkowych disulfidów białek, disulfidu glutationu oraz mieszanych disulfidów białkowo-glutationowych [13,14]. Badania z wykorzystaniem elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) dowiodły, że utlenianiu wielu grup tiolowych towarzyszy pojawienie się rodników tiolowych, a w przypadku znacznego nadmiaru podchlorynu również rodników nitrocentrowych [15]. Dalsze utlenianie disulfidów może prowadzić do formowania grup sulfenowych, sulfinowych i ostatecznie sulfonowych. Stosunkowo niedawno odkryto, że produktami utleniania glutationu przez podchloryn mogą być także jego wewnątrzcząsteczkowy sulfonamid, dehydroglutation oraz tiosulfonian glutationu (Ryc. 4) [16,17].



Rycina 5. Produkty chlorowania tyrozyny przez HOCl.

CHLOROWANIE RESZT TYROZYNOWYCH BIAŁEK

W reakcji HOCl/ClO⁻ z resztami tyrozylowymi białek powstają: 3-chlorotyrozyna i 3,5-dichlorotyrozyna (Ryc. 5) [18]. Obecność chlorotyrozyny wykazana została także w



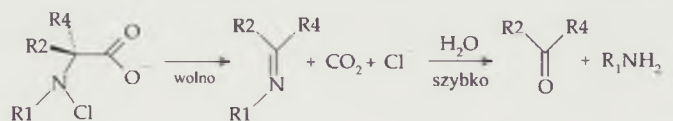
Rycina 6. Mechanizm chlorowania reszt aminowych przez HOCl.

białkach ekspozowanych na działanie układu mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl⁻ oraz aktywowanych neutrofilów. Jak dotąd, mało wiadomo na temat metabolizmu chlorotyrozyny. Przypuszcza się, że jest ona substratem dla dehalogenaz lub/i S-transferazy glutationowej. Obecność 3-chlorotyrozyny wykazano w płytkach miażdżycowych (około 300 reszt chlorotyrozynowych/1000000 reszt tyrozynowych) [19].

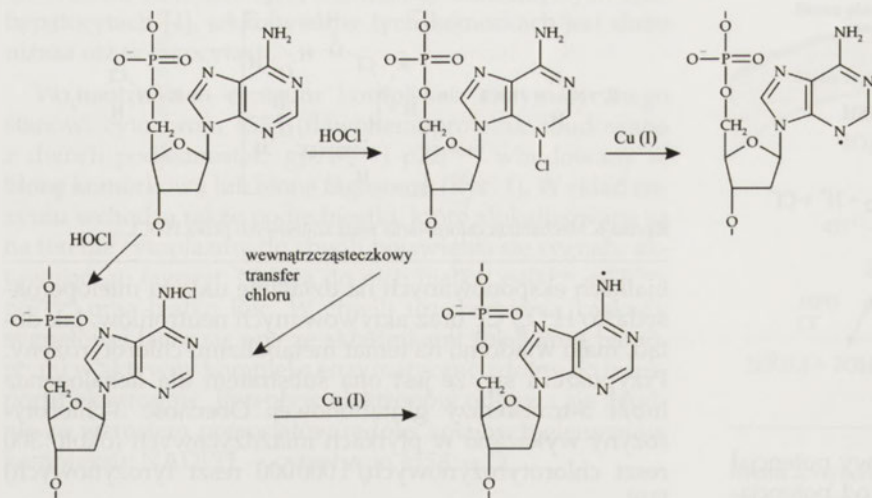
CHLOROWANIE RESZT AMINOWYCH

Grupy aminowe białek i aminokwasów, a także zasad purynowych i pirymidynowych ulegają chlorowaniu w obecności HOCl/ClO⁻. Największe znaczenie biologiczne, jak dotąd, przypisuje się chloraminom aminokwasów i amin biogennych. Ich stosunkowo wysokie stężenie *in vivo* (stężenie tauryny dochodzące do 20 mM wewnątrz neutrofilów, histaminy do 100 mM wewnątrz komórek tucznych), podatność grupy aminowej na reakcję z podchlorynem oraz wykazana zdolność chloroamin do wchodzenia w reakcje z innymi związkami sprawia, że są one uważane za mediatory działania podchlorynu [20]. W reakcji wymiany atomu chloru z atomem wodoru grupy aminowej biorą udział cząsteczki wody (Ryc. 6) [9]. Wiązania wodorowe umożliwiają tworzenie stanu przejściowego w trakcie reakcji HOCl z grupą aminową.

Szybkość reakcji grup aminowych z HOCl zależy od ich zasadowości. Stałe szybkości reakcji amin pierwszo- i drugorzędowych o pK_a > 9 z kwasem chlorowym (I) są podobne (10⁷-10⁸ M⁻¹s⁻¹), a proces charakteryzuje się niską energią aktywacji. Biorąc pod uwagę wysoką wartość stałych szybkości reakcji należy oczekiwać, że szybkość, z jaką będzie zachodzić chlorowanie reszt aminowych może być ograniczona tylko przez dyfuzję potencjalnych substratów reakcji. W przypadku amin trzeciorzędowych stała szybkości reakcji jest o trzy rzędy wielkości niższa, co potwierdza udział atomów wodoru w reakcji podstawienia atomów chloru do grupy aminowej. Chloraminy charakteryzuje mała stabilność w roztworach wodnych. Mogą podlegać kilku procesom w zależności od warunków środowiska. W pH bliskim obojętnemu N-chloroaminokwasy, występujące w większości w postaci anionów, ulegają rozpadowi, w wyniku którego powstają: aldehyd lub keton zawierający jeden atom węgla mniej niż wyjściowa cząsteczka aminokwasu,



Rycina 7. Schemat rozpadu chloroamin.



Rycina 8. Schemat chlorowania reszty adeniny w kwasach nukleinowych i powstawania rodników nitrocentrowych.

CO₂, NH₃ lub amina pierwszorzędowa (w przypadku *N*-acetyloaminokwasów) i jon chlorkowy (Ryc. 7). Rozpad *N*-chloroaminokwasów przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap, warunkujący szybkość całego rozpadu cząsteczki, polega na fragmentacji cząsteczki *N*-chloroaminokwasu na Cl⁻, CO₂ i iminokwas, który następnie w drugim etapie reakcji ulega szybkiej hydrolizie na aldehyd lub keton i NH₃ lub aminę pierwszorzędową [9] (Ryc. 7).

Rozpad *N*-chloroaminokwasów jest procesem pierwszorzędowym, niezależnym od pH, jednak zachodzącym szybciej w miarę obniżania polarności rozpuszczalnika. W obecności jonów metali przejściowych (np. Cu (I)) może dochodzić do rozpadu wiązania N-Cl i powstawania wolnych rodników z elektronem zlokalizowanym na atomie azotu, który tworzył wiązanie kowalencyjne z atomem chloru (Ryc. 8) [21]. Znane są również przypadki wewnątrzcząsteczkowego i międzycząsteczkowego transferu chloru, pomiędzy grupami aminowymi (iminowymi) tej samej cząsteczki [22].

Szczególnie dobrze poznanym procesem jest tworzenie rodników nitrocentrowych na resztach lizyny w łańcuchach

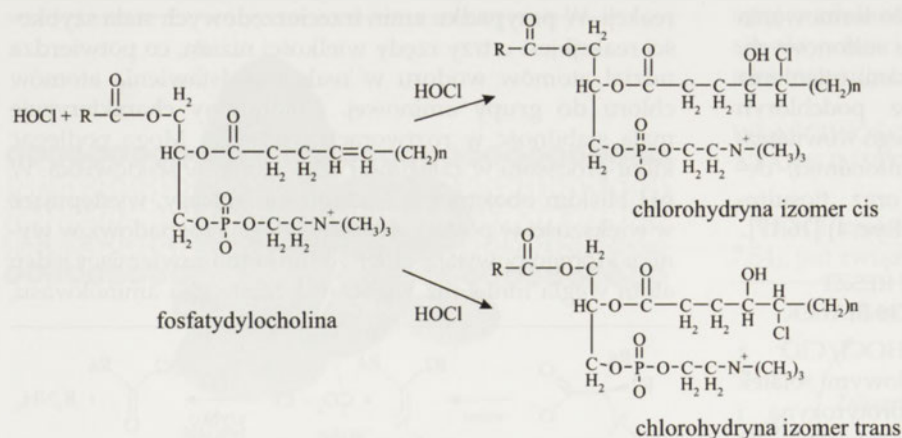
białkowych w wyniku homolizy wiązania N-Cl, czemu towarzyszy fragmentacja białka [23]. Powstawanie rodników nitrocentrowych może prowadzić zarówno do fragmentacji, jak i do agregacji białek i nukleotydów, tworzenia wiązań DNA-białko, a także do pęknięć nici DNA. Niektóre z doniesień wskazują na zdolność rodników nitrocentrowych do inicjowania procesu peroksydacji lipidów [24].

REAKCJE Z WIĄZANAMI PODWÓJNYMI

Chlorohydryny powstają w reakcji kwasu chlorowego (I) z cząsteczką posiadającą w swojej strukturze wiązanie podwójne (Ryc. 9). Produktami reakcji są izomery: *cis* i *trans*. Tworzone są głównie chlorohydryny lipidów i cholesterolu, chociaż istnieją doniesienia o tworzeniu chlorohydrin zasad pirymidynowych w komórkach ekspozowanych na działanie

HOCl/CIO⁻ [25]. Badania przeprowadzone na liposomach fosfatydylocholinowych wykazały, że chlorohydryny są głównym produktem reakcji podchlorynu z fosfatydylocholinami zawierającymi w swoich cząsteczkach reszty kwasów tłuszczowych z maksymalnie czterema wiązaniami nienasyconymi [26,27].

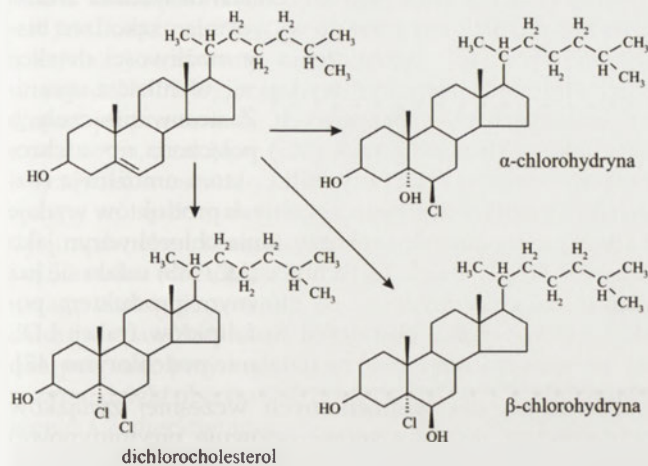
Wydłużenie czasu ekspozycji fosfatydylocholinę zawierającej reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na działanie podchlorynu prowadzi do powstania lizofosfolipidów. Powstają one na skutek osłabienia wiązania estrowego pomiędzy grupą hydroksylową glicerolu a grupą karboksylową wielonienasyconego kwasu tłuszczowego jako wynik pojawienia się podstawników elektronoakceptorowych (-Cl i -OH) w resztach kwasu tłuszczowego [26]. Badania przeprowadzone na liposomach zawierających cholesterol oraz na lipidach ekstrahowanych z erytrocytów i błon erytrocytarnych dowodzą, że w obecności HOCl/CIO⁻ (podobnie jak w obecności układu mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl⁻) dochodzi do powstawania α- i β-chlorohydrin cholesterolu oraz dichlorocholesterolu (Ryc. 10) [28].



Rycina 9. Schemat powstawania chlorohydrin fosfolipidów.

CHLOROWANIE ZASAD PIRYMIDYNOWYCH

Chociaż grupy aminowe nukleotydów są preferowanym celem ataku HOCl/CIO⁻ udowodniono, że jednym z produktów powstających w układzie: mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl⁻/deoksycytidyna oraz mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl⁻/kwas nukleinowy jest 5-chlorocytozyna (pH 4.5-6) [29]. Podobnie, ekspozycja uracylu i kwasu rybonukleinowego na działanie HOCl/CIO⁻ prowadzi do powstania 5-chlorouracylu [30,31]. W pH obojętnym 5-chlorocytozyna jest związkiem nietrwałym, a produktem jej spontanicznej lub enzymatycznej deaminacji także 5-chloro-

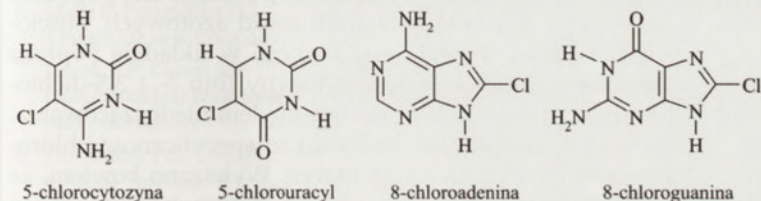


Rycina 10. Produkty oraz schemat reakcji HOCl z cholesterolem.

uracyl [32,33]. Reakcji podchlorynu z kwasami nukleinowymi towarzyszy również powstawanie chlorowanych zasad purynowych (8-chloroadenina, 8-chloroguanina), jednak w znacznie mniejszych ilościach (Ryc. 11) [34].

NIESPECYFICZNE PRODUKTY REAKCJI PODCHLORYNU

Dość powszechnie wykorzystywanym do ilościowego oznaczenia oksydacyjnych uszkodzeń białek i lipidów markerem są grupy karbonylowe, powstające w białkach i błonach białkowo-lipidowych poddanych działaniu podchlorynu. Uważa się, że w procesie ich powstawania główną rolę odgrywa rozpad wiązań N-Cl uprzednio chlorowanych reszt aminowych białek, który prowadzi do powstania rodników nitrocentrowych. Delokalizacja elektronów z atomów azotu na atomy węgla może prowadzić do destabilizacji cząsteczki białka i w konsekwencji do rozpadu białek z jednoczesnym utworzeniem grup karbonylowych [23]. Rodniki centro-węglowe przyłączając tlen cząsteczkowy tworzą rodnik nadtlenkowy, posiadający zdolność do inicjacji procesu peroksydacji lipidów, który może być następstwem modyfikacji białek przez podchloryn szczególnie w błonach i lipoproteinach [35]. Inny proponowany mechanizm tworzenia grup karbonylowych białek opiera się na rozpadzie grup chloroaminowych bez etapu tworzenia rodników, który prowadzi do powstania grup aldehydowych bądź ketonowych (Ryc. 10) [9]. Grupy karbonylowe są także stabilnymi produktami końcowymi procesu peroksydacji lipidów i rozpadu wodoronadtlenków, jednak mechanizm inicjacji tego procesu przez podchloryn szczególnie w liposomach nie zawierających białek pozostaje w dalszym ciągu nierozstrzygnięty. Szczególny udział w indukcji peroksydacji lipidów w liposomach przypisywany jest obecności śladowych



Rycina 11. Główne produkty reakcji zasad azotowych z HOCl.

ilości wodoronadtlenków, których reakcja z podchlorynem prowadzi do uwolnienia tlenu singletowego znanego ze zdolności do wchodzenia w reakcję z wiązaniami podwójnymi łańcuchów lipidowych [36,37]. Istnieją doniesienia o udziale reszt aminowych fosfolipidów (fosfatylyloseryna, fosfatydyloetanolamina) w procesie peroksydacji lipidów indukowanej przez podchloryn [24]. Autorzy sugerują, że podobnie jak w przypadku chloramin reszt białkowych, chloraminy fosfolipidów i powstające w wyniku rozpadu wiązania N-Cl rodniki bądź centro-azotowe, bądź centro-węglowe mogą wykazywać zdolność odrywania atomu wodoru od łańcucha węglowodorowego kwasów tłuszczowych inicjując w ten sposób kaskadę reakcji prowadzącą do powstania wodoronadtlenków i grup karbonylowych.

Spektrum produktów powstających w wyniku działania podchlorynu w układach biologicznych rozszerza się także o produkty typowe dla stresu oksydacyjnego wywołanego przez reaktywne formy tlenu [13,38,39]. Wynika to w dużej mierze z faktu (oprócz wymienionych wcześniej), że podchloryn posiada zdolność do wchodzenia w reakcję z anionorodnikiem ponadtlenkowym w wyniku czego powstaje jedna z najsilniej reaktywnych cząstek: rodnik hydroksylovowy [40]. Podobna sytuacja ma miejsce w układzie DNA-Cu^I: podchloryn utleniając miedź skompleksowaną z DNA prowadzi do powstania rodnika hydroksylovowego w bezpośrednim sąsiedztwie kwasu nukleinowego, co z kolei pociąga za sobą tworzenie oksydacyjnych uszkodzeń zasad azotowych oraz prowadzi do pęknięć helisy DNA.

CECHY IDEALNEGO BIOMARKERA A WŁAŚCIWOŚCI PRODUKTÓW REAKCJI PODCHLORYNU

Podstawowymi cechami, które powinny charakteryzować dobry biomarker są:

1. specyficzność: jego pojawienie nie powinno budzić wątpliwości co do mechanizmu jego powstania; powinien być produktem charakterystycznym tylko dla jednego typu reakcji lub konkretnego substratu;
2. stabilność: powinien charakteryzować się niską reaktywnością i pozostawać w układzie w formie niezmienionej przez wystarczająco długi okres czasu;
3. odpowiednio wysokie stężenie: potencjalny kandydat powinien wykazywać na tyle dużą reaktywność w stosunku do związku, którego ma być markerem, aby ilość powstałego w wyniku reakcji produktu była wystarczająca do jego ilościowego bądź jakościowego oznaczenia (wykrycia).

W środowisku, w którym powstaje podchloryn najbardziej uprzywilejowanymi reakcjami są reakcje utleniania głównie niskocząsteczkowych antyoksydantów (glutationu, kwasu askorbinowego, metioniny) oraz grup tiolowych białek, jednak większość powstających produktów (również dehydroglutation) jest efektem działania także innych oksydantów [13,16]. Wyjątek stanowi wewnątrzcząsteczkowy sulfonamid glutationu, który może być dominującym produktem utleniania glutationu przy wysokich stężeniach podchlorynu (62% glutationu ulega prze-

kształceniu w sulfonamid glutationu przy $[\text{HOCl}]:[\text{GSH}] = 4$, podczas gdy 32% przy $[\text{HOCl}]:[\text{GSH}] = 1$ [16]. Co więcej, reakcja ta ma charakter nieodwracalny, ponieważ komórki nie są wyposażone w system naprawy tego typu uszkodzeń. Technika LC-MS/MS łącząca chromatografię ciecząwą ze spektrometrią mas umożliwia wykrycie już 0,1 pmola sulfonamidu glutationu i została skutecznie zaadoptowana do oznaczania jego stężenia wewnątrz komórek oraz w płynach ustrojowych [41]. Jednak sulfonamid glutationu może powstawać także w obecności takich oksydantów jak nadtlendioazotyn (do 5% gdy $[\text{ONOO}]:[\text{GSH}] = 4$) czy kwas bromowy (I) (około 25 % kiedy $[\text{HOBr}]:[\text{GSH}] = 2$) [16]. Fakt, że powstawaniu podchlorynu może towarzyszyć tworzenie nadtlendioazotynu i kwasu bromowego (I) zwłaszcza z stanach zapalnych wydaje się ograniczać możliwość wykorzystania sulfonamidu glutationu jako specyficznego markera HOCl. Stosunkowo mało wiadomo także na temat tiosulfonianu glutationu zidentyfikowanego obok sulfonamidu (jednak w znacznie mniejszej ilości) wśród produktów utlenienia glutationu przez podchloryn.

Reakcje, w których do cząsteczki przyłączony lub podstawiony zostaje atom chloru wydają się dawać większe prawdopodobieństwo pojawienia się charakterystycznego dla HOCl produktu o wymaganych dla markera właściwościach. Należy zwrócić jednak uwagę na fakt, że stałe szybkości dla tego typu reakcji są zwykle o kilka rzędów wielkości niższe niż stałe szybkości reakcji utleniania dla podchlorynu [42].

Najbardziej podatne na podstawienie atomu chloru są grupy aminowe białek i aminokwasów. Wykazano, że w hodowli aktywowanych neutrofilów stężenie chloraminy tauryny może osiągać stężenie powyżej 100 μM [43]. Jednak stosunkowo mała stabilność i niejednokrotnie towarzysząca chloraminom zdolność do utleniania innych związków sprawia, że nie spełniają one wymogów stawianych biologicznemu markerowi podchlorynu [44,45]. Ich spontaniczny rozkład do aldehydów (ketonów), katalizowany przez jony metali przejściowych i rodniki nadtlendioazotynu powodują zmniejszenie ilości 8-chloroadeniny, powstałej w helisie DNA w wyniku ekspozycji na HOCl, a przy wyższych stężeniach m.in. nadtlendioazotynu także obniżenie poziomu 5-chlorocytozyny [50]. Patrząc przez pryzmat cech, jakimi powinien charakteryzować się marker biologiczny jest to efekt niepożądany, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że najczęściej reakcja, w której powstaje podchloryn przebiega w środowisku o zwiększonym stężeniu reaktywnych form tlenu i azotu (wybuch oddechowy w aktywowanych fagocytach). Podobnie sytuacja wygląda w przypadku 3-chlorotyrozyny, która podobnie jak jej dichloropochodna (3,5-dichlorotyrozyna) uważana była do niedawna za stabilny produkt reakcji podchlorynu z tyroziną i resztami tyrozynowymi białek. Udowodniono jednak, że w obecności takich oksydantów jak nadtlendioazotyn obniżeniu ulega poziom zarówno 3-chlorotyrozyny jak i chlorowanych reszt tyrozynowych białek [51]. Dlatego też, podobnie jak w przypadku chlorowanych zasad azotowych, ilościowe oznaczenie stężenia podchlorynu w układzie poprzez oznaczenie stężenia 3-chlorotyrozyny (lub 3- i 3,5-dichlorotyrozyny) może być obciążone błędem niedoszacowania. Co więcej, wątpliwość budzi także specyficzność chlorowania tyrozyny przez podchloryn. Wykazano bowiem, że zarówno 3-chlorotyrozyna, jak i 3,5-dichlorotyrozyna mogą powstawać w tkankach w wyniku ekspozycji na chlor w formie gazowej oraz w niskim pH żołądka w obecności

działaniu HOCl, jednak przy stężeniach oksydanta znacznie wyższych, niż niezbędne do wywołania uszkodzeń białek błonowych [46]. Ograniczenia w możliwości detekcji niskich stężeń chlorohydryn wydają się wynikać z ograniczeń metodycznych i sprzętowych. Zastosowanie czułych metod jak spektrometria mas (MS) połączona np. z chromatografią ciecząwą (LC) czy HPLC, która umożliwia rozdzielanie i identyfikację poszczególnych produktów wydaje się stwarzać możliwość wykorzystania chlorohydryn jako markerów HOCl. Dzięki tej technice (LC/MS) udało się już wykazać, że chlorohydryny są głównym produktem powstającym w wyniku ekspozycji fosfolipidów frakcji LDL (ang. *low density lipoproteins*) na działanie podchlorynu [47].

Alternatywą dla wymienionych wcześniej związków są chlorowane zasady azotowe (głównie pirymidynowe) oraz chlorotyrozyna, charakteryzujące się obecnością jednego lub dwóch atomów chloru przyłączonych do pierścienia aromatycznego. Największą frekwencją wśród metod stosowanych do identyfikacji produktów reakcji HOCl z DNA i RNA wyróżnia się spektrometria mas, ze względu (przede wszystkim) na swoją czułość. W komórkach poddanych działaniu HOCl dzięki połączeniu techniki HPLC z analizą za pomocą tandemowego spektrometru mas udało się wykazać obecność 8-chloroguaniny, 8-chloroadeniny i 5-chlorocytozyny [34]. Podobnie, obecność 5-chlorouracylu stwierdzono za pomocą spektrometrii mas połączonej z chromatografią gazową w komórkach eksponowanych na działanie podchlorynu w dawkach subletalnych [48]. Otrzymanie przeciwciała monoklonalnego (mAbD3), dla którego epitopem okazała się być 5-dichloro- i 5-dibromocytydina, wydawała się umożliwiać dodatkowo ilościowe oznaczenie chlorocytozyny dopóki nie odkryto, że obecność innych oksydantów wpływa znacząco na poziom chlorowanych zasad azotowych [49]. Nadtlendioazotyn, SIN-1 oraz układ generujący rodnik hydroksylowy ($\text{CuCl}_2/\text{askorbinian}/\text{H}_2\text{O}_2$) powodują zmniejszenie ilości 8-chloroadeniny, powstałej w helisie DNA w wyniku ekspozycji na HOCl, a przy wyższych stężeniach m.in. nadtlendioazotynu także obniżenie poziomu 5-chlorocytozyny [50]. Patrząc przez pryzmat cech, jakimi powinien charakteryzować się marker biologiczny jest to efekt niepożądany, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że najczęściej reakcja, w której powstaje podchloryn przebiega w środowisku o zwiększonym stężeniu reaktywnych form tlenu i azotu (wybuch oddechowy w aktywowanych fagocytach). Podobnie sytuacja wygląda w przypadku 3-chlorotyrozyny, która podobnie jak jej dichloropochodna (3,5-dichlorotyrozyna) uważana była do niedawna za stabilny produkt reakcji podchlorynu z tyroziną i resztami tyrozynowymi białek. Udowodniono jednak, że w obecności takich oksydantów jak nadtlendioazotyn obniżeniu ulega poziom zarówno 3-chlorotyrozyny jak i chlorowanych reszt tyrozynowych białek [51]. Dlatego też, podobnie jak w przypadku chlorowanych zasad azotowych, ilościowe oznaczenie stężenia podchlorynu w układzie poprzez oznaczenie stężenia 3-chlorotyrozyny (lub 3- i 3,5-dichlorotyrozyny) może być obciążone błędem niedoszacowania. Co więcej, wątpliwość budzi także specyficzność chlorowania tyrozyny przez podchloryn. Wykazano bowiem, że zarówno 3-chlorotyrozyna, jak i 3,5-dichlorotyrozyna mogą powstawać w tkankach w wyniku ekspozycji na chlor w formie gazowej oraz w niskim pH żołądka w obecności

jonów chlorkowych [52,53]. Mimo to, 3-chlorotyrozyna jest jak dotąd najpowszechniej (obok aktywności mieloperoxydazy) stosowanym wskaźnikiem generowania HOCl w układach biologicznych. Badania udowodniły znaczny wzrost jej poziomu w surowicy osób, u których wystąpił zawał serca, a także w płytkach miażdżycowych [19,54,55]. Najczęściej stosowanymi metodami w detekcji chlorotyrozyny są: spektrometria mas, technika HPLC oraz metody immunohistochemiczne wykorzystujące przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko 3-chlorotyrozynie. Na uwagę zasługuje również fakt, że produktem końcowym chlorowania tyrozyny jest 3,5-dichlorotyrozyna i to głównie ona powstaje przy wysokich stężeniach HOCl. 3-chlorotyrozyna, dzięki obecności elektrofilowego podstawnika przy węglu C3 pierścienia jest zdecydowanie bardziej podatna na wprowadzenie drugiego atomu chloru przy węglu C5, niż tyrozyna na wprowadzenie pierwszego podstawnika, co sprawia, że reakcja tworzenia 3-chlorotyrozyny szybko osiąga fazę plateau [13]. Dlatego najwłaściwsze wydaje się oznaczanie poziomów obydwu produktów reakcji.

PODSUMOWANIE

Znalezienie specyficznego markera, którego pojawienie się wskazywałoby jednoznacznie na obecność podchlorynu w układzie oraz walidacja metod jego precyzyjnej detekcji ma szczególne znaczenie dla prognozowania rozwoju wielu chorób, które są wynikiem lub w przebiegu których dochodzi do zwiększonej produkcji tego oksydanta. Rozwój nowych, czułych technik takich jak HPLC, spektrometria mas czy metody immunohistochemiczne obniżył próg detekcji, umożliwiając tym samym rozważanie możliwości wykorzystania jako markerów związków, występujących w materiale biologicznym w ilościach śladowych. Dzięki temu, stosunkowo niedawno wykryte związki takie jak sulfonamid glutationu, chlorohydriny fosfolipidów i cholesterolu czy chlorowane zasady azotowe mają szansę stać się biomarkerami HOCl, zwłaszcza, jeśli uwzględnimy fakt, że jedynym dotychczas klinicznie potwierdzonym wskaźnikiem zwiększonej produkcji HOCl jest chlorotyrozyna.

PIŚMIENNICTWO

1. Plekhova NG (2006) Bactericidal activity of phagocytes. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 6: 89-96
2. Thomas EL, Lehrer RI, Rest RF (1988) Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 10 Suppl 2: S450-S456
3. Roos D, van Bruggen R, Meischl C (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5: 1307-1315
4. Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313
5. But PG, Fomina VA, Murav'ev RA, Rogovin VV (2003) Myeloperoxidase from neutrophil peroxisomes. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 261-265
6. Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C (2007) Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol* 152: 838-854
7. Leung KP, Goren MB (1989) Uptake and utilization of human polymorphonuclear leukocyte granule myeloperoxidase by mouse peritoneal macrophages. *Cell Tissue Res* 257: 653-656
8. Furtmuller PG, Obinger C, Hsuanyu Y, Dunford HB (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur J Biochem* 267: 5858-5864
9. Armesto X, Canle M (1998) Aqueous chemistry of N-halo-compounds *Chem Soc Rev* 27: 453-460

10. Spalteholz H, Panasencko OM, Arnhold J (2006) Formation of reactive halide species by myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 445: 225-234
11. Eley DW, Eley JM, Korecky B, Fliiss H (1991) Impairment of cardiac contractility and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase activity by hypochlorous acid: reversal by dithiothreitol. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 1677-1685
12. Winterbourn CC (2002) Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181-182: 223-227
13. Winterbourn CC, Kettle AJ (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 29: 403-409
14. Vissers MC, Winterbourn CC (1995) Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem J* 307: 57-62
15. Davies MJ, Hawkins CL (2000) Hypochlorite-induced oxidation of thiols: formation of thyl radicals and the role of sulfenyl chlorides as intermediates. *Free Radic Res* 33: 719-729
16. Harwood DT, Kettle AJ, Winterbourn CC (2006) Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method. *Biochem J* 399: 161-168
17. Winterbourn CC, Brennan SO (1997) Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J* 326: 87-92
18. Chapman AL, Senthilmohan R, Winterbourn CC, Kettle AJ (2000) Comparison of mono- and dichlorinated tyrosines with carbonyls for detection of hypochlorous acid modified proteins. *Arch Biochem Biophys* 377: 95-100
19. Hazen SL, Heinecke JW (1997) 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99: 2075-2081
20. Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakajima T, Usui T (1982) Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem* 28: 1758-1761
21. Hawkins CL, Davies MJ (2002) Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol* 15: 83-92
22. Pattison DI, Davies MJ (2006) Evidence for rapid inter- and intramolecular chlorine transfer reactions of histamine and carnosine chloramines: implications for the prevention of hypochlorous-acid-mediated damage. *Biochemistry* 45: 8152-8162
23. Hawkins CL, Davies MJ (1999) Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 340: 539-548
24. Kawai Y, Kiyokawa H, Kimura Y, Kato Y, Tsuchiya K, Terao J (2006) Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation. *Biochemistry* 45: 14201-14211
25. Auchere F, Bertho G, Artaud I, Girault JP, Capeillere-Blandin C (2001) Purification and structure of the major product obtained by reaction of NADPH and NMNH with the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system. *Eur J Biochem* 268: 2889-2895
26. Panasencko OM, Spalteholz H, Schiller J, Arnhold J (2003) Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radic Biol Med* 34: 553-562
27. Pitt AR, Spickett CM (2008) Mass spectrometric analysis of HOCl- and free-radical-induced damage to lipids and proteins. *Biochem Soc Trans* 36: 1077-1082
28. Carr AC, van den Berg JJ, Winterbourn CC (1996) Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys* 332: 63-69
29. Henderson JP, Byun J, Heinecke JW (1999) Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial RNA. *J Biol Chem* 274: 33440-33448

30. Pal BC, Cumming RB, Walton MF, Preston RJ (1981) Environmental pollutant 5-chlorouracil is incorporated in mouse liver and testes DNA. *Mutat Res* 91: 395-401
31. Whiteman M, Jenner A, Halliwell B (1997) Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA. *Chem Res Toxicol* 10: 1240-1246
32. Chen HJ, Row SW, Hong CL (2002) Detection and quantification of 5-chlorocytosine in DNA by stable isotope dilution and gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 15: 262-268
33. Hale JT, Bigelow JC, Mathews LA, McCormack JJ (2002) Analytical and pharmacokinetic studies with 5-chloro-2'-deoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 64: 1493-1502
34. Badouard C, Masuda M, Nishino H, Cadet J, Favier A, Ravanat JL (2005) Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827: 26-31
35. Hazell LJ, Davies MJ, Stocker R (1999) Secondary radicals derived from chloramines of apolipoprotein B-100 contribute to HOCl-induced lipid peroxidation of low-density lipoproteins. *Biochem J* 339: 489-495
36. Panasenko OM, Arnhold J, Vladimirov Iu A, Sergienko VI (1995) Interaction of hypochlorite with hydroperoxides and other oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica* 60: 1419-1428
37. Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Correa TC, Toma IN, Bertolucci A, Oliveira MC, Motta FD, Medeiros MH, Mascio PD (2007) Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* 59: 322-331
38. Robaszekiewicz A, Bartosz G, Soszynski M (2008) N-chloroamino acids cause oxidative protein modifications in the erythrocyte membrane. *Mech Ageing Dev* 129: 572-579
39. Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmazynska T, Schaur RJ (2000) The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 47: 889-899
40. Candeias LP, Patel KB, Stratford MR, Wardman P (1993) Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett* 333: 151-153
41. Harwood DT, Kettle AJ, Brennan S, Winterbourn CC (2009) Simultaneous determination of reduced glutathione, glutathione disulphide and glutathione sulphonamide in cells and physiological fluids by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 3393-3399
42. Pattison DI, Davies MJ (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol* 14: 1453-1464
43. Hawkins CL, Rees MD, Davies MJ (2002) Superoxide radicals can act synergistically with hypochlorite to induce damage to proteins. *FEBS Lett* 510: 41-44
44. Robaszekiewicz A, Bartosz G, Soszynski M (2008) Effect of N-chloroamino acids on the erythrocyte. *Free Radic Res* 42: 30-39
45. Peskin AV, Winterbourn CC (2001) Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med* 30: 572-579
46. Carr AC, Vissers MC, Domigan NM, Winterbourn CC (1997) Modification of red cell membrane lipids by hypochlorous acid and haemolysis by preformed lipid chlorohydrins. *Redox Rep* 3: 263-271
47. Jerlich A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM (2000) Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med* 28: 673-682
48. Jiang Q, Blount BC, Ames BN (2003) 5-Chlorouracil, a marker of DNA damage from hypochlorous acid during inflammation. A gas chromatography-mass spectrometry assay. *J Biol Chem* 278: 32834-32840
49. Kawai Y, Morinaga H, Kondo H, Miyoshi N, Nakamura Y, Uchida K, Osawa T (2004) Endogenous formation of novel halogenated 2'-deoxycytidine. Hypochlorous acid-mediated DNA modification at the site of inflammation. *J Biol Chem* 279: 51241-51249
50. Whiteman M, Hong HS, Jenner A, Halliwell B (2002) Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: implications for assessment of oxidative damage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 883-889
51. Whiteman M, Spencer JP (2008) Loss of 3-chlorotyrosine by inflammatory oxidants: implications for the use of 3-chlorotyrosine as a biomarker in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 50-53
52. Sochaski MA, Jarabek AM, Murphy J, Andersen ME (2008) 3-chlorotyrosine and 3,5-dichlorotyrosine as biomarkers of respiratory tract exposure to chlorine gas. *J Anal Toxicol* 32: 99-105
53. Nickelsen MG, Nweke A, Scully FE, Jr., Ringhand HP (1991) Reactions of aqueous chlorine in vitro in stomach fluid from the rat: chlorination of tyrosine. *Chem Res Toxicol* 4: 94-101
54. Cheng ML, Chen CM, Gu PW, Ho HY, Chiu DT (2008) Elevated levels of myeloperoxidase, white cell count and 3-chlorotyrosine in Taiwanese patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 41: 554-560
55. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C (2006) Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res* 133: 143-149

Markers of chloric acid (I) in biological systems – identification and properties

Agnieszka Robaszekiewicz[✉]

Department of Molecular Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

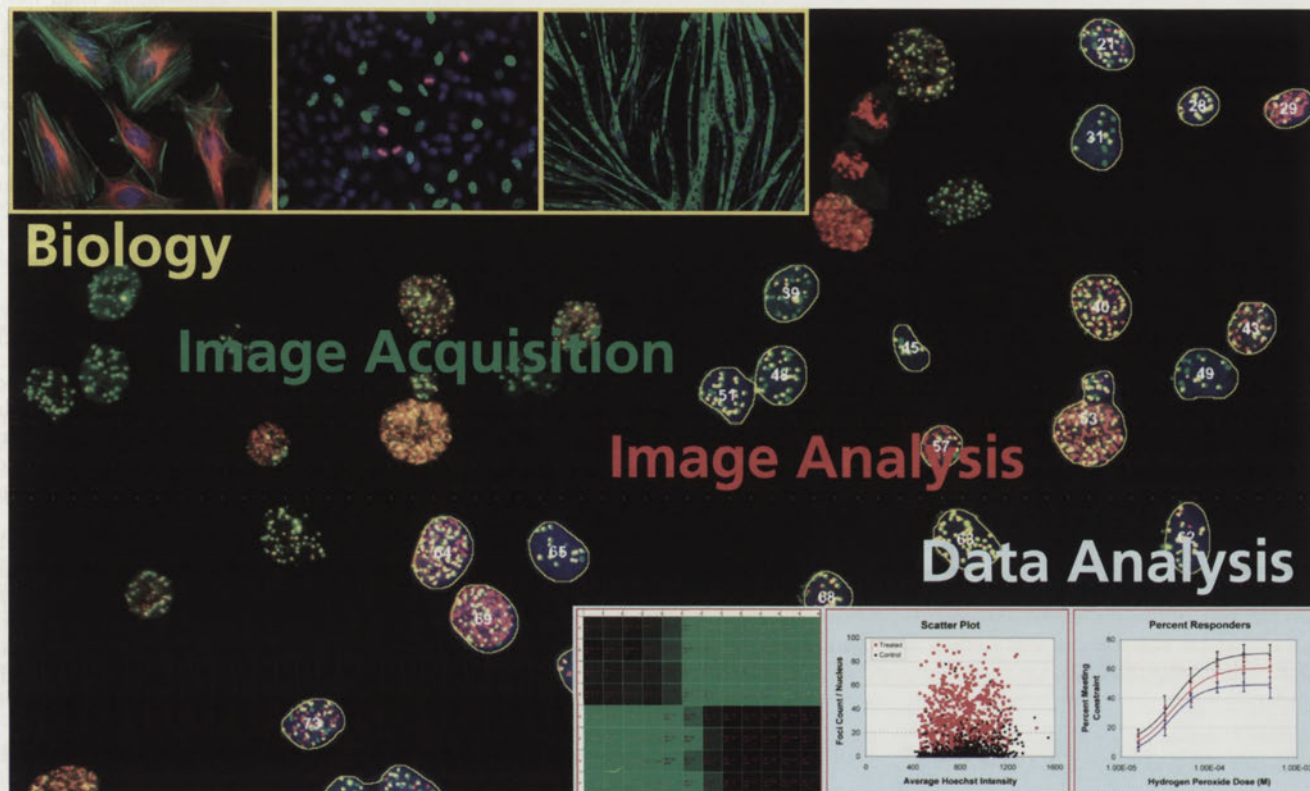
[✉]e-mail: agnieszka.robaszekiewicz@gmail.com

Key words: myeloperoxidase, hypochlorite, chloramines, biomarkers

ABSTRACT

Reactive oxygen and nitrogen species are attributed to initiation and propagation of many diseases. The demonstration of elevated activity of myeloperoxidase and the level of 3-chlorotyrosine in atherosclerosis, kidney diseases and chronic inflammations brought about the interest in the biological role of another strong oxidant – hypochlorite. Concentration of this compound is extremely difficult to estimate *in vivo* and *in vitro* because of its high reactivity. The reaction of hypochlorite with biological compounds lead to formation of chlorohydrins, glutathione sulfonamides, chloramines, 3- and 3,5-dichlorotyrosines and chlorinated DNA bases (8-chloroadenine, 8-chloroguanine, 5-chlorocytosine and 5-chlorouracil). At least some of these products of hypochlorite action are believed to provide specific HOCl-biomarkers, useful especially in the analysis of clinical samples, using sensitive detection techniques.

Sterowanie procesem akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu



Wprowadzenie

Akwizycja i wieloparametrowa analiza obrazu (ang. *high-content imaging*) to szybko rozwijająca się dziedzina, która znalazła zastosowanie we wszystkich fazach procesu opracowywania leku.¹ W ostatnim czasie akwizycja i wieloparametrowa analiza obrazu staje się coraz powszechniej wykorzystywanym podstawowym narzędziem badawczym. Jednocześnie poszerzył się zakres zastosowań tej technologii – okazała się ona przydatna w obszarach, takich jak biologia komórki, badania przesiewowe (skrining) siRNA oraz w innych metodach z zakresu genomiki czynnościowej i proteomiki. Niezależnie od tego, czy użytkownik posiada szerokie doświadczenie, czy też jest nowicjuszem w tej dziedzinie, sterowanie procesem akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu jest skomplikowanym zadaniem. Dokładne zrozumienie podstawowych pojęć, strategii i celów technologii akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu ma decydujące znaczenie z punktu widzenia zapewnienia skutecznego i pomyślnego wdrożenia tej technologii. W niniejszym artykule przeanalizowano niektóre z ważniejszych obszarów, które należy uwzględnić w trakcie rozwijania i optymalizacji aplikacji akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu.

Akwizycję i wieloparametrową analizę obrazu można scharakteryzować jako połączenie dwóch lub większej liczby podstawowych zastosowań mikroskopii fluorescencyjnej, w których materiał biologiczny hodowany jest na płytkach wielodołkowych, a akwizycja obrazu i analizy ilościowej zostały w pełni zautomatyzowane. Jednoczesne obrazowanie wielu komórek pozwala na rejestrację i analizę wielu parametrów w ramach

pojedynczego doświadczenia. Zwiększona skala i prędkość akwizycji obrazu oraz analiza, konieczne do przeprowadzenia obrazowania wieloparametrowego, wiążą się z zastosowaniem zaawansowanej platformy oprzyrządowania. Analizatory komórkowe BD Pathway™ zostały zaprojektowane i stworzone specjalnie do obsługi aplikacji akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu. Sprzęt oraz oprogramowanie tworzące system BD Pathway pozwalają uzyskać maksimum elastyczności w zakresie akwizycji obrazu, analizy i wizualizacji danych. Choć specyficzne możliwości platform obrazowania wieloparametrowego różnią się w zależności od producenta, wiele tematów omówionych w niniejszej nocy aplikacyjnej znajduje zastosowanie generalnie wobec dziedziny obrazowania wieloparametrowego.

Proces obrazowania wieloparametrowego można podzielić na cztery główne etapy: przygotowanie materiału biologicznego, akwizycję obrazu, analizę obrazu oraz analizę danych. W ramach każdego etapu istnieje szereg czynników, które należy wziąć pod uwagę i zoptymalizować. Sterowanie każdym etapem wiąże się z realizacją szeregu kroków, a pomyślna realizacja danego kroku zależy od udanej realizacji poprzedniego. Podczas opracowywania nowej aplikacji, aby zrealizować określone zadanie, często konieczne jest dokonanie wyboru spośród wielu opcji. Zalety i wady każdej opcji należy dokładnie zbadać i rozważyć.



Poza tym, przed rozpoczęciem optymalizacji należy dobrze zdefiniować cele aplikacji i na każdym etapie często je weryfikować, aby upewnić się, że wybrane czynniki i opcje pozwolą na realizację ustalonych celów.

W **Tabeli 1** wymienione są cztery główne etapy obrazowania wieloparametrowego oraz kluczowe dla nich czynniki, których optymalizacja może być konieczna w trakcie procesu rozwoju testu. Niniejsza nota aplikacyjna zawiera szczegółowe omówienie wielu z tych czynników oraz konkretne przykłady pochodzące z kilku aplikacji obrazowania wieloparametrowego. W ramach niniejszej noty aplikacyjnej nie było jednak możliwości szczegółowego omówienia każdego czynnika, toteż może istnieć kilka dodatkowych elementów, które wpłyną na Państwa test.

Tabela 1. Główne etapy obrazowania wieloparametrowego i kluczowe czynniki, jakie należy zoptymalizować.

<p>Etap 1 – Przygotowanie materiału biologicznego</p> <ul style="list-style-type: none"> • Komórki i hodowla komórkowa <ul style="list-style-type: none"> ◦ Podłoża i suplementy ◦ Komórki pierwotne i linie komórkowe ◦ Hodowle zawieszinowe ◦ Całe organizmy ◦ Żywe komórki (oznaczenie kinetyczne) ◦ Komórki utrwalone (oznaczenie punktu końcowego) ◦ Liczba pasaży ◦ Gęstość komórek na płytce • Płytki do hodowli obrazowania • Macierze zewnątrzkomórkowe • Struktura płytki i dodawanie związków chemicznych • Protokoły dot. obrazowania płytek i odczynniki detekcyjne
<p>Etap 2 – Akwizycja obrazu</p> <ul style="list-style-type: none"> • Źródło oświetlenia • Zestawy filtrów • Soczewki obiektywu • Ustawienia aparatu • Rozdzielczość obrazu • Liczba pól obrazowania (montaż) • Metody automatycznego ustawiania ostrości • Składanie planów fokalnych w osi Z
<p>Etap 3 – Analiza obrazu</p> <ul style="list-style-type: none"> • Przetwarzanie obrazu • Segmentacja • Cechy Pomiarowe
<p>Etap 4 – Analiza i wizualizacja danych</p> <ul style="list-style-type: none"> • Klasyfikacja danych • Mapy termiczne • Wykresy rozproszone • Ograniczenia parametrów (progi odcięcia) • Odsetek komórek odpowiadających na czynnik • Krzywe odpowiedzi na dawkę • Współczynnik Z' • Stosunek sygnału do szumu • EC_{50}, IC_{50}

Etap 1 – Przygotowanie materiału biologicznego

Jednym z najważniejszych czynników przyczyniających się do sukcesu testu opartego na komórkach jest określenie i wykorzystanie stabilnego i sprawdzonego modelu biologicznego. Istnieje szereg czynników, które należy wziąć pod uwagę podczas wybierania lub opracowywania systemu modelu. Komórki w hodowli są dynamiczne i nigdy nie należy zakładać, że stanowią jednorodną populację. Powinny one być okresowo badane pod kątem czynnościowym, aby mieć pewność, że wraz ze wzrostem liczby pasaży zachowują pożądane cechy i odpowiedzi. Podłoże do hodowli komórek i suplementy mają również decydujące znaczenie z punktu widzenia cech komórek. Należy rozważyć zastosowanie kilku różnych rodzajów komórek i podłoży hodowlanych, a następnie porównać je, aby wybrać kombinację, która najlepiej odpowiada ogólnemu działaniu testu. Poza tym środowisko zewnątrzkomórkowe ma wpływ na sposób przylegania komórek do substratu, wzrost i odpowiedź na zastosowane leki. Aspekty biologiczne są swoiste dla każdego rodzaju komórki, systemu testu oraz metody analizy, toteż należy je we właściwy sposób zoptymalizować. Zoptymalizowanie każdego spośród wielu aspektów biologicznych na początku procesu rozwoju testu zaoszczędzi znaczną ilość czasu i nakładu pracy w ogólnym rozrachunku.

Komórki i hodowla komórkowa

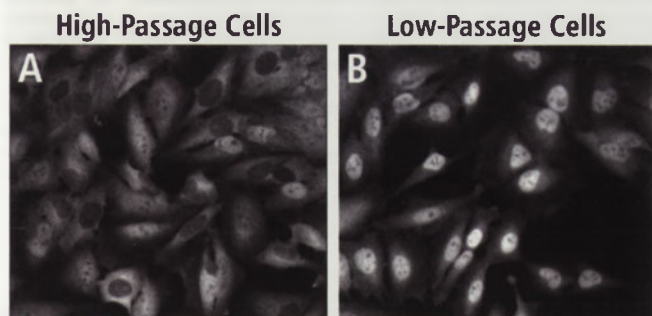
Wybranie właściwego rodzaju komórki może mieć istotny wpływ na wyniki testu. Należy wybrać komórki najodpowiedniejsze dla testu. Konieczna jest ocena parametrów takich jak gatunek i rodzaj tkanki, z której pochodzą komórki, jak również obecność lub brak specyficznych szlaków sygnałowych. W przeszłości do testów opartych na komórkach wykorzystywano linie komórkowe oraz komórki pierwotne. Linie komórkowe wyprowadzono z wielu różnych tkanek i skutecznie wykorzystywano w rozmaitych testach opartych na komórkach. Linie komórkowe takie jak HeLa, U2-OS i CHO-K1 są łatwo dostępne, można je dość łatwo namnażać, a ich proliferacja w hodowli może być nieskończona. Z tych powodów ogromną większość testów wykorzystujących technologię obrazowania wieloparametrowego opracowano w oparciu o linie komórkowe. Komórki pierwotne mogą teoretycznie stanowić lepszy system modelu, ponieważ są bardziej zbliżone pod względem genetycznym i fenotypowym do środowiska *in vivo*. Komórki te muszą być jednak pozyskiwane ze zwierząt lub człowieka, ogólnie wymagają bardziej wyspecjalizowanych warunków wzrostu i mogą być utrzymane w hodowli tylko przez ograniczony czas. Z tego względu komórki pierwotne są generalnie wykorzystywane tylko wtedy, gdy korzyści przewyższają nakłady. Komórki macierzyste – zarówno „dziewicze”, jak i poddane różnicowaniu – stanowią potencjalnie obiecującą alternatywę zarówno dla ustalonych linii komórkowych, jak i komórek pierwotnych, ale obecnie wymagania w zakresie wzrostu i utrzymania tych komórek nie są wystarczająco dopracowane, aby można je było wykorzystać do większości aplikacji obrazowania wieloparametrowego.

Linie komórek adherentnych w formie hodowli jednowarstwowej są generalnie rozważane w pierwszej kolejności do zastosowania w testach wykorzystujących przetwarzanie wieloparametrowe z powodu względnie łatwego sposobu utrwalania i obrazowania. Niemniej jednak do opracowania nowych aplikacji obrazowania wieloparametrowego można użyć alternatywnych modeli: mogą to być komórki zawieszinowe, komórki hodowane w układach wielowarstwowych lub też całe organizmy, takie jak *C. elegans* czy embriony danio pęgowanego. Systemy BD Pathway™ nadają się w unikalny sposób do obrazowania tych różnorodnych i wymagających rodzajów próbek. Dla przykładu, podczas akwizycji obrazu, soczewka obiektywu przesuwa się od dołka do dołka, podczas gdy próbka pozostaje nieruchoma. Ułatwia to przeprowadzenie obrazowania luźno przyczepionych komórek i komórek w zawieszinie bez zakłócania ich funkcjonowania. Poza tym elastyczność wyboru trybów obrazowania – szerokopłowego, konfokalnego i montażowego – pozwala na wielowymiarowe obrazowanie rozmaitych próbek biologicznych (patrz rozdział *Akwizycja obrazu*).

Należy również zastanowić się, czy zastosować komórki żywe (w oznaczeniach kinetycznych) czy też utrwalone (w oznaczeniach punktów końcowych). W przypadku komórek żywych można użyć automatycznego fluorescencyjnego obrazowania typu *time-lapse* (poklatkowego) i systemu dozowania w celu zaobserwowania odpowiedzi komórek na dodanie związku chemicznego w czasie rzeczywistym. Wykorzystanie żywych komórek w aplikacjach obrazowania wieloparametrowego zazwyczaj wiąże się z koniecznością poświęcenia dodatkowego czasu na opracowanie, optymalizację i wdrożenie testów. Z drugiej strony łatwiej jest wdrożyć oznaczenia punktów końcowych doświadczeń z wykorzystaniem komórek utrwalonych. Umożliwia to wybór punktu zatrzymania doświadczenia, ułatwia automatyzację procesu, optymalizując przerób próbek. Z uwagi na przejściowy charakter wielu odpowiedzi biologicznych, konieczne może okazać się przeprowadzenie doświadczeń wstępnych z komórkami żywymi lub komórkami utrwalonymi w różnych punktach czasowych po dodaniu odczynnika (stymulant, inhibitor itp.), aby zbadać i zoptymalizować aspekty kinetyczne odpowiedzi komórkowej.

W trakcie pomiaru odpowiedzi biologicznej, komórki kontrolne powinny posiadać niski poziom wyjściowy i wysoki poziom odpowiedzi, z jednoczesnym zachowaniem wysokiej wrażliwości na badany czynnik. Zwiększona liczba pasaży może zmieniać właściwości linii komórkowej, np. odpowiedź na bodziec, tempo wzrostu, syntezę białek i szlaki sygnałowe.² W przykładzie przedstawionym na **Rycinie 1**, komórki HeLa po wielokrotnym pasażu ujawniły mniejszą translokację białek NF- κ B z cytoplazmy do jądra w odpowiedzi na czynnik martwicy noworowu alfa (TNF- α) niż w przypadku komórek o małej liczbie pasaży. W celu zapewnienia spójnych wyników testu w czasie, komórki należy utrzymywać na względnie niskim poziomie pasażowania. Wraz ze wzrostem liczby pasaży, komórki należy okresowo badać pod kątem odpowiednich odpowiedzi w systemie testu.

Należy gruntownie rozważyć rozmaite techniki hodowli komórek. Dla przykładu, umieszczenie świeżo posianych płytek w inkubatorze w atmosferze CO₂ może spowodować nierówne rozmieszczenie komórek w dołkach na obrzeżach płytki.³ Ponadto inkubowanie płytek przy poziomach wilgotności poniżej optymalnych może spowodować nierówną utratę podłoża na brzegach płytki wskutek odparowania. Opisywane nieprawidłowości, a także wiele innych, mogą zwiększać liczbę artefaktów obserwowanych w dołkach zlokalizowanych na brzegach płytki (zjawisko zwane „efektem brzegowym”) i przyczyniać się do zróżnicowania wyników testu pomiędzy płytkami. Pozostawienie świeżo posianych płytek w temperaturze pokojowej przez około 30

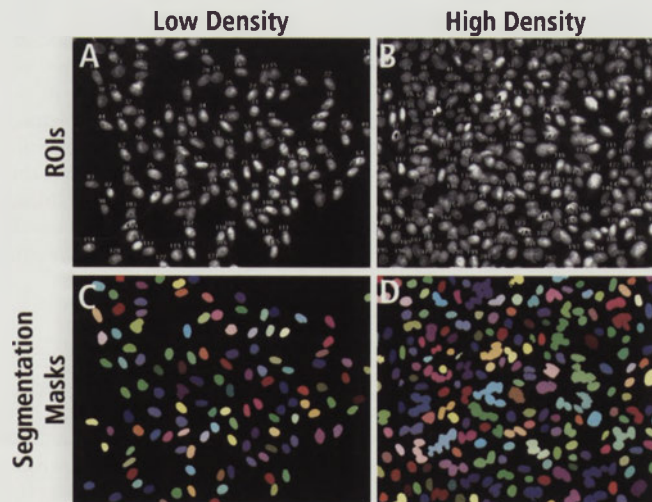


Rycina 1. Utrata czułości testu w przypadku komórek o dużej liczbie pasaży. Hodowle komórek HeLa o wysokiej liczbie pasaży (pasaż 32 po nabyciu, Panel A) i o niskiej liczbie pasaży (pasaż 2 po nabyciu, Panel B) zbadano pod kątem czynnościowym przy użyciu testu translokacji NF- κ B do jądra. Komórki poddano działaniu TNF- α (50 ng/ml) przez 30 minut, a następnie przygotowano do barwienia z zastosowaniem przeciwciała anti-NF- κ B. W komórkach o wyższej liczbie pasaży, pozytywną odpowiedź zaobserwowano tylko w subpopulacji komórek, na co wskazało barwienie z zastosowaniem przeciwciała anti-NF- κ B w jądrze. W hodowli komórek o niskiej liczbie pasaży, wszystkie komórki ujawniły silną pozytywną odpowiedź. Akwizycję obrazów (przycięte) dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

minut przed umieszczeniem ich w inkubatorze w atmosferze CO₂ w temperaturze 37°C może spowodować bardziej równomierny rozkład komórek w każdym dołku, co opisał Lundholt.³ Utrzymanie optymalnego poziomu wilgotności w inkubatorze oraz stosowanie płytek z pokrywami regulującymi parowanie oraz pierścieniami kondensacyjnymi, jak płytki hodowlane do obrazowania BD Falcon™ (Nr Kat. 353219) pomagają zapobiec nierównej utracie podłoża hodowlanego i może znacząco zredukować efekt brzegowy.

Istotne jest określenie i rozmieszczenie na płytkach optymalnej liczby komórek dla każdej aplikacji. Gęstość komórek na płytce testowej zależy od wielu czynników, między innymi od wielkości komórek, tempa wzrostu, stosowanego leku oraz czasu pozostawiania w hodowli. Jeśli komórki są nieliczne, konieczna będzie akwizycja dodatkowych pól obrazu w celu uzyskania statystycznie istotnej liczby komórek. Z drugiej strony, jeśli gęstość komórek jest zbyt duża, ich segmentacja na pojedyncze komórki może się okazać niemożliwa. **Rycina 2** pokazuje wpływ gęstości komórek na zdolność segmentacji pojedynczych komórek.

Gęstość komórek może również wpływać na sposób odpowiedzi populacji na zastosowany lek, a przez to istotnie wpływa na działanie testu. Umieszczenie na 96-dołkowej płytce komórek HeLa w liczbie od 8 000 do 10 000 na jeden dołek sprawdza się w przypadku aplikacji, w których żywe komórki lub komórki poddane działaniu leku utrwalone są i obrazowane w ciągu 24 godzin. Taka gęstość komórek na płytce sprawdza się również w przypadku komórek o zbliżonej wielkości i czasie podwojenia, np. A549 i U2-OS. Komórki o różnych rozmiarach i czasach generacji wymagają zastosowania innych poziomów gęstości komórek na płytce. Aplikacje, w których komórki są pozostawiane w hodowli przez dłuższy czas, będą wymagać optymalizacji wstępnej gęstości komórek na płytce. I w końcu, ręczne zliczenie i umieszczenie komórek na płytce może prowadzić do zmienności wyników pomiędzy poszczególnymi dniami, zwłaszcza gdy procedurę wykonują różne osoby. Urządzenie do automatycznego liczenia komórek, może wyeliminować zmienność z procesu liczenia komórek i zapewnić spójne wyniki każdego dnia. Dzięki zastosowaniu automatycznego urządzenia do umieszczania komórek na płytce, zmienność tę można jeszcze bardziej kontrolować.



Rycina 2. Wpływ gęstości komórek na segmentację pojedynczych komórek. Komórki CHO-K1 posiano na płytce, zachowując niską i wysoką gęstość. Następnego dnia komórki poddano barwieniu odczynnikami Hoechst i obrazowaniu. Przy użyciu oprogramowania BD AttoVision™ wykonano segmentację obrazów i wygenerowano obszary zainteresowania (*ang. region of interest -ROI*, Panele A i B) i maskę segmentacji (Panele C i D, kolory przypisane losowo). Przy dużej gęstości komórek (Panele B i D), segmentacja poszczególnych komórek była trudniejsza niż w przypadku małej gęstości komórek (Panele A i C). Obrazy uzyskano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 435.

Płytki hodowlane do obrazowania

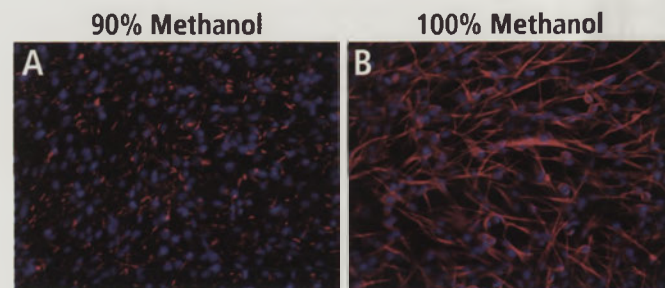
Istnieje wiele rodzajów płytek wielodołkowych. Wybranie właściwej płytki jest bardzo istotne – rodzaj wybranej płytki do obrazowania może na przykład w dużym stopniu dyktować rodzaj soczewki obiektywu, jaki można zastosować. W **Tabeli 2** wymieniono główne zalety i wady różnych rodzajów płytek obrazowych.

Grubość płytek grubodennych wynosi zazwyczaj >500 mikronów. Wymagają one zastosowania obiektywów o dużej odległości roboczej (*ang. long working distance – LWD*) do wykonania obrazowania próbki. Obiektywy typu LWD posiadają na ogół niższą wartość apertury numerycznej (NA), która jest miarą zdolności zbierania światła i rozdzielczości optycznej (dokładniejsze omówienie odległości roboczej i NA znajduje się w punkcie Soczewki Obiektywów). Zastosowanie płytek grubodennych może również wygenerować więcej szumu tła fluorescencyjnego na obrazach. Niemniej jednak plastikowe płytki grubodenne są na ogół bardziej płaskie od płytek cienkich, ponieważ dna tych płytek są sztywniejsze. Poza tym płytki grubodenne są dostępne w postaci fabrycznie opłaszczonych (płytki BD BioCoat™) różnego rodzaju macierzami zewnątrzkomórkowymi (ECM).

Grubość plastikowych płytek cienkodennych wynosi zazwyczaj <250 mikronów i obrazowania można dokonać przy użyciu obiektywów o wysokiej wartości NA i małej odległości roboczej. Dla przykładu: dna 96-dołkowych płytek obrazowych BD Falcon™ posiadają grubość około 190 mikronów. Ze względu na niewielką grubość materiału, z którego wykonane jest dno płytki, oraz względnie dużą szerokość dołków (około 6 mm średnicy), powierzchnia obrazowania cienkich plastikowych płytek 96-dołkowych może być mikroskopijnie wypukła. Centralny obszar dołka plastikowej, płaskodennej płytki 96-dołkowej stanowi jego najbardziej płaską część (bardziej płaską względem stref dalszych od środka dołka). Z tego względu, aby uzyskać najlepsze wyniki zaleca się wykonywanie obrazowania w środku dołka lub możliwie blisko środka dołka. W przypadku cienkich, plastikowych płytek 384-dołkowych, obszar pomiędzy dołkami jest mniejszy, co daje bardziej płaską powierzchnię obrazowania.

W celu przebadania większej liczby próbek, można zastosować formaty płytek wielodołkowych o liczbie dołków powyżej 96. Na ogół przejście z płytki 96-dołkowej na 384-dołkową zapewni wystarczające zwiększenia ilości próbek, niemniej jednak dostępne są również płytki 1536-dołkowe. Przejście z jednego formatu płytki na inny wymaga sprawdzenia wszystkich protokołów, w tym obróbki komórek. Dla przykładu, protokoły utrwalania i permeabilizacji opracowane dla testu z płytką 96-dołkową nie mogą być w sposób bezpośredni przeniesione na format 384-dołkowy. Choć każdy dołek 384-dołkowej płytki odpowiada w przybliżeniu jednej czwartej powierzchni i objętości dołka płytki 96-dołkowej, nie zawsze w prosty sposób można podzielić objętość wszystkich odczynników przez cztery. Poza tym praca z płytkami 384-dołkowymi w trybie ręcznym jest trudniejsza. Z tego względu do umieszczania komórek na płytkach 384-dołkowych i obróbki takich płytek często wykorzystuje się automatyczne aparaty z funkcją dozowania i aspiracji.

Metody wykorzystywane w tych zautomatyzowanych platformach jednak należy również zoptymalizować. Dla przykładu, automatyczny sprzęt do obróbki płytki pozostawia na ogół pewną objętość rezydualną materiału w każdym dołku. W efekcie mogą zaistnieć dwa negatywne skutki: rozcieńczony odczynnik pozostający w dołkach, który zakłóca kolejne etapy realizacji testu i objętość rezydualna, powodująca rozcieńczenie kolejnego odczynnika do stężenia poniżej optymalnego. Pierwszy skutek można wyeliminować poprzez zastosowanie etapów dodatkowego płukania, aby rozcieńczyć odczynnik do takiego stężenia, przy którym nie będzie on wpływał na dalszy przebieg procesu. Należy jednak zachować ostrożność i ustalić, czy dodatkowe płukanie nie zniszczy delikatnych struktur komórek lub luźno przyczepionych komórek. Wyeliminowanie drugiego efektu wymaga zastosowania odczynników o większych stężeniach, aby zrekompensować rozcieńczenie przez objętość rezydualną. **Rycina 3** przedstawia przykład testu, w którym etap permeabilizacji 90% metanolem był skuteczny w przypadku ręcznego wykonania testu z użyciem 96-dołkowej płytki, zaś w przypadku automatycznej realizacji testu w formacie 384-dołkowym okazał się nieskuteczny. Wskutek pozostawienia około 10 µl objętości rezydualnej po zastosowaniu płuczki do płytek, 90% metanol został rozcieńczony do stężenia, przy którym stracił właściwości skutecznego odczynnika do permeabilizacji. Po zastosowaniu 100% metanolu w celu uzyskania efektywnego stężenia na poziomie 90%, przywrócono możliwość barwienia z zastosowaniem przeciwciała. Opiswane problemy związane z obróbką płytek mogą również wpływać na wyniki w przypadku przejścia z płytek o standardowych objętościach na płytki o małych objętościach konserwowanych przez odczynnik lub płytek o zmniejszonym o połowę obszarze (*ang. half area plates*).



Rycina 3. Porównanie wpływu stężenia buforu metanolowego w celu uzyskania permeabilizacji na barwienie przeciwciałem na płytkach 384-dołkowych. Płytki 384-dołkowe cienkodenne (Nr Kat. 353221) zostały poddane obróbce w trybie automatycznym. Komórki C6 zostały utrwalone za pomocą paraformaldehydu, przepłukane roztworem PBS, a przed płukaniem i barwieniem mysim przeciwciałem przeciwko β -tubulinie (BD™ Bioimaging Certified Alexa Fluor® 555 mouse anti- β -tubulin antibody, Nr Kat. 558605) dodano 100 µl 90% metanolu (Panel A) lub 100% metanolu (Panel B). Akwizycję obrazu komórek znakowanych odczynnikiem Hoechst (niebieski) i α -tubuliną (czerwony) dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) w aparacie BD Pathway™ 435 i scalonego kanału koloru.

Tabela 2. Zalety i wady płytek obrazowych.

Rodzaj płytki	Zalety	Wady
Gruby plastik > 500 mikronów	<ul style="list-style-type: none"> Może być bardziej płaska niż cienkie płytki plastikowe Dostępna w wielu wersjach opłaszczenia (BD BioCoat) 	<ul style="list-style-type: none"> Wymaga zastosowania obiektywów typu LWD (niska wartość NA) Wyższa fluorescencja tła
Cienki plastik < 250 mikronów	<ul style="list-style-type: none"> Względnie płaska Pozwala na użycie obiektywów o wysokiej rozdzielczości (wysoka wartość NA) 	<ul style="list-style-type: none"> Może nie być tak płaska jak gruby plastik
Szklana < 200 mikronów	<ul style="list-style-type: none"> Płaska Pozwala na użycie obiektywów o wysokiej rozdzielczości (wysoka wartość NA) 	<ul style="list-style-type: none"> Wyższy koszt Komórki mogą nie przylegać

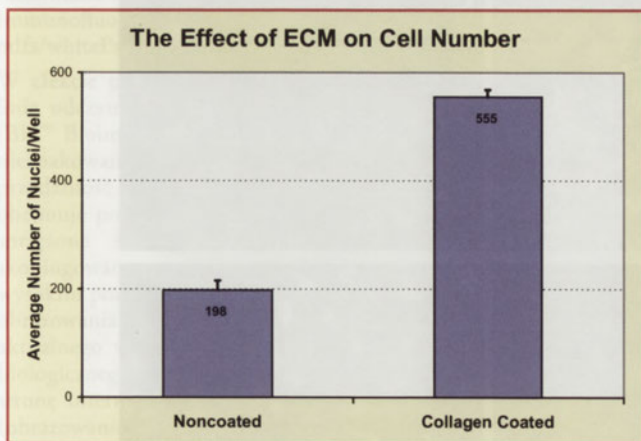
Macierze zewnątrzkomórkowe

Najczęściej stosowane linie komórek adherentnych dobrze się przytwierdzają do płytek o odpowiednio naładowanej powierzchni (*ang. tissue-culture-treated*). Pewne rodzaje komórek mogą jednak nie przylegać lub nie rozprzestrzeniać się w optymalny sposób na tego rodzaju powierzchni. Dostępne są rozmaite macierze zewnątrzkomórkowe (ECM), takie jak BD Matrigel™, kolagen, poli-D-lizyna, bądź inne rodzaje opłaszczenia – w postaci fabrycznie opłaszczonych płytek (BD BioCoat™) lub oddzielnych odczynników. Sposób przylegania komórek do rozmaitych typów powierzchni jest zróżnicowany. Komórki luźno przylegające lub komórki zawieszonowe, jak np. komórki chłoniaka mysiego, mogą wymagać zastosowania powłoki pozwalającej na utrzymanie kontaktu z powierzchnią płytki. **Tabela 3** zawiera wykaz rodzajów opłaszczenia płytek zalecanych do kilku konkretnych aplikacji obrazowania wieloparametrowego.

Tabela 3. ECM do różnych aplikacji.

ECM	Komórki	Aplikacja
Brak	HeLa	NF-κB
Kolagen	PC12 i SH-SY5Y	Rozrost neurytów
BD Matrigel	CHO-K1	Mikronukleus
	HUVEC-2	Angiogeneza
Poli-D-lizyna	L5178Y (chłoniak mysy)	Mikronukleus

Znaczenie użycia właściwej macierzy ECM zostało przedstawione na **Rycinie 4**. Hodowlę komórek SH-SY5Y (linia komórek neuronalnych) prowadzono na płytkach nieopłaszczonych i płytkach opłaszczonych kolagenem, a następnie poddano je działaniu paraformaldehydu i metanolu. Liczbę komórek zachowanych na płytkach określono poprzez zliczenie jąder barwionych odczynnikiem Hoechst. Po zakończeniu procedury stwierdzono, iż na płytce opłaszczonej kolagenem pozostało > 2,5-krotnie więcej komórek niż na płytce nieopłaszczonej.



Rycina 4. Porównanie płytki nieopłaszczonej z płytką opłaszczoną kolagenem. Równa liczba komórek SH-SY5Y została umieszczona na nieopłaszczonych i opłaszczonych kolagenem 96-dółkowych płytkach obrazowych BD Falcon™ oraz poddana hodowli. Następnie komórki potraktowano paraformaldehydem i metanolem. Obrazy jąder barwionych odczynnikiem poddano segmentacji, zliczono je i sporządzono wykres średniej liczby jąder na jeden dołek. N = 48 dołków ± SEM.

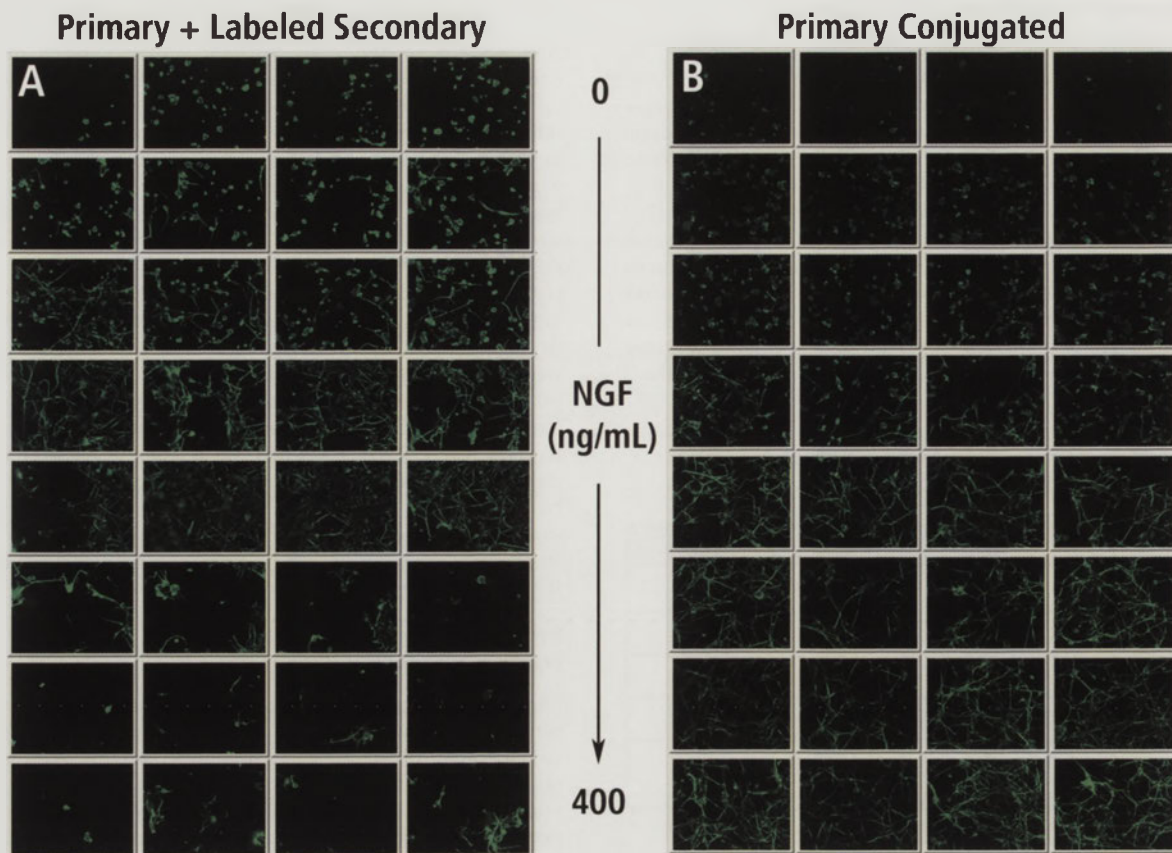
Struktura płytki i dodawanie związków chemicznych

Aby uzyskać solidne i statystycznie istotne dane z testów, przed naniesieniem próbek należy ostrożnie zaplanować parametry płytek, np. określić liczbę powtórzeń dołków (*ang. replicate wells*). Bez ustalenia odpowiedniej liczby powtórzeń dołków, poziomy ufnosci dla wyników są niższe, a wnioski wyciągnięte w oparciu o te dane mogą być mało wiarygodne. Poza tym, na wynik doświadczenia wpływać może również lokalizacja dołków powtórzonych na płytce. Należy przeanalizować dane w celu ustalenia, czy efekt brzegowy wpłynie na wyniki. Jeśli cele doświadczenia obejmują określenie tzw. okna testu i jego stabilności, płytka testowa powinna zawierać dużą liczbę dołków stanowiących kontrolę pozytywną i negatywną. Dane wygenerowane w oparciu o taką strukturę płytki mogą być następnie użyte do obliczenia okna testu (iloraz wartości uzyskanych z dołków potraktowanych zgodnie z procedurą testu przez wartości uzyskane z dołków kontrolnych) oraz jego stabilności (współczynnik Z').⁴ Ewentualnie jeśli celem jest określenie czułości testu, na płytkę powinny być naniesione serie rozcieńczeń odpowiednich związków we właściwych stężeniach dla uzyskania pełnej odpowiedzi biologicznej. W celu uzyskania optymalnej krzywej, należy uzyskać stosowną liczbę punktów danych po każdej stronie punktu środkowego. W oparciu o ten rodzaj struktury płytki można obliczyć wartość EC₅₀ lub IC₅₀ (patrz rozdział *Analiza Danych i Wizualizacja*).

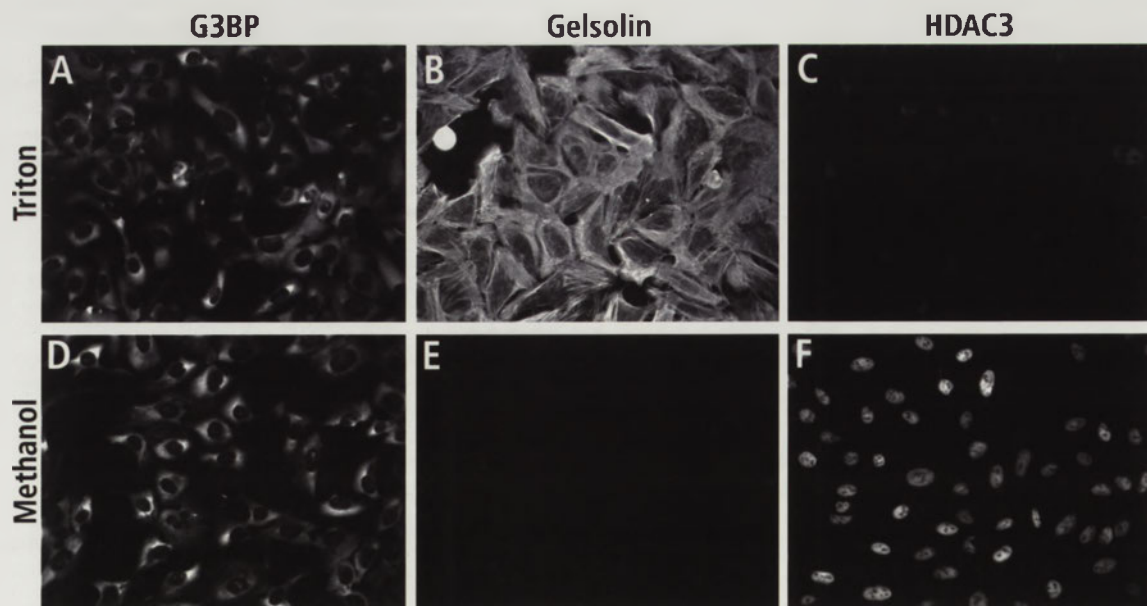
Protokoły dotyczące przetwarzania płytek i odczynniki detekcyjne

Niezależnie od tego, czy korzysta się z żywych komórek czy dokonuje oznaczeń punktów końcowych doświadczenia na komórkach utrwalonych, zwykle przed obrazowaniem należy przeprowadzić pewnego rodzaju obróbkę płytki. Należy zachować ostrożność i dopilnować, aby kroki w ramach obróbki płytki nie wpłynęły negatywnie na wyniki testu. Dla przykładu komórki mitotyczne i apoptotyczne są zaokrąglone i mogą luźno przylegać do powierzchni płytki, dlatego też jeśli przed utwaleniem dokonuje się aspiracji pożywki, może dojść do odłączenia i utraty tych komórek. Nadmierna utrata komórek podczas obróbki płytki prowadzi do niedostatecznej reprezentacji specyficznych populacji komórek. Aby zminimalizować utratę luźno przyczepionych komórek, można dodać roztwór utwalacza o większym stężeniu (dwukrotnie lub jeszcze bardziej stężony) bezpośrednio do pożywki hodowlanej, a nie usuwać ją przed utwaleniem. Sytuacja wygląda podobnie w przypadku złożonych struktur komórkowych, np. neurytów poddanych różnicowaniu, które są bardzo delikatne i mogą łatwo ulec uszkodzeniu lub oderwać od powierzchni płytki w trakcie obróbki płytki. Na **Rycinie 5** przedstawiono znaczenie zastosowania odczynników redukujących liczbę etapów płukania w przypadku komórek o wrażliwych strukturach. W tym teście, użycie bezpośrednio skoniugowanego przeciwciała wyeliminowało 40% etapów płukania i ograniczyło uszkodzenie neurytów. Było to szczególnie widoczne w przypadku wyższych stężeń NGF, gdy wypustki stają się dłuższe i bardziej złożone.

Wybór odczynników do utwalania komórek i w szczególności do permeabilizacji ma decydujące znaczenie dla uzyskania optymalnych wyników testu. Istnieje szereg odczynników utwalających, stosowanych w mikroskopii fluorescencyjnej. Stwierdziliśmy, że w aplikacjach obrazowania wieloparametrowego dobrze sprawdza się formaldehyd lub paraformaldehyd (3,7 do 4%). Podczas znakowania białek wewnątrzkomórkowych przeciwciałem konieczne jest zastosowanie etapu permeabilizacji. Wybór odczynnika do permeabilizacji jest jednak nieco bardziej skomplikowany, gdyż nie wszystkie odczynniki do permeabilizacji w optymalny sposób współdziałają ze wszystkimi przeciwciałami. Na **Rycinie 6** przedstawiono wybrane przykłady pochodzące z dużego skriningu przeciwciał, w którym zastosowano permeabilizację z użyciem Triton™ X-100 lub metanolu dla każdego przeciwciała. W przypadku niektórych przeciwciał obie metody permeabilizacji sprawdziły się równie dobrze, niemniej jednak w przypadku innych tylko jedna z metod dała zadowalające wyniki. Z tego względu metody utwalania i permeabilizacji oraz odczynniki należy optymalizować pod kątem specyficznych sond stosowanych w teście. Jest to szczególnie ważne podczas multipleksowania (wielokrotnianie) różnych przeciwciał lub sond.



Rycina 5. Porównanie odczynników i protokołów. Komórki PC12 zostały poddane działaniu rosnących stężeń czynnika wzrostu nerwów (NGF) w celu zróżnicowania wypustek neurytów. Komórki zostały następnie utrwalone, poddane obróbce i barwieniu przy użyciu przeciwciała przeciwko β -tubulinie (BD™ Bioimaging Certified β -tubulin antibody), które było albo przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko β -tubulinie (Nr Kat. 556321), po którym użyto znakowanego przeciwciała drugorzędowego (Panel A), albo bezpośrednio skoniugowanym przeciwciałem przeciwko β -tubulinie (Nr Kat. 558605, Panel B). Rycina przedstawia miniatury obrazów czterech powtórzeń dołków w pseudokolorach, dla każdej dawki NGF i metody barwienia przeciwciałem. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.



Rycina 6. Porównanie barwienia przeciwciałem przy użyciu różnych metod permeabilizacji. Komórki U2-OS zostały utrwalone formaldehydem, a następnie poddane działaniu 0,1% Triton X-100 (Panele A-C) lub 90% metanolu (Panele D-F). Następnie przeprowadzono barwienie trzema różnymi mysimi przeciwciałami monoklonalnymi, certyfikowanymi do obrazowania biologicznego (BD Bioimaging Certified). Przeciwciało pierwszorzędowe zostało wybarwione przy użyciu drugorzędowego przeciwciała przeciw mysiej IgG skoniugowanego z APC (Nr Kat. 550826). G3BP, białko wiążące z domeną RasGAP SH3 (Nr Kat. 611127, Panele A i D) wykazało takie same wzorce barwienia po zastosowaniu obu odczynników do permeabilizacji, natomiast Gelsolina, białko rozcinające filamenty aktynowe (Nr Kat. 610413, Panele B i E) zadziałała tylko z Triton X-100. HDAC3, deacetylaza histonowa 3 (Nr Kat. 611125, Panele C i F) najlepiej reagowała z metanolem. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Lista odczynników, barwników fluorescencyjnych, sond i protokołów dostępnych do stosowania w aplikacjach do badań biologicznych rozszerza się w szybkim tempie. Niemniej jednak odczynnik współdziałający z jedną aplikacją może nie nadawać się do zastosowania w innej. Dla przykładu opracowano szereg bezpośrednio skoniugowanych przeciwciał do stosowania w cytometrii przepływowej, ale w wielu przypadkach przeciwciała te zostały skoniugowane z barwnikami (takimi jak FITC lub PE), które łatwo ulegają fotowysbieleniu (*ang. photobleaching*) w systemach obrazowania, w których rejestratorem jest kamera. Barwniki oraz sondy fluorescencyjne stosowane w obrazowaniu wieloparametrowym należy dobierać ostrożnie, z uwzględnieniem jasności, fotostabilności i kompatybilności z innymi odczynnikami.

Barwienie immunofluorescencyjne przeciwciałami to metoda powszechnie stosowana do wykrywania i lokalizowania antygenów w pojedynczych komórkach, ale wiele spośród dostępnych na rynku przeciwciał nie zostało przetestowanych pod kątem przydatności w aplikacjach obrazowania wieloparametrowego. Poza tym, możliwość użycia wielu przeciwciał (multipleksowania) jest ograniczona ze względu na reaktywność krzyżową pomiędzy gatunkami w przypadku użycia standardowych, nieznakowanych przeciwciał pierwszorzędowych ze znakowanymi przeciwciałami drugorzędowymi. Aby ułatwić użycie przeciwciał w aplikacjach obrazowania wieloparametrowego wykorzystujących multipleksowanie, BD Biosciences zainicjowało proces skringingu przy użyciu automatycznego obrazowania w celu dokonania oceny przeciwciał monoklonalnych pod kątem ich przydatności w obrazowaniu biologicznym. Projekt ten obejmował początkowo specyficzności, które rozpoznają białka zaangażowane w komórkowe szlaki sygnałowe, cykl komórkowy, proces apoptozy i nowotworowy. Następnie skringingowi poddano przeciwciała właściwe dla zastosowań w zakresie neurobiologii i embrjonalnych komórek macierzystych. Przeciwciała przetestowano przy użyciu linii komórkowych i metod właściwych dla aplikacji skringingu wieloparametrowego na automatycznych platformach obrazowania. Zalecenia dotyczące metody permeabilizacji oraz stężenia przeciwciała są zawarte w karcie danych technicznych każdego odczynnika certyfikowanego do obrazowania biologicznego (BD™ Bioimaging Certified Reagent). W celu uzyskania dokładniejszych informacji na temat rozwoju certyfikowanych odczynników przeciwciał, należy sięgnąć do noty aplikacyjnej „Screening and Development of Antibodies for Use in Cell-Based Assays Using Immunofluorescence Microscopy” (Skrining i Rozwój Przeciwciał do Stosowania w Testach Komórkowych z Wykorzystaniem Mikroskopii Immunofluorescencyjnej), dostępnej na stronie bdbiosciences.com/pdfs/whitePapers/07-A790030-18A.pdf

W efekcie projektu skringingu przeciwciał, powstały dwie odrębne linie odczynników certyfikowanych do obrazowania biologicznego (BD™ Bioimaging Certified Reagent). Jedna duża grupa obejmuje nieznakowane przeciwciała pierwszorzędowe, które wykazały ogólną przydatność w aplikacjach obrazowania biologicznego. Druga grupa obejmuje podzestaw tych odczynników, które zostały bezpośrednio sprzężone z wieloma różnymi fluoroforami. Bezpośrednio skoniugowane przeciwciała umożliwiają multipleksowanie na wysokim poziomie (trzy lub cztery kolory) w rozmaitych aplikacjach obrazowania wieloparametrowego. W celu uzyskania najbardziej aktualnego wykazu odczynników certyfikowanych do obrazowania biologicznego BD Bioimaging Certified Reagents, należy wejść na stronę internetową bdbiosciences.com i szukać hasła „Bioimaging” (obrazowanie biologiczne).

Znaczniki białek fluorescencyjnych (*ang. fluorescent protein – FP*) okazały się być nieocenionymi narzędziami badawczymi, wykorzystywanymi do badania szerokiej gamy procesów komórkowych takich jak transport i segregacja białek, aktywacja genów, różnicowanie komórkowe i rozwój. Są również skuteczne w aplikacjach obrazowania wieloparametrowego. BD Biosciences opracował zestaw wektorów dla organelli komórkowych, Zielone FP i Czerwone FP, które można stosować w aplikacjach obrazowania wykorzystujących zarówno żywe, jak i utrwalone komórki. Osiem nowych odczynników certyfikowanych do obrazowania biologicznego (BD Bioimaging Certified Reagents) zweryfikowano pod kątem

prawidłowej ekspresji i lokalizacji poprzez zbadanie ich kolokalizacji w komórkach przy użyciu znanych przeciwciał i barwników fluorescencyjnych. W celu uzyskania dokładniejszych informacji na temat odczynników FP prosimy sięgnąć do noty aplikacyjnej „Fluorescent Protein Organelle Biomarkers are Beneficial in Live-Cell and Fixed-Cell-Based Imaging Applications”, znajdującej się na stronie: bdbiosciences.com/appnote/FPorganelle.

Etap 2 – Akwizycja obrazu

Po dokładnym rozważeniu i zoptymalizowaniu wszystkich aspektów biologicznych, kolejnym etapem aplikacji obrazowania wieloparametrowego jest akwizycja obrazu. Podobnie jak na etapie przygotowania materiału biologicznego, również i tutaj istnieje wiele różnych obszarów z możliwością wyboru rozmaitych opcji, które należy zbadać.

Źródło oświetlenia

Źródło światła należy konserwować i okresowo sprawdzać pod kątem natężenia i jakości wiązki. Natężenie lampy pogarsza się wraz z upływem godzin pracy, toteż należy ją wymienić po upływie zalecanego czasu pracy. Wyrównanie lampy wymaga ręcznego ustawiania i również powinno być okresowo sprawdzane. Jakakolwiek zmiana lub dostosowanie źródła światła bądź toru światła może wpływać na wyniki testu. Dla przykładu, zmiana toru światła zmienia korekcje i dezaktualizuje referencyjne obrazy dla korekcji płaskiego pola (patrz rozdział *Kompensacja Różnic Czulości Poszczególnych Pikseli (ang. Flat Field Correction)*) i wymaga wygenerowania nowych obrazów.

Zestawy filtrów

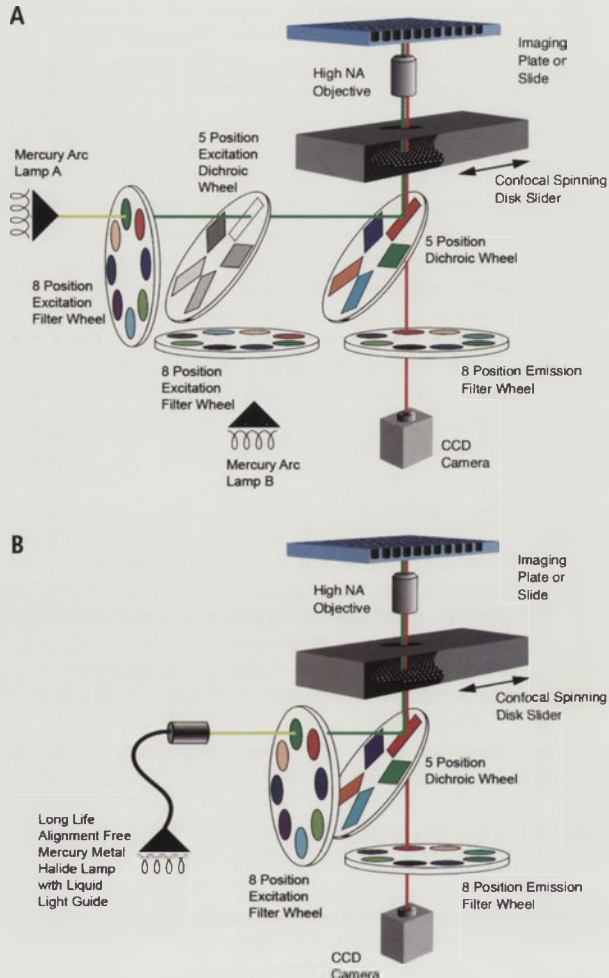
W aplikacjach wieloparametrowego obrazowania stosuje się szereg filtrów do obrazowania fluorescencyjnych sond i barwników. Filtry mają transmitować i odzwierciedlać długości fal światła w specyficznych obszarach lub pasmach spektrum barw, zwanych również kanałami barw. Zestawy filtrów należy ostrożnie dopasowywać do specyficznych spektrów wzbudzenia i emisji poszczególnych barwników i sond fluorescencyjnych. Standardowe zestawy filtrów w kołowych zmieniaczach filtrów systemu BD Pathway™ zoptymalizowano do obrazowania szerokiej gamy powszechnie stosowanych odczynników fluorescencyjnych, które emitują światło o długościach fal od kanału UV po kanał głębokiej czerwieni. W razie potrzeby filtry można ustawiać zgodnie z potrzebami podyktowanymi bardziej specjalistycznymi aplikacjami.

Filtry klasyfikuje się w oparciu o ich położenie w torze optycznym i są nazywane zgodnie ze specyficznymi długościami fal światła, jakie transmitują. Zakres długości fal transmitowanych przez filtr zwany jest popularnie szerokością pasma lub pasmem przepuszczania filtra. Światło, które nie jest transmitowane ulega odbiciu, toteż jest blokowane lub jego przejście przez filtr jest niemożliwe. Filtry pasmowo-przepustowe transmitują światło jedynie pomiędzy górną a dolną granicą długości fali. Na przykład filtr pasmowo-przepustowy 460/50 transmituje światło pomiędzy 435 a 485 nm (pasma 50 nm scentrowane na 460 nm). Wąskie filtry pasmowo-przepustowe transmitują relatywnie wąskie pasmo światła, na przykład filtr 360/10 transmituje światło pomiędzy 355 a 365 nm. Filtry górnoprzepustowe transmitują wszystkie długości fal powyżej pewnej długości fali światła. Na przykład filtr 435LP transmituje wszystkie długości fal powyżej 435 nm.

Standardowa mikroskopia epifluorescencyjna wykorzystuje trzy elementy: filtr wzbudzający, filtr emisyjny i zwierciadło dichroiczne. Takie same elementy wykorzystuje się w kołach filtrowych systemów obrazowania BD Pathway (*Rycina 7*). Filtr wzbudzający definiuje długości fal, które oświetlają próbkę, natomiast filtr emisyjny umożliwia rejestrację przez aparat tylko odpowiednich długości fal światła. Zwierciadło dichroiczne jest umieszczone pod kątem 45° i zlokalizowane w torze optycznym pomiędzy filtrem wzbudzającym a filtrem emisyjnym. Kieruje ono światło wzbudzające przez obiektyw, a także przekazuje światło o większej długości fali z próbki do filtra emisyjnego. W torze optycznym systemu BD Pathway 855 istnieje jedno dodatkowe koło filtrowe, dichroiczne koło wzbudzające,

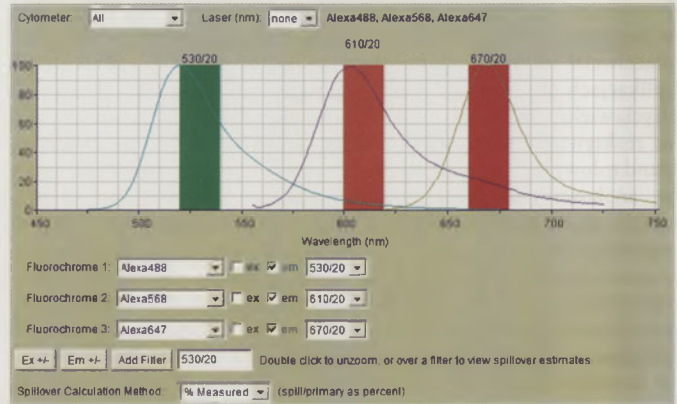
które zawiera pełne zwierciadło, częściowe zwierciadła, zwierciadło dichroiczne i pozycję otwartą. Pozycja otwarta zapobiega blokowaniu światła z Lampy A, co umożliwia przeniknięcie światła do zwierciadła dichroicznego. Zwierciadła umożliwiają jednocześnie lub sekwencyjne kierowanie światła z drugiej lampy (Lampa B) do głównego toru optycznego. Dzięki zwierciadłu dichroicznemu, dla celów aplikacji wymagających szybkich pomiarów kinetycznych, takich jak obrazowanie wyrzutu jonów wapnia, dwie długości fal światła można przełączać za pomocą migawki (a nie przesuwania kół filtrowych).

niż obrazowanie przy użyciu zestawów filtrów jednoobarwnych. *Przegląd spektrów fluorescencji* przedstawiony na **Rycinie 8** jest narzędziem online, którego można użyć do zoptymalizowania zestawów filtrów dla aplikacji opartych na multipleksowaniu. Narzędzie to umożliwia podgląd spektrów wzbudzenia i emisji wielu powszechnie dostępnych barwników i sond fluorescencyjnych oraz umieszczenie ich na wykresie z różnymi filtrami wzbudzającymi i emisyjnymi w celu ustalenia najlepszej kombinacji. Można je również wykorzystać do oceny rozmiarów zachodzenia na siebie spektrów lub efektu *bleed-through*, które mogą wystąpić w przypadku różnych kombinacji sond i filtrów. *Podgląd Spektrów Fluorescencji* dostępny jest na stronie BD Biosciences: bdbiosciences.com/spectral.



Rycina 7. Tor optyczny systemów obrazowania BD Pathway™. System BD Pathway 855 z oświetleniem pochodzącym z Lampy A jest przedstawiony na Panelu A. Panel B przedstawia System BD Pathway 435.

Większość zestawów filtrów jest zaprojektowana do optymalnego obrazowania jednego kanału fluorescencji (zestawy pojedyncze). Inne zestawy filtrów są przeznaczone do transmisji światła w dwóch kanałach barw lub większej ich liczbie (zestawy wielopasmowo-przepustowe), odbijając światło pomiędzy transmitowanymi barwami. Filtry górnoprzepustowe i szerokie filtry pasmowo-przepustowe umożliwiają największą przepustowość światła, ale mogą nie nadawać się do stosowania w testach opartych na multipleksowaniu z powodu efektu *bleed-through* (wzbudzenie wskutek wzbudzenia bezpośredniego), wynikającego z obecności sond lub barwników fluorescencyjnych o zachodzących na siebie spektrach wzbudzenia i emisji. Wąskie filtry pasmowo-przepustowe i filtry wielopasmowo-przepustowe umożliwiają skuteczniejsze multipleksowanie, transmitują one jednak znacznie mniej światła z powodu wąskich pasm transmisji przy każdej długości fali. Obrazowanie przy użyciu filtrów wielopasmowo-przepustowych może więc wymagać relatywnie jasnych próbek i dłuższych czasów ekspozycji



Rycina 8. Zrzutek z ekranu przedglądu spektrów fluorescencji. *Podgląd spektrów fluorescencji* jest przydatnym narzędziem wspomagającym wybór odpowiednich kombinacji sond i filtrów dla aplikacji obrazowania wieloparametrowego wykorzystujących multipleksowanie.

Większość zestawów danych uzyskiwanych z obrazowania wieloparametrowego składa się z obrazów komórek znakowanych odczynnikami fluorescencyjnymi o wielu barwach. W przypadku niektórych aplikacji wykorzystujących multipleksowanie, przydatnym miernikiem może być stopień kolokalizacji dwóch białek lub większej ich liczby. W celu wizualizacji lokalizacji przestrzennej dwóch lub wielu sond, pomocne jest nałożenie na siebie (połączenie) obrazów każdego kanału barwy. Jednakże na połączonym obrazie jedna barwa może wydawać się delikatnie niedopasowana względem drugiej. To zjawisko określane jest jako przesunięcie pikseli. Przesunięcie pikseli może wynikać z niewyrównanych filtrów i kół filtrowych bądź ze składu i właściwości poszczególnych filtrów. Delikatne przesunięcie światła przechodzącego przez filtry różnych kanałów barwy może powodować przesunięcie obrazu powiązanego z jednym kanałem względem drugiego kanału. Przesunięcie pikseli, jeśli zostanie zaobserwowane, dotyczy na ogół kilku pikseli. Z tego względu problem przesunięcia pikseli może dotyczyć jedynie aplikacji wymagających obrazów o wysokiej rozdzielczości i precyzyjnej kolokalizacji małych obiektów, jak np. kolokalizacja ognisk w jądrze w przypadku uszkodzenia i naprawy DNA. Przesunięcia optyczne można również wykryć w wymiarze Z, jeśli optymalna płaszczyzna ostrości różni się nieco w zależności od kanału barwy. W celu wyeliminowania przesunięć pomiędzy kanałami barw w wymiarach X, Y i Z, można użyć zestawów filtrów wielopasmowo-przepustowych, wykorzystujących ten sam filtr dichroiczny i emisyjny do obrazowania różnych barw. W razie konieczności, na etapie Analizy Obrazu można również przetworzyć obrazy w celu skorygowania przesunięć pikseli w wymiarze X i Y. Poza tym w ramach protokołów akwizycji obrazu można zdefiniować kompensację Z, aby dostosować różne płaszczyzny ostrości pomiędzy kanałami barw.

Opracowując i optymalizując nową aplikację obrazowania wieloparametrowego wykorzystującą multipleksowanie, należy zaprojektować doświadczenia wstępne w celu dokonania pomiaru każdej z omówionych cech filtra. W celu zmierzenia efektu *bleed-through*, należy

przygotować komórki barwione każdym barwnikiem pojedynczo, a także dwoma barwnikami lub większą ich liczbą, a następnie poddać obrazowaniu w różnych kanałach barw. Poza tym należy również przeprowadzić doświadczenia mierzące natężenie specyficznych sygnałów, niespecyficzne tło i przesunięcie pikseli. W oparciu o wyniki tych doświadczeń można dokonać odpowiednich dostosowań do odczynników, protokołów, konfiguracji filtrów i innych parametrów akwizycji obrazu.

Soczewki obiektywu

Soczewki obiektywów stanowią zwykle najważniejszy element układu optycznego, ponieważ są one głównym czynnikiem definiującym jakość obrazu. Wybór soczewek obiektywów zależy głównie od rozdzielczości koniecznej do analizy obrazu, liczby komórek koniecznej, aby uzyskać dane istotne statystycznie, a także, jak już wspomniano, od zastosowanej płytki obrazowej (patrz rozdział *Płytki do obrazowania*).

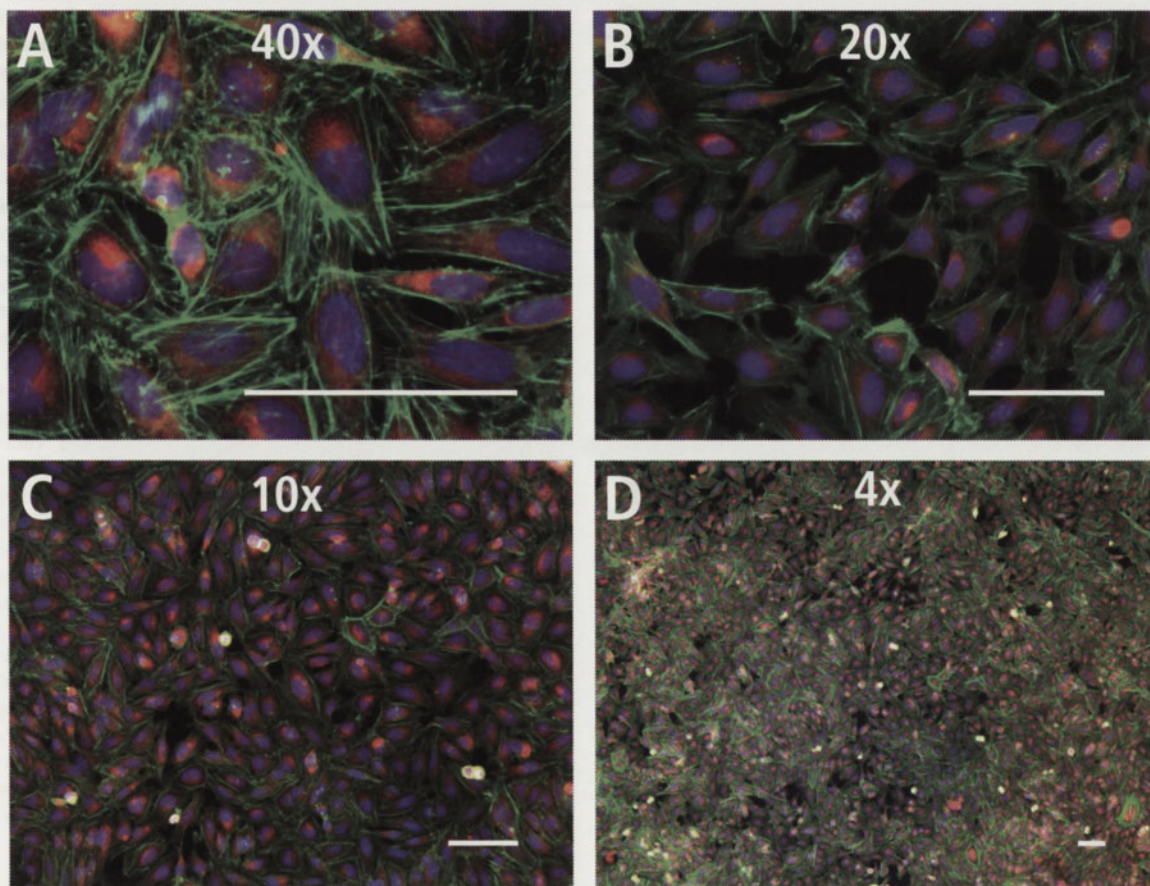
Soczewki obiektywów klasyfikuje się głównie w oparciu o powiększenie, odległość roboczą i wartość NA. Powiększenie obiektywu konieczne dla danego testu wynika z potrzeb w zakresie analizy obrazu. Pomiarów struktur na dużym obszarze, np. tworzenie tubul w badaniach nad angiogenezą, bądź obrazowanie całych organizmów, wymagają obrazowania przy małym powiększeniu (powiększenie <10x). Z kolei w jądrach w badaniu uszkodzenia i naprawy DNA, liczenie submikronowych ognisk wymaga dużego powiększenia (obiektyw 40x). Większość aplikacji obrazowania wieloparametrowego wymaga zastosowania obiektywu 10x lub 20x. Zdolność do akwizycji czterokrotnie większej liczby komórek przy tej samej liczbie pól obrazu jest wyraźną zaletą przy obrazowaniu

obiektywem 10x względem obiektywu 20x tak długo, jak towarzyszące temu obniżenie rozdzielczości obrazu nie wpływa niekorzystnie na analizę obrazu i danych. **Tabela 4** zawiera wykaz rozmiarów pól (mierzonych za pomocą mikrometru systemu BD Pathway™ 855) z reprezentatywnymi testami dostosowanymi do każdej z soczewek obiektywu. Pola obrazu uchwycone obiektywami o różnych powiększeniach są przedstawione na **Rycinie 9**.

Tabela 4. Wymiary pola i reprezentatywne testy dla soczewek obiektywów.

Obiektyw	Wymiary pola (mikrony)	Reprezentatywny test
40x*	210 x 160	Uszkodzenie i naprawa DNA
20x*	420 x 320	Translokacja do jądra
10x	840 x 640	Cykl komórkowy
4x	2100 x 1600	Formowanie tubul
2x	4200 x 3200	Obrazowanie danio przegowanego

*W systemach BD Pathway dostępne są obiektywy o wysokiej wartości NA i typu LWD.



Rycina 9. Porównanie obrazów uchwyczonych obiektywami o różnych powiększeniach. Komórki HeLa barwione odczynnikami Hoechst (niebieski), falloidyną znakowaną Alexa Fluor® 488 (zielony) i MitoTracker® Red (czerwony) zostały poddane obrazowaniu przy użyciu soczewek obiektywów 40x (Panel A), 20x (Panel B), 10x (Panel C) i 4x (Panel D). Jeśli n równa się liczbie komórek uchwyczonych obiektywem 40x, to liczba komórek uchwyczonych obiektywami 20x, 10x lub 4x wyniosłaby odpowiednio 4x, 16x i 100x. Obrazy pełnego pola (w pseudokolorach lub połączone) w ramach tego samego dolka poddano akwizycji przy użyciu systemu BD Pathway 435. Skala reprezentuje 100 mikronów.

Odległość roboczą obiektywu definiuje się jako odległość (w mm) od przedniej części soczewek obiektywu do powierzchni obrazowania (na przykład odległość pomiędzy obiektywem a próbką), gdy próbka jest widziana ostro. Wartość NA jest miarą zdolności zebrania światła przez soczewkę obiektywu. Soczewki o dużym powiększeniu zwykle mają wysokie wartości NA i umożliwiają wejście w obiektyw większej liczby promieni światła formujących obraz, pod większymi kątami (bardziej z ukosa). Z tego względu obiektywy o wysokich wartościach NA generują obrazy o większej rozdzielczości niż obiektywy o niskiej wartości NA. Jednakże z powodu małej odległości roboczej, obiektywów o wysokiej wartości NA można używać tylko w przypadku płytek cienkodennych. Nie można ich używać do obrazowania próbek na płytkach grubodennych lub płytkach z grubymi opłaszczeniami macierzy ECM. Do obrazowania próbek na płytkach grubodennych konieczne jest użycie obiektywów o niskich wartościach NA (które mają większe odległości robocze). Obiektywy te mają jednak ograniczone możliwości w zakresie zdolności zbierania światła i rozdzielczości obrazu. Użycie płytek grubodennych z obiektywami o niskich wartościach NA wymaga dłuższych czasów ekspozycji, co może negatywnie wpływać na zdolność obrazowania ciemnych próbek, zwłaszcza w trybie konfokalnym.

Ustawienia aparatu

Ustawienia aparatu, takie jak czas ekspozycji, binning pikseli i wzmocnienie (*gain*) są istotnymi czynnikami wpływającymi na jakość obrazu i analizę danych. Optymalne ustawienia aparatu należy więc ustalać dla każdego barwnika lub sondy fluorescencyjnej, stosowanych w aplikacji obrazowania wieloparametrowego. Czasy ekspozycji należy ustawiać w taki sposób, aby najjaśniejsze obiekty zainteresowania nie były poddane nadmiernej ekspozycji (powyżej maksymalnego natężenia pikseli). Nasycone piksele na obrazie mogą negatywnie wpływać na dokładność późniejszych pomiarów opartych na natężeniu. W przypadku obrazowania ciemnych próbek lub obrazowania w trybie konfokalnym, w którym to do aparatu transmituje się znacznie mniej światła, w celu skrócenia czasów ekspozycji można zastosować ustawienia binningu pikseli i wzmocnienia. Jednakże w przypadku ich niewłaściwego zastosowania, oba te ustawienia aparatu mogą wpłynąć negatywnie na jakość próbki.

Termin głębokość bitowa, zwany również głębokością piksela, odnosi się do maksymalnej liczby natężeń, jakie aparat może jednocześnie wyświetlić. Aparat wyposażony w fotoczułe elementy półprzewodnikowe (ang. *charge-coupled device* – CCD) w systemach BD Pathway™ generuje obrazy 12-bitowe (212 lub 4096 odcieni szarości), składające się z siatki pikseli 1344 x 1024 (w przypadku systemu BD Pathway 855) lub 1392 x 1024 pikseli (w przypadku systemu BD Pathway 435). Istnieje ustalona liczba fotoelektronów, które muszą zostać zarejestrowane dla piksela na każdym poziomie szarości. Obiekty emitujące mniej fotoelektronów (ciemne próbki) rejestrują mniej poziomów szarości niż obiekty emitujące więcej fotoelektronów (próbki jaśniejsze). Ekspozycję należy ustawić tak, aby zmaksymalizować dynamiczny zakres wartości poziomów szarości. Dla przykładu, pracując z kamerą 12-bitową w systemie BD Pathway, ekspozycję należy ustawić tak, aby maksymalne natężenia pikseli najjaśniejszego sygnału mieściły się w przedziale od 3500 do 4000 poziomów szarości (skala od 0 do 4095). W przypadku ciemnych próbek, ekspozycję należy ustawić tak, aby uzyskać sygnał właściwy do osiągnięcia odpowiedniej separacji pomiędzy natężeniami (tła) specyficznymi i niespecyficznymi. Choć obrazy uzyskiwane z kamer zawierają 12-bitów danych (4096 odcieni szarości), są one przechowywane w postaci niezmięnionej (bez skalowania) w 16-bitowych plikach danych, aby były kompatybilne z powszechnie stosowanym oprogramowaniem do przetwarzania obrazów.

Dostosowanie wzmocnienia (*gain*) aparatu definiuje liczbę akumulowanych fotoelektronów, które określają każdy poziom szarości. Wzrost wzmocnienia elektronowego odpowiada zmniejszeniu liczby fotoelektronów, które są przypisane do jednego poziomu szarości. Różni się to od ustawień wzmocnienia stosowanych w innych rodzajach detektorów (takich jak fotopowielacze stosowane w cytometrach przepływowych), które wzmacniają sygnały za pomocą stałego współczynnika powielania. Wzmocnienie umożliwia podzielenie danego poziomu sygnału na większą liczbę stopni poziomów szarości. Choć

ustawienie wzmocnienia jest metodą rozszerzenia słabego sygnału do pożądanej większej liczby poziomów szarości, nadmierne używanie tej funkcji może prowadzić do wyższych poziomów szumu, które pojawiają się na obrazie końcowym w postaci tzw. groszkowania.

Łączenie pikseli w siatkę określa się jako binning pikseli. W obrazie bez binningu (określanym jako bin 1 lub binning 1x1), każdy z pikseli jest mierzony niezależnie. Przy binningu 2x2 (bin 2), cztery sąsiadujące piksele są łączone w jeden duży piksel lub superpiksel. Przy binningu 4x4 (bin 4) 16 pikseli sumuje się razem, i tak dalej. Powstające w efekcie superpiksele są przetwarzane jako jeden piksel zawierający połączoną zawartość fotoelektronów wszystkich zsumowanych pikseli. Korzyści wynikające z binningu pikseli to większe natężenie sygnału, które umożliwia 4-krotne skrócenie czasów ekspozycji (na 1 poziom binningu) i mniejsze rozmiary pliku z obrazem, co zmniejsza zarówno wymagania w zakresie przechowywania danych, jak i czas przetwarzania obrazu. Jednakże wraz ze wzrostem poziomu binningu, rozdzielczość przestrzenna ulega zmniejszeniu. Generalnie obrazy uzyskiwane przy wykorzystaniu poziomów binningu powyżej 2x2 nie nadają się do ilościowej analizy obrazu. Wysokie poziomy binningu (4x4 lub 8x8) są jednak przydatne do zwiększania szybkości metod ustawiania ostrości w oparciu o obraz.

Rozdzielczość obrazu

Rozdzielczość obrazu to termin stosowany w celu określenia poziomu szczegółów zawartych w obrazie. Jest ona determinowana głównie powiększeniem obiektywu oraz liczbą i wymiarami pikseli w kamerze i na obrazie. Wymiary pola dla poszczególnych soczewek obiektywów stosowanych w systemie obrazowania można zmierzyć za pomocą mikrometru. Następnie dzieląc wymiary pola (w mikronach) przez wymiary obrazu (w pikselach) można obliczyć rozdzielczość obrazu (w mikronach/piksel) . Do obliczenia rozdzielczości obrazu na różnych poziomach binningu pikseli wykorzystano wymiary pola zmierzone dla różnych obiektywów systemu BD Pathway 855. Są one wymienione w **Tabeli 5**. Obrazowanie przy binningu 1x1 za pomocą obiektywu 20x generuje obrazy o podobnej rozdzielczości (0,3125 mikronów/piksel) jak obrazowanie przy binningu 2x2 za pomocą obiektywu 40x. Ponieważ pole obiektywu 20x jest czterokrotnie większe niż pole obiektywu 40x, można uchwycić czterokrotnie więcej komórek na jedno pole obrazu. Może to być korzystne w przypadku aplikacji wymagających zarówno wysokiej rozdzielczości, jak i wyższej liczby komórek, ponieważ czasy akwizycji mogą być znacznie krótsze. Obrazowanie przy binningu 1x1 wymaga jednak dłuższego czasu ekspozycji niż obrazowania przy binningu 2x2, co może zwiększać szumy tła na obrazach i negatywnie wpłynąć na wyniki testu.

Tabela 5. Rozmiary pola obrazu i charakterystyki uchwycone przy wykorzystaniu różnych obiektywów i poziomów binningu pikseli.

Binning	Rozmiar obrazu (piksele)	Rozmiar pliku ze zdjęciem (KB)	Obiektyw	Pole widoku (mikrony)	Rozdzielczość (mikrony/piksele)
1x1	1344x1024	2697	40x	210x160	0,15625
			20x	420x320	0,3125
			10x	840x640	0,625
2x2	672x512	677	40x	210x160	0,3125
			20x	420x320	0,625
			10x	840x640	1,25
4x4	336x256	171	40x	210x160	0,625
			20x	420x320	1,25
			10x	840x640	2,5
8x8	168x128	44	40x	210x160	1,25
			20x	420x320	2,5
			10x	840x640	5,0

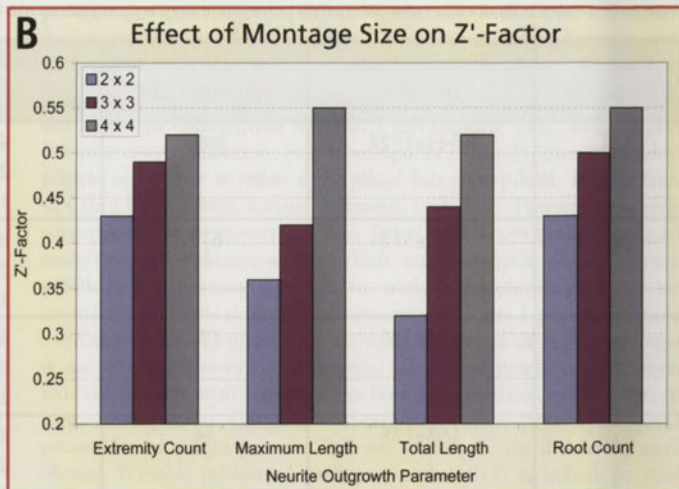
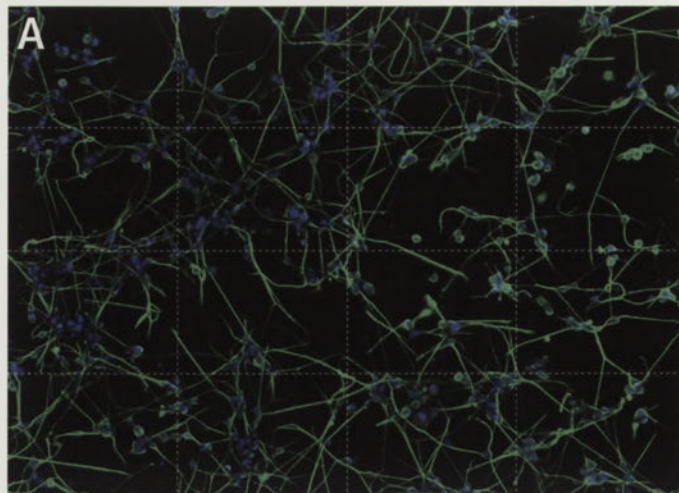
Liczba pól obrazu (montaż)

W obrazowaniu wieloparametrowym ważne jest uchwycenie na tyle dużej populacji komórek na każdym obrazie, aby uzyskane dane były istotne statystycznie. O liczbie uchwyconych komórek decyduje rodzaj i liczba komórek umieszczonych na płytce i powiększenie oraz liczba uchwyconych pól obrazu. Akwizycja większej liczby komórek w każdym dołku lub na obrazie, generalnie przekłada się na testy o wyższym poziomie istotności statystycznej, mierzonej współczynnikiem Z' (patrz część Analiza i Wizualizacja Danych). Testy o współczynniku $Z' > 0,5$ są uznawane za znacząco stabilne, nadające się do aplikacji skringowych.⁴ Ponieważ większość odpowiedzi biologicznych opartych na komórce ma charakter heterogeniczny, rosnąca wielkość analizowanej populacji komórek zmniejsza zróżnicowanie średnich danych dla dołka mierzonych w powtórzeniach dołków i zwiększa wartości współczynnika Z' . Jednym ze sposobów zwiększenia liczby analizowanych komórek jest zwiększenie gęstości komórek na płytkach. Aplikacje obrazowania wieloparametrowego na ogół analizują jednak pojedyncze komórki, nie zaś populacje komórek, a duża gęstość komórek na płytkach może utrudniać segmentację pojedynczych komórek. Alternatywą jest obrazowanie dodatkowych pól poprzez zastosowanie montażu w trybie ciągłym (*ang. contiguous*) lub nieciągłym (*ang. discontinuous*). W trybie ciągłym systemy BD Pathway™ mogą dokonać precyzyjnej akwizycji sąsiadujących pól obrazu i dla celów analizy połączyć je w jeden większy, zmontowany obraz wielu pól. Jest to szczególnie przydatne w teście rozrostu neurytów, co zaprezentowano na **Rycinie 10**. Ten test z zasady charakteryzują niskie wartości współczynnika Z' z uwagi na heterogeny charakter wydłużonych neuronów. Komplikuja to jeszcze bardziej duże rozmiary komórek, które rozciągają się poza granice pojedynczego pola obrazu. Dane wskazują, że wraz z rosnącym rozmiarem montażu w trybie ciągłym, wartości współczynnika Z' rosną dla każdego spośród parametrów testu mierzonych przy użyciu oprogramowania aplikacyjnego BD AttoVision™ do Rozrostu Neurytów. Montaż 4x4 pozwolił uzyskać wartości współczynnika Z' na poziomie $>0,5$. W celu uzyskania dokładniejszych informacji, należy sięgnąć do noty aplikacyjnej „Quantitative High Content Analysis of Neurite Outgrowth”, dostępnej na stronie: bdbiosciences.com/pdfs/whitePapers/07-A790030-19A.pdf.

Metody automatycznego ustawiania ostrości

Automatyczne systemy obrazowania wykorzystują metody sprzętowe i programowe do automatycznego ustawiania ostrości i uchwycenia obrazu w kolejnych dołkach lub w obrębie tego samego dołka płyki wielodołkowej. Niezależnie od zastosowanej metody, ustawienia autofokusa należy zoptymalizować, aby uwzględnić parametry testu takie jak komórki o różnej grubości w osi Z lub sondy zlokalizowane w różnych regionach subkomórkowych (jądro i błona plazmatyczna). Systemy BD Pathway wykorzystują dwa różne tryby automatycznego ustawiania ostrości: oparty o laser i oparty o obraz. Autofokus oparty o laser identyfikuje styk obrazowania powierzchni dołka/ciecicy, a następnie w celu uchwycenia obrazu przesuwa się o ustaloną odległość w wymiarze Z względem tego styku, do skalkulowanej płaszczyzny ostrości. W trybie ustawiania ostrości opartym o obraz, do określenia optymalnej płaszczyzny ostrości wykorzystuje się maksymalne natężenie fluorescencji i wartości kontrastu analizowane na podstawie złożenia poszczególnych planów fokalnych w osi Z próbki. Obie metody automatycznego ustawiania ostrości umożliwiają optymalizację za pomocą ustawień definiowanych przez użytkownika. Niekiedy przydatne może okazać się połączenie tych dwóch metod, na przykład, gdy optymalna płaszczyzna ostrości próbki odbiega od jednej ustalonej pozycji w wymiarze Z (np. w przypadku montażu obejmujących duże odległości, typy komórek rosnące trójwymiarowo lub macierze o nierównej grubości).

Tryb ustawiania ostrości oparty o laser jest szybszy niż tryb ustawiania ostrości oparty o obraz i może znacząco skrócić czas akwizycji obrazu. Tryb ustawiania ostrości oparty o obraz oferuje jednak możliwość ustawienia ostrości w oparciu o barwnik, co pozwala na niezależne ustawianie ostrości na obiektach znakowanych różnymi fluoroforami. Tryb ustawiania ostrości oparty o obraz wymaga oświetlenia próbki, a w przypadku nadmiernego jej oświetlenia może dojść do fotowysbielenia sygnałów fluorescencyjnych. Z tego względu tryb ustawiania ostrości oparty o obraz może nie być odpowiedni do obrazowania fotolabilnych sond i barwników.



Rycina 10. Wpływ rozmiaru montażu na działanie testu w aplikacji Rozrostu Neurytów. Doświadczenie typu min/max przygotowano przy użyciu 48 dołków nie wystawionych na działanie żadnej substancji i 48 dołków poddanych działaniu NGF (100 ng/m NGF), zawierających komórki PC12, a następnie przeprowadzono obrazowanie w trybie niekonfokalnym wykorzystując różne rozmiary montażu. Dane obrazu przeanalizowano przy użyciu modułu oprogramowania BD AttoVision™ do Rozrostu Neurytów i obliczono współczynnik Z' dla rozmaitych parametrów. Montowane obrazy 2x2, 3x3 i 4x4 zawierają odpowiednio 4, 9 i 16 sąsiadujących pól obrazu. Montaż 4x4 składający się z 16 sąsiadujących pól obrazu (oznaczonych białymi przerywanymi liniami) przedstawia Panel A. Wykres wartości współczynników Z' dla czterech parametrów, uzyskanych na podstawie analiz obrazów o różnych rozmiarach montażu przedstawiony jest na Panelu B. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Konfokalny Stos Z – zbieranie fluorescencji ze wszystkich planów fokalnych próbki

Niektóre aplikacje wieloparametrowe wymagają wysokiej rozdzielczości obrazu nie tylko w wymiarach X i Y, ale także w wymiarze Z. W takich przypadkach obrazowanie konfokalne oferuje kilka wyraźnych zalet w stosunku do tradycyjnego obrazowania fluorescencyjnego o szerokim polu. Obrazowanie w trybie konfokalnym usuwa nieostrości poza polem ogniskowania poprzez przepuszczenie światła przez otwór optyczny, co skutkuje uchwyceniem większej rozdzielczości osiowej (wzdłuż osi Z) próbki. Poza tym obrazowanie konfokalne pozwala na zebranie „stosu Z” (zbieranie fluorescencji ze wszystkich płaszczyzn fokalnych próbki) lub serii przekrojów optycznych o wysokiej rozdzielczości przez próbkę. Stosu Z można użyć do odtworzenia próbki w 3-D lub zrzucić go do pojedynczego obrazu dwuwymiarowego dla celów dalszej analizy. Obraz ze zrzucenym konfokalnym stosem Z (*ang. confocal collapsed Z stack*) generuje ostrą prezentację fluorescencji z całej grubości próbki. Jest to szczególnie użyteczne w przypadku testów takich jak formowanie tubul (angiogeneza), gdzie struktury komórkowe formują grubą macierz ECM. W celu uzyskania dokładniejszych informacji, należy sięgnąć do noty aplikacyjnej „An Image-Based Assay of Endothelial Cell Tube Formation as a Model of Angiogenesis”, dostępnej na stronie: bdbiosciences.com/pdfs/whitePapers/06-A790030-3A1.pdf.

Korzyści z zastosowania konfokalnego stosu Z w przypadku gęstych pierwotnych sieci nerwowych omówiono również w przytoczonej wcześniej notce aplikacyjnej dot. rozrostu neurytów.

Definiując kroki w zakresie wymiaru Z, należy uwzględnić rozdzielczość systemu obrazowania w wymiarze Z (mierzoną zdolnością rozdzielczą w osi Z). Rozdzielczość w wymiarze Z mierzy się za pomocą funkcji rozproszenia punktowego (*ang. point spread function – PSF*).⁵ Rozdzielczości w wymiarze Z zmierzone za pomocą funkcji PSF dla trzech obiektywów reprezentatywnego systemu BD Pathway™ 855 wyniosły:

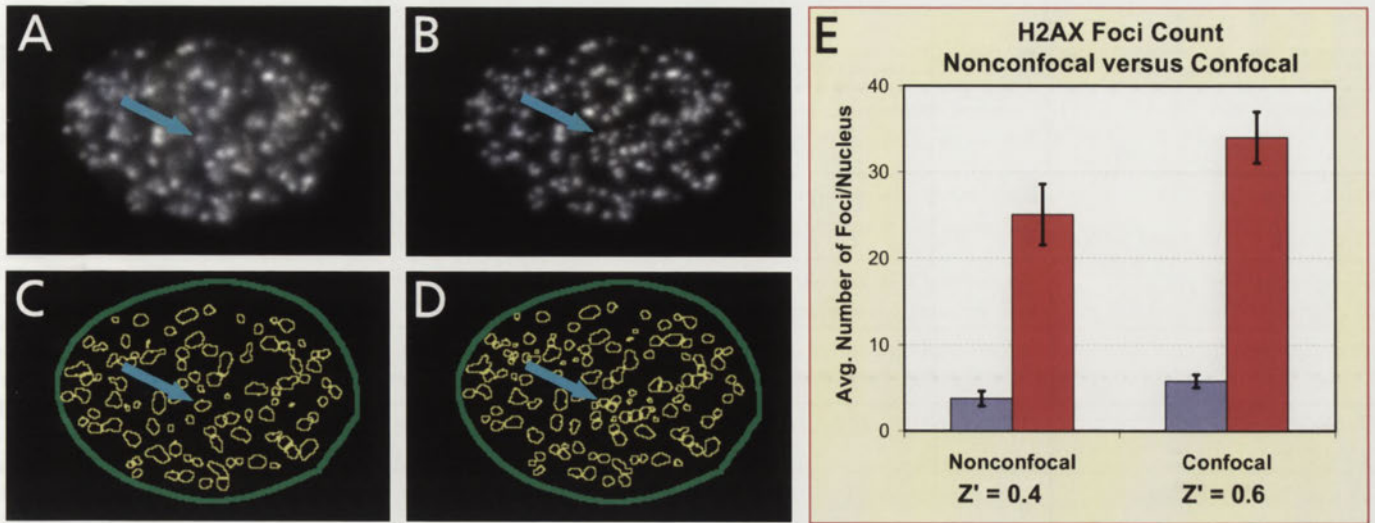
- 60x (1,4 NA) = 0,8 mikrona
- 40x (0,9 NA) = 2,0 mikrony
- 20x (0,75 NA) = 2,8 mikronów

Aby uzyskać właściwą reprezentację szczegółów w osi Z próbki odległość kroku Z powinna wynosić około połowę rozdzielczości systemu w wymiarze Z. Na przykład w przypadku stosowania obiektywu o

powiększeniu 40x (0,9 NA) systemu BD Pathway 855, dla którego zmierzona rozdzielczość w wymiarze Z wynosi 2,0 mikrony, obrazowanie należy wykonać przy krokach w wymiarze Z na poziomie 1,0 μm.

Przykład tego, w jaki sposób obrazowanie konfokalne może poprawić działanie testu obrazowania o wysokiej rozdzielczości, ilustrują dane z obrazowania uszkodzeń i systemów naprawczych DNA zaprezentowane na **Rycinie 11**. W tym teście obrazowanie w trybie konfokalnym ze zrzuceniem stosu Z wygenerowało ostrzejsze granice ognisk w jądrach, co umożliwiło lepszą identyfikację poszczególnych zmian w porównaniu z trybem obrazowania w szerokim polu (niekonfokalnym). Przekłada się to na większą dokładność i stabilność testu. W celu uzyskania dokładniejszych informacji należy sięgnąć do noty aplikacyjnej „DNA Damage and Repair – Quantification of Sub-Cellular Events Using Automated Confocal Imaging”, dostępnej na stronie: bdbiosciences.com/pdfs/whitePapers/06-A790030-6A1.pdf.

Tabela 6 zawiera podsumowanie zalet i wad rozmaitych czynników akwizycji obrazu, które omówiono. Choć podczas etapu przygotowywania materiału biologicznego i akwizycji obrazów należałoby rozważyć i zoptymalizować wiele istotnych czynników, znalezienie jednej kombinacji warunków, która generuje perfekcyjny zestaw obrazów może nie być konieczne lub możliwe. Istotne jest dokonanie oceny wymagań (lub tolerancji) testu, które dla każdej aplikacji generują biologicznie i statystycznie istotne wyniki.



Rycina 11. Porównanie trybów akwizycji konfokalnej i niekonfokalnej. Komórki HT-1080 potraktowano nadtleniem wodoru i poddano barwieniu przeciwciałem wykrywającym postać ufosforylowaną H2AX (wyspecjalizowana postać histonu H2, akumulująca się przy uszkodzeniach obu nici DNA). W porównaniu z trybem konfokalnym ze zrzuceniem stosu Z (Panel B), w trybie niekonfokalnym (Panel A), liczba ognisk w jądrach wydawała się być mniejsza, były one większe i nieostre. Obrazowanie konfokalne skutkowało identyfikacją większej liczby pojedynczych ognisk (strzałka) i lepszą segmentacją obrazu (Panele C i D). Panel E przedstawia średnią liczbę ognisk w jądrze – wartości kontrolne (słupki niebieskie) porównano z dołkami potraktowanymi nadtleniem wodoru (słupki czerwone). Działanie testu zmierzono wartością współczynników Z' dla przeciętnej liczby zmian w jądrze, która wyniosła 0,4 dla obrazów w trybie niekonfokalnym i 0,6 dla obrazów w trybie konfokalnym ze zrzuceniem stosu. N = 6 dołków ± SD. Akwizycji obrazów (przyciętych) dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 40x (0,9 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Tabela 6. Zalety i wady trybów oraz opcji akwizycji obrazów w systemie BD Pathway™.

Opcje	Zalety	Wady
Powiększenie 40x	Dostępne opcje wysokiej wartości NA i LWD Wysoka rozdzielczość przestrzenna	Zmniejsza rozmiar pola obrazu
Powiększenie 20x	Dostępne opcje wysokiej wartości NA i LWD Dobrze spełnia większość potrzeb z zakresu obrazowania	Drobne cechy subkomórkowe mogą nie być w pełni uchwycone
Powiększenie 10x	Wychwytuje 4-krotnie więcej komórek na 1 obraz niż powiększenie 20x	Niska rozdzielczość
Powiększenie 4x, 2x	Duże pole obrazu umożliwia obrazowanie większej liczby komórek i organizmów modowych	Niska rozdzielczość
Zestawy filtrów górnoprzepustowych	Duża przepustowość światła	Możliwość wystąpienia efektu „bleed-through” (przy multipleksowaniu)
Zestawy filtrów pasmowo-przepustowych	Węższy zakres umożliwia multipleksowanie	Możliwość przesunięcia pikseli
Zestawy filtrów wielopasmowo-przepustowych	Umożliwiają multipleksowanie	Mała przepustowość światła Możliwość wystąpienia efektu „bleed-through”
Wzmocnienie	Zwiększa natężenie sygnału	Zwiększa szum tła
Binning pikseli	Zwiększa natężenie sygnału	Obniża rozdzielczość obrazu
Tryb montażu	Wychwytuje ciągłe (lub nieciągłe) pola obrazu Zwiększa rozmiar próbki	Wydłuża czas akwizycji obrazu i analizy obrazu
Automatyczne ustawianie ostrości oparte o laser	Przyspiesza obrazowanie próbek Brak fotowysbielenia próbki	Stała pozycja kompensacji (<i>ang. offset</i>) wymaga optymalizacji dla każdej kombinacji płytki/obiektywu
Automatyczne ustawianie ostrości oparte o obraz	Oparte o barwnik Monitoruje próbki przy zmiennych odległościach względem dna płytki	Zmniejsza przerób płytek Powoduje fotowysbielenie próbki
Szerokie pole	Dobrze działa w przypadku wielu aplikacji Umożliwia obrazowanie ciemnych próbek	Obrazy zawierają światło sponad i spod płaszczyzny ostrości
Tryb konfokalny	Rekonstrukcja 3-D obrazu o wysokiej rozdzielczości Ostrzejsze obrazy	Zwiększa czas ekspozycji Wymaga jasnych próbek
Tryb konfokalny ze zrzuceniem stosem Z	Informacja 3-D na obrazie 2-D Zwiększa dogłębność analizy	Wydłuża czas obrazowania

Etap 3 – analiza obrazu

Po dokonaniu akwizycji obrazów, kolejnym etapem obrazowania wieloparametrowego jest analiza obrazu. Na analizę obrazu składa się seria kroków z zakresu przetwarzania i segmentacji obrazów, mających wydobyć dane ilościowe z obrazów. Przetwarzanie obrazu polega na zastosowaniu algorytmów, takich jak kompensacja różnic czułości poszczególnych pikseli (ang. *flat field correction*), odejmowanie tła i korekcja cieni, aby poprawić jakość obrazów dla celów segmentacji cech komórkowych będących przedmiotem zainteresowania. Segmentacja składa się głównie z zastosowania progów natężenia w celu zdefiniowania obszarów komórkowych (zwanymi również obszarami zainteresowania, ang. *regions of interest – ROI*), w których dokonane zostaną pomiary. Właściwa segmentacja może być kluczem do wygenerowania sensownych danych i musi być zoptymalizowana dla każdej aplikacji wieloparametrowej.

Dostępnych jest wiele narzędzi analizy obrazu, które można łączyć i wykorzystywać do optymalizacji metody analizy obrazu. Każdy krok metody analizy można przetestować na małym zestawie reprezentatywnych zdjęć z doświadczenia. Zoptymalizowana metoda musi jednak działać w odniesieniu do wszystkich obrazów w doświadczeniu. Może to stanowić szczególne wyzwanie, gdy ekspozycja komórek na działanie środka drastycznie zmienia wygląd mierzonych komórek lub obiektów (na przykład w badaniu na obecność apoptozy). W niektórych przypadkach metoda analizy obrazu może zrekompensować wady wynikających z przygotowania materiału biologicznego i akwizycji obrazu. W innych przypadkach wykorzystanie przetwarzania obrazu w celu skorygowania drobnych defektów nie jest jednak konieczne, ponieważ niedoskonałości mają niewielki wpływ na wyniki testu lub nie mają żadnego wpływu. W tej części pokrótce omówiono kilka częściej stosowanych metod analizy obrazu. Dostarcza ona również ram dla dalszych doświadczeń. Znakomitym źródłem będącym punktem wyjścia do głębszej dyskusji na temat technik przetwarzania obrazu jest pozycja „*Het Image Processing Handbook*” (Podręcznik dotyczący Przetwarzania Obrazu) autorstwa Johna C. Russa.⁶

Przetwarzanie obrazu

Pierwszy krok przetwarzania obrazów polega często na usunięciu artefaktów z obrazu. Głównymi źródłami artefaktów są czynniki biologiczne (w tym autofluorescencja z rozmaitych źródeł, pozostałości komórkowe i fluorescencyjne obiekty obce) i szum właściwy dla systemu obrazowania (m. in. lamp, filtrów, obiektywów, zwierciadeł lub aparatu). Obecność szumów niespecyficznego tła na zdjęciach sprawia, że segmentacja i identyfikacja specyficznych sygnałów fluorescencyjnych będących przedmiotem zainteresowania jest trudniejsza i niespójna. Usunięcie tych artefaktów pozwala na lepszą segmentację i dokładniejsze pomiary odpowiedzi biologicznej. Niektóre kroki z zakresu przetwarzania obrazu (jak korekcja cieni) zmieniają obrazy i poprawiają segmentację. Obrazy te zwykle nie są używane do analizy obrazów, ponieważ przetwarzanie modyfikuje natężenia pikseli w sposób, który nie byłby stosowny w przypadku większości pomiarów opartych na natężeniu. Zdjęcia generowane w oparciu o te typy kroków z zakresu przetwarzania można jednak wykorzystywać do generowania obszarów zainteresowania *ROI* lub dokonania pomiarów morfometrycznych struktur komórkowych. Rozległe przetwarzanie obrazu może znacznie wydłużyć czas potrzebny do przeprowadzenia analizy obrazu. Poza tym w celu zapewnienia maksimum elastyczności na rzecz ponownej analizy obrazu w przyszłości, należy zawsze zachowywać pierwotne dane obrazu w stanie nieprzetworzonym (systemy BD Pathway robią to automatycznie). W zależności od potrzeby, oprogramowanie systemu daje możliwość wygenerowania i zapisania przetworzonych zdjęć. Choć dostępnych jest wiele technik przetwarzania obrazu, typowa sekwencja kroków może obejmować kombinację dowolnych elementów spośród następujących:

- Kompensacja różnic czułości poszczególnych pikseli (ang. *flat field correction*)
- Odejmowanie tła
- Inne filtry przed zasadniczym przetwarzaniem (ang. *preprocessing filters*)

Kompensacja różnic czułości poszczególnych pikseli (ang. *flat field correction*)

Kompensacja różnic czułości pikseli to metoda przetwarzania obrazu przeznaczona do korekcji nierównego oświetlenia pola obrazu lub cieni wygenerowanych przez system obrazowania. Te artefakty mogą wynikać ze złe ustawionej optyki, odcisków palców lub kurzu i mogą być spowodowane przez każdy element toru optycznego światła. Kompensacja różnic czułości pikseli wiąże się z uchwyceniem referencyjnego obrazu toru światła. Obraz referencyjny jest często wykorzystywany do skorygowania każdego obrazu uchwyconego przy tym samym lub podobnym torze światła. Kompensacja różnic czułości pikseli może poprawić jakość obrazu i rozdzielczość danych sprawiając, że pomiary natężenia we wszystkich polach obrazu będą dokładniejsze. Wpływ kompensacji różnic czułości pikseli jest przedstawiony na **Rycinie 12**.

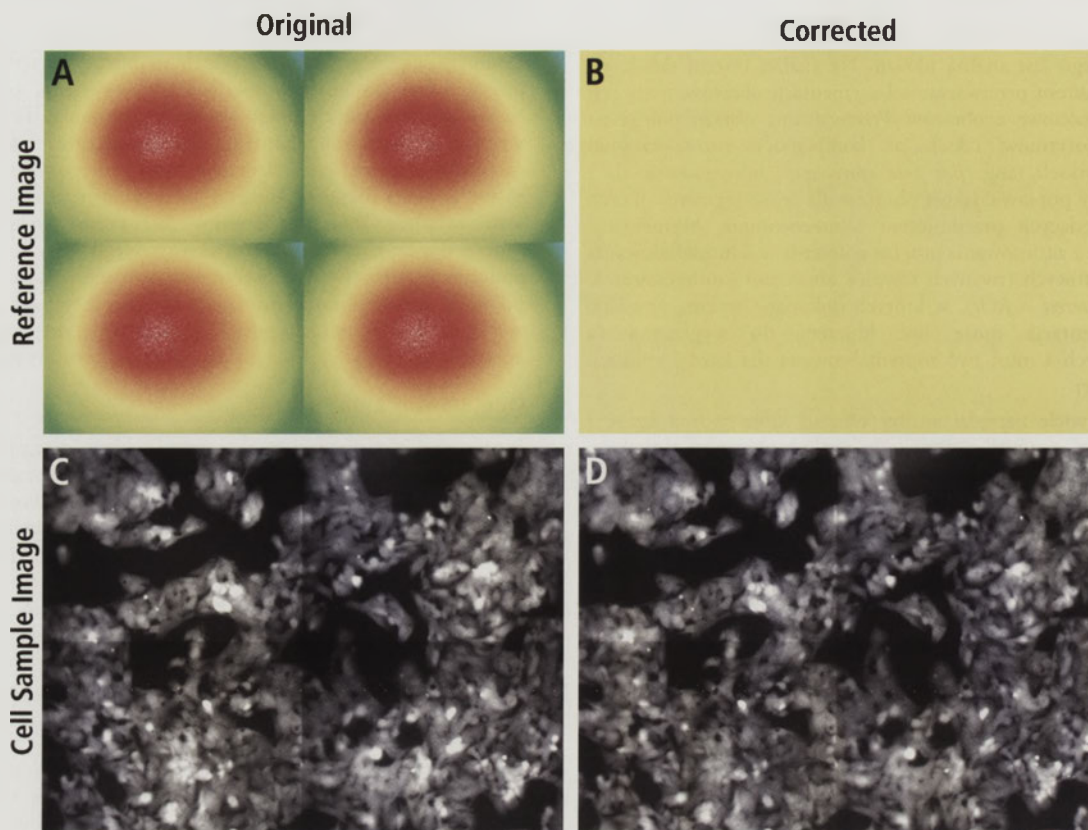
Odejmowanie tła

Poza szumem pochodzącym z systemu, obrazy mogą zawierać sygnały pochodzące z elementów innych niż obiekty będące przedmiotem zainteresowania, takich jak autofluorescencja z podłoża hodowlanego, buforów, związków chemicznych, odczynników i płytek obrazowych. W doświadczeniach na żywych komórkach, barwniki fluorescencyjne często wyciekają i przez jakiś czas są transportowane poza komórkami, przyczyniając się do niespecyficznego fluorescencji tła próbki. Odejmowanie tła to proces odejmowania tej niespecyficznego fluorescencji tła w celu wyeliminowania jej wpływu na segmentację obrazu i pomiar. Odejmowanie tła można zastosować wobec doświadczenia na różne sposoby. Na przykład stałą wartość pikseli można odjąć globalnie od każdego pikseli na każdym obrazie. Ta stała wartość pikseli może być wartością zdefiniowaną przez użytkownika lub określoną automatycznie w oparciu o natężenia pikseli obrazu. Ewentualnie można uchwycić obraz referencyjny tła i odjąć od każdego obrazu. Inne rodzaje metod odejmowania tła (takie jak algorytm *rolling ball* – „toczącej się kulki”) modyfikują każdy obraz doświadczenia w inny sposób. Metoda odejmowania tła oparta na algorytmie *rolling ball* przetwarza każdy obraz w oparciu o operacje zdefiniowane wartościami pikseli małego obszaru otaczającego obraz. Ten rodzaj odejmowania tła może zmieniać piksele w jednej części obrazu inaczej niż w innej części. Przykład zastosowania metody odejmowania tła opartej na algorytmie *rolling ball* w celu wyeliminowania artefaktu i poprawienia segmentacji obrazu jest przedstawiony na **Rycinie 13**.

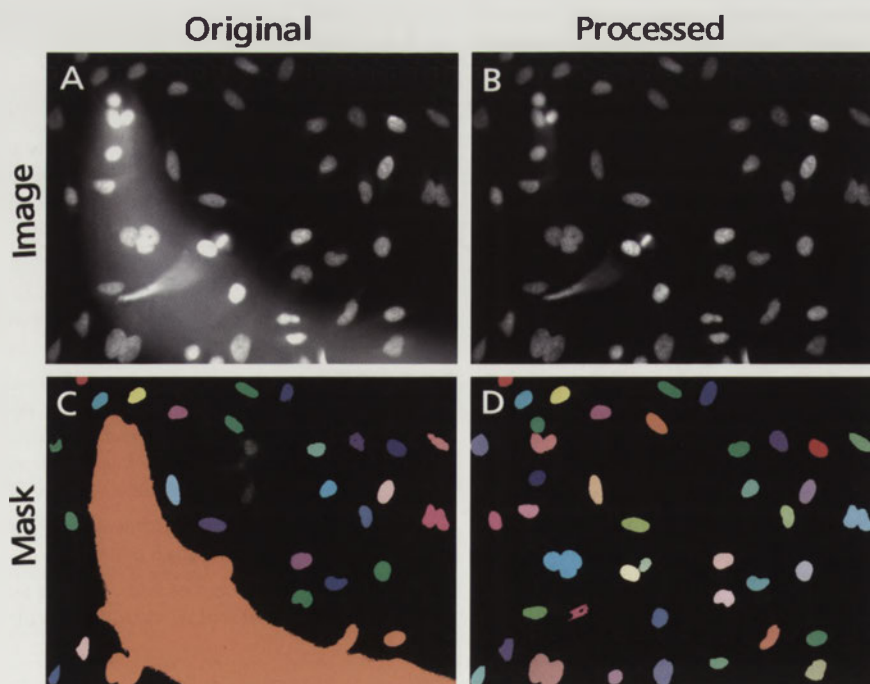
Inne filtry przetwarzania obrazu

Istnieje szeroka gama innych filtrów przetwarzania obrazów, które można zastosować w celu poprawienia segmentacji. Przetestowanie różnych kombinacji filtrów stanowi istotną część optymalizacji procesu analizy obrazu. Oprogramowanie BD AttoVision™ v.1.6 oferuje następującą grupę filtrów przetwarzania obrazu:

- Korekcja cieni – wyrównuje natężenia pikseli obiektów w ramach obrazów czyniąc je jednakowymi (nawet jeśli w rzeczywistości ich intensywność jest różna).
- Lokalne – grupa filtrów opartych na algorytmie *rolling ball*, które generują i odejmują obraz tła w oparciu o przesuwanie koliste sąsiadującego jądra (mała macierz operacji przetwarzania), w którym każdy piksel jest zmieniany w oparciu o wkład ze zdefiniowanej liczby pikseli sąsiadujących.
- Wyostrające – koncentrują się na obrazach nieostrych, zwiększając kontrast sąsiadujących pikseli.
- Wygładzające – zestaw filtrów, które przetwarzają obrazy zastępując każdy piksel średnią sąsiadujących pikseli.



Rycina 12. Kompensacja różnic czułości pikseli montowanych obrazów. W celu skorygowania obrazów 2 x 2 próbki referencyjnej płaskiego pola (Panel A i B, w pseudokolorach uzyskanych przy użyciu stosunkowej skali natężenia) i komórek (Panel C i D) użyto obrazu referencyjnego kompensacji różnic czułości poszczególnych pikseli. Pierwotne zdjęcia są przedstawione na Panelach A i C. Skorygowane obrazy są przedstawione na Panelach B i D. Po kompensacji różnic czułości pikseli, natężenia sygnałów są rozłożone bardziej równomiernie. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 435.



Rycina 13. Odejmowanie tła oparte na algorytmie rolling ball poprawia segmentację obrazu. Obraz jąder komórek HeLa barwionych odczynnikiem Hoechst, zawierający artefakt (Panel A) został przetworzony przy wykorzystaniu metody odejmowania tła opartej na algorytmie *rolling ball* (Panel B). Dokonano segmentacji obrazu pierwotnego i przetworzonego. Maski segmentacji są przedstawione odpowiednio na Panelach C i D (losowo przydzielone kolory). W obrazie nieprzetworzonym artefakt zidentyfikowano jako obszar zainteresowania, podobnie jak otaczające komórki. W obrazie przetworzonym jedynie komórki w polu obrazu zidentyfikowano jako obszary zainteresowania. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Segmentacja

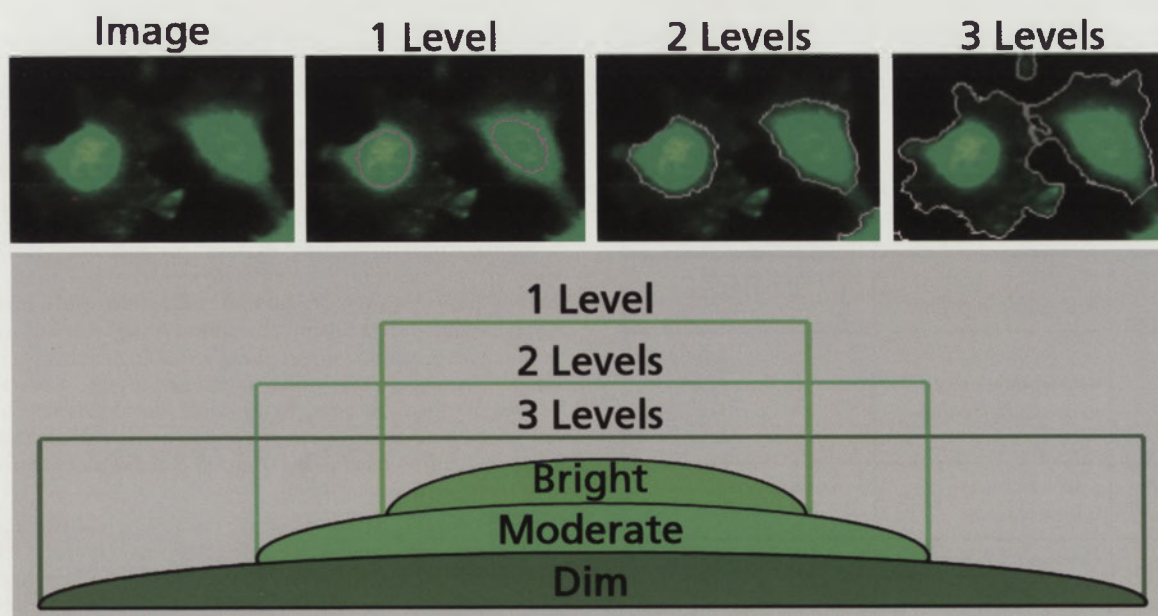
Kolejnym krokiem analizy obrazu po jego przetworzeniu jest segmentacja. Segmentacja to proces identyfikowania, oddzielania i definiowania obiektów w obrazach, jako odrębnych elementów. Zwykle uzyskuje się to poprzez zastosowanie wobec obrazu progu opartego na natężeniu. W przypadku fluorescencyjnych obrazów komórek, natężenie progowe to wartość szara obrazu poniżej której dane obrazu są uznawane za tło i powyżej której dane są uznawane za obiekt lub część obiektów zainteresowania. Po ustawieniu progu, obiekty zawierające natężenia pikseli powyżej progu są identyfikowane i definiowane poprzez granice segmentacji lub obszary zainteresowania. W systemach BD Pathway™, progową wartość natężenia można określać ręcznie lub automatycznie. Próg określany ręcznie to pojedyncza wartość natężenia definiowana przez użytkownika, która jest stosowana wobec całego doświadczenia. Automatyczny próg jest dostosowany w oparciu o zawartość danego obrazu i zwykle jest różny dla różnych obrazów doświadczenia. Ustalanie wartości progu należy właściwie zastosować wobec wszystkich obrazów doświadczenia. Z tego względu w przypadku większości aplikacji obrazowania wieloparametrowego generalnie zaleca się automatyczne ustalanie progu, ponieważ złożone dozowanie może wywierać zależny od dawki wpływ na natężenie tła obrazu.

W oprogramowaniu BD AttoVision™, próg jest określany automatycznie przy użyciu wielopoziomowej analizy histogramu intensywności (natężenia) sygnału. Analizę histogramu można przeprowadzić wykorzystując maksymalnie pięć poziomów natężeń. Poziomy natężenia są definiowane przez obszary obrazu (piksele) o podobnym natężeniu. Automatyczne ustalanie progu przy użyciu jednego poziomu (najwyższe natężenie) definiuje granicę wokół najjaśniejszych obiektów obrazu (np. jądra). Każde zwiększenie liczby poziomów daje coraz niższą wartość natężenia progowego. Na przykład użycie dwóch lub większej liczby poziomów definiuje granicę wokół coraz ciemniejszych obiektów (cytoplazmy i błony plazmatycznej). Liczba automatycznych poziomów progów powinna korelować z liczbą progów natężenia obserwowanych na obrazie i liczbą obszarów subkomórkowych, koniecznych dla właściwej analizy aplikacji. Przykład automatycznego wielopoziomowego ustalania progu dla obrazu komórki przedstawia **Rycina 14**.

Ponieważ ekspozycja na substancję badaną może drastycznie zmieniać morfologię komórek, jest bardzo prawdopodobne, że optymalna metoda segmentacji komórek kontrolnych i poddanych ekspozycji może się

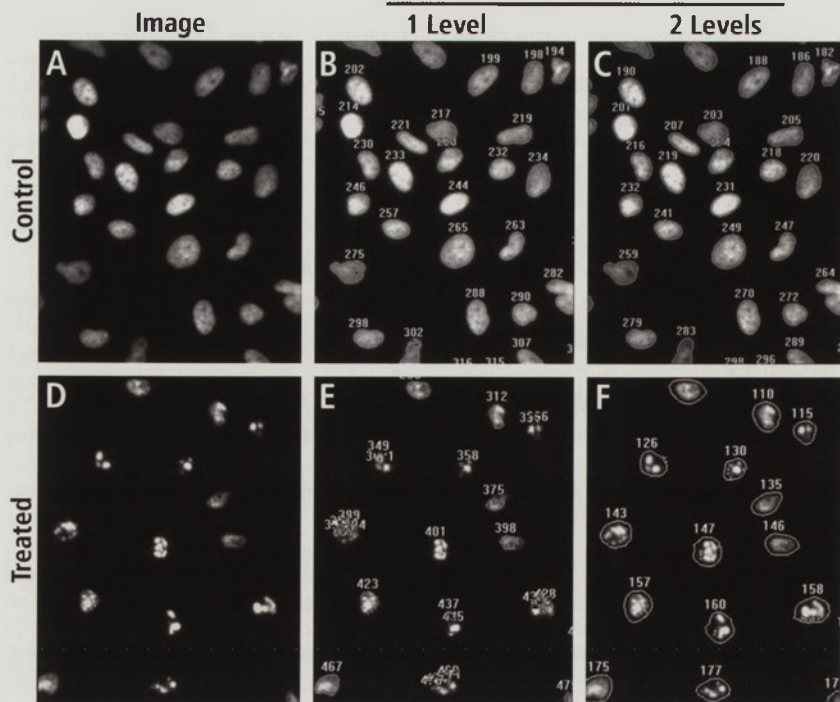
różnić pomiędzy testami. Pod pewnymi warunkami segmentacja przy użyciu wielopoziomowego, automatycznego ustalania progu może zrekomensować te zmiany morfologiczne. Zostało to zademonstrowane za pomocą testu na obecność apoptozy (**Rycina 15**). W tym przykładzie jądra nie poddawanych ekspozycji komórek kontrolnych mają plamkę o względnie równomiernym, dużym natężeniu i kontraście względem ciemnego tła, a jądra komórek poddanych ekspozycji na lek były podzielone tworząc małe regiony o wysokim natężeniu, otoczone ciemniejszymi regionami jądra. Po użyciu jednopozomowego, automatycznego ustalania progu, uzyskano właściwą segmentację jąder komórek kontrolnych, ale w komórkach poddanych ekspozycji na suraminę wiele fragmentów jąder zidentyfikowano jako pojedyncze obszary zainteresowania, których liczba przekraczała liczbę komórek. Automatyczne ustalanie progów z wykorzystaniem dwóch poziomów okazało się korzystne zarówno w przypadku komórek kontrolnych, jak i poddanych działaniu czynnika (leku). W komórkach kontrolnych wysoki kontrast pomiędzy jądrem a tłem nadal umożliwiał właściwą segmentację. W komórkach traktowanych suraminą, poziom natężenia powyżej tła był obecny pomiędzy jasnymi fragmentami jąder, co umożliwiło stworzenie jednego obszaru zainteresowania dla jądra w ramach każdego lokalnego obszaru podzielonego. Pozwoliło to właściwie wyznaczyć liczbę jąder i uzyskać właściwą liczbę komórek.

Metody segmentacji są wybierane i stosowane w oparciu o generowane przez nie wyjściowe obszary zainteresowania. W **Tabeli 7** wymienione są metody segmentacji dostępne w oprogramowaniu BD AttoVision v.1.6. W większości przypadków, choć nie we wszystkich, punktem wyjścia do segmentacji jest jądro z powodu lepszej zdolności oddzielania sąsiadujących ze sobą jąder, niż cytoplazm sąsiadujących ze sobą komórek. Wielobok (Polygon) stosuje się na ogół, gdy pożądane są pomiary w ramach jednego regionu (na przykład jądra lub całej komórki). Pierścień (Ring) tworzy obszar zainteresowania w kształcie pierścienia (o szerokości pikseli zdefiniowanej przez użytkownika) wokół centralnego obszaru komórki (zwykle jądra). Zarówno Wielobok, jak i Pierścień realizują ustalanie progu dla obrazu w oparciu o jeden kanał barwy fluorescencyjnej. Kształt pierścienia *Ring* można również zastosować przy dwóch wyjściowych obszarach zainteresowania, aby jednocześnie dokonać pomiaru w obszarze centralnym (jądrze) pierścienia, oraz w obszarze poza pierścieniem (obszar okołojądrowy lub cytoplazma).



Rycina 14. Wielopoziomowe automatyczne ustalanie progu. Przycięty obraz w pseudokolorach komórek znakowanych fluorescencyjnie jest przedstawiony bez segmentacji i z granicami segmentacji uzyskanymi w oparciu o 1 Poziom, 2 Poziomy i 3 Poziomy (na górze) automatycznego ustalania progu. Ilustracja poziomów natężenia w ramach jednej komórki jest przedstawione na dole.

Automatic Thresholding



Rycina 15. Dostosowanie poziomu automatycznego ustalania progu poprawiło jakość segmentacji. Komórki HeLa kontrolne (Panele A, B i C) lub poddane działaniu 1 μ M staurosporyny przez 4 godz. (Panele D, E i F). Obrazy (Panele A i D) poddano segmentacji przy użyciu automatycznego ustalania progu z jednym poziomem (Panele B i E) lub dwoma poziomami (Panele C i F). Należy zwrócić uwagę na drastyczną zmianę natężenia i morfologii jądra w komórkach potraktowanych staurosporyną w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Liczby obszarów zainteresowania wykazują na wpływ metod segmentacji na liczbę komórek. Akwizycji obrazów (przycięte) dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Segmentacja dwukanałowa (*Dual Channel*) realizuje ustalanie progu przy użyciu obrazów jednego lub dwóch kanałów barwy fluorescencyjnej. Pierwszy kanał (Kanał A) stosuje się zwykle do zidentyfikowania jądra, zaś drugi kanał (Kanał B) jest stosowany do wyznaczenia progu dla barwnika lub sondy znakującej w specjalny sposób element komórki poza jądrem (np. cytoplazmę czy błonę komórkową). Poza tym, opcji *Dual Channel* można użyć do wyznaczenia segmentów na jednym obrazie, gdzie zarówno jądro, jak i cytoplazma są znakowane jednym barwnikiem, ale o różnych poziomach natężenia. Segmentację *Dual Channel* można zastosować w celu dokonania pomiaru natężenia w całej komórce (także w jądrze) lub w cytoplazmie (z wyłączeniem sygnału w jądrze). Podobnie jak w przypadku opcji *Ring*, opcji *Dual Channel* (2 Obszary Danych) można użyć w celu dokonania jednoczesnych pomiarów w dwóch regionach subkomórkowych.

Tabela 7. Opis metod segmentacji i wykaz testów odpowiednich, aby je zastosować.

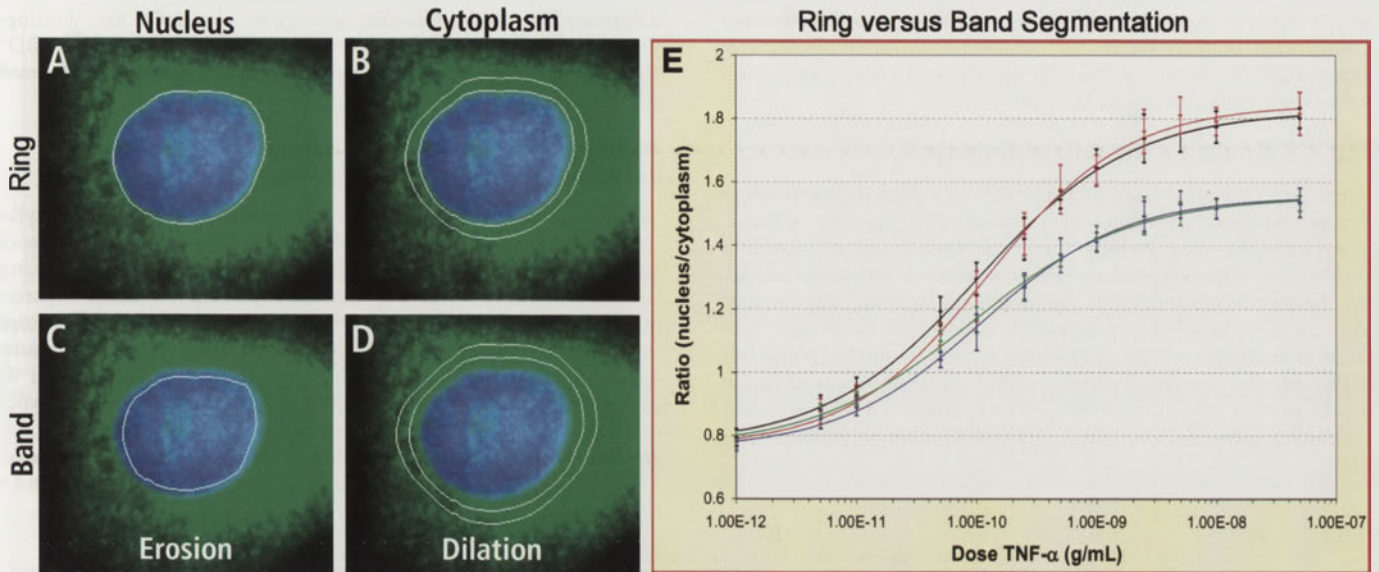
Metoda segmentacji	Opis	Reprezentatywne testy
Wielobok (<i>Polygon</i>)	Pojedynczy region, Komórka lub jądro	Cykl komórkowy
Pierścień (<i>Ring</i>)	Region okołojądrowy definiowany przez rozszerzenie z jądra	Translokacja do jądra
Dwukanałowa (<i>Dual Channel</i>)	Cała komórka lub cytoplazma	Rozrost neurytów
Pasma (<i>Bands</i>)	Obszary subkomórkowe definiowane przez rozszerzenie/ograniczenie	Redystrybucja białka do jądra, cytoplazmy lub błony

Nowe funkcje segmentacji w oparciu o pasmo (*band*) w oprogramowaniu BD AttoVision™ v.1.6 poszerzyły przydatność każdej z podstawowych metod segmentacji poprzez dodanie zdolności ograniczania, rozszerzania i dzielenia poszczególnych obszarów zainteresowania na region wewnętrzny i zewnętrzny. Dla każdego kanału (Kanał A i B), można dokonywać jednoczesnego lub niezależnego pomiaru dwóch obszarów. Obszar zewnętrzny definiuje się przez rozszerzenie, a obszar wewnętrzny przez ograniczenie. Jako przykład wykorzystano aplikację translokacji NF- κ B do jądra (**Rycina 16**). Pomiarów natężenia dokonano zarówno w jądrze jak i okołojądrowym pierścieniu cytoplazmatycznym w oparciu o obszary zainteresowania zdefiniowane przy użyciu opcji *Ring* (2 Obszary Danych) i *Ring* (2 Obszary Danych)/*Band*. Obliczono stosunek natężenia w pierścieniu jądro/cytoplazma i wykorzystano do oceny translokacji białek z cytoplazmy do jądra w odpowiedzi na ekspozycję na TNF- α . Z uwagi na fakt, że natężenie cytoplazmy może być zmienne, gdyż w miarę zbliżania się do skrajów komórki cytoplazma rozrzedza się, w celu zdefiniowania obszarów zainteresowania w cytoplazmie na ogół wykorzystuje się pierścień okołojądrowe. Jasne sygnały fluorescencyjne mogą jednak tworzyć poświatę przenikającą z jednego regionu (jądro) na inny (cytoplazma), toteż korzystne może okazać się usunięcie z pomiarów obiektu pikseli przylegających bezpośrednio do granicy jądra. W celu dostrojenia rozmieszczenia wyznaczonych segmentami obszarów zainteresowania, można użyć segmentacji pasmowej typu *band*. **Rycina 16** przedstawia porównanie danych wygenerowanych przy użyciu metody segmentacji typu *Ring* (2 Obszary Danych) i *Ring* (2 Obszary Danych)/*Band*. Choć wartości EC_{50} obliczone dla dwóch metod segmentacji były jednakowe (danych nie pokazano), segmentacja pasmowa *Band* konsekwentnie poprawia tzw. okno testu aplikacji.

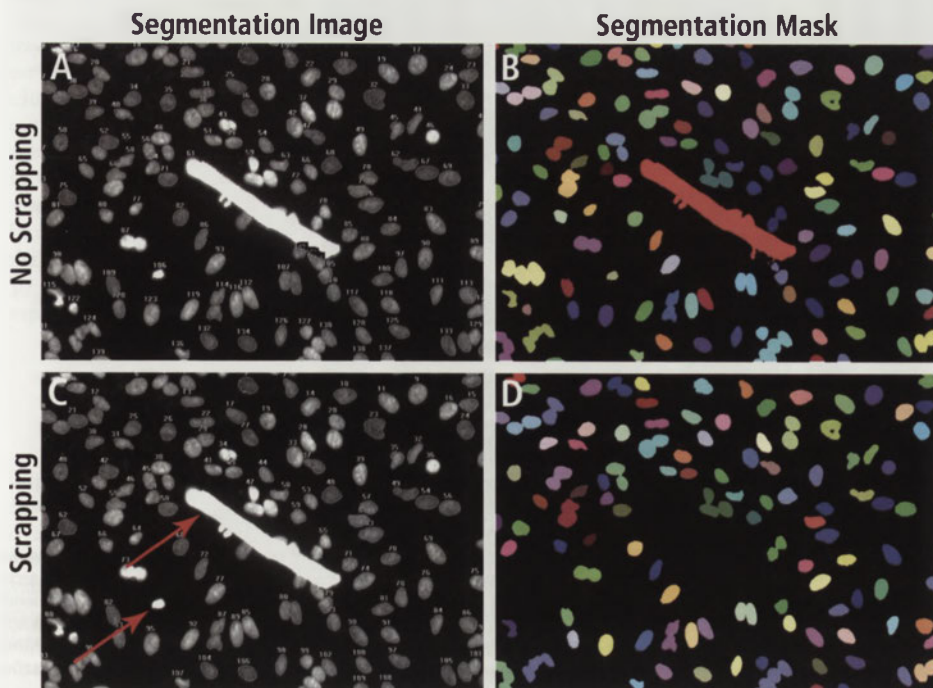
Na segmentację wpływać mogą również artefakty fluorescencyjne lub pozostałości komórkowe widniejące na obrazach jako obiekty. Te artefakty są często większe lub mniejsze od faktycznych obiektów zainteresowania. Często korzystne jest wyeliminowanie lub „wycięcie” (*ang. scrapping*) tych obiektów zanieczyszczających z procesu segmentacji w oparciu o ich rozmiar. Minimalny rozmiar wycinka stosuje się w celu wyeliminowania małych resztek fluorescencyjnych lub obiektów będących efektem szumów systemu obrazowania, natomiast maksymalny

rozmiar wycinka stosuje się w celu wyeliminowania dużych obiektów i grup komórek. *Rycina 17* przedstawia przykład tego, w jaki sposób wycięcie elementów może poprawić segmentację poprzez usunięcie dużych i małych artefaktów. Należy zwrócić uwagę na różnicę w wyniku końcowym uzyskanym z zastosowaniem metody wycinków (*Rycina 17*) w porównaniu z odejmowaniem tła w oparciu o algorytm *rolling ball* (*Rycina 13*) w celu usunięcia dużego artefaktu. W metodzie wycinków,

komórki przydzielone do segmentu jako część artefaktu i komórki przysłonięte przez artefakt, zostały usunięte z maski segmentacji, pozostawiając puste miejsce. Zastosowanie metody odejmowania tła w oparciu o algorytm *rolling ball* spowodowało usunięcie artefaktów obrazu przed segmentacją (pod warunkiem, że były one ciemniejsze niż obiekty zainteresowania), umożliwiając właściwą segmentację wszystkich komórek.



Rycina 16. Porównanie metod segmentacji dwóch obszarów danych w oparciu o pierścienie *ring* i pasmo *band*. Przygotowano dwie identyczne płytki testowe NF-κB i poddano obrazowaniu. Wyniki segmentacji zostały nałożone na siebie na przyciętym i powiększonym obrazie pojedynczej komórki bez ekspozycji na stymulant, akwizycji dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 40x (0,9 NA). Panele A i B przedstawiają wyjściowe obszary zainteresowania dla segmentacji pierścieniowej *ring*, a Panele C i D przedstawiają wyjściowe obszary zainteresowania dla segmentacji pasmowej *band* z ograniczeniem do jądra (Panel C) i rozszerzeniem na cytoplazmę (Panel D). Panele A i C przedstawiają obszary zainteresowania w obrębie jądra, a Panele B i D obszary zainteresowania w obrębie cytoplazmy. Panel E przedstawia krzywe odpowiedzi na dawkę, porównujące segmentację pierścieniową *ring* (niebieskie i zielone krzywe) z segmentacją *band* ustawioną w taki sposób, aby usunąć po dwa piksele z każdej strony granicy jądra (krzywa czerwona i czarna). N = 6 dołków ± SD dla każdej płytki. Akwizycji zdjęć dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.



Rycina 17. Efekt zastosowania metody wycinków (*scapping*) na segmentację obrazu. Jądra barwione odczynnikami Hoechst'a zobrazowano i podzielono na segmenty z zastosowaniem metody określenia minimalnej i maksymalnej wielkości wycinka (odpowiednio 300 i 2000) i bez wycinania. Panele A i B przedstawiają odpowiednio podzielony na segmenty obraz z numerami obszarów zainteresowania i maskę segmentacji bez zastosowania wycinania. Panele C i D przedstawiają odpowiednio podzielony na segmenty obraz z numerami obszarów zainteresowania i maskę segmentacji przy zastosowaniu metody wycinania. Czerwona strzałka wskazuje obszary zainteresowania usunięte metodą wycinania w oparciu o rozmiar; obiekty te nie mają już skojarzonych z nimi numerów. Akwizycji zdjęć dokonano przy użyciu obiektywu o powiększeniu 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.

Cechy pomiarowe

Po dokonaniu odpowiedniej segmentacji obrazów, można zmierzyć bardzo wiele cech. Większość cech można sklasyfikować jako oparte na natężeniu i oparte na właściwościach morfometrycznych. Niektóre cechy, np. średnie natężenie i obszar, są cechami ogólnymi, wykorzystywanymi w większości aplikacji. Inne cechy są unikalne dla konkretnych aplikacji. Na przykład średnia długość neurytu, liczba korzeni i punkty węzłów to cechy specyficzne w aplikacji Rozrostu Neurytów. Do oprogramowania BD AttoVision™ v.1.6 dodano wiele nowych funkcji pomiarowych, w tym pomiary morfometryczne, zaawansowane pomiary oparte na natężeniu i mierzenie obiektów w ramach obiektów. Pomiar wielu cech umożliwia bardziej szczegółowe (*high content*) badanie systemu biologicznego.

Etap 4 – Analiza i wizualizacja danych

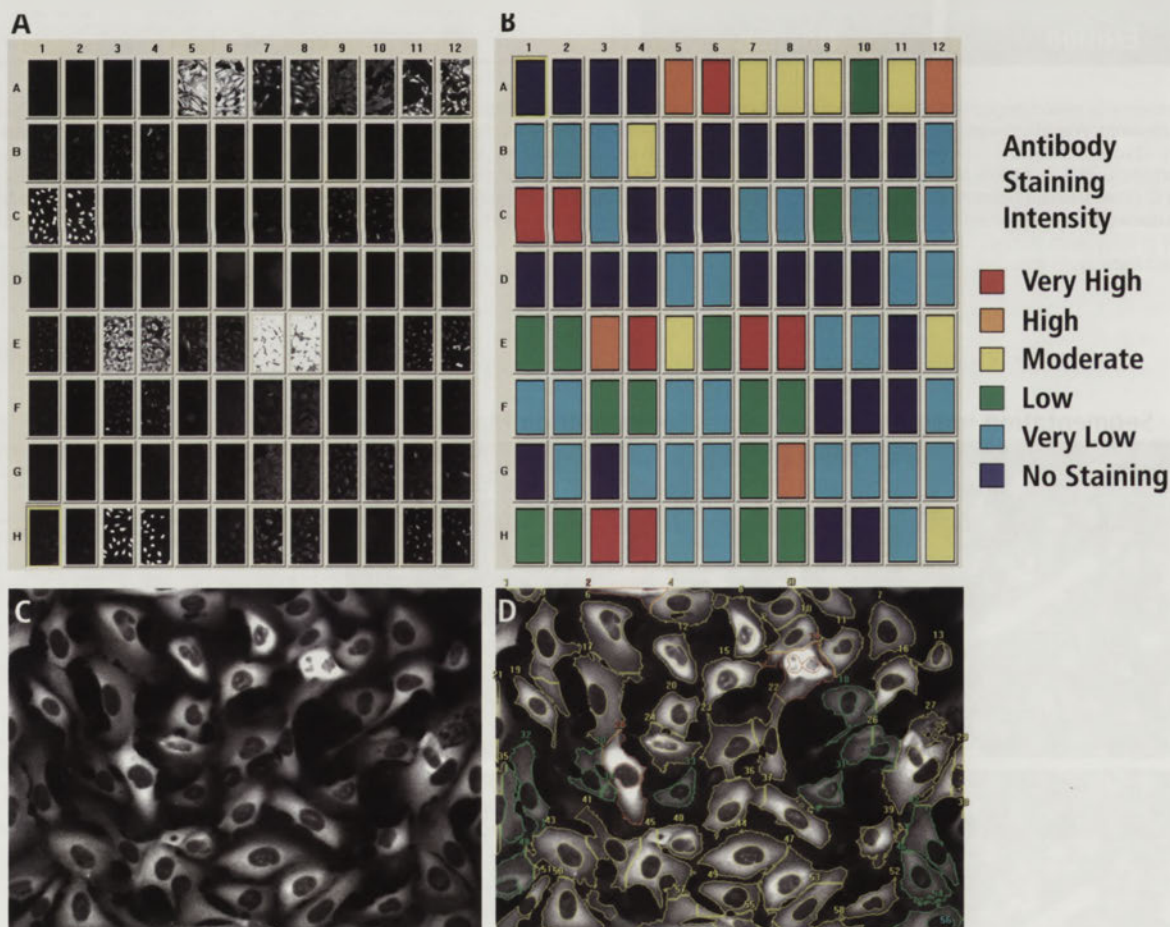
Interpretacja wyników z aplikacji obrazowania wieloparametrowego wymaga właściwej prezentacji i wizualizacji danych obrazu. Oprogramowanie BD Pathway™ oferuje wiele opcji wyświetlania danych. Dane obrazu można wyświetlić w formie graficznej w postaci map termicznych, wykresów liniowych, wykresów słupkowych, wykresów rozproszonych czy krzywych odpowiedzi na dawkę. Poza tym, w celu szybkiego zinterpretowania danych w obrębie płytki lub zestawu płytek, istnieje możliwość wyświetlenia miniatur obrazów dla całej płytki i przeglądania wartości pomiarów cech w formie map termicznych nałożonych na mapę wielodółkową lub mapę ekspozycji na lek.

Klasyfikacja danych

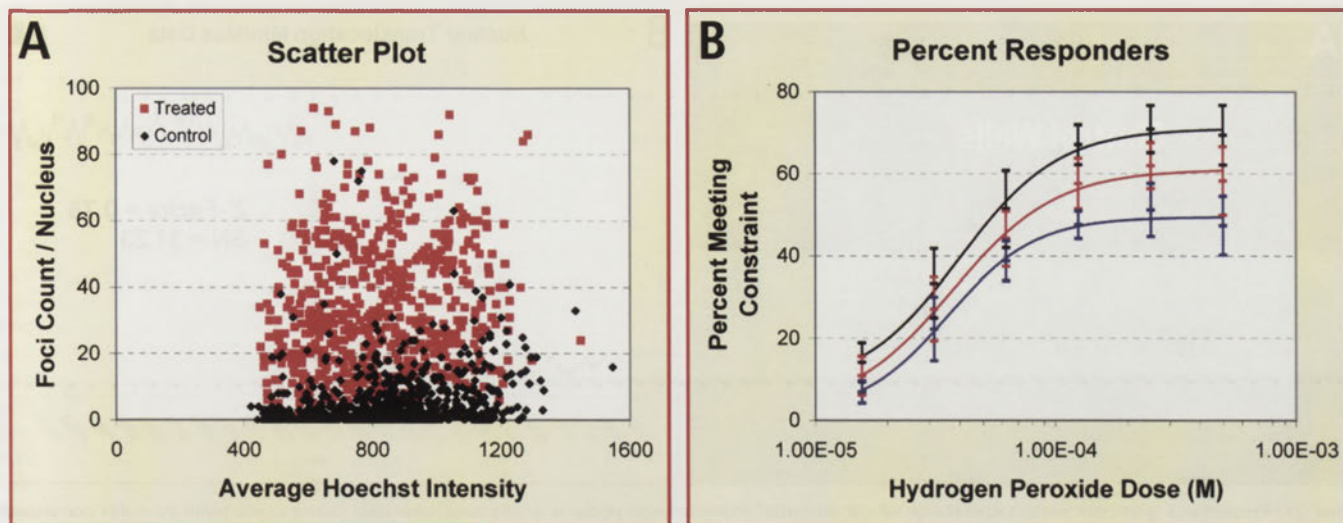
Dane obrazu można również sklasyfikować w grupy w oparciu o wartości progowe zdefiniowane przez użytkownika, które są specyficzne dla danej cechy mierzonej. Umożliwia to szybkie identyfikowanie i lokalizowanie odpowiedzi pozytywnych z serii płytek, jak w kampanii skryningowej leku. Klasyfikacji danych można również dokonać „z marszu”, aby umożliwić natychmiastową wizualizację wyników. Dane dotyczące obszarów zainteresowania i dołków mogą być oznaczone kodem barwnym w zależności od poziomów odpowiedzi. **Rycina 18** przedstawia sklasyfikowane dane dot. doświadczenia skryningu przeciwciał certyfikowanych do obrazowania biologicznego – BD™ Bioimaging Certified (omówione w rozdziale *Przygotowanie Materiału Biologicznego*).

Wykresy rozproszone, ograniczenia parametrów i odsetki odpowiadających

Wiele odpowiedzi biologicznych ma charakter heterogenny i tylko subpopulacja komórek może odpowiedzieć na podanie substancji badanej w pewnym punkcie czasu. Jednym ze sposobów przeanalizowania heterogennej odpowiedzi biologicznej jest sporządzenie wykresu odsetka komórek w populacji, które wykazują daną odpowiedź. Można to zrealizować ustalając wartość progową dla danej cechy i klasyfikując komórki jako odpowiadające i nieodpowiadające w odniesieniu do progu. W celu określenia odpowiedniego progu, wartości dwóch cech można umieścić obok siebie na wykresie rozproszonym. Na **Rycinie 19** przedstawiono przykład, w którym wartości z obszarów



Rycina 18. Klasyfikacja danych ze skryningu przeciwciał. Komórki HeLa zostały utrwalone i poddane barwieniu 47 różnymi swoistymi przeciwciałami, przy zastosowaniu odpowiednich kontroli, w zduplikowanych dołkach płytki 96-dółkowej. Przy użyciu oprogramowania BD AttoVision, poszczególne komórki i dołki zostały zliczone w oparciu o natężenie barwienia przeciwciałami i sklasyfikowane w sześć grup. Klasyfikacje mieściły się w zakresie od dużego natężenia barwienia (czerwony) po brak barwienia (ciemnoniebieskie). Miniatury obrazów z reprezentatywnej płytki 96-dółkowej pochodzącej z doświadczenia przedstawione są w Panelu A, a klasyfikację opartą na dołkach oznaczonych kodem barwnym przedstawia Panel B. Na Panelu C widnieje reprezentatywne pole obrazu z dołka, sklasyfikowane na poziomie Średni (żółty). Panel D przedstawia klasyfikację poszczególnych komórek (należy zwrócić uwagę na kody barwne) opartą na średnim natężeniu barwienia cytoplazmy. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu z powiększeniem 20x (0,75 NA) systemu BD Pathway™ 855.



Rycina 19. Wykresy rozproszone i ograniczenia wartości cech stosowane do obliczenia odsetka odpowiadających. Komórki HT-1080 poddano ekspozycji na rozieńczenia nadtlenu wodoru (w kontroli nie podawano tego czynnika) przez 10 minut. Komórki zostały utrwalone i przeprowadzono barwienie jądra (odczynnik Hoechst) i ognisk w jądrach (przeciwciało anti- γ -H2AX). Ogniska w jądrach podzielono na segmenty i zliczono w poszczególnych jądrach za pomocą automatycznej metody analizy obrazu (*Rycina 11*). Panel A przedstawia wykres rozproszony przeciętnej liczby ognisk na jedno jądro względem natężenia barwnika Hoechst w przypadku komórek traktowanych (250 μ M nadtlenu wodoru, czarne znaki) i komórek kontrolnych (czerwone znaki), N = 6 dołków. W przypadku większości komórek kontrolnych odnotowano przeciętnie mniej niż 20 ognisk. Panel B przedstawia krzywe odpowiedzi na dawkę z odsetkiem odpowiadających przy każdej dawce nadtlenu wodoru, przy czym średnia liczba zmian w jądrze została ograniczona do różnych poziomów: >20 (czarna krzywa), >25 (czerwona krzywa) i >30 (niebieska krzywa) ognisk na jądro. N = 6 dołków \pm SD. Akwizycji obrazów dokonano przy użyciu obiektywu z powiększeniem 40x (0,9 NA) systemu BD Pathway™ 855.

zainteresowania, pochodzące z wielu dołków kontrolnych i poddanych ekspozycji na lek, zostały umieszczone na tym samym wykresie. Pozwoliło to na łatwiejsze ustalenie progowego poziomu odpowiedzi, który najlepiej oddzielał dwie kategorie. Wartości progowej użyto następnie do nałożenia ograniczenia na dane z doświadczenia, tak, aby można było przedstawić na wykresie odsetek komórek powyżej progu (odsetek odpowiadających).

Współczynnik Z' i stosunek sygnału do szumu

Oprogramowanie BD Pathway™ automatycznie oblicza współczynnik Z' i stosunek sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise ratio* – SN) dla każdej mierzonej cechy. Umożliwia to ocenę rang skuteczności cech jako narzędzi pomiarowych. Współczynnik Z' jest powszechnie stosowaną miarą oceny zdolności testu do skringingu lub jego stabilności. W przypadku obliczania współczynnika dla dawki niższej od maksymalnej, jest on nazywany współczynnikiem Z, a nie współczynnikiem Z'.⁴ W celu obliczenia współczynnika Z' zwykle przygotowuje się płytkę w konfiguracji min/maks z połową płytki wystawioną na działanie leku w stężeniu wystarczającym do wygenerowania maksymalnej odpowiedzi do wykorzystania jako kontroli pozytywnych i drugą połowę poddaną pozornemu leczeniu do wykorzystania jako kontroli negatywnych. Terminy statystyczne użyte do obliczenia współczynnika Z' i stosunku SN obejmują średnią (p) i odchylenie standardowe (o) kontroli pozytywnych (p) i negatywnych (n) (odpowiednio pp, op, pn, on). Równanie dla współczynnika Z' jest następujące:

$$Z' \text{-factor} = 1 - \frac{3 \times (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Współczynnik Z' dla testu jest bliski 1,0, gdy tzw. okno testu jest bardzo duże, a odchylenia standardowe bardzo małe. Testy ze współczynnikami Z' >0,5 są uznawane za odpowiednie dla bibliotek leków poddawanych skringingowi, ale mogą istnieć pewne różnice w zależności od testu. Jeśli wartości współczynników Z' spadają poniżej zera, punkty danych z dołków stanowiących kontrolę pozytywną i negatywną pokrywają się. Stosunek SN definiuje się w następujący sposób:

$$SN = \frac{\mu_p - \mu_n}{\sigma_n}$$

Parametry o dużych wartościach sygnału do szumu wykazują większe oddzielenie populacji kontrolnych i traktowanych badaną substancją. *Rycina 20* przedstawia przykład płytki w konfiguracji min/maks przygotowanej przy użyciu aplikacji translokacji NF- κ B do jądra.

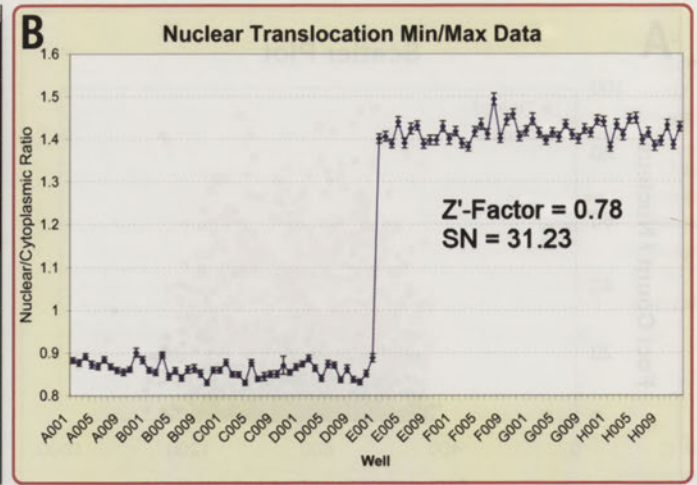
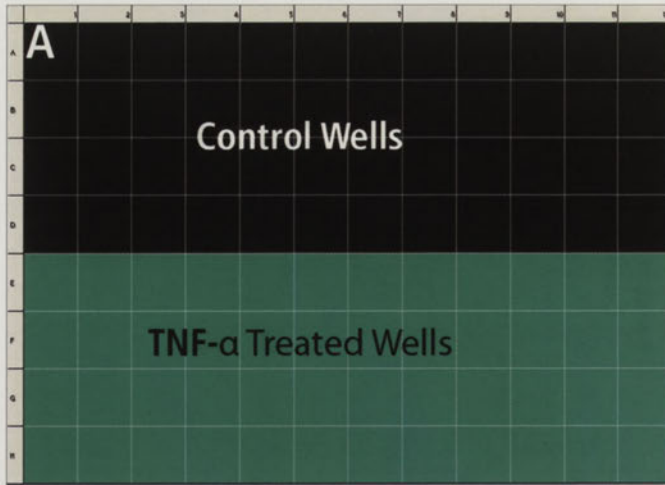
Wartości EC₅₀ i IC₅₀

Miernikami stosowanymi najczęściej do oceny siły działania leku są stężenia leku (substancji badanej) powodujące 50% zahamowanie określonego procesu, EC₅₀ w przypadku agonistów i IC₅₀ w przypadku antagonistów. Terminy te odnoszą się do stężenia leku, który wywołuje odpowiedź w punkcie środkowym pomiędzy wyjściowym i maksymalnym poziomem odpowiedzi. Wartości EC₅₀ i IC₅₀ należy obliczać w oparciu o uważnie przygotowane krzywe odpowiedzi na lek. W celu wygenerowania najlepszych wyników, krzywe muszą zawierać punkty danych, które dokładnie odzwierciedlają zakres odpowiedzi. Poza tym musi istnieć odpowiednia liczba powtórzeń dołków w celu zminimalizowania „wrodzonej” zmienności biologicznej. Dane dot. odpowiedzi na lek są dopasowywane do krzywej sigmoidalnej za pomocą 4-parametrowego modelu logistycznego (model Hill-Slope). Krzywe wykorzystuje się następnie do określenia wartości EC₅₀ i IC₅₀. Równanie definiuje się jako:

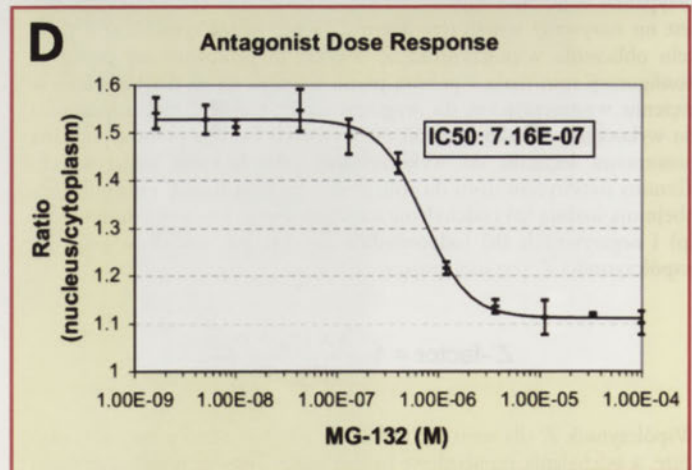
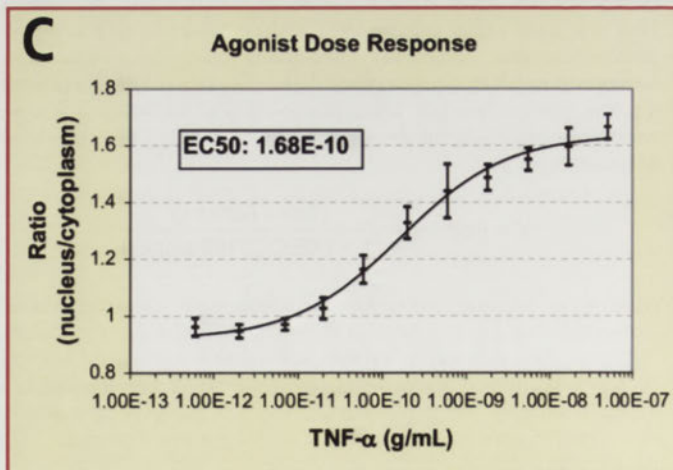
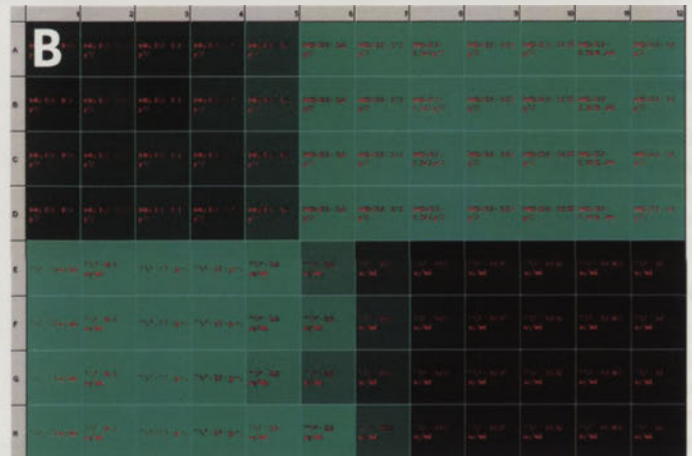
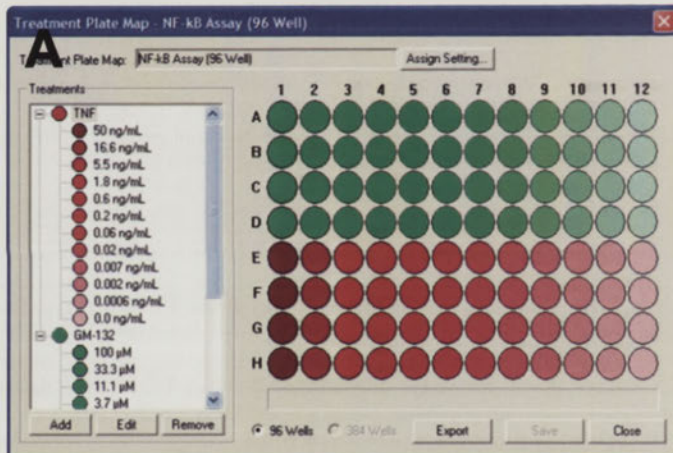
$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + (X/EC_{50})^{Hill\ slope})}$$

gdzie Y to wartość zaobserwowana, *Bottom* to najniższa wartość zaobserwowana, *Top* to najwyższa wartość zaobserwowana, a nachylenie *Hill slope* daje największą wartość bezwzględną nachylenia krzywej. W przypadku testów dla antagonistów, komórki są najpierw poddane działaniu antagonistów w pełnych stężeniach, a następnie agonistów w dawce poniżej maksymalnej, zdolnej wywołać poziom odpowiedzi 70% lub 80% (EC₇₀ lub EC₈₀).

Przy użyciu oprogramowania BD Pathway, krzywe EC₅₀ i IC₅₀ można obliczać automatycznie. Przykład struktury płytki dla celów obliczenia wartości EC₅₀ i IC₅₀ przedstawia *Rycina 21*. Wygenerowano dwie krzywe odpowiedzi na dawkę, jedną dla TNF- α , a drugą dla MG-132, inhibitora odpowiedzi na NF- κ B. W przypadku testu hamowania, komórki były wstępnie traktowane różnymi stężeniami inhibitora przez 30 minut, po czym następowała ekspozycja na agonistę przy EC₈₀.



Rycina 20. Prezentacja graficzna testu translokacji NF- κ B do jądra. Przygotowano płytkę w konfiguracji min/maks. Górną część płytki (N = 48) potraktowano jako kontrolę, a dolną połowę płytki (N = 48) poddano działaniu 50 ng/ml TNF- α przez 30 min. Komórki przygotowano i poddano barwieniu za pomocą przeciwciała wykrywającego białko p65 NF- κ B. Cechę mierzoną, zdefiniowaną jako stosunek przeciętnego natężenia fluorescencji jądra do przeciętnego natężenia fluorescencji cytoplazmy dla każdego dołka, przedstawiono graficznie w postaci mapy termicznej (Panel A, kolor ciemny = niska wartość stosunku, kolor jasny = wysoka wartość stosunku). W celu przedstawienia na wykresie wartości stosunków \pm SEM dla każdej studzienki, zastosowano wykres liniowy (Panel B). Współczynnik Z' i stosunek sygnału do szumu (SN) obliczone dla tej mierzonej cechy przez oprogramowanie BD Pathway™ wyniosły odpowiednio 0,78 i 31,23.



Rycina 21. Krzywe odpowiedzi na dawkę w teście translokacji NF- κ B do jądra. Zarówno w testach dla agonisty (TNF- α), jak i antagonisty (MG-132), użyto komórek HeLa. Test dla antagonisty zrealizowano przy poziomie EC80 dla TNF- α (3 ng/mL). Komórki przygotowano i poddano barwieniu za pomocą przeciwciała przeciw NF- κ B. W celu oznakowania każdego dołka odpowiednim stężeniem substancji dozowanej (czerwony tekst na Panelu B), oprogramowanie wykorzystało mapę płytki poddanej działaniu leku (Panel A). Stosunek średniego natężenia fluorescencji jądra do średniego natężenia fluorescencji cytoplazmy dla każdej studzienki jest przedstawiony w postaci mapy termicznej (Panel B, kolor ciemny = niska wartość stosunku, kolor jasny = wysoka wartość stosunku). Do obliczenia EC₅₀ dla TNF- α (Panel C) i IC₅₀ dla MG-132 (Panel D) wykorzystano oprogramowanie BD Pathway.

Podsumowanie

Wdrożenie stabilnej aplikacji akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu to złożony i czasochłonny proces. Istnieje wiele czynników, które mogą w sposób decydujący wpływać na wyniki. Proces komplikuje się jeszcze bardziej, ponieważ każda aplikacja jest unikalna i wiąże się z nowym zestawem istotnych czynników. Czynniki wywierające największy wpływ należy optymalizować. Ta nota aplikacyjna służy jako przewodnik w identyfikowaniu kluczowych czynników, które mogą mieć największy wpływ na skuteczne wdrożenie obrazowania wieloparametrowego.

Aby uczynić cały proces łatwiejszym do zarządzania, podzieliliśmy go na cztery etapy: przygotowanie materiału biologicznego, akwizycja obrazu, analiza obrazu i analiza danych. W ramach każdego etapu zidentyfikowaliśmy kilka kluczowych czynników, które w decydujący sposób wpływają na wyniki testu. Wykorzystując specjalne przykłady pochodzące z aplikacji obrazowania wieloparametrowego oraz innych materiałów źródłowych, przedstawiliśmy i omówiliśmy wiele parametrów wpływających na te czynniki i przedstawiliśmy wskazówki mające pomóc w ich optymalizacji. Dogłębne zrozumienie procesu akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu zapewni podstawy dla rozwoju i optymalizacji nowych i istniejących aplikacji.

Naszym celem jest sprawić, aby sterowanie procesem akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu było łatwiejsze dzięki specyficznym produktom i publikacjom poświęconym tej ekscytującej i ambitnej technologii (patrz *Produkty BD do Obrazowania Wieloparametrowego*).

Piśmiennictwo

1. Starkuviene V. and Pepperkok R. The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2007;152:62-71.
2. Passage Number Effects In Cell Lines – Why they happen and what you can do about it. *American Type Culture Collection (ATCC) Technical Bulletin*. 2007;7.
3. Lundholt BK. A simple technique for reducing edge effects in cell-based assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 2003;8(5):555-570.
4. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 1999;4(2):67-73.
5. Shaw PJ, Rawlings DJ. The point-spread function of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *Journal of Microscopy*. 1991;163:151-165.
6. Russ JC. *The image processing handbook*, 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002.

BD Produkty BD do Akwizycji i Wieloparametrowej Analizy Obrazu

BD Biosciences oferuje kompletne rozwiązanie do akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu (ang. *high-content imaging*). Poniżej znajduje się stale rozszerzany wykaz usług i produktów stworzonych, aby pomóc we wdrożeniu tej eksycytującej technologii.

Materiał Biologiczny

- Płytki Obrazowe BD Falcon™
 - Przetestowane pod kątem płaskości
 - Pokrywa ograniczająca parowanie
 - Pierścienie kondensacyjne
- Macierze Zewnątrzkomórkowe (BD Biocoat™)
 - Kolagen
 - Poli-D-lizyna
 - BD Matrigel™
 - Inne
- Odczynniki i Zestawy BD™ Certyfikowane do Obrazowania Biologicznego
 - Przeciwciała nieznakowane
 - Przeciwciała koniugowane bezpośrednio znakowane fluorescencyjnie
 - Zestaw do Cyklu Komórkowego
 - Zestaw Testowy In-vitro do Komórek Mikronukleusa
 - Fluorescencyjne białkowe biomarkery organelli komórkowych
- Automatyczny Licznik Komórek BD AccuCell™
 - Technologia oparta na obrazie
 - Liczby komórek zdolnych do życia/ niezdolnych do życia
 - Jednorazowa komora zliczania komórek

Akwizycja Obrazu

- Analizatory Komórkowe BD Pathway™ 435 i 855 do akwizycji i wieloparametrowej analizy obrazu
 - Zaawansowane automatyczne ustawianie ostrości oparte o laser
 - Konfokalna z wirującym dyskiem w czasie rzeczywistym
 - Wysoce precyzyjne obiektywy obsługujące wymiary X, Y i Z
 - Źródło światła – pełne spektrum
 - Kontrola temperatury i CO₂ (tylko BD Pathway 855)
 - Opcje pracy z cieciami (tylko BD Pathway 855)

Analiza Obrazu

- BD AttoVision™ 1.6
 - Przetwarzanie Obrazu
 - Kompensacja różnic czułości poszczególnych pikseli
 - Odejmowanie tła
 - Korekcja cieni
 - Inne filtry
 - Segmentacja
 - Ręczne i automatyczne ustawianie progu
 - Wielobok (*Polygon*)
 - Pierścień (*Ring*)
 - Dwukanałowa (*Dual Channel*)
 - Pasma (*Bands*)

Analiza Danych i Wizualizacja

- Oprogramowanie BD Pathway
 - Klasyfikacja danych
 - Wykresy słupkowe
 - Wykresy rozproszone
 - Krzywe odpowiedzi na dawkę
 - Mapy termiczne
 - Analiza danych komórka po komórce, dołek po dołku
 - Analiza subpopulacji
 - Trójwymiarowy rendering

Wsparcie Techniczne i Szkolenia

- Noty aplikacyjne
- Wsparcie klienta
- Naukowcy ds. aplikacji technicznych
- Ośrodek edukacyjny
- Indywidualne usługi softwarowe BD Pathway
- Opcje gwarancji i przedłużonej umowy serwisowej



BD Biosciences
ul. Królowej Marysieńki 90
02-954 Warszawa
tel.: + 48 22 651 62 52
faks: + 48 22 651 75 89
www.bdbiosciences.com

NEW

TurboFect™ siRNA Transfection Reagent

Highly efficient silencing at low siRNA concentrations



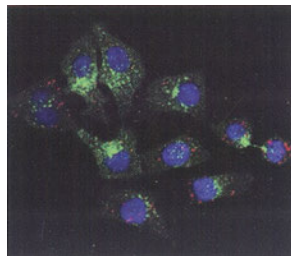
All the advantages at a glance

- **Highly efficient** siRNA transfection.
- **Low siRNA concentrations** for gene silencing.
- **Transfection of a wide variety of cell types.**
- **Compatible with serum and antibiotics.**

Applications

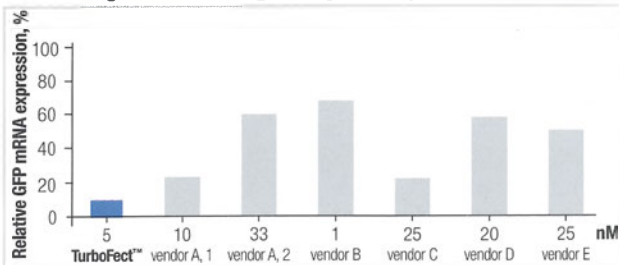
- siRNA transfection.
- siRNA-DNA co-transfection.

Efficient siRNA transfection



Red – Cy3-labeled siRNA
Blue – DAPI stained nuclei
Green – endosomes labeled with anti-Transferrin receptor antibodies

Efficient gene silencing using GFP specific siRNA



Inhibition of GFP expression in cells transfected with GFP-targeting siRNA. siRNA concentrations recommended by each manufacturer were used.

Product	Cat. #	Size
TurboFect™ siRNA Transfection Reagent	R1401	0.5 ml

NEW

TurboFect™ Protein Transfection Reagent

Highly efficient delivery of functionally active proteins



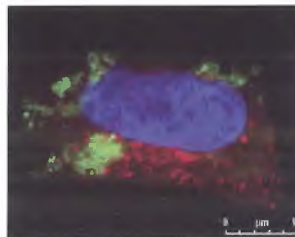
All the advantages at a glance

- **High transfection efficiency** of a wide variety of cell types.
- **Delivers functionally active proteins.**
- **Delivers more protein molecules per cell than other reagents.**

Application

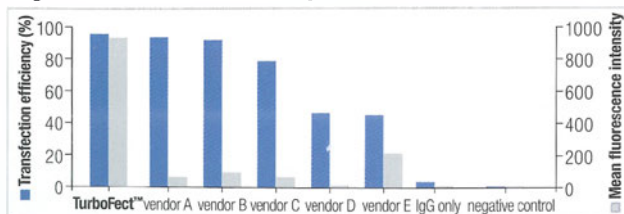
- Delivery of proteins, antibodies and peptides.

Transfected goat IgG is localized in HeLa cell



Green – Alexa Fluor 488-labeled goat IgG
Blue – DAPI stained nucleus
Red – endosomes labeled with PE conjugated mouse anti-Transferrin receptor antibodies

High transfection efficiency



Comparison of Fermentas reagent with transfection reagents from other vendors. HeLa cells were transfected with Alexa Fluor 488-labeled goat IgG.

Product	Cat. #	Size
TurboFect™ Protein Transfection Reagent (supplied with Enhancer Solution and control protein)	K1411	125 µl

abo

abo Grażyna Tarnowska Boreysza
 ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk
 Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk
 tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80
 e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl

**Fermentas**
LIFE SCIENCES<http://rcin.org.pl>



Calbiochem[®]

Szukasz lepszego sposobu
na zabezpieczenie preparatów
wybarwionych fluorescencyjnie?

Tak! Wybierz odczynnik
FluorSave[™], który zapewni
najlepsze wyniki.

That's what's in it for you.

Merck Chemicals

Cechy:

- Wodne medium do zamykania preparatów mikroskopowych.
- Zabezpiecza skrawki tkanek lub komórki wybarwione fluorescencyjnie.
- Preparaty przechowywane w 4°C w ciemności są zabezpieczone przed wygaszaniem sygnału fluorescencji przez kilka miesięcy.
- Używany z następującymi znacznikami fluorescencyjnymi: fluoresceina, rodamina lub fikobiloproteiny.
- Nie zawiera glicerolu.
- Łatwy w użyciu.

www.merck-chemicals.pl

