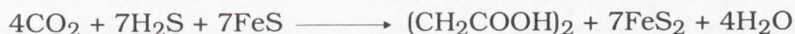


Żelazo — pierwiastek życia i śmierci

Paweł M. Stróżycki
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Poznań

1. Rola żelaza w funkcjonowaniu świata ożywionego

Występujące głównie w formie pirytu, hematytu, magnetytu lub syderytu żelazo, jest czwartym pod względem ilościowym składnikiem skorupy ziemskiej i stanowi około 5,3% jej zawartości. Reakcje utleniania związków żelaza, podczas tworzenia pirytu (FeS_2), były prawdopodobnie źródłem elektronów — siły redukcyjnej, koniecznej do tworzenia pierwszych złożonych łańcuchów węglowych. Wspomagane udziałem światła ultrafioletowego (fotoutlenianie żelaza), reakcje typu:



można uznać za prototyp współczesnych cykli metabolicznych (1,2 za 3). Co więcej, uważa się, że pierwsze związki tego metalu brały udział w reakcjach, w których powstał na ziemi tlen atmosferyczny. Żelazo, jak widać było jednym z głównych elementów, dzięki którym powstało na Ziemi życie.

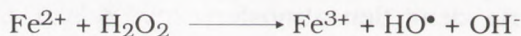
W obecnym świecie żelazo stanowi podstawowy składnik odżywczy wszystkich organizmów. Wyjątek stanowią tylko niektóre bakterie jak *Lactobacillus* i *Bacillus* (4), w przypadku których funkcje żelaza przejęte zostały przez inne metale przejściowe, głównie mangan i kobalt. Dla wszystkich innych form żywych, żelazo jest głównym i niezastąpionym składnikiem decydującym o właściwościach i funkcjach (aktywności) setek białek i enzymów lub ich kofaktorów. Jest ono elementem budowy systemów przenoszenia tlenu (np. hemoglobiny), transportu elektronów (np. cytochromy), syntezy DNA (redukcja rybonukleotydów) itp. Jony żelaza ze względu na stosunkowo mały promień jonowy mają skłonność do tworzenia poprzez wiązania koordynacyjne kompleksów z takimi ligandami jak tlen, azot i siarka, a zawierające żelazo enzymy obejmują bardzo szeroki zakres potencjałów redoks. To właśnie z połączenia tych właściwości wypływa szczególna rola żelaza w fundamentalnych dla funkcjonowania żywego organizmu procesach.

Na całym świecie ponad miliard ludzi ma problemy zdrowotne, związane z niedoborem żelaza (5). Sytuacja ta wynika między innymi stąd, że zdecydowana większość diet opiera się na materiale roślinnym jako głównym źródle tego pierwiastka, a tylko niewielka jego frakcja (skompleksowana ze związkami organicznymi) jest dostępna w glebie. Ograniczony jest zatem często normalny wzrost roślin, a w konsekwencji także, nagromadzenie żelaza w ich tkankach.

Najczęściej występującymi chorobami, spowodowanymi niedoborem żelaza są różnego typu anemie oraz choroby wynikające z obniżenia poziomu, zawierających żelazo enzymów oddechowych. Enzymy te wymagane są np. dla normalnej pracy mięśni. W przypadku kobiet sytuacja potęgowana jest jeszcze przez naturalne stany fizjologiczne. Aby odbudować zachwianą równowagę konieczne jest dostarczenie organizmowi odpowiedniej ilości żelaza. Również rozwijający się w łonie matki płód, wymaga ciągłego dopływu tego pierwiastka. Jego niedobór, w trakcie rozwoju płodowego, może prowadzić do nieodwracalnych zmian rozwojowych dziecka (np. niedorozwój mózgu (6)). W Stanach Zjednoczonych w latach osiemdziesiątych ok. 25% ciężarnych kobiet cierpiało z powodu niedoboru żelaza (7,8).

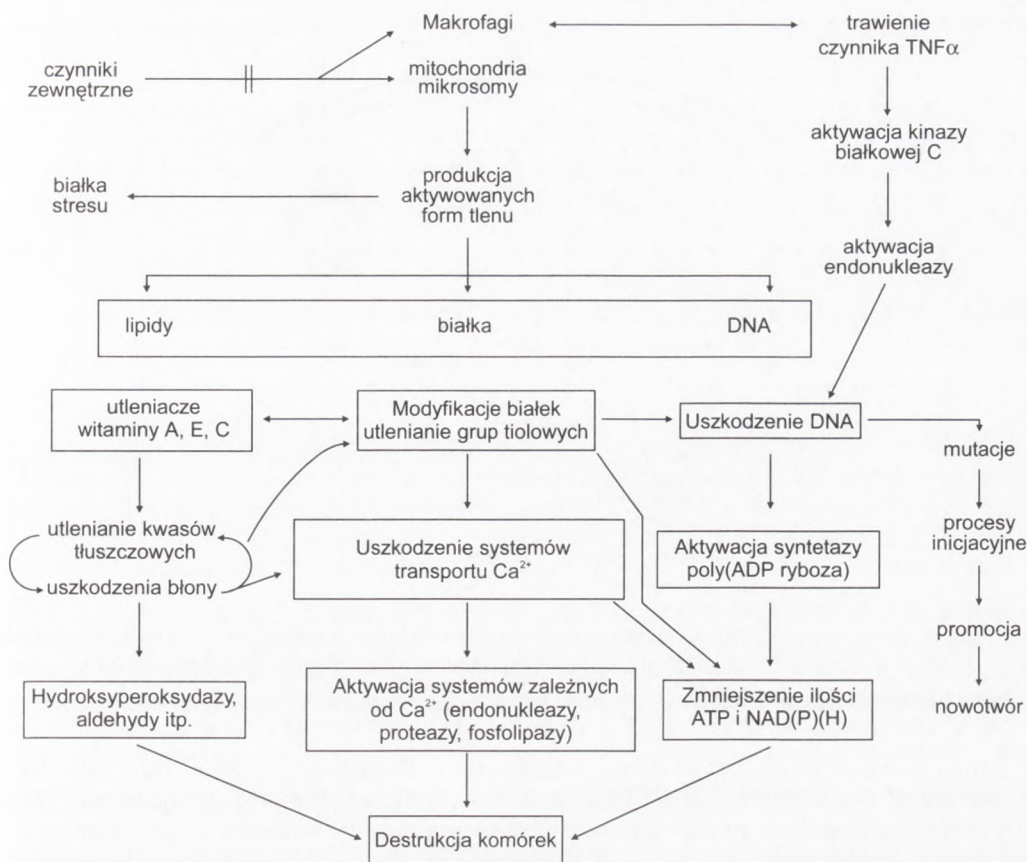
2. Zagrożenia wynikające z obecności żelaza w organizmach żywych

Ewolucja wyposażyła żywe organizmy w mechanizmy absorpcji żelaza, lecz nie wytworzyła wydajnych mechanizmów usuwania jego nadmiaru. Żelazo, ze względu na swoje chemiczne właściwości, może katalizować reakcje prowadzące, w obecności aktywnych form tlenu, do powstawania wolnych rodników hydroksylowych (HO^\bullet) (tzw. reakcja Fentona (9)).



Chociaż stała szybkości reakcji Fentona z udziałem jonów miedzi jest wyższa niż jonów żelaza, to jednak wyższa zawartość żelaza w systemach biologicznych czyni je bardziej prawdopodobnym katalizatorem wytwarzania HO^\bullet (10). Swój udział, w tworzeniu wolnych rodników w żywej komórce, poza żelazem i miedzią mają także inne metale przejściowe, takie jak: kadm, chrom, rtęć, nikiel, wanad i ołów (11). Wolne rodniki ze względu na bardzo wysoką aktywność chemiczną oraz zdolność inicjowania reakcji łańcuchowych, są najskuteczniejszymi ze znanych czynnikami utleniającymi (12). Efektem ich działania może być nawet śmierć komórki (organizmu).

Szereg białek takich jak ferrytyna, transferyna czy hemosyderyna efektywnie kontroluje obecność wolnego żelaza w komórce. Ze względu jednak na konieczność dostarczania żelaza do różnych kompartmentów komórki, musi być ono także uwalniane. Chelatowane jest ono wtedy przez niskocząsteczkowe związki jak cytryniany czy ADP, tworząc z nimi minimalną pulę „wol-

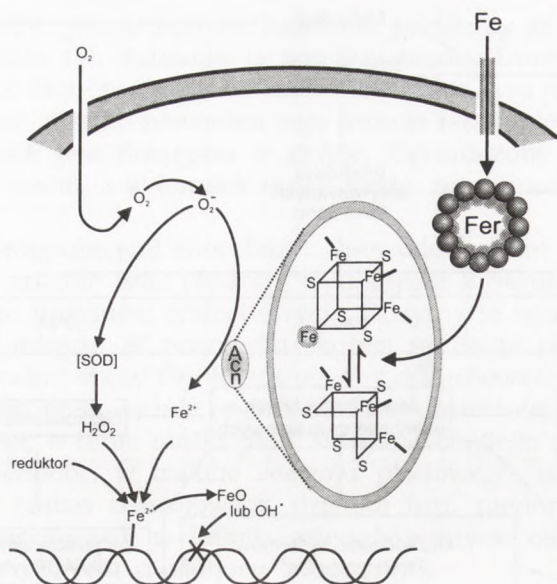


Rys. 1. Schemat poznanych dotąd oddziaływań z udziałem aktywnych form tlenu, oraz wywołanych przez nie skutków wg (11).

nego” żelaza (kompleksów aktywnych w inicjowaniu reakcji wolnorodnikowych). Długotrwałe gromadzenie żelaza (ang. *iron overload*), jak i powstawanie aktywnych form tlenu (np. w procesach chorobowych) zaburza ustaloną równowagę (13-15). W krajach o wzrastającym spożyciu mięsa oraz produktów wysokokalorycznych, coraz większym problemem stają się choroby indukowane przez nadmiar żelaza, a konkretnie przez powstające z jego udziałem wolne rodniki (starzenie, choroby nowotworowe i serca (3,12,13,15)).

Zestawienie poznanych dotąd procesów z udziałem aktywnych form tlenu przedstawiono na rysunku 1. Dwa spośród nich przyciągnęły szczególną uwagę lekarzy i badaczy. Pierwszy to trwałe uszkodzenia materiału genetycznego komórki, drugim jest destrukcja jej błon.

Spontaniczne autoutlenianie enzymów oddechowych oraz cytoplazmatycznych prowadzi do powstawania nadtlenków (O_2^-), a następnie do reakcji dysmutacji cząsteczek H_2O_2 . Nadtlenki niszczą nietrwałe połączenia żelaza

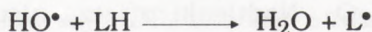


Rys. 2. Model współdziałania aktywnych form tlenu z jonami żelaza, w generowaniu uszkodzeń DNA (3,63). Acn — akonitaza; Fer — ferrytyna; SOD — dysmutaza nadtlenkowa.

i siarki [4Fe-4S] (np. w centrum aktywnym akonitazy), powodując tym samym uwalnianie żelaza o niskiej liczbie koordynacyjnej do cytoplazmy. Napływ wolnego żelaza może być spotęgowany przez ponowne uzupełnianie żelaza w kompleksach z siarką. Pochodzić ono może z tzw. rezerw komórkowych przechowywanych, np. w ferrytynie. Część wolnego żelaza ulega związaniu do DNA i katalizuje przeniesienie elektronu z różnych niezidentyfikowanych czynników redukcyjnych na H_2O_2 . Powstały w rezultacie hydroksylowy rodnik atakuje reszty deoksyrybozy w łańcuchu DNA (rys. 2). Sytuację pogłębia fakt, że akonitaza czy ferrytyna to nie jedyne białka, z których nadtlenek zdolny jest uwalniać katalitycznie aktywne żelazo. Innymi, uaktywnianymi stresem źródłami żelaza mogą być, np. laktoferyna czy hemosideryna. W połączeniu z inaktywacją lub uszkodzeniem enzymów naprawczych, prowadzi to do gromadzenia się mutacji, i w efekcie do zmian aktywności genów, a nawet do śmierci komórki.

Powstające w katalizowanej przez żelazo reakcji Fentona wolne rodniki, biorą także udział w procesie peroksydacji kwasów tłuszczowych, jako że proces ten ma charakter reakcji łańcuchowej, a w efekcie powoduje stosunkowo ciężkie konsekwencje fizjologiczne (np. niedokrwienne choroby serca czy zawał). Przebieg tego procesu przedstawiono na schemacie.

Rodnik hydroksylowy zdolny jest do usunięcia atomu wodoru (H^\bullet) z łańcucha wielonienasyconego kwasu tłuszczowego cząsteczki fosfolipidowej:



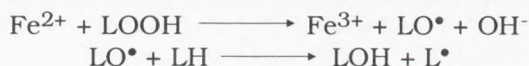
Powstały w ten sposób rodnik lipidowy, reaguje z tlenem cząsteczkowym, tworząc w efekcie rodnik nadtlenkowy lipidu (LOO[•]):



Rodnik nadtlenkowy lipidu zdolny jest z kolei do oderwania atomu wodoru z następnego łańcucha wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, wytwarzając kolejny rodnik L[•] wywołując reakcję łańcuchową:



Szacuje się, że *in vivo* pojedynczy przypadek inicjacji (•OH) uruchamia kaskadę od 10 do 15 cykli, aż do momentu kiedy łańcuch zostanie przerwany — zwykle przez „zmiatacze wolnych rodników”, np. cząsteczkę witaminy E (16,17). Efektem pojedynczej reakcji łańcuchowej byłaby w takim przypadku akumulacja od 10 do 15 cząsteczek wodoronadtlenków lipidowych (LOOH). Lokalny odcinek błony komórki zostaje „inkrustowany” zarodkami od 10 do 15 nowych reakcji łańcuchowych, które mogą być zapoczątkowane przez żelazo. Zredukowane w reakcji z nadtlenkiem do formy Fe²⁺ żelazo, zdolne jest z kolei do redukcji LOOH i wytworzenia nowego rodnika LO[•]. Inicjuje ono w ten sposób nowy łańcuch reakcji, podobnych do opisanych:



Ostatecznym skutkiem współistnienia rodników nadtlenkowych oraz aktywnego żelaza jest destabilizacja struktury błony biologicznej, a przez to i żywotności komórki (18).

Wiadomo, że poza załamaniem zdolności regulacyjnych systemu redoks (prowadzącym do peroksydacji lipidów jak i oksydacyjnego uszkodzenia DNA i białek) efektem stresu oksydacyjnego powodowanym przez żelazo, jest także indukcja systemu redoks w kierunku aktywacji szeregu mechanizmów redukcyjnych i ochronnych. Paradoksalnie, jak się wydaje, to właśnie indukcja mechanizmów ochronnych jest jednym z elementów promocyjnych rozwoju szeregu typów nowotworów. Znacznie podwyższony poziom np. S-transferazy (pi) glutationu w komórkach ludzkiego raka okrężnicy, płuc czy szyjki macicy, sugeruje istnienie w nich mechanizmu chroniącego komórki nowotworowe przed stresem oksydacyjnym.

Poza nowotworami do najbardziej rozpowszechnionych chorób, w których indukcji i rozwoju, wykazano udział wolnych rodników, zaliczyć należy: miażdżycę tętnic, niedokrwienie mięśnia sercowego, choroby Alzheimera i Parkinsona, katarakty, skrobiawicę oraz cukrzycę (3,19,20).

Obserwacje dramatycznego wzrostu zapadalności na szereg chorób (zwłaszcza na wymienione) wraz z wiekiem, a także wykazanie we krwi starszych pacjentów podwyższonych poziomów czynników świadczących o powstawaniu stresu oksydacyjnego, niezbicie dowodzi związku procesu starzenia się or-

ganizmu z przyspieszonym tworzeniem wolnych rodników. Zmiany te inicjowane są głównie w mitochondriach. Uważa się, że tempo tworzenia aktywnych form tlenu w mitochondriach, w trakcie naturalnych przemian metabolicznych, wzrasta wraz z wiekiem. Wzrastający z wiekiem stres oksydacyjny zbiega się z osłabieniem procesów obronnych. Wynika ono ze spadku wydolności aparatu biosyntezy białka. W krajach rozwiniętych fakt ten, jak się wydaje, jest podstawowym czynnikiem ryzyka zapadania na szereg chorób oraz wzrostu śmiertelności w wieku powyżej 28 lat. We współczesnej medycynie próbuje się stosować szereg czynników „wychwytyjących” wolne rodniki (np. N-tert-butyl- α -phenylnitron = PBN) jak i czynniki chelatujące jony metali biorących udział w reakcjach tworzenia wolnych rodników przy udziale aktywnego tlenu (EDTA, kwas fitynowy). Coraz więcej uwagi poświęca się ostatnio także stosowaniu odpowiedniej diety: obniżeniu kaloryczności (ograniczenie aktywności mitochondriów) jak i redukcji w produktach żywnościowych zawartości czynników indukujących powstawanie wolnych rodników (Cu, Mn, Fe, łatwo tworzące nadtlenki aminokwasy, np. lizyna czy wielonienasycone tłuszcze) (21,22).

Omawiając procesy chorobotwórcze związane z gospodarką żelazem w organizmie, nie sposób pominąć tych z udziałem patogenów bakteryjnych lub, np. pasożytów wywołujących malarię (23-25). Wiadomo, że dla swojego rozwoju wykorzystywać one muszą dostępne w płynach ustrojowych gospodarza żelazo. Jednym ze sposobów ograniczania ich rozwoju jest stosowanie związków trwale wiążących żelazo, a zatem uniemożliwiających jego przyswajanie przez pasożyta.

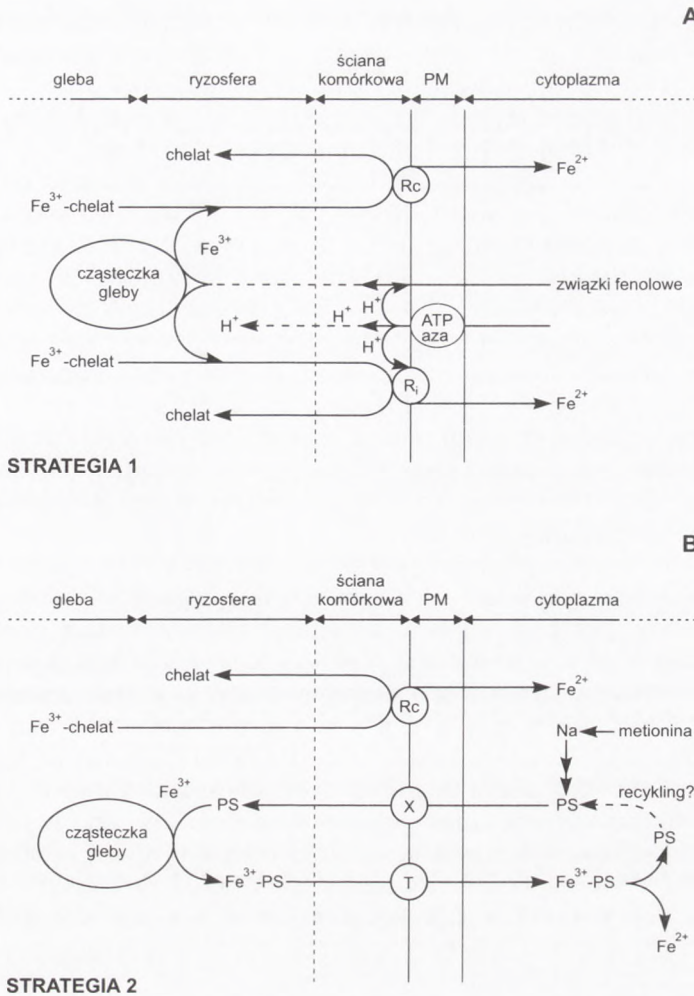
Spośród wielu roślinnych mechanizmów obronnych przed inwazją organizmów patogennych, czy przed procesami gnilnymi na uwagę zasługuje produkcja zwiększonych ilości polifenoli. Poprzez związanie wolnego żelaza tworzą one w tkankach atakowanej rośliny środowisko rozpoznawane przez patogena jako niesprzyjające, ograniczając tym samym jego rozwój (26).

3. Strategie przyswajania żelaza przez organizmy żywe

Żelazo występuje w przyrodzie przeważnie w formie niedostępnej dla żywych organizmów. Konieczne jest zatem istnienie mechanizmów, dzięki którym związki żelaza są rozpuszczane, a następnie transportowane do wnętrza komórki.

Większość prokariotów wytwarza związki posiadające bardzo wysokie powinowactwo do żelaza w formie żelazowej, zwane sideroforami (27). Tworzą one z żelazem rozpuszczalne chelaty żelazowe, które następnie poprzez specyficzne receptory przenoszone są do wnętrza komórki. W cytoplazmie, kompleksy żelaza z sideroforami ulegają rozkładowi. Najlepiej poznanymi przykładami tego typu systemów są te pochodzące z *Escherichia coli*. Wykorzystywanymi przez nie związkami chelatującymi żelazo są np. aerobaktyna, cytrynian czy enterobaktyna.

Inny, szczegółowo opisany na przykładzie *Saccharomyces cerevisiae*, system przyswajania żelaza oparty jest na funkcjonowaniu, zlokalizowanej w bło-



Rys. 3. Strategie pobierania żelaza przez rośliny dwuliścienne i nietrawiaste jednoliścienne (A) oraz rośliny trawiaste (B). Rc, konstytutywna reduktaza żelazowa związana w błonie plazmatycznej (PM). **A.** Strategia I: indukowalna reduktaza żelazowa (Ri); ATPaza, wzmocniona aktywność ATPazy w korzeniach roślin „nietrawiastych” w warunkach niedoboru żelaza. **B.** Strategia II: indukowalna synteza fitosideroforów (PS) z metioniny przez pochodną azetydyny (NA) u traw w warunkach niedoboru żelaza. X: indukowalny system uwalnający fitosiderofory do ryzosfery. T: indukowalny system transportowy, umożliwiający specyficzne pobieranie kompleksów Fe³⁺-fitosiderofor przez korzenie (30,64).

nie komórkowej reduktazy. Pobrane z wewnątrzkomórkowych donorów elektrony przenoszone są przez nią na zewnątrz, redukując znajdujące się w sąsiedztwie żelazo (4).

Wyraźne podobieństwo do mechanizmu opisanego dla drożdży wykazuje system pobierania żelaza wykorzystywany przez rośliny dwuliścienne oraz nietrawiaste jednoliścienne (strategia I rys. 3).

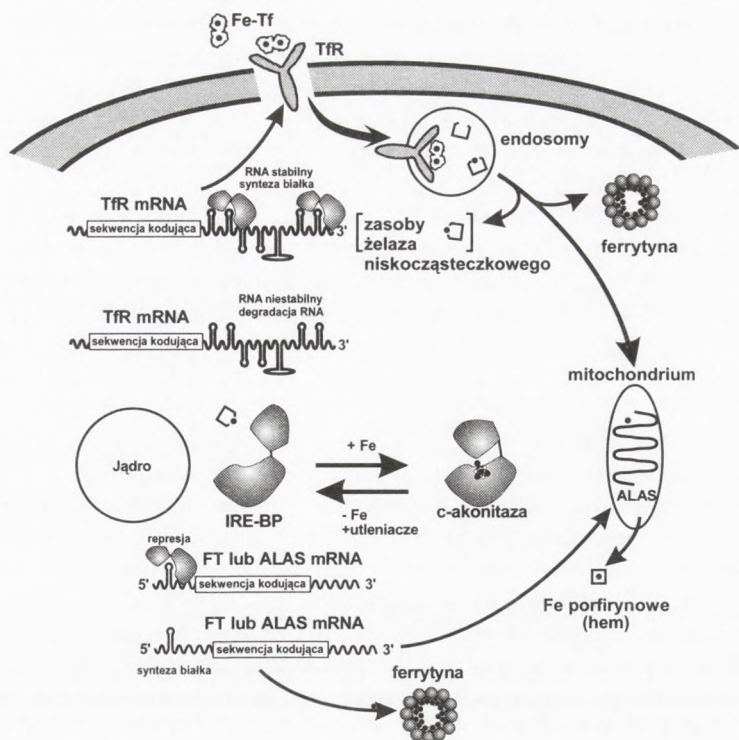
Korzenie tych roślin w warunkach niedoboru żelaza, wzmagają uwalnianie protonów (być może także szeregu związków redukujących), obniżając w ten sposób pH ryzosfery. Umożliwia to rozpuszczenie żelaza z Fe^{3+} , a następnie jego enzymatyczną redukcję do Fe^{2+} . Enzymem odpowiedzialnym za tę reakcję jest usytuowana w błonie plazmatycznej reduktaza.

Rośliny trawiaste reagują na niedobór żelaza uwolnieniem do środowiska fitosideroforów (28,29) (strategia II rys. 3). Są to wtórne, niebiałkowe aminokwasy, które dzięki swoim grupom aminowym, hydroksylowym i karboksylowym mogą funkcjonować jako chelatory kationów. W ryzosferze fitosiderofory chelatują rozpuszczalne żelazo z wodorotlenków czy fosforanów, poprzez tworzenie kompleksów Fe^{3+} -fitosiderofor. Uważa się, że właśnie taki kompleks jest przemieszczany przez błonę plazmatyczną korzenia, przez specyficzny dla kompleksu Fe^{3+} -fitosiderofor transporter. W przypadku gleb alkalicznych, buforowanych węglanami, zdolność wykorzystywania fitosideroforów daje trawom ekologiczną przewagę. W tego rodzaju podłożach rozpuszczanie żelaza przez tworzenie środowiska redukcyjnego (na drodze uwalniania protonów) jest hamowane (30).

Systemy zwierzęce, wykazują pewne podobieństwa do opisanych. Tak na przykład u ssaków, podobnie jak w przypadku organizmów wytwarzających siderofory, żelazo jest przenoszone wewnątrz ciała w formie chelatu. Nośnikiem żelaza jest tutaj transferyna — glikozyłowane białko (glikoproteina) surowicy zdolna do wiązania dwóch atomów żelaza w formie żelazowej. Zasadniczą korzyścią układu transportu żelaza związanego z białkiem o dużej masie cząsteczkowej (80 kilodaltonów) zamiast z nośnikiem niskocząsteczkowym typu siderofor (ok. 320 daltonów) jest to, że kompleks taki nie jest usuwany z organizmu podczas filtrowania w kłębuszkach nerkowych i w zasadzie wszystkie komórki ssaków wykorzystują system transferyny do pobierania żelaza. Podobnie jak w systemach wykorzystujących siderofory, niosąca żelazo transferyna wiąże się do powierzchni komórki przez specyficzny receptor. Kompleks żelaza z transferyną i receptorem transferynowym przenoszony jest do endosomów. Dzięki aktywnemu zakwaszeniu endosomów następuje tam dysocjacja żelaza z kompleksu transferyny (proces ten prawdopodobnie wpływa także na zwiększenie rozpuszczalności żelaza) (31), a w kolejnej fazie uwolnienie go do cytoplazmy komórki (rys. 4).

4. Magazynowanie żelaza w komórce

Ferrytyna jest jedynym znanym białkiem kontrolującym przejście jonów z roztworu do fazy stałej. Podstawowa reakcja tzw. biomineralizacji żelaza, kontrolowana przez ferrytynę prowadzi do powstawania Fe_2O_3 (32). Żelazo w takiej formie przechowywane jest wewnątrz kompleksu ferrytyny. Mineralne jądro tego kompleksu zawierać może do 4500 atomów żelaza. W ferrytynie żelazo choć odizolowane („bezpieczne”), jest jednak w pełni dostępne dla innych elementów funkcjonalnych komórki. Dzięki pewnym (wciąż nie do końca wyjaśnionym) procesom może być ono w razie potrzeby uwalniane.



Rys. 4. Aspekty regulacji poziomu żelaza w komórce zwierzęcej, poprzez regulację translacji mRNA receptora transferyny (TfR) oraz ferrytyny, Tf-transferyna (65).

Pomimo podobieństw ferrytyn zwierzęcych i roślinnych, świadczących o istnieniu „wspólnego przodka”, wyraźne są także różnice między nimi. Pierwszą z nich jest ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa. Ferrytyny zwierzęce funkcjonują w cytoplazmie, podczas gdy roślinne zlokalizowane są w plastydach. Tak zatem sekwencja mRNA kodująca białko roślinne, dłuższa jest o odcinek odpowiadający 24 aminokwasom peptydu odpowiedzialnego za transport całego białka do plastydu (33). Także struktury genów ferrytyn zwierzęcych i roślinnych różnią się diametralnie. W genach zwierzęcych sekwencja kodująca podzielona jest trzema intronami, natomiast w roślinnych siedmioma (34). Pozycje intronów genów zwierzęcych i roślinnych nie są zachowane, chociaż wewnątrz królestw wykazują wysoką zachowawczość.

Wpływ na regulację ekspresji genów ferrytyn u zwierząt i roślin ma zarówno faza rozwojowa organizmu, hormony, jak i poziom żelaza. W promotorach genów ferrytyn, zarówno zwierzęcych jak i roślinnych, zidentyfikowano szereg elementów tzw. MRE (*metal regulatory elements*). Mają one prawdopodobnie związek z transkrypcyjną regulacją ekspresji ferrytyny u roślin, a także u zwierząt, gdzie ma ona znaczenie drugorzędne w stosunku do regulacji translacji.

Hemoglobina dzięki obecności skoordynowanego w tzw. kieszeni hemowej żelaza, ma zdolność odwracalnego wiązania tlenu. Zdolność ta w powiązaniu z mobilnością hemoglobiny (wraz z krwią), czynią z niej efektywny transporter tlenu z naczyń krwionośnych płuc do najodleglejszych części ciała. W organizmach zwierzęcych wysoka zawartość żelaza „wymuszona” jest właśnie obecnością hemoglobiny we krwi (erytrocyty).

Inne niż przenoszenie tlenu funkcje hemoglobin zwierzęcych związane są np. z modulacją metabolizmu erytrocytów czy udziałem w indukcji procesu ich starzenia się (poprzez utlenianie hemoglobiny). Znane są także zależności pomiędzy genetyczną opornością na malarię a hemoglobina. Hemoglobina wykazuje szereg aktywności enzymatycznych, ma także zdolność oddziaływania z wieloma związkami chemicznymi (m.in. lekami), jest też źródłem fizjologicznie aktywnych katabolitów. Wykazano również udział hemoglobiny w regulacji temperatury płodu: pełni ona w tym przypadku rolę czynnego przekaźnika ciepła (w cyklu utleniania-odtleniania) (35).

Wiele globin funkcjonuje jako podjednostki większych kompleksów. Dla przykładu α i β łańcuchy hemoglobiny ludzkiej są częścią tetrameru $\alpha_2\beta_2$ natomiast hemoglobina mięczaka jest homodimerem. Inne, jak hemoglobiny owadów, roślin oraz minogów są monomerami.

Pomimo wysokiego podobieństwa struktur trzeciorzędowych hemoglobin (u organizmów o różnym stopniu pokrewieństwa), struktury pierwszorzędowe tych białek wykazują niską zachowawczość. Identyczne okazały się tylko te aminokwasy (i ich pozycje w łańcuchu polipeptydowym), które odgrywają główną rolę w strukturze funkcjonalnego białka (36,37).

Organizacja genów globin zwierzęcych i roślinnych wykazują wysoki stopień podobieństwa (m.in. pozycje intronów). Zasadnicza różnica polega na obecności dodatkowego, trzeciego intronu w genach roślinnych, dzielącego odpowiednik centralnego eksonu genu zwierzęcego.

Dotąd opisano szereg elementów sekwencji promotorów genów hemoglobin zwierzęcych, które decydują o poziomie ekspresji tych genów, jak i jej synchronizacji z ogólnym schematem rozwoju organizmu (38-40).

Znacznie bardziej, przede wszystkim ze względu na łatwość uzyskiwania materiału transgenicznego, zaawansowane są prace dotyczące mechanizmów regulacji ekspresji genów hemoglobin roślinnych. Szczególny przypadek stanowią geny tzw. hemoglobin symbiotycznych w roślinach motylkowatych (41). Promotory genów leghemoglobin wszystkich badanych dotąd roślin motylkowatych zawierają w obrębie odcinka 200 nukleotydów (licząc od kodonu inicjującego translację — ATG), element sekwencji decydujący o poziomie ich brodawkowospecyficjnej ekspresji. Element taki, zwany „organospecyficznym” (OSE) (42-43), schematycznie przedstawić można jako AAAGATN₄₋₈CTCTT. Analiza w roślinach transgenicznych ekspresji genów reporterowych, wprowadzanych pod kontrolę modyfikowanych promotorów genów leghemoglobin, wykazała bardzo wysoką zachowawczość sekwencji elementów OSE. Zmiany nawet pojedynczych nukleotydów wewnątrz takiego elementu prowadzą do drastycznego spadku poziomu brodawkowospecyficjnej ekspresji, kontrolowanego przez zmutowany promotor genu (44).

Jedynym poznanym, jak dotąd, przypadkiem odstępstwa od przedstawionego schematu budowy promotora genów leghemoglobin, jest struktura promotora leghemoglobiny łubinu żółtego. Choć nie zawiera on w swojej sekwencji typowych dla innych roślin motylkowatych elementów organospecyficznych, kieruje ekspresję genu do centralnej, zainfekowanej bakteriami strefy brodawki (45,46). Dzięki aktywności w innych niż brodawki tkankach wykazuje on pewne podobieństwa do promotorów hemoglobin niesymbiotycznych. Na podstawie badań porównawczych sekwencji cDNA oraz i aminokwasowych sądzić można, że sytuacja taka wynika ze swoistej pozycji łubinu w ewolucji systemów symbiotycznego wiązania azotu — łubin jest jedną z najstarszych roślin motylkowatych (46-48).

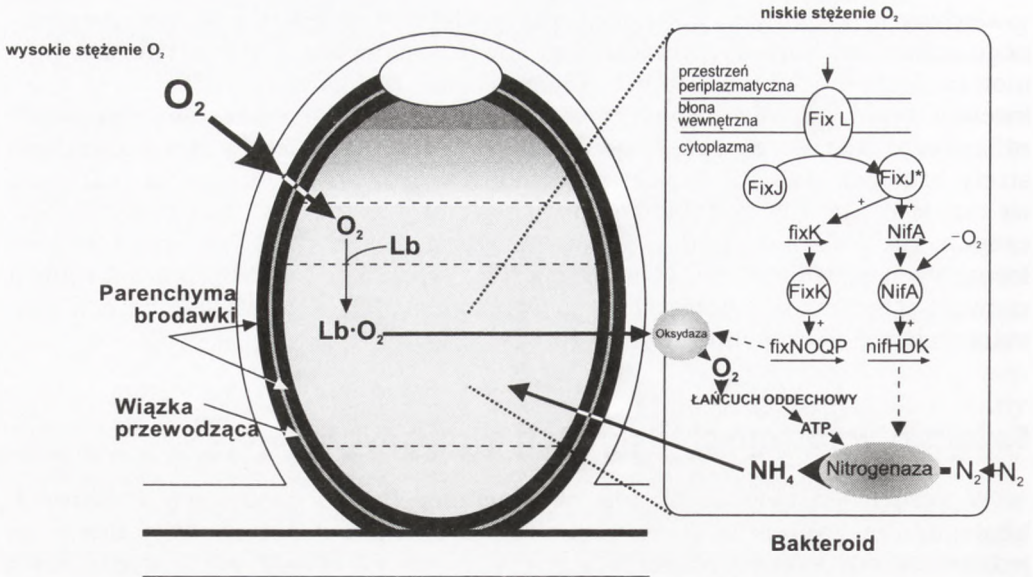
5. Żelazo w roślinnych układach symbiotycznych

W przeciwieństwie do systemów zwierzęcych w organizmach roślinnych hemoglobina występuje w stosunkowo niewielkich ilościach. Wyjątkiem są jedynie układy symbiotyczne, w których zawartość hemoglobiny sięgać może 30% wszystkich białek cytoplazmatycznych komórki brodawki.

Bakterie rodzaju *Rhizobium* po wnikięciu do tkanek korzenia (lub w niektórych przypadkach łodygi) rośliny indukują procesy (m.in. aktywacja genów odpowiedzialnych za syntezę tzw. nodulin) prowadzące do powstania nowego organu — brodawki korzeniowej (49,50).

Dzięki specyficznej budowie brodawki oraz obecności hemoglobiny, możliwa jest tam efektywna redukcja azotu atmosferycznego. Azot po redukcji włączany jest do takich związków jak ureidy czy amoniak, a przez nie do syntezy aminokwasów. Za proces redukcji azotu odpowiedzialny jest bakteryjny enzym nitrogenaza. Enzym ten, wysoce wrażliwy na obecność tlenu, jest przez niego nieodwracalnie inaktywowany. Konieczne jest zatem ograniczenie dostępu tlenu w okolicy bakteroidów (otoczonych błonami bakterii, uwolnionych do cytoplazmy komórki brodawki). Redukcja azotu cząsteczkowego jest jednak procesem wymagającym znacznych ilości energii. Wiąże się to z koniecznością aktywacji łańcucha oddechowego bakterii, a w konsekwencji wzrostem zapotrzebowania na tlen. Hemoglobina syntetyzowana w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych (leghemoglobina, Lb), dzięki wysokiemu powinowactwu do tlenu, stanowi doskonałą ochronę nitrogenazy, tworząc rodzaj gradientu tlenowego w okolicy bakteroidu. Jednocześnie ze względu na wyższe niż leghemoglobiny powinowactwo do tlenu terminalnych oksydaz bakteryjnych, istnieje możliwość „przechwycenia” przez nie tlenu i włączenia do łańcucha oddechowego.

Szczególnie ważnym, dla zrozumienia znaczenia żelaza w procesie symbiotycznego wiązania azotu, jest obecność tego metalu w centrum aktywnym samej nitrogenazy. Bez niego zatem, proces ten nie tylko nie funkcjonowałby efektywnie, ale co więcej, nie byłby możliwy (rys. 5).



Rys. 5. Schemat przedstawiający zależność procesu symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego w brodawkach roślin motylkowatych od białek zawierających żelazo (66).

Rośliny motylkowate wytworzyły swego rodzaju fizjologiczną zależność od wiązanej w brodawkach azotu. Starzenie się i destrukcja brodawki, a także związane z tym wyczerpywanie się zasobów dostępnego azotu, zbiegają się w czasie z zakończeniem wegetacji i obumieraniem rośliny. Tak jak dla podstawowych funkcji brodawki zasadniczą rolę odgrywa żelazo, tak ostatecznie staje się ono przyczyną jej rozpadu. Wspomniano już, że znaczną część białek rozpuszczalnych brodawki stanowi leghemoglobina. W utlenowanej formie leghemoglobiny (oksyLb) żelazo może ulegać powolnemu procesowi utleniania do formy żelazowej (metLb). Produktem tej reakcji są także anionorodniki nadadtlenkowe ($O_2^{\cdot-}$) z których na drodze dysmutacji powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2). Podczas reakcji metLb z niewielkim nadmiarem H_2O_2 , elektron przenoszony jest z żelaza na resztę tyrozynową globiny. W ten sposób generowany jest na białku swego rodzaju rodnik. Rodnik taki ma zdolność reagowania z frakcją błonową peribakteroidów, wytwarzając w konsekwencji rodniki lipidowe. Tworzenie tego rodzaju rodników może prowadzić do wyczerpania reduktorów błonowych i zapoczątkowania procesu tworzenia nadadtlenków lipidów (peroksydacji lipidów) (51). Niszczenie błon jest jednym z najwcześniej obserwowanych symptomów starzenia się brodawki (52).

Poza hemoglobinami funkcjonującymi w układach symbiotycznych znana jest także klasa hemoglobin tzw. niesymbiotycznych, syntetyzowana w komórkach innych niż zainfekowane bakteriami *Rhizobium* komórki brodawki (53,54). Synteza tej klasy hemoglobin w różnych tkankach, indukowana jest

pojawieniem się stresu tlenowego. Może być to stres pochodzenia fizjologicznego, jak np. niedobór tlenu w szybko dzielących się tkankach merystematycznych, lub stres wywołany czynnikami zewnętrznymi, np. niską temperaturą. Niektóre hipotezy dotyczące aktywności hemoglobin niesymbiotycznych sugerują, że mogą one funkcjonować jako swego rodzaju „sensory” poziomu tlenu w komórce (tkance) lub wspomagać jego dyfuzję (55). Ze względu na bardzo wysokie powinowactwo do tlenu tej klasy białek, jak się wydaje, jest jednak mało prawdopodobne. Rezultaty niektórych badań świadczą o tym, że mogą one funkcjonować jako oksygenazy. Utleniając (w połączeniu z flavoproteinami) NADH, podtrzymują glikolizę, stabilizując w efekcie status energetyczny komórki (56,57).

6. Molekularne procesy obronne przeciwko stresowi oksydacyjnemu — udział żelaza w regulacji ekspresji genów

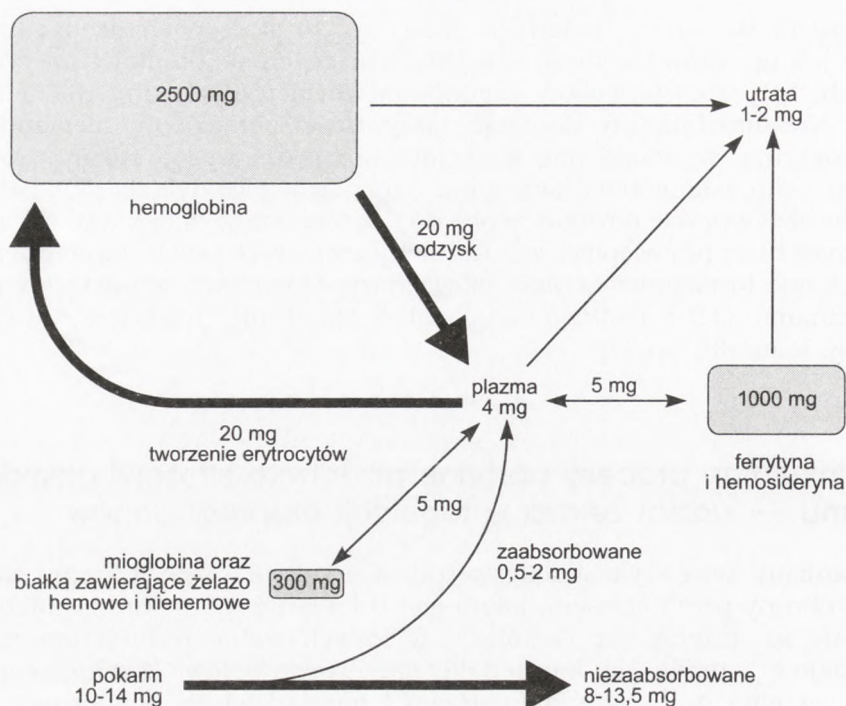
Organizmy żywe wykształciły w trakcie ewolucji różne systemy zapobiegania i obrony przed stresem, jakim jest utlenianie. W niektóre z nich zaangażowane są enzymy, np. katalaza, w innych wolne rodniki usuwane są przez małe cząsteczki, jak karotenoidy czy związki tiolowe (zredukowany glutation, cysteina itp.). Najwydajniejszym i najbardziej ekonomicznym procesem jest jednak magazynowanie wolnego żelaza przez ferrytynę.

Najlepiej poznanymi mechanizmami regulacji poziomu żelaza w komórce są te, które opisano dla organizmów zwierzęcych (ssaków). Stabilizacja (homeostaza) poziomu żelaza jest tutaj osiągana dzięki skoordynowanej regulacji syntezy receptora transferyny oraz ferrytyny.

Kontrolując poziom syntezy tych białek, komórka reguluje ilość przyswajanego żelaza (proporcjonalnie do liczby receptorów transferyny), a także stopień jego związania (proporcjonalnie do poziomu ferrytyny w cytoplazmie). Tak zatem w komórce wymagającej więcej żelaza, poziom receptora transferyny rośnie, a poziom ferrytyny spada. W przypadku, gdy stężenie żelaza osiągnie lub przekroczy optimum, synteza receptora zostaje ograniczona, natomiast wzrasta synteza ferrytyny.

Wiadomo obecnie, że za zależną od żelaza kontrolę translacji mRNA ferrytyny jak i receptora transferyny odpowiedzialne są elementy sekwencji tych RNA (*cis-acting*) tzw. *iron-responsive elements* — IRE (58,59). Utworzone przez około 30-nukleotydowe odcinki RNA elementy strukturalne specyficznie rozpoznawane są przez białko IRE-BP (*iron-responsive element binding protein*). W przypadku mRNA receptora transferyny i mRNA ferrytyny efekt przyłączenia IRE-BP do IRE daje odwrotny skutek (60) (rys. 4).

IRE-BP wiążąc się do zlokalizowanych na końcu 3' mRNA receptorów transferyny elementów IRE stabilizuje ten RNA, dzięki czemu możliwa jest synteza białka. Wówczas gdy IRE-BP nie są zasocjowane z IRE, RNA ulega szybkiej degradacji i translacja zostaje zahamowana. Natomiast gdy „obsadzony” przez IRE-BP zostanie IRE zlokalizowany na 5' końcu mRNA ferry-



Rys. 6. Dystrybucja żelaza w organizmie człowieka (7).

tyny, blokowana jest jego translacja i nie powstaje białko. Przy odpowiednim poziomie żelaza możliwe jest przyłączenie do IRE-BP grupy siarkowo-żelazowej $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, dzięki czemu nabywa ono aktywności enzymatycznej (akoni-tazy), przy jednoczesnej zmianie struktury przestrzennej (w „zamkniętą”), uniemożliwiającej wiązanie do IRE. W takiej formie białko to spełnia prawdopodobnie rolę sensora poziomu aktywnego tlenu w komórce (61). Utlenianie grupy $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ prowadzi najpierw do uwolnienia jonu żelaza, a następnie całkowitej destrukcji grupy $[3\text{Fe-4S}]$ i odtworzenia IRE-BP (62).

Podobny jak w przypadku ferrytyny mechanizm regulacji, decyduje o translacji mRNA syntazy kwasu 5-aminolewulinowego (ϵ -ALAS), podstawowego enzymu szlaku biosyntezy hemu. W rezultacie wzrost ilości żelaza w komórce, prowadzi pośrednio do aktywacji syntezy hemoglobiny w erytrocytach (kręgowców). Dzięki liczebności tych komórek (w krwi człowieka znajduje się ich średnio 30 bilionów), gromadzą one ponad 50% całego żelaza znajdującego się w organizmie (rys. 6). Fakt ten czyni hemoglobinę jednym z głównych czynników biorących udział w zachowaniu równowagi tego metalu w organizmie.

7. Perspektywy

W opracowaniu tym przedstawiono tylko podstawowe informacje dotyczące roli żelaza w funkcjonowaniu świata ożywionego.

Spośród ważniejszych wymienić należy np. zagadnienie biologicznej cyrkulacji żelaza w oceanach, które przecież zajmują większą część powierzchni globu ziemskiego. W ostatnich badaniach wykazuje się, że zawartość dostępnego dla organizmów żywych żelaza jest w ich wodach zaskakująco niska.

Zasadniczymi są też problemy pobierania i przemian związków żelaza przez mikroorganizmy, a to głównie ze względu na rolę jaką odgrywają one w funkcjonowaniu organizmów wyższych, pośrednio poprzez współtworzenie ich środowiska jak i w bezpośrednich oddziaływaniach (symbiotycznych czy patogennych).

Wspomniano o niektórych białkach biorących udział w procesie utrzymania równowagi żelaza w organizmie (ferrytyny, hemoglobiny), nie przedstawiono jednak związku struktury tych białek z ich aktywnością biologiczną.

W rozważaniach nie można także pominąć roli innych jonów w procesach pobierania, transportu oraz magazynowania żelaza w żywych komórkach.

Panu Profesorowi Janowi Barciszewskiemu bardzo dziękuję za konstruktywną krytykę.

Literatura

1. Wächtershäuser G., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 200-204.
2. de Duve C., (1991), *The nature and origin of life*, Neil Patterson ed., 166-168, in: *Blue print for a cell*.
3. Toyokuni S., (1996), Free Radical. Biol. Med., 20, 553-566.
4. Guerinot M. L., (1994), Annu. Rev. Microbiol., 48743-48772.
5. Baynes R. D., Bothwell T. H., (1990), Annu. Rev. Nutr., 133-138.
6. Koeppen A. H., (1995), J. Neurol. Sci., 134, 1-9.
7. Beard J. L., Dawson, H. Pinero D. J., (1996), Nutr. Rev., 54, 295-317.
8. Bothwell T. H., (1995), Nutr. Rev., 53, 237-245.
9. Lloyd R. V., Hanna P. M. Mason R. P., (1997), Free Radical. Biol. Med., 22, 885-888.
10. Meneghini R., Benfato M. S., Bertoncini C. R., Carvalho H., Gurgueira S. A., Robalinho R. L., Teixeira H. D., Wendel C. M. A., Nascimento A. L. T. O., (1995), Canc. J., 8, 109-113.
11. Stohs S. J., Bagchi D., (1995), Free Radical. Biol. Med., 18, 321-336.
12. Guerinot M. L., Yi Y., (1994), Plant Physiol., 104, 815-820.
13. Kozlov A. V., Bini A., Galesi D., Giovannini F., Iannone A., Masini A., Meletti E., Tomasi A., (1996), Biometals., 9, 98-103.
14. Lynch S. R., (1995), Nutr. Rev., 53, 255-260.
15. Martinez-Cayuela M., (1995), Biochimie, 77, 147-161.
16. Frei B., Keaney J. F., Retsky K. L., Chen K., (1996), Vitamins and Hormones, 52, 1-34.
17. Retsky K. L., Frei B., (1995), Biochim. Biophys. Acta, 1257, 279-287.
18. Mccord J. M., (1996), Nutr. Rev., 54, 85-88.
19. Ansari N. H., Wang L. F., Srivastava S. K., (1996), Biochem. Mol. Med., 58, 25-30.
20. Liu J. K., Shigenaga M. K., Mori A., Ames B. N., (1996), Free Radicals in Brain Physiology and Disorders., 425-437.

21. Harman D., (1995), *Age*, 18, 51-62.
22. Choi J. H., Yu B. P., (1994), *Age*, 17, 93-97.
23. Otto B. R., Sparrius M., Wors D. J., Degraaf F. K., Maclaren D. M., (1994), *Microb. Pathog.*, 17, 137-147.
24. Rosenthal P. J., Meshnick S. R., (1996), *Mol. Biochem. Parasitol.*, 83, 131-139.
25. Cabantchik Z. I., (1995), *Parasitol. Today*, 11, 74-78.
26. Mila I., Scalbert A., Expert D., (1996), *Phytochemistry*, 42, 1551-1555.
27. Neilands J. B., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 26723-26726.
28. Higuchi K., Nishizawa N. K., Yamaguchi H., Romheld V., Marschner H., Mori S., (1995), *J. Exp. Bot.*, 46, 1061-1063.
29. Ma J. F., Nomoto K., (1996), *Physiol. Plant*, 97, 609-617.
30. Briat J. F., Fobisloisy I., Grignon N., Lobreaux S., Pascal N., Savino G., Thoiron S., Vonwiren N. Vanwuytswinkel O., (1995), *Biol. Cell*, 84, 69-81.
31. Chahine J. M. E. H., Pakdaman R., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 230, 1102-1110.
32. Trikha J., Waldo G. S., Lewandowski F. A., Ha Y., Theil E. C., Weber P. C., Allewell N. M., (1994), *Protein-Struct. Funct. Genet.*, 18, 107-118.
33. Ragland M., Briat J.-F., Gagnon J., Lauhere J.-P., Massenet O., Theil E. C., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 18339-18344.
34. Proudhon D., Wei J., Briat J.-F., Theil E. C., (1996), *J. Mol. Evol.*, 42, 325-336.
35. Giardina B., Messana I., Scatena R., Castagnola M., (1995), *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 30, 165-196.
36. Aronson H.-E. G., Royer W. E., Hendrickson W. A., (1994), *Protein Sci.*, 1706-1711.
37. Kapp O. H., Moens L., Vanfleteren J., Trotman C. N. A., Suzuki T., Vinogradov S. N., (1995), *Protein Sci.*, 4, 2179-2190.
38. Bresnick E. H., Felsenfeld G., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1314-1317.
39. Anagnou N. P., Perezstable C., Gelinis R., Costantini F., Liapaki K., Constantopoulou M., Kostas T., Moschonas N. K., Stamatoyannopoulos G., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 10256-10263.
40. Engel J. D., (1993), *Trends. Genet.*, 9, 304-309.
41. Stróżycki P. M., (1994), *Prace Ogródu Botanicznego PAN*, z. 5/6, 183-190.
42. She Q. X., Sandal N. N., Stougaard J., Marcker K. A., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 931-935.
43. de Bruijn F. J., Schell J., (1993), *Control of Plant Gene Expression*, CRC press, Boca Raton, FL, 241-257.
44. Ramlov K. B., Laursen N. B., Stougaard J., Marcker K. A., (1993), *Plant J.*, 4, 577-580.
45. Stróżycki P. M., Karłowski W. M., Legocki A. B., (1998), *Plant Physiol. Plant Gene Register*, 116, 867.
46. Stróżycki P. M., Karłowski W. M., Legocki A. B., Dessaux Y., Petit A., Tempe J., (1999), *Plant Sci.*, (in press).
47. Stróżycki P. M., Karłowski W. M., (1996), *Nitrogen fixing systems and evolution of plant hemoglobins.*, 325-328, in: *Biological Fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture.*, Eds. Legocki A. B., Bothe H., Puhler A., Springer, Berlin.
48. Stróżycki P. M., Legocki A. B., (1995), *Plant Sci.*, 110, 83-93.
49. Hirsch A. M., (1992), *New Phytol.*, 122, 211-237.
50. Boivin C., Ndoye I., Molouba F., de Lajudie P., Dupuy N., Dreyfus B., (1997), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16, 1-30.
51. Moreau S., Davies M. J., Mathieu C., Herouart D., Puppo A., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 32557-32562.
52. Becana M., Klucas R. V., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8958-8962.
53. Appleby C. A., (1992), *Sci. Prog.*, 76, 365-398.
54. Hardison R. C., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5675-5679.
55. Arredondo-Peter R., Hargrove M. S., Moran J. F., Sarath G., Klucas R. V., (1998), *Plant Physiology*, 118, 1121-1125.
56. Hill R. D., (1998), *Can. J. Bot.*, 76, 707-712.
57. Sowa A. W., Duff S. M. G., Guy P. A., Hill R. D., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10317-10321.

58. Klausner R. D., Harford J. B., (1989), *Science*, 246, 870-872.
59. Theil E. C., (1994), *Biochem. J.*, 304, 1-11.
60. Weiss G., Wachter H., Fuchs D., (1995), *Immunol. Today*, 16, 495-500.
61. Hentze M. W., (1996), *Trends. Biochem. Sci.*, 21, 282-283.
62. Rouault T. A., Klausner R. D., (1996), *Trends. Biochem. Sci.*, 21, 174-177.
63. Keyer K., Gort A. S., Imlay J. A., (1995), *Journal of Bacteriology*, 177, 6782-6790.
64. Marschner H., Romheld V., (1994), *Plant and Soil*, 165, 261-274.
65. Ohalloran T. V., (1993), *Science*, 261, 715-725.
66. Stróżycki P. M., (1995), *Kosmos*, 44, 515-525.

Iron — element of life and death

Summary

Iron is the fourth most abundant element and second, after aluminium, metal in the Earth's crust.

It is an essential nutrient for almost all living organisms. Iron is a component of hundreds proteins, enzymes and their cofactors. It is a central part of numerous systems, such as: oxygen transport and storage (hemoglobin), elektron transfer (cytochromes), DNA synthesis (ribonucleotide reduction), symbiotic nitrogen fixation (leghemoglobin, nitrogenase), hormone synthesis (i.e. lipoxygenases)...

Due to its chemical properties, iron also poses a threat to living cells. It may catalyse one-electron transfer reactions, which (in the presence of active oxygen) generate radical species. Free radicals are the most potent oxidising agents known thus far. The best known effects of their actions include: oxidative DNA damage and lipid peroxidation. These reactions destroy the cell integrity and may lead to its death. Many of the 20th century diseases, like some cancers or heart problems, are in part caused by free radicals. In order to supply with iron and to protect from iron their components, living organisms have developed specific systems for iron acquisition and maintenance in the cell.

Despite the potential risks of iron overload, 15% of the world's population suffers iron-deficiency anemia.

Key words:

iron, hemoglobin, leghemoglobin, free radical.

Adres do korespondencji:

Paweł M. Stróżycki, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, e-mail: sprom@ibch.poznan.pl