

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 49, NR 4, 2003 . . . . .

MikroRNA . . . . .	214
Detektory pęknięć DNA . . . . .	229
Polimeraza poli-ADP-rybozy . . . . .	239
Stres - śmierć komórki . . . . .	250
Domeny PDZ . . . . .	257
Transport kwasów monokarboksylowych	268
Transportery cukrów . . . . .	278
Dendrymery w medycynie . . . . .	290
Kinazy histydynowe . . . . .	298

Sprawozdanie z XXXIX Zjazdu P.T.Bioch  
Sprawozdanie z kursu FEBS



#### WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa, Poland  
tel/fax 658-20-99  
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl  
www.ptbioch.edu.pl

#### REDAKTOR SENIOR

Senior Editor  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 831-24-03

#### REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02

#### REDAKTORZY

Editors  
KRYSTYNA GRZELAK  
DANUTA HULANICKA  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
ANDRZEJ KASPRZAK  
LILIANA KONARSKA  
ANNA SZAKIEL  
ADAM SZEWCZYK

#### BIURO REDAKCJI

Editorial office  
SEKRETARZ  
Secretary  
HANNA ŁASKOWSKA  
poniedziałki, czwartki  
monday—thursday  
14—16  
tel. 659-85-71 w. 441  
SKŁAD I ŁAMANIE  
Typesetting  
MAŁGORZATA BASAJ

#### RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
G. DOBROWOLSKA (Warszawa)  
A. DYGAŚ (Warszawa)  
W. JACHYMCZYK (Warszawa)  
E. JAGIEŁŁO-  
WÓJTOWICZ (Lublin)  
M. KOZIOŁKIEWICZ (Łódź)  
G. MUSZYŃSKA (Warszawa)  
B. NAWROT (Łódź)  
J. OTLEWSKI (Wrocław)  
J. SZTROSNAJDER (Warszawa)  
H. SZUMIŁO (Lublin)

#### ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
ul. Pasteura 3. 02-093 Warszawa  
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

## SPIS TREŚCI

## CONTENTS

<b>MikroRNA - nowi członkowie rodziny niekodujących RNA</b> MicroRNAs - new members of non-coding RNA family JACEK KRÓL, DANUTA KACZYŃSKA, WŁODZIMIERZ J. KRZYŻOSIAK	214
<b>Białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA i ich udział w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na stres</b> Detectors of DNA strand breaks and their role in the cellular response to stress JOANNA ŁANUSZEWSKA, PIOTR WIDŁAK	229
<b>Polimeraza poli(ADP-rybozy) i jej udział w naprawie DNA</b> Poly(ADP-ribose) polymerase and its function in DNA repair TOMASZ ŚLEDZIŃSKI	239
<b>Uszkodzenie komórki - rola mitochondriów</b> Damage of cell - role of mitochondria ANNA ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN	250
<b>Struktura i funkcja białkowych domen PDZ</b> Structure and function of the PDZ domains MICHAŁ MILEWSKI	257
<b>Transport krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych przez błonę plazmatyczną</b> Transport of short-chain monocarboxylic acids through plasma membrane MAGDALENA MAC	268
<b>Bakteryjne systemy transportu cukrów</b> Bacterial systems of sugar transport MAŁGORZATA MARCZAK, ANDRZEJ MAZUR, ANNA SKORUPSKA	278
<b>Dendrymery w zastosowaniach terapeutycznych</b> Dendrimers in therapeutic applications BARBARA KLAJNERT, TOMASZ PRZYGOZDKI	290
<b>Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi</b> Plant receptor histidine kinases and multistep phosphate relay to response regulators STANISŁAW KOWALCZYK, ANNA HETMAN	298
<b>Sprawozdanie z XXXIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</b>	319
<b>Sprawozdanie z kursu FEBS "Rekombinacyjna technologia DNA i ekspresja białka"</b> Report on the FEBS Course "Recombinant DNA technology and protein expression" GRZEGORZ B. GMYREK, RAFAŁ ZIELIŃSKI	322
<b>Roczny spis treści</b>	325



## MikroRNA — nowi członkowie rodziny niekodujących RNA

## MicroRNAs — new members of non-coding RNA family

JACEK KRÓL<sup>1</sup>, DANUTA KACZYŃSKA<sup>2</sup>,  
WŁODZIMIERZ J. KRZYŻOSIAK<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Odkrycie i analiza mikroRNA
  - II-1. stRNA — pierwsze mikroRNA
  - II-2. Identyfikacja populacji mikroRNA u zwierząt
    - II-2-1. Metody bioinformatyczne
    - II-2-2. Metody genetyczne
    - II-2-3. Metody biochemiczne
  - II-3. mikroRNA roślin
- III. Charakterystyka mikroRNA
  - III-1. Nazewnictwo miRNA
  - III-2. Prekursor mikroRNA
  - III-3. Geny mikroRNA
- IV. Biochemia biogenezy i funkcji mikroRNA
  - IV-1. Rybonukleazy Dicer i DCL1
  - IV-2. HEN1
  - IV-3. Białka PPD
  - IV-4. Gemin3/Gemin4
  - IV-5. FMR1 i VIG1
- V. Mechanizm działania i biologiczna funkcja mikroRNA
- VI. MikroRNA czy siRNA?
- VII. Perspektywy technologii mikroRNA

**Wykaz stosowanych skrótów:** CAF — (ang. *CARPEL FACTORY*) czynnik wiązania chromatyny; DCL-1 — roślinny homolog rybonukleazy Dicer; dsRNA — (ang. *double stranded RNA*) dwuniciowy RNA; HEN1 — roślinne białko regulatorowe; miRNA — mikroRNA; mikro RNP — kompleks rybonukleoproteinowy zawierający mikroRNA; ncRNA — (ang. *non-coding RNA*) niekodujące białek RNA; PPD — (ang. *PIWI/PAZ domain protein*) podjednostka białkowa zawierająca charakterystyczne motywy strukturalne PIWI i PAZ; pre-miRNA — prekursor mikroRNA; pri-miRNA — pierwotny transkrypt mikroRNA; RISC — kompleks blokujący induk-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery and analysis of microRNAs
  - II-1. stRNA — first example of microRNAs
  - II-2. Identification of microRNA population in animals
    - II-2-1. Bioinformatic approach
    - II-2-2. Genetic approach
    - II-2-3. Biochemical approach
  - II-3. Plant microRNAs
- III. Characteristics of microRNAs
  - III-1. Nomenclature of miRNAs
  - III-2. MicroRNA precursor
  - III-3. MicroRNA genes
- IV. Biochemistry of microRNA biogenesis and functions
  - IV-1. Dicer and DCL1 ribonucleases
  - IV-2. HEN1
  - IV-3. PPD proteins
  - IV-4. Gemin3/Gemin4
  - IV-5. FMR1 and VIG1
- V. Mechanism and biological function of microRNAs
- VI. MicroRNA or siRNA?
- VII. Perspectives of microRNA technologies

wany przez RNA; sRNA — (ang. *small RNA*) mały RNA; siRNA — (ang. *small interfering RNA*) interferujący RNA; stRNA — (ang. *small temporal RNA*) mały przejściowy RNA; SNP — polimorfizm pojedynczych nukleotydów; VIG — (ang. *Vasa intronic gene*) czynnik stabilizujący RNA

### I. Wprowadzenie

U wielu eukariontów, w tym również w transkrypcie człowieka, zidentyfikowano liczne RNA, które nie są matrycą do syntezy białek, lecz funkcjonują jako niekodujące RNA (ncRNA) regulujące różne procesy komórkowe. Kodowane przez genom niekodujące RNA są wysoce heterogenne zarówno pod względem funkcji jak i struktury.

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>studentka V roku Wydziału Biologii UAM, <sup>3</sup>prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, tel.: (61)852-8503 wew.136, e-mail: wlokrzy@ibch.poznan.pl



Wyróżnia się konstytutywne RNA, ulegające w komórce ekspresji na stałym poziomie i niezbędne do jej prawidłowego funkcjonowania, oraz regulatorowe RNA, syntetyzowane w określonej fazie cyklu czy stadium rozwoju komórki i zdolne do kontrolowania ekspresji innych genów na poziomie transkrypcji czy translacji [1]. Dodatkowo, ze względu na długość oligomeru we frakcji regulatorowych ncRNA można wyróżnić: (i) podklasę małych 21-25 nukleotydowych mikroRNA (miRNA) działających jako regulatory procesu rozwoju u nicieni, owadów i ssaków; (ii) grupę małych RNA (sRNA) długości ~100 — 200 nt scharakteryzowanych jako regulatory translacji w komórkach bakterii oraz grupę RNA > 10000nt zaangażowaną w blokowanie ekspresji genów u wyższych eukariontów [2].

Klasa mikroRNA jest liczną i szeroko rozgałęzioną filogenetycznie grupą zidentyfikowaną zarówno w transkryptomach roślin, jak i zwierząt. Niektóre mikroRNA wykazują zachowawczość ewolucyjną u organizmów znacznie oddalonych filogenetycznie. Pojedynczy organizm może zawierać setki różnych cząsteczek miRNA, generowanych w całym organizmie lub ulegających ekspresji w sposób swo-

isty dla danego stadium cyklu komórkowego, typu komórki czy rodzaju tkanki. Naturalnie występujące mikroRNA są oligomerami długości 19-25 nukleotydów, powstającymi z tworzącego nieregularną strukturę typu spinka do włosów prekursora pre-miRNA kodowanego przez genom. Wszystkie wydają się być zaangażowane w potranskrypcyjną regulację ekspresji swoistych docelowych mRNA. Większość danych dotyczących mechanizmu działania miRNA pochodzi z badań małych przejściowych RNA, regulujących fazy rozwoju nicienia *Caenorhabditis elegans*. Analizy białek uczestniczących w generowaniu dojrzałych i funkcjonalnych miRNA wykazały zaangażowanie mikroRNA w procesach koniecznych dla prawidłowego rozwoju roślin i zwierząt. Różnorodność składu nukleotydowego i długości sekwencji świadczą o szybko postępującej ewolucji mikroRNA. Ich występowanie zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych sugeruje, że pierwsze miRNA pojawiły się w chwili wykształcenia się złożonego życia wielokomórkowego.

MikroRNA są podobne do małych interferencyjnych RNA (siRNA) indukujących blokowanie ekspresji genów na drodze interferencji RNA (RNAi).

**Tabela 1.**

Charakterystyka porównawcza mikroRNA i dupleksów siRNA

	mikroRNA	siRNA
<b>Podobieństwa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. potranskrypcyjne regulatory ekspresji</li> <li>b. oligomery o podobnej długości 21-25nt generowane przez nukleazę Dicer</li> <li>c. tworzą ~500 kDa kompleks rybonukleoproteinowy z białkami z rodziny PPD</li> <li>d. funkcjonalność obu ncRNA u niższych organizmów zależy od ATP</li> </ul>	
<b>Różnice</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. powstają z prekursora RNA o długości ~70nt posiadającego strukturę typu <i>hairpin</i> z niesparowaniami w trzonie</li> <li>b. aktywną formą jest jednoniciowy oligomer</li> <li>c. działają na regiony 3'UTR mRNA</li> <li>d. komplementarność hybrydy mikroRNA/mRNA nie jest całkowita</li> <li>e. powodują głównie zablokowanie translacji lub rzadko degradację mRNA</li> <li>f. kodowane są endogennie przez geny <i>mir</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. powstają z dsRNA różnej długości jedynie w regionach całkowicie dwuniciowych</li> <li>b. aktywną formą jest dupleks</li> <li>c. działają na dowolne miejsce w mRNA wykazujące komplementarność z antysensową nicią dupleksu</li> <li>d. hybrydują z docelowym mRNA na zasadzie całkowitej komplementarności</li> <li>e. wywołują degradację mRNA</li> <li>f. mają pochodzenie endo i\lub egzogenne</li> </ul>

siRNA są 21-25nt dupleksami RNA powstającymi w wyniku trawienia dwuniciowego RNA (dsRNA) przy udziale wielodomenowej rybonukleazy Dicer [3, 4]. Dojrzałe siRNA tworzą kompleks rybonukleoproteinowy z wielkocząsteczkowym kompleksem RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) zdolny do rozpoznania i degradacji mRNA o sekwencji komplementarnej z antysensową nicią duplesu [5, 6]. Proces blokowania ekspresji genów indukowany siRNA zaobserwowano u zwierząt, roślin i niektórych gatunków grzybów. Jest on prawdopodobnie zaangażowany w ochronę genomu przed wirusami, transpozonomi czy ekspansją sekwencji powtarzających się lub innych aberacyjnych endo- czy egzogennych dsRNA mogących zakłócić stabilność genetyczną komórki. Pod względem struktury i funkcji miRNA i siRNA różnią się między sobą w wielu aspektach, jednak obie cząsteczki powstają z użyciem tych samych mechanizmów enzymatycznych (Tabela 1).

## II. Odkrycie i analiza mikroRNA

Obecnie znanych jest około 300 mikroRNA zidentyfikowanych w komórkach roślin i zwierząt. Pierwszymi reprezentantami grupy i zarazem najlepiej obecnie scharakteryzowanymi miRNA są *lin-4* i *let-7* zaangażowane w rozwój osobniczy nicienia *C. elegans* [7].

### II-1. stRNA — pierwsze mikroRNA

Pierwsze odkryte mikroRNA - *lin-4* i *let-7*, wyodrębnione z grupy niekodujących RNA i nazwane, ze względu na ich przejściową aktywność ekspresyjną, małymi przejściowymi RNA — stRNA (ang. *small temporal RNA*-stRNA), kontrolują postembrionalny rozwój nicienia poprzez regulację ekspresji białek, powstających z transkryptów zawierających w regionach 3'UTR miejsca komplementarne do stRNA [8, 9].

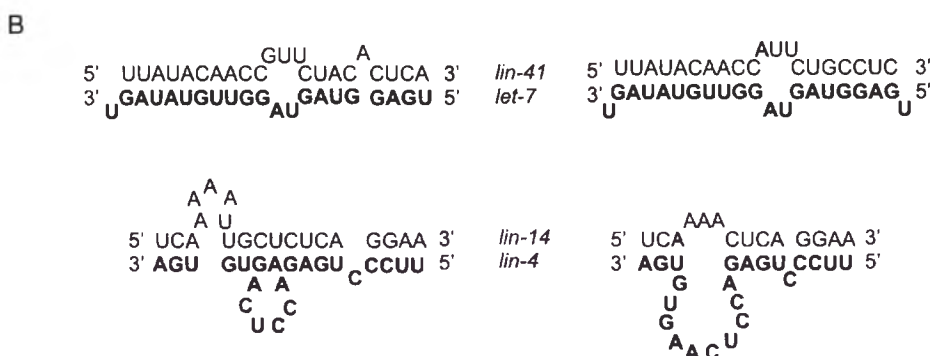
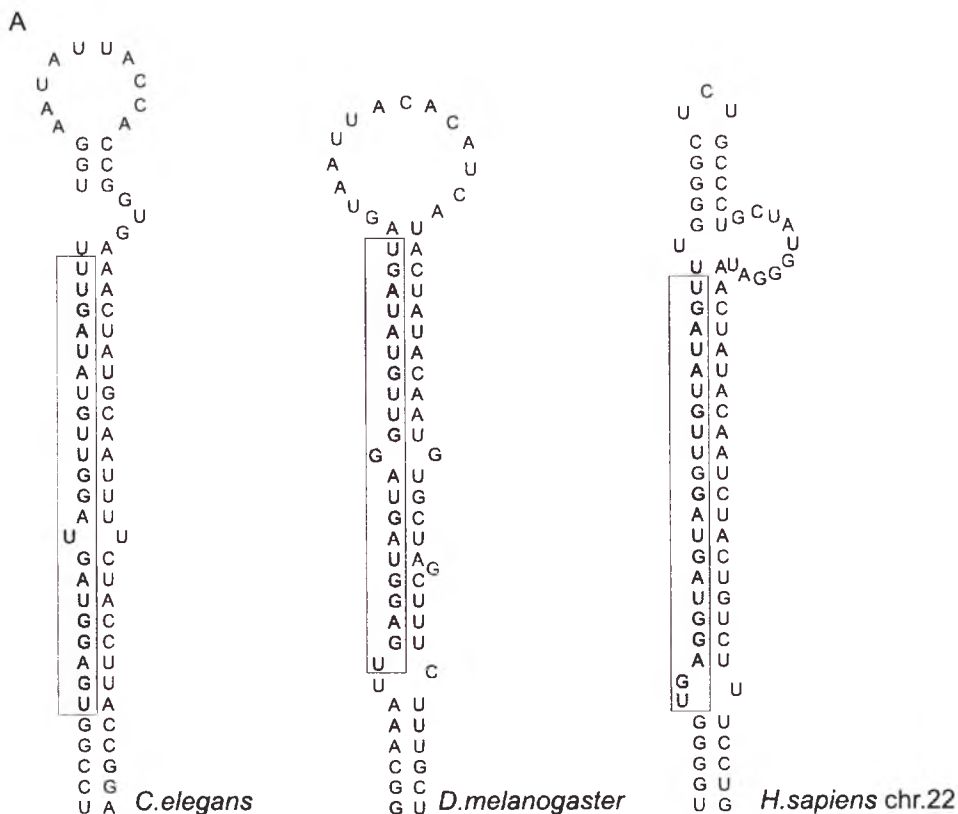
Sklonowanie genów *lin-4* [8] i *let-7* [10, 18] wykazało nietypowość obu sekwencji. Geny stRNA są niewielkich rozmiarów, kodują ~70nt prekursorowe cząsteczki dsRNA (pre-stRNA), z których generowane są dojrzałe ~20nt stRNA i pomimo wysokiej heterotkankowej aktywności ekspresyjnej nie stwierdza się ich produktu białkowego. Gen kodujący *lin-4* został odkryty poprzez analizę opartą na losowym i systematycznym wyszukiwaniu mutantów wykazującego zmieniony wzór podziałów i różnicowania komórkowego [11]. Genom nicienia pofragmentowany na odcinki DNA długości ~700 pz został

sklonowany w poszukiwaniu sekwencji umożliwiającej zniesienie fenotypu *lin-4<sup>-</sup>*. Odnaleziony gen nie zawierał otwartej ramki odczytu homologicznej do znanych sekwencji ORF zachowanych ewolucyjnie u czterech gatunków *Caenorhabditis* i nie kodował białka. Analiza typu *Northern blot* wykazała istnienie dwóch małych RNA komplementarnych do jednej nici genu: dominującego ilościowo 21-22nt RNA (*lin-4S*) oraz mniej licznego 61nt RNA (*lin-4L*). Badanie odporności na działanie nukleaz pozwoliło na precyzyjne zmapowanie końców obu RNA i wykazanie, że mniejszy *lin-4S* jest konstytutywną częścią końca 5' *lin-4L*, stanowiącego potencjalną cząsteczkę prekursorową dla *lin-4S* [8].

Badania te dostarczyły danych o funkcji genu *lin-4* w rozwoju nicienia. 22nt *lin-4* powstający z 61nt prekursora jest aktywatorem przejścia I wczesnego stadium do II wczesnego stadium larwalnego. stRNA *lin-4* jest komplementarny do krótkich sekwencji regionu 3'UTR mRNA *lin-14* i *lin-28*. Transkrypt *lin-14* zawiera siedem miejsc częściowo komplementarnych do RNA *lin-4* stanowiących miejsca docelowe dla stRNA [7]. Mutacje punktowe we wszystkich siedmiu miejscach znoszą regulację rozwoju zależną od *lin-4* [12]. Z kolei w sekwencji 3'UTR *lin-28* znajduje się pojedynczy 15nt region częściowo komplementarny do *lin-4* [13]. Delecja tego miejsca powoduje nieprawidłową ekspresję *lin-28* wynikającą z błędnego funkcjonowania blokowania ekspresji genu zależnego od stRNA.

We wczesnym I stadium larwalnym synteza heterochronicznych białek *Lin-14* i *Lin-28* jest hamowana w wyniku aktywacji ekspresji *lin-4*, co jest sygnałem progresji kolejnej fazy organogenezy nicienia [14]. Mutanty *lin-4<sup>-</sup>* wykazują zmienioną synchronizację rozwoju postembrionalnego z zaburzoną kolejnością etapów larwalnych i linii. Nicienie pozbawione genu *lin-4* wielokrotnie inicjują wczesne stadium larwalne i nie przechodzą do późniejszych etapów rozwoju [15-17].

Gen *let-7* został zidentyfikowany podobnie do *lin-4* poprzez analizę mutantów *C. elegans* wykazujących defekty rozwojowe [18]. Podobnie jak *lin-4*, *let-7* ulega ekspresji zależnie od fazy rozwoju organizmu, osiągając najwyższy poziom aktywności ekspresyjnej podczas ostatniego stadium larwalnego, utrzymującego się do dorosłego stadium nicienia. stRNA *let-7* kontroluje przejście pomiędzy wymienionymi stadiami rozwojowymi. 21nt *let-7* jest analogicznym do *lin-4* potranskrypcyjnym antysensowym represorem translacji, prawdopodobnie aktywnym w stosunku do białek *Lin-41* oraz *Lin-42* zaangażowanych w heterochroniczny szlak rozwoju *C.*



**Ryc. 1.** Sekwencja stRNA i hybrydów stRNA/mRNA. A. Przewidziana komputerowo drugorzędowa struktura prekursora pre-let-7 *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Homo sapiens*. Region odpowiadający dojrziałemu let-7 zaznaczono prostokątem. B. Dwa miejsca wiązania let-7 w regionie 3'UTR mRNA lin-41 wykazują różnice w strukturze tworzonego dupletu hybrydizacyjnego. Podobne właściwości mogą wykazywać interakcje pomiędzy lin-4 a jego docelowym mRNA.

*elegans*. Dwa częściowo komplementarne miejsca w regionie 3'UTR transkryptu lin-41 stanowią miejsca oddziaływania z let-7 [19]. Docelowym mRNA dla let-7 może też być lin-14 zawierający w regionie 3'UTR obszary komplementarne do obu stRNA.

stRNA let-7 jest zachowawczy filogenetycznie pod względem długości i składu zasad we wszystkich organizmach o bilateralnej symetrii ciała (Ryc. 1A) [20]. Sekwencję identyczną z 21nt oligomerem let-7 odnaleziono w genomach owada (*Drosophila melanogaster*) i człowieka. U obu gatunków zidentyfikowano RNA o długości 21-22nt wykorzystując hybrydizację Northern blot, co dowodzi aktywnej ekspresji genu let-7 w komórkach obu organizmów.

Transkryptów let-7 nie wykryto jedynie u parzydełkowców i gąbek [21]. Ortologi docelowej sekwencji mRNA dla let-7 odnaleziono u licznych wielokomórkowców łącznie z człowiekiem [20].

Początkowe analizy transkryptomów wielu organizmów, prowadzone metodą Northern blot, nie wykazały obecności sekwencji prekursora let-7. W przypadku *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Homo sapiens* sekwencja genomowa let-7 wraz z regionami otaczającymi miRNA, potencjalnie umożliwiała transkrypcję dłuższego RNA o drugorzędowej strukturze nieregularnej spinki do włosów, podobnej do lin-4L. Prekursor pre-let-7, posiadający swoistą gatunkowo długość ~70nt, został



wykryty dopiero po inaktywacji rybonukleazy Dicer odpowiedzialnej za generowanie dojrzałych mikroRNA poprzez trawienie cząsteczek prekursora [22-24].

Pod względem funkcji, stRNA lin-4 i let-7 są najlepiej scharakteryzowanymi mikroRNA lecz mechanizm ich działania jako regulatorów ekspresji genów określony został najdokładniej jedynie w przypadku *C.elegans*. Liczne ortologi stRNA wykryte u innych organizmów wykazują przejściową aktywność regulacyjną podobną do modelu typowego dla let-7; sądzi się zatem, że również funkcjonują w potranskrypcyjnej regulacji genów rozwojowych [21]. Stwierdzono, że transkrypty let-7 pojawiają się u *D. melanogaster* zależnie od stadium rozwoju owada, a u człowieka ich ekspresja jest specyficzna tkankowo. W komórkach *Drosophila* ekspresja let-7 osiąga najwyższy poziom w późnej fazie rozwoju, co w odniesieniu do *C. elegans*, sugeruje zachowane ewolucyjnie znaczenie stRNA w regulacji rozwoju.

Obserwacje specyficznych cech stRNA stanowiły punkt zwrotny w zainteresowaniu mikroRNA i przy-

czyniły się do systematycznych i pełniejszych przeszukiwań sekwencji genomowych w celu identyfikacji małych, aktywnych transkryptów wykazujących niezwykle cechy regulatorów ekspresji.

## II-2. Identyfikacja populacji mikroRNA u zwierząt

Dane z prowadzonych na szeroką skalę eksperymentów sekwencjonowania genomów dostarczyły informacji o obecności licznych regionów nie kodujących białek, a wykazujących aktywność transkrypcyjną w genomowym DNA eukariontów. Część tych *loci* stanowi frakcja genów kodujących funkcjonalne i zdefiniowane ncRNA. Systematyczne badania genomu w poszukiwaniu genów ncRNA z wykorzystaniem technik bioinformatycznych, biochemicznych czy genetycznych, przyczyniły się do identyfikacji kolejnych aktywnych mikroRNA, analogicznych funkcjonalnie do lin-4 i let-7 *C. elegans* (Tabela 2). Stosując klonowanie bibliotek cDNA, hybrydyzacje typu *Northern* czy analizę bioinformatyczną zidentyfikowano dziesiątki nowych mikro-

**Tabela 2.**

Kryteria identyfikacji miRNA (wg. 81, zmienione)

<b>Kryterium ekspresji</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. detekcja przez hybrydyzację typu <i>Northern</i> różnych transkryptów ~22nt jako wyselekcjonowanych pod względem długości frakcji RNA</li> <li>b. identyfikacja sekwencji ~22nt z bibliotek cDNA wygenerowanych z wyselekcjonowanego pod względem długości RNA; takie sekwencje powinny odpowiadać sekwencji genomowej organizmu, z którego pochodzą klony</li> </ul>
<b>Kryterium biogenezy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. przewidywanie drugorzędowych struktur prekursorów pre-miRNA zawierających sekwencję ~22nt miRNA w układzie 3' lub 5' dwuniciowego trzonu struktury RNA typu <i>hairpin</i>; drugorzędowa struktura przyjmowana przez sekwencję prekursora miRNA powinna tworzyć strukturę o najniższej energii swobodnej jaką przewiduje program MFOLD [Mathews i in. 1999 J. Mol. Biol. 288:911-940] lub inne konwencjonalne programy przewidywania struktur RNA; struktura pre-miRNA nie powinna zawierać dużych wewnętrznych pętli, a w szczególności dużych asymetrycznych wybrzuszeń; u zwierząt struktury prekursorów są zwykle 60-80nt, podczas gdy u roślin ich długość jest bardziej zmienna i może sięgać kilkuset nukleotydów</li> <li>b. filogenetyczna zachowawczość ~22nt sekwencji miRNA i drugorzędowych struktur pre-miRNA</li> <li>c. wykrywanie akumulacji prekursorów miRNA w komórkach organizmów pozbawionych funkcjonalnej rybonukleazy Dicer</li> </ul>

RNA stanowiących części składowe transkryptomów *C. elegans*, *D. melanogaster*, *Mus musculus* czy *Homo sapiens* [16, 25-28].

Długość dojrzałych mikroRNA u zwierząt jest swoista gatunkowo i wynosi 21-25nt. Istnieje niewielka grupa miRNA o innej długości. Niektóre mikroRNA są kodowane przez kilka genomowych *loci*, jednak brak jest danych dotyczących istnienia mechanizmu regulującego lub koordynującego ich ekspresję na poziomie komórkowym. Sekwencje niektórych miRNA pochodzących z tego samego organizmu są bardzo podobne do siebie, różniąc się jednym lub kilkoma nukleotydami. Nie wiadomo jednak czy istnieją między nimi również podobieństwa funkcji.

### II-2-1. Metody bioinformatyczne

Metody komputerowej identyfikacji regionów genu kodujących białka są nieefektywne w przypadku poszukiwania sekwencji genów miRNA, gdyż stosując kryteria wykorzystywane dla genów białkowych możliwe jest przeoczenie genów miRNA. Ponadto, mikroRNA mogą nie występować w konwencjonalnych bibliotekach cDNA generowanych z poliadenylowanego mRNA. Wykorzystując swoiste cechy transkryptów stRNA let-7 i lin-4 opracowano metodologię bioinformatyczną, umożliwiającą wyszukiwanie regionów genu, mogących stanowić potencjalną matrycę do syntezy transkryptu ~65nt, tworzącego drugorzędową strukturę typu spinki do włosów. Drugim kryterium kwalifikującym daną sekwencję jako potencjalny region kodujący mikroRNA jest analiza porównawcza sekwencji DNA pomiędzy ortologami miRNA różnych gatunków. Banki genów, zawierające całkowicie lub częściowo kompletną sekwencję genomową różnych gatunków, przeszukiwane są pod kątem obecności sekwencji miRNA wyizolowanych i dobrze scharakteryzowanych u jednego gatunku. Przykładowo, sekwencje miR-34, miR-60, miR-72, miR-79 i miR-84 odkryte u *C. elegans* odnaleziono w genomie *D. melanogaster*. Z kolei sekwencję kodującą miR-39 zidentyfikowano na podstawie zachowawczości ewolucyjnej, gdyż stanowiła składnik grupy *loci* miRNA u *C. elegans* i *C. briggsae* [18].

W badaniach miRNA *C. elegans* prognozowanie sekwencji ncRNA wykonano z użyciem programu MFOLD, umożliwiającego przewidywanie drugorzędowych struktur helis, pętli i wybrzuszeń formowanych przez badany transkrypt [29]. Wybrana sekwencja stanowiła potencjalny bezpośredni prekursor mikroRNA. Wyselekcjonowano 40 sekwencji tworzących *in silico* struktury typu *hairpin* RNA od-

powiadające wielkością i strukturą drugorzędową prekursorom pre-let-7 i pre-lin-4. Z frakcji ~22nt RNA wyizolowanych z cRNA, przygotowano biblioteki cDNA. Ponad 5000 niezależnych insertów reprezentujących 3600 różnych sekwencji poddano procedurze sekwencjonowania. Każdą z sekwencji cDNA porównano w bazie BLAST do 800000 fragmentów genu *C. briggsae* oraz do znanych sekwencji genomowych innych gatunków. Pojedyncze kopie sekwencji cDNA, odpowiadające nieznanym wcześniej transkryptom zidentyfikowanym w genomie *C. briggsae*, poddano modelowaniu komputerowemu w programie mFold w celu ustalenia struktur drugorzędowych. Blisko 40 nowych sekwencji cDNA kodowało transkrypty tworzące drugorzędowe struktury typu *hairpin*, z czego 13 użyto do hybridyzacji typu *Northern*. We wszystkich przypadkach stwierdzono obecność małych transkryptów o długości ~22nt [25].

Powstał również program komputerowy MiRscan umożliwiający monitorowanie sekwencji genu w poszukiwaniu genów miRNA. MiRscan na podstawie dopasowania do ustalonych kilkietapowych okien standardów wstępnie kwalifikuje konserwatywną sekwencję nukleotydową, przyjmującą charakterystyczną strukturę drugorzędową, jako potencjalną sekwencję prekursora pre-miRNA [30].

### II-2-2. Metody genetyczne

Metodologia klonowania fragmentów cDNA odpowiadających małym 22nt transkryptom RNA została opracowana w badaniach procesu interferencji RNA [6] i zaadaptowana do poszukiwania mikroRNA. Frakcje krótkich RNA generowane w reakcji odwrotnej transkrypcji z cDNA izolowanego z całych organizmów (*C. elegans*, *D. melanogaster*), kultur komórkowych czy tkanek ssaków poddawano selekcji pod względem długości poprzez rozdział elektroforetyczny. Cząsteczki ~20nt wprowadzano w wektory zawierające adaptory końców 5' i 3' dla małych transkryptów generowanych w komórce przy udziale RNazy klasy III. Dzięki takiej selekcji pozytywne klon zawierały jedynie sekwencje RNA powstałe w wyniku działania nukleazy takiej jak Dicer i stanowiące potencjalne mikroRNA. Po odwrotnej transkrypcji i amplifikacji metodą PCR, plazmidy skonstruowanych potencjalnych bibliotek mikro-cDNA klonowano w układach prokariotycznych i poddawano sekwencjonowaniu. Sekwencje insertów porównywano ze znanymi sekwencjami RNA transkryptomu *D. melanogaster*.

Metoda pozwoliła na zidentyfikowanie małych 20-23nt transkryptów ulegających ekspresji we wczesnych embrionach owadów. Analogiczną metodę poszukiwania mikroRNA zastosowano w komórkach HeLa, co umożliwiło zidentyfikowanie ludzkich miRNA. Geny kodujące klonowane transkrypty znajdowały się w obszarach eksonowych lub pomiędzy sekwencjami genów kodujących białka [31]. Dla większości nowych RNA zidentyfikowano sekwencje dłuższych prekursorów przyjmujących *in silico* drugorzędowe struktury RNA typu *hairpin* podobne do prekursorów pre-lin-4 i pre-let-7 [16, 25, 26].

### II-2-3. Metody biochemiczne

W identyfikacji mikroRNA wykorzystano również badania biochemiczne ukierunkowane na analizę mechanizmu powstawania i działania miRNA. Liczne ludzkie mikroRNA wyizolowano i sklonowano na podstawie ich wiązania się z kompleksem wielobiałkowym zaangażowanym w szlak generowania miRNA [27]. W badaniach tego typu zastosowano immunoprecypitację z przeciwciałami przeciwko białkom Gemin3, Gemin4 oraz IF2C.

W większości eksperymentów poprzez hybrydację typu *Northern* potwierdzono, że sklonowane geny ulegają ekspresji jako małe transkrypty. Analiza ta dostarczyła informacji na temat przestrzennego i czasowego profilu ekspresji prekursora i dojrzałego miRNA.

Pomimo sukcesów w identyfikacji nowych miRNA, należy mieć na uwadze, że jedynie niewielki procent tych ncRNA został wykryty. Chromosomy eukariontów zawierają liczne regiony nie kodujące białek, a ulegające aktywnej transkrypcji. Nie wiadomo jednak, jak wiele z nich koduje zdefiniowane i funkcjonalne miRNA [32]. Liczbę miRNA u *C. elegans* szacuje się na setki do tysięcy różnych cząsteczek w komórce. W przypadku wyższych eukariontów liczba ta może być znacznie wyższa [33].

Rozwinięcie metodologii poszukiwania genów mikroRNA stanowi z pewnością krok naprzód do zdefiniowania RNomu miRNA. Odnotowuje się jednak pewne ograniczenia w istniejących podejściach definiowania miRNA. Większość metod bioinformatycznych skupia się na przeszukiwaniu międzygenowych regionów genomu. Niektóre ncRNA powstają jednak z dłuższych transkryptów kodujących białka lub rRNA [34]. Istnieje zatem możliwość niewykrycia miRNA występującego w jednym transkrypcie z innym RNA zwłaszcza, że jest mało prawdopodobne, by miRNA ulegał ekspresji z przeciwnej nici genów kodujących białka. Z kolei metody badania ekspresji

mogą pominąć ncRNA syntetyzowane w ściśle zdefiniowanych warunkach, w odpowiedzi na specyficzne sygnały środowiska, podczas swoistych stadiów rozwoju czy w określonym typie komórek. Pułapką łowienia miRNA poprzez klonowanie cDNA jest również możliwość generowania bibliotek klonów z fragmentów innych niekodujących RNA (np. rRNA, tRNA czy snRNA) jak również mRNA o podobnych wyselekcjonowanych dłu gościach.

### II-3. mikroRNA roślin

W komórkach *Arabidopsis thaliana* metodą klonowania zidentyfikowano i wyizolowano ponad 100 mikroRNA [35-37]. Homologi niektórych z nich odnaleziono w ryżu, tytoniu i kukurydzy. Roślinne mikroRNA wykazują wiele cech charakterystycznych dla zwierzęcych miRNA. Generowane są z częściowo helikalnego prekursora przy udziale rybonukleazy typu Dicer nazwanej DCLI lub CAF i wykazują ekspresję specyficzną tkankowo. Cząsteczki roślinnych pre-mikroRNA są trzykrotnie dłuższe i wykazują bardziej stabilną drugorzędową strukturę w porównaniu z prekursorami zwierzęcych mikroRNA [35, 36, 38, 39]. Nie stwierdzono zachowanych ewolucyjnie identycznych mikroRNA w komórkach roślin i zwierząt.

## III. Charakterystyka mikroRNA

### III-1. Nazewnictwo miRNA

MikroRNA nazywa się używając prefiksu „miR” i unikatowego numeru identyfikacji (np. miR-1, miR-2,... miR-89, itd.). Nazwy genów kodujących mikroRNA zawierają takie same trzy litery prefiksu i numer pisane kursywą zgodnie z przyjętymi zasadami dla poszczególnych gatunków (np. *mir-1* u *C. elegans* i *D. melanogaster*, *MIR156* u *A. thaliana* i ryżu). Numer identyfikacji jest wyznaczony zgodnie z kolejnością występowania w sekwencji genu. Identyczne miRNA różnych gatunków oznaczone są takim samym numerem. Jeśli w danym organizmie stwierdza się identyczne miRNA generowane z różnych prekursorów do ich nazwy dodawany jest drugi numer porządkowy (np. miR-6-1 i miR-6-2). Podobne miRNA, różniące się między sobą sekwencją kilku nukleotydów, również opisywane są takim samym numerem identyfikacji uzupełnionym o dodatkowe litery porządkowe (np. miR-19a i miR-19b człowieka, miR-13a i miR-13b owadów czy let-7e i let-7f nicienia).



Poszukiwania nowych miRNA prowadzone są na dużą skalę. Konieczne jest zatem śledzenie postępu w nazewnictwie miRNA w celu uniknięcia powtarzania tych samych nazw określających różne mikroRNA. Baza danych dostępna online (<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>) dostarcza informacji o cząsteczkach ncRNA [40]. Baza europejskiego konsorcjum EURIT zawiera aktualne dane o miRNA opisanych w publikacjach lub w manuskryptach przyjętych do druku (<http://www.eurit-network.org>).

### III-2. Prekursor mikroRNA

Większość znanych mikroRNA generowanych jest w sposób asymetryczny z pre-mikroRNA, którego region helikalny zawiera niesparowania w postaci wyrzuseń i pętli wewnętrznych. Cząsteczka prekursora powstaje z dłuższego transkryptu (pri-miRNA) wytwarzanego w jądrze komórkowym jako pierwotny transkrypt genów *mir* i stanowiącego cząsteczkę macierzystą prekursora [41].

Filogenetyczne dowody pochodzące z badań porównawczych homologicznych genów *mir* potwierdzają duże znaczenie struktury prekursora dla właściwej syntezy dojrzałych mikroRNA. W przypadku występowania kilkunukleotydowych różnic pomiędzy homologicznymi mikroRNA *C. elegans* i *Caenorhabditis briggsae* często obserwuje się kompensacyjne zmiany w antyrównoległych niciach struktury trzonu prekursora mikroRNA, pozwalające na zachowanie charakterystycznej struktury drugorzędowej [25]. Podobnie pre-miRNA *A. thaliana* oraz sekwencje genomowe ryżu wykazują znaczącą zachowawczość w drugorzędowej strukturze prekursora niezależnie od sekwencji [36]. W przypadku ludzkich miR-30 oraz miR-21 sparowane nukleotydy u podstawy trzonu prekursora wydają się mieć krytyczne znaczenie dla prawidłowego dojrzewania mikroRNA [42]. Wprowadzenie do sekwencji pre-miR-21 lub pre-miR-30 mutacji punktowych, które likwidują sparowania w trzonie prekursora, praktycznie eliminuje powstawanie dojrzałych miRNA. Ponadto, substytucje zaprojektowane w celu zaburzenia struktury w centrum helisy trzonu hamują zdolność miR-21 do blokowania ekspresji genów [42].

Funkcjonalne miRNA mogą powstawać zarówno ze strony 3' jak i 5' trzonu prekursora. Częstość występowania miRNA po jednej ze stron zaburzonej helisy pre-miRNA jest różna. Szacuje się że 25 % miRNA generowanych jest ze strony 5' prekursora ( w tym *lin-4* i *let-7*) a pozostała część z 3' strony [25]. Stabilny produkt działania rybonukleazy Dicer może

pochodzić z któregokolwiek z dwóch ramion prekursora, aczkolwiek nie jest znany mechanizm determinujący stronę donorową. Przypuszcza się, że w procesie tym uczestniczy rodzina białek ARGONAUTE, zdolnych do rozpoznania ramienia prekursora zawierającego sekwencję funkcjonalnego mikroRNA i przekazania informacji rybonukleazie Dicer [26, 43]. Niektóre cząsteczki prekursorów zawierają funkcjonalne miRNA generowane z obu stron trzonu. Tak jest w przypadku miR-56 i miR-56\* (\* -mikroRNA występujący w mniejszej ilości w transkryptomie) oraz miR-17 i miR-91 wycinanych z pre-miRNA w procesie przypominającym syntezę siRNA indukowaną rybonukleazą Dicer [25, 27, 36]. Mechanizm wycinania miRNA wydaje się zatem być bardzo złożony.

### III-3. Geny mikroRNA

Rozmieszczenie genów *mir* w genomie nie jest przypadkowe. Mogą być one zlokalizowane wewnątrz eksonów, intronów lub między genami kodującymi białka [31]. Większość poznanych dotąd genów *mir* leży w rejonach międzygenowych i jest oddalona od znanych *loci* o co najmniej 1000pz. Ich ekspresja zachodzi z niezależnych jednostek transkrypcyjnych, wcześniej niezidentyfikowanych za względu na brak otwartych ramek odczytu. Geny miRNA zajmujące położenie blisko regionów kodujących (np. *mir-65*) czy wewnątrz intronów (np. *mir-70*) ulegają autonomicznej ekspresji dzięki własnym sekwencjom promotorowym [25, 31]. U *C. elegans* w regionie przed sekwencją kodującą *let-7* stwierdzono występowanie regulatorowego elementu TRE (ang. *temporal regulatory element*) o długości 116 pz, koniecznego i wystarczającego do kontrowania ekspresji stRNA w fazie L3/L4 rozwoju nicienia [44]. Region TRE zawiera 22pz fragment odwróconych powtórzeń (IR) zachowany ewolucyjnie u *C. briggsae* i stanowiący miejsce wiązania działającego w układzie *trans* czynnika TREB będącego potencjalnym aktywatorem transkrypcji *let-7* [44].

Często geny miRNA tworzą zgrupowania czy zespoły genowe. Przykładem jest zespół 7 paralogów miRNA w genomie *C. elegans* zawierający geny *mir-35 - 41*, zlokalizowany w chromosomie 2. Homologiczne zgrupowanie u *C. briggsae* zawiera 8 paralogów. Niektóre z miRNA w zgrupowaniu u *C. elegans* są bardziej podobne do siebie nawzajem, niż do swoich odpowiedników w zgrupowaniu *C. briggsae* i odwrotnie. Bliskie sąsiedztwo genów miRNA wewnątrz zespołu *mir-35 - 41* sugeruje, że ulegają

one transkrypcji jako policistronowy prekursorowy transkrypt RNA, co potwierdza skoordynowana ekspresja tych genów kontrolowana przez wspólne elementy regulatorowe. Podobna do operonu organizacja i charakterystyczna ekspresja pozwala wysnuć hipotezy odnośnie potencjalnych funkcji zgrupowanych genów mikroRNA [25]. Jedna z nich dotyczy skoordynowanej kontroli zespołu niezależnych docelowych mRNA, gdzie każdy miRNA kodowany z danej grupy genów mógłby celować w odmienny mRNA dla zahamowania translacji jakiejś rodziny transkryptów. W innym przypadku zmasowanego ataku na wspólny cel, cały zespół mikroRNA mógłby koncentrować się na tym samym mRNA, tak jak *lin-4* i *let-7*, potencjalnie aktywne wobec 3' UTR docelowego *lin-14* [25, 31].

Podobne zgrupowania genomowe zidentyfikowano u *D. melanogaster* (np. zespół genów *mir-3 - mir-6*) oraz w ludzkich komórkach HeLa (np. zespół genów *mir-17 - mir-20* z chromosomu 13) [26].

Niektóre mikroRNA kodowane są w kilku różnych *loci* genomowych. U roślin wiele miRNA, zidentyfikowanych na podstawie metody klonowania, ma wiele genomowych miejsc matrycowych [35]. Sekwencje ludzkiego genu *let-7a* odnaleziono w czterech chromosomowych *loci*. W dwóch z tych *loci* występują zduplikowane sekwencje kodujące cząsteczki prekursorowe o identycznych strukturach drugorzędowych [26].

#### IV. Biochemia biogenezy i funkcji mikroRNA

W jądrze komórkowym z pierwotnego pri-miRNA transkrybowanego jako mono- lub policistronowy RNA generowany jest, przy udziale rybonukleazy Drosha [82], ~60-70nt prekursor pre-microRNA o strukturze spinki do włosów. Swoista struktura prekursora miRNA jest rozpoznawana przez białko transportujące, które eksportuje pre-miRNA na teren cytoplazmy. Fakt przyjmowania przez pre-mikroRNA struktury zaburzonej helisy o długości (~70 nt) przypomina inną grupę niekodujących RNA, a mianowicie tRNA czy UsnRNA. pre-mikroRNA może być zatem potencjalnym substratem dla jądrowych czynników eksportu Eksportyny-t czy Eksportyny-1/CRM1 [45]. Czynniki transportujące cząsteczki tRNA czy UsnRNA z jądra do cytoplazmy mogą potencjalnie rozpoznawać transkrypty pre-mikroRNA o podobnej długości [46].

Kolejny etap biogenezy zachodzi na terenie cytoplazmy, gdzie pre-miRNA hydrolizowany jest przez rybonukleazę Dicer i prawdopodobnie przez inne rybonukleazy do formy dojrzałego ~22nt mikroRNA

[41]. Funkcjonalne ludzkie mikroRNA wiążą się w ~550 kDa (15S) kompleksy rybonukleoproteinowe z białkami Gemin3, Gemin4 i eIF2C2 [27]. Ludzki homolog *let-7* związany w mikroRNP indukuje blokadę ekspresji komplementarnego docelowego mRNA [47]. Kompleks miRNP jest odpowiednikiem kompleksu RISC, zaangażowanego w proces interferencji RNA i umożliwia translacyjną kontrolę mRNA.

Mechanizm biogenezy miRNA u roślin różni się od opisanego wcześniej procesu generowania zwierzęcych mikroRNA. Pomimo, że białka DCL1 i CAF, homologi Dicer, uczestniczą w generowaniu miRNA u *A. thaliana* [48], cząsteczki pre-miRNA stanowią znikomą, trudną do wyizolowania frakcję w komórkach rzodkiewnika, podczas gdy dojrzałe mikroRNA obserwowane są z łatwością [35, 36]. Ponadto u wielokomórkowców obniżenie aktywności rybonukleazy Dicer powoduje wzrost liczebności pre-miRNA w komórce, podczas gdy mutanty CAF<sup>-</sup> posiadają obniżony poziom mikroRNA bez towarzyszącej akumulacji cząsteczek prekursora [36]. Mając na uwadze przynależność CAF i DCL1 do grupy białek jądrowych sugeruje się, że niektóre roślinne miRNA mogą być generowane w jądrze komórkowym w trakcie lub zaraz po transkrypcji pierwotnego pri-miRNA [49]. Dojrzałe mikroRNA mogą następnie ulegać transportowi do cytosolu jako części składowe kompleksów miRNA.

Analizy genetyczne i biochemiczne pozwoliły na bliższe określenie niektórych białek biorących udział w biogenezie miRNA. Niektóre z tych czynników zostały wcześniej scharakteryzowane jako regulatory metabolizmu i translacji RNA. Fakt zaangażowania tych białek również w genozę i aktywność siRNA w procesie RNAi wskazuje na powiązania obu procesów.

##### IV-1. Rybonukleazy Dicer i DCL1

Rybonukleaza Dicer hydrolizuje dsRNA na małe dupleksy siRNA w procesie RNAi oraz generuje dojrzałe mikroRNA z prekursora pre-miRNA u *D. melanogaster*, *C. elegans* i ssaków [16, 22, 50-52]. Homologiczne białko DCL1 (ang. *Dicer-Like1*) wymagane jest do wytworzenia miRNA u *A. thaliana* [53, 54].

Struktura i skład domen wszystkich ortologów białek Dicer i DCL1 wskazują na silną konserwatywność filogenetyczną obu nukleaz. Białka zawierają N-końcową domenę helikazową typu DEXH/DEAH box z siedmioma motywami charakterystycznymi dla superrodziny helikaz II [55, 56]. Mutageneza celowana w poszczególne motywy wykazała ich zaan-

gażowanie w wiązanie ATP (motyw I), hydrolizie (motywy II i VI) oraz rozplatanie RNA (motyw III) [57]. Na końcu karboksylowym nukleazy zawierają dwie domeny pochodne RNazy III oraz motyw wiązania się z dwuniciowym RNA (dsRBM) [55]. Sekwencja kodująca katalityczną domenę RNazową obecna jest w sekwencji cDNA w dwóch powtórzeniach. Pierwszą kopię stwierdzono u sześciu ortologów - u drożdży, rzodkiewnika, nicienia, owada, myszy i człowieka, brak jej natomiast w RNazie III bakterii *E. coli*. Druga sekwencja oraz motyw dsRBM, stanowiące rdzeń struktury polipeptydu, występują konserwatywnie we wszystkich organizmach. Obecność dwóch katalitycznych podjednostek rybonukleazowych sugeruje, że nukleazy funkcjonują jako dimer, a skoordynowane działanie czterech perfekcyjnie zlokalizowanych domen umożliwia generowanie produktu o zdefiniowanej długości. W Dicer oraz DCL1 scharakteryzowano również domenę PAZ (ang. *Pinwheel-Argonaute-Zwille*), charakterystyczną dla rodziny białek ARGONAUTE [58]. Domena ta jest ~ 110 aminokwasowym regionem o słabo poznanej funkcji, wykazuje jednak wysoką konserwatywność we wszystkich ortologach (z wyjątkiem RNazy III *S. pombe*) [59]. Motyw PAZ jest potencjalnym miejscem oddziaływań typu białko-białko pomiędzy rybonukleazą a innymi peptydami z rodziny ARGONAUTE, kierującymi dalszymi etapami mechanizmu działania mikroRNA lub RNAi [58, 60, 61].

Nukleaza Dicer hydrolizuje dsRNA na dupлекsy siRNA długości ~22nt zawierające na końcach 3' po dwa niesparowane nukleotydy. Zgodnie z właściwościami nukleaz klasy III generowane z pre-miRNA 15-30nt oligomery mikroRNA, podobnie jak siRNA, zaopatrzone są na końcu 3' w grupę hydroksylową a na końcu 5' w monofosforan i występują jedynie w formie jednoniciowej [3, 22, 58]. Różnice w strukturze produktu wynikają najprawdopodobniej z natury kompleksów białkowych zaangażowanych w genezę obu rodzajów ncRNA lub ze swoistej struktury cząsteczki dwuniciowego RNA, z którego są uwalniane.

#### IV-2. HEN1

Białko HEN1 pełni rolę regulatorową w rozwoju *A. thaliana* [62]. Mutanty pozbawione funkcjonalnego genu *HEN1* fenotypowo odpowiadają organizmom z wadliwym genem kodującym *CAF*. Homologi HEN1 kodowane są przez genomy niektórych zwierząt i grzybów lecz ich funkcja jest nieznana.

Roślinny czynnik HEN1 bierze udział w tworzeniu i stabilizacji dojrzałych mikroRNA [37].

#### IV-3. Białka PPD

Białka z domeną PIWI/PAZ (ang. *PIWI/PAZ domain protein PPD*), również nazywane rodziną ARGONAUTE, uczestniczą w generowaniu i funkcjonowaniu mikroRNA. Wielokomórkowe organizmy roślinne i zwierzęce oraz drożdże *Schizosaccharomyces pombe* kodują od kilku do kilkudziesięciu różnych białek PPD. Białka z rodziny ARGONAUTE zawierają dwie konserwatywne domeny: ~300 aminokwasowy motyw *PIWI-box* znajdujący się bliżej końca C regionu ORF oraz centralnie zlokalizowaną domenę PAZ [59].

W komórkach *C. elegans* białka PPD ALG-1/ALG-2 uczestniczą w tworzeniu i utrzymaniu populacji dojrzałych form *lin-4* i *let-7*, jednocześnie nie biorąc udziału w procesie RNAi [22]. Mutanty pozbawione funkcjonalnych genów *alg* wykazują zmiany embrionalne nie wywołane błędami w metabolizmie *lin-4* i *let-7*, co sugeruje zaangażowanie ALG-1 i ALG-2 w genezę również innych mikroRNA istotnych dla rozwoju organizmu.

W komórkach ssaków zidentyfikowano inne białka z grupy PPD zaangażowane w regulację aktywności mikroRNA. Ludzki czynnik inicjujący eIF2C2 (95 kD) jest składnikiem kompleksu miRNP kierującego rozpoznaniem i blokowaniem ekspresji transkryptów komplementarnych do mikroRNA [27]. Białko eIF2C2 działa jako stabilizator dojrzałych miRNA chroniąc je przed atakiem nukleolitycznym. U *D. melanogaster* białkiem wiążącym miRNA jest ARGONAUTE1, komponent kompleksu RISC działającego w procesie RNAi, co sugeruje że oba mechanizmy regulacji ekspresji genów mogą posiadać wspólne maszyny enzymatyczne [63].

Prawdopodobnie różne białka PPD wymagane są do produkcji, stabilizacji czy funkcjonowania różnych podklas mikroRNA. Czynnikiem determinującym powiązania mikroRNA-białko mogą być: swoista sekwencja miRNA, struktura prekursora lub wewnątrzkomórkowa lokalizacja docelowego transkryptu. Ludzkie białko eIF2C1 (w 85% identyczne z eIF2C2), obecne na terenie struktur Golgiego i ER, może odgrywać rolę w zależnej od miRNA translacyjnej regulacji wydzielanych białek [64, 65].

#### IV-4. Gemin3/Gemin4

W komórkach ludzkich kompleksy rybonukleo-proteinowe miRNP zawierające cząsteczki doj-



rzałych mikroRNA tworzone są, oprócz czynnika eIF2C2, z białek Gemin [27]. Gemin3 jest helikazą RNA z motywem DEAD-*box* potencjalnie rozplatającą RNA oraz/lub rekonstruującą kompleks RNP podczas dojrzewania miRNA czy rozpoznawania i wiązania docelowego mRNA. Funkcja Gemin4 jest nieznana.

Białka Gemin3, Gemin4 i eIF2C2 mogą stanowić komponenty wszystkich miRNP, lecz niewykluczone jest zaangażowanie innych czynników białkowych w budowę funkcjonalnych kompleksów mikroRNA-białka. Gemin3 posiada zdolność wiązania się z różnymi białkami ARGONAUTE. Stwierdzono również, że różne białka z rodziny ARGONAUTE tworzą zespoły proteinowe z różnymi helikazami.

Gemin3 oraz Gemin4 zostały ponadto zidentyfikowane w kompleksach białek SMN (ang. *Survival of Motor Neurons*), wykazujących obniżony poziom w atrofiach mięśniowo-rdzeniowych. Fakt ten pozwala na postawienie hipotezy, że kompleks SMP, kluczowy czynnik biogenezy i funkcjonalności różnych RNP w komórce, może być pośrednio zaangażowany w szlak działania miRNP [27].

#### IV-5. FMRI i VIG1

W komórkach *D. melanogaster* zaobserwowano wiązanie się białek dFMRI i VIG1 z miRNA [63]. Białko VIG kodowane jest wewnątrz intronu genu *Vasa* i zawiera domenę RGG-*box* wiązania z RNA. VIG jest ewolucyjnie konserwatywnym białkiem, którego homologi odnaleziono u *C. elegans*, *A. thaliana*, *S. pombe* i ssaków. Niewiele wiadomo odnośnie funkcji tej rodziny białek. Jednakże ludzki homolog VIG, białko PAI-RBP-1, został zidentyfikowany jako czynnik regulujący stabilność i mający powinowactwo do bogatych w AT elementów regionu 3'UTR RNA inhibitora aktywności plazminogenu (PAI) [66].

Rodzina białek FMRP (ang. *Fragile X mental retardation protein*) zawiera dwie kopie domeny KH (ang. *hnRNP K homology*) i motyw RGG-*box*. Wszystkie te podjednostki umożliwiają wiązanie się z RNA [67, 68]. FMRP są regulatorami translacji. Pojawiły się spekulacje na temat ich zaangażowania w regulację ekspresji genów indukowaną mikroRNA lub siRNA [63].

#### V. Mechanizm działania i biologiczna funkcja mikroRNA

Kompleks miRNP zawierający funkcjonalny mikroRNA rozpoznaje docelowy mRNA i wiążąc się w

regionie 3'UTR hamuje translację najprawdopodobniej zaraz po inicjacji syntezy białka (Ryc. 2) [8, 69]. Aktywność mikroRNA nie wymaga całkowitej komplementarności pomiędzy sekwencją miRNA a mRNA. Wchodzące w interakcję fragmenty RNA tworzą zaledwie 6-10nt nieprzerwane duplekisy i nie wiadomo, czym determinowany jest taki sposób hybrydyzacji. Miejsce docelowe dla *lin-4* jest komplementarne do stRNA w 50-75%. Koniec 3' tego regionu jest zwykle tworzony z par Watsona-Cricka, natomiast dla końca 5' charakterystyczne są wypętlenia i wybrzuszenia (ryc. 1B). Biorąc pod uwagę istnienie w mRNA często kilku miejsc oddziaływania z miRNA można domniemywać, że niecałkowita hybrydyzacja umożliwia ominięcie niekomplementarnych par wynikających z ewentualnych pojedynczych mutacji czy miejsc SNP i dopasowanie się sekwencji mikroRNA/transkrypt mRNA w procencie wystarczającym do zahamowania ekspresji. Ponadto, powstające w miejscu wiązania wybrzuszenia mogą być rozpoznawane przez dodatkowe czynniki białkowe, niezidentyfikowane do tej pory, a zaangażowane w mechanizm hamowania translacji i działające w oparciu o charakterystyczne motywy strukturalne RNA.

Oprócz drugorzędowej struktury, sekwencja nukleotydowa może determinować miejsce wiązania się i działania miRNA. Swoiste elementy sekwencji regionów 3'UTR tj. motywy *K-box* (CUGUGAUA) oraz *Brd-box* (AGCUUUUA) są istotne w potranskrypcyjnym blokowaniu ekspresji genów ważnych dla prawidłowego rozwoju *D. melanogaster* [70]. Miejsca te, zachowane ewolucyjnie również w 3'UTR mRNA innych organizmów, stanowią potencjalne sekwencje docelowe dla niektórych miRNA [17]. Stwierdzono komplementarność końców 5' kilkunastu miRNA z motywem *K-box*. miR-4 oraz miR-11 tworzą 8nt dupleks, przypominający strukturalnie sparowanie *lin-4*/mRNA, z *K-box* i *Brd-box* regionu 3'UTR regulatora rozwoju u *D. melanogaster* [17].

mikroRNA jako składowe transkryptomu wykazują zmienny wzór ekspresji, od jednorodnego w trakcie rozwoju, po względnie swoisty, charakterystyczny dla danego stadium czy rodzaju tkanki. Taki profil ekspresji sugeruje zaangażowanie mikroRNA w różne procesy komórkowe, włączając wspomnianą regulację rozwoju, przestrzenne różnicowanie komórek czy fizjologię komórkową i ustrojową. Najlepiej scharakteryzowane pod względem funkcji biologicznej są opisane wcześniej stRNA *lin-4* i *let-7*. Intensywne badania dostarczają nowych danych na te-

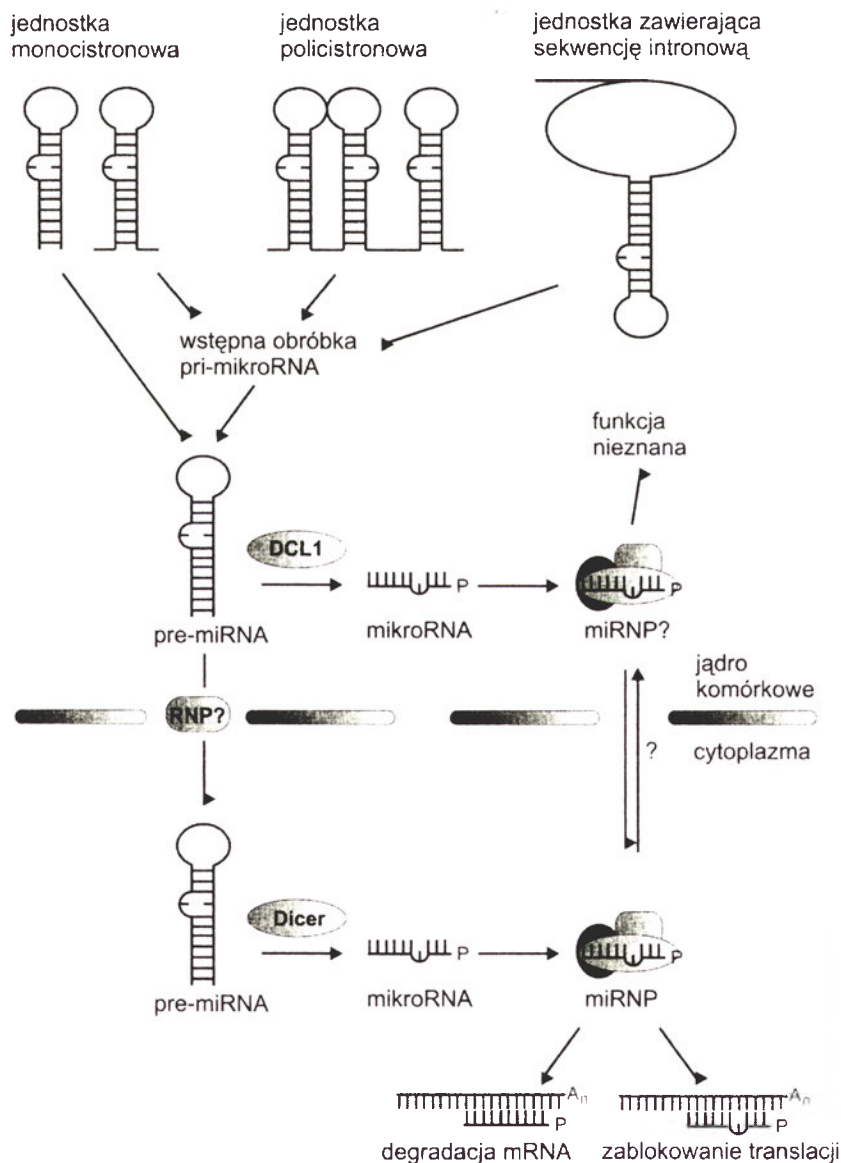
mat znaczenia innych przedstawicieli klasy miRNA dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

miR-14, ulegający ekspresji podczas embriogenezy i w dorosłym stadium *D. melanogaster*, hamuje aktywność apoptozy [71, 72]. Zablockowanie produkcji funkcjonalnego miRNA powoduje obniżenie przeżywalności mutantów oraz podniesienie wrażliwości na stres. Zidentyfikowanie mikroRNA zaangażowanego w proces regulacji apoptozy nasuwa pytanie o istnienie potencjalnych mikro-regulatorów onkogenezy. Nie wykazano bezpośredniego związku rozwoju nowotworu z zablockowaniem apoptozy poprzez mikroRNA. Wśród grupy genów aktywujących nowotworzenie poprzez zahamowanie programowanej śmierci komórki nie znajdują się geny *mir*. Nie można jednak wykluczyć takiej kore-

lacji, która byłaby istotnym aspektem w zrozumieniu procesu regulacji przeżywalności chorych komórek.

Chroniczna leukemia leukocytna (CLL, ang. *chronic lymphocytic leukemia*) jest najczęstszą formą białaczki na świecie [73]. Związana z chorobą delecja *locus* 13q14 występuje w ponad połowie przypadków i stanowi najczęstszą formę aberracji chromosomowych charakterystycznych dla CLL. Region 13q14 zawiera pięć genów kodujących ncRNA, w tym geny *miR15* oraz *miR16*. Postuluje się, że miR15-16 traczone w wyniku delecji w 65% przypadków CLL są odpowiedzialne za prawidłowy rozwój i funkcjonowanie leukocytów [74].

Innym przykładem regulatora rozwoju komórek jest miR-23 biorący udział w różnicowaniu się neuronów z komórek NT2 pod wpływem kwasu retinowego [75]. Ludzki gen *Hes1* jest regulatorem rozwo-



**Ryc. 2.** Model biogenezy i przypuszczalnej funkcji mikroRNA. Geny mikroRNA przepisywane są jako pierwotny transkrypt (pri-miRNA) przekształcany następnie w ~70nt prekursor pre-mikroRNA. Część precursora, po transporcie do cytoplazmy hydrolizowana jest przez rybonukleazę Dicer do formy dojrzałych mikroRNA wiązanych w kompleksy miRNP, które hamują translację lub degradują docelowe mRNA. MikroRNA wiążące się z mRNA w sposób całkowicie komplementarny indukują degradację docelowego transkryptu. Mechanizm biogenezy takich mikroRNA, podobnych do dupleksów siRNA, jest obecnie słabo poznany.

ju komórkowego, ulegającym ekspresji w neuronalnych komórkach macierzystych i kodującym represor transkrypcji hamujący rozwój neuronów. *Hes1* jest celem dla miR-23, kodowanego w różnicujących się i rozwijających neuronach. Funkcjonalność miR-23 jako regulatora *Hes1* wykazuje konserwatywność filogenetyczną u człowieka i myszy [75].

Utworzenie dupleksu mRNA/mikroRNA nie zakłóca stabilności mRNA, poziomu poliadenylacji i zasocjowania w polisomy. Znaczna część frakcji białek związanych w kompleksach miRNP wytrąca się w określonych warunkach wraz z rybosomami [27]. Nie wiadomo, czy współstrącanie oznacza funkcjonalne związanie się czynników z rybosomami, choć w przypadku *lin-4* stwierdzono bezpośredni związek stRNA z polisomalnym mRNA *lin-14* [76]. Przypuszcza się zatem, że oprócz tłumienia translacji, miRNA mogą regulować stabilność i lokalizację mRNA w komórce [31].

mikroRNA zdolne są do regulacji wzajemnej ekspresji. Sekwencję genu *mir-5*, zawierającą motyw *K-box*, zlokalizowano obok *locus* genu kodującego miR-6-1,2,3 posiadającego region komplementarny do *K-box* w 20-21 ciągu nukleotydowym. miR-5 może zatem oddziaływać lub konkurować ze zdolnością oddziaływania miR-6-1,2,3 z regionami 3'UTR zawierającymi *K-box* [17].

mikroRNA zaangażowane są także w mechanizm własnej biogenezy. Transkrypt genu kodującego białko DCL1 u *A. thaliana* utrzymywany jest w komórce na stałym poziomie dzięki potranskrypcyjnemu negatywnemu sprzężeniu zwrotnemu. Sekwencja mRNA *dcl1* zawiera region komplementarny do miR-162. Funkcjonalna rybonukleaza DCL1 katalizuje generowanie populacji mikroRNA w komórce, z których jeden (miR-162) częściowo hamuje ekspresję DCL1 zapewniając utrzymywanie ilości białka na funkcjonalnie niskim poziomie [54].

## VI. MikroRNA czy siRNA?

Niektóre roślinne mikroRNA wykazują całkowitą lub prawie całkowitą komplementarność z docelowym mRNA. miR-171 (miRNA39), należący do grupy mikroRNA hybrydujących do mRNA w sposób całkowicie komplementarny, reguluje ekspresję transkryptów z rodziny *SCL*. Białka *SCL* są czynnikami transkrypcji kontrolującymi hormonalne szlaki sygnałowe oraz zaangażowanymi w rozwój merystemu korzenia i podziały komórek. miR-171 ma możliwość funkcjonowania jako siRNA hamujący ekspresję poprzez degradację komplementarnego transkryptu. Jednocześnie, miR171 nie jest częścią więk-

szej populacji siRNA skierowanej przeciwko szerszym fragmentom mRNA *SCL*, gdyż nie stwierdzono w *A. thaliana* innych małych RNA homologicznych do regionu 3' docelowego genu [38, 39].

Opisany wcześniej miR-162 także działa zgodnie z mechanizmem charakterystycznym dla RNAi. miR-162 inicjuje degradację częściowo dojrzałego pre-mRNA *dcl1* na terenie jądra komórkowego. Ten mechanizm nieco odbiega od przyjętego modelu działania większości miRNA (Ryc. 2). Coraz więcej danych wskazuje jednak na możliwość takiego sposobu funkcjonowania mikroRNA.

W genomie myszy zmapowano tkankospecyficzne geny mikroRNA, tj. *mir-127* oraz *mir-136* na chromosomie 12, których homologi występują u człowieka w *locus* 14q32. Oba geny zlokalizowane są w pobliżu wyspy CpG mysiego genu *Rtl1* (ang. *retrotransposon-like*), ulegającego ekspresji wyłącznie z allelu ojcowskiego. Geny *mir-127* i *mir-136* przepisane są w antysensowej orientacji w stosunku do *Rtl1*, a ich ekspresja zachodzi jedynie z chromosomu matczyngo. Sekwencje miR-127 oraz miR-136 są całkowicie komplementarne do fragmentu ORF *Rtl1*, co sugeruje, że podobnie jak niektóre roślinne miRNA funkcjonują one jako siRNA wyciszając ekspresję *Rtl1* [77]. Wzajemne piętnowanie genów kodujących białka i genów ncRNA, zgrupowanych w tym samym regionie sugeruje, że regulatorowa rola niekodujących RNA może dotyczyć autosomalnej kontroli epigenetycznej [78].

## VII. Perspektywy technologii mikroRNA

Zjawisko interferencji RNA z powodzeniem stosowane jest obecnie w genomice funkcjonalnej i terapii genowej. Właściwości małych siRNA generowanych z wektorów wykorzystano do scharakteryzowania profili ekspresji wielu genów oraz do degradacji wirusowego materiału genetycznego. Funkcjonalność mikroRNA stanowi również obiecujące narzędzie inżynierii genetycznej. Pierwsze syntetyczne cząsteczki mikroRNA stworzone w wyniku klonowania pożądanej sekwencji w strukturę prekursora pre-miR-30, z zachowaniem jego swoistej struktury drugorzędowej, funkcjonują jak naturalne miRNA blokując ekspresję transkryptu komplementarnego do zaprojektowanego insertu [79, 80]. Dzięki zdolności do tłumienia ekspresji, a nie całkowitej degradacji docelowego transkryptu, technologia mikroRNA może okazać się niezastąpiona podczas badań funkcji genów tkankowo specyficznych lub aktywnych w określonej fazie cyklu komórkowego czy stadium rozwoju.



## Piśmiennictwo

1. Szymański M, Barciszewski J (2002) *Genome Biol* 3: 0005.1-5.8
2. Storz G (2002) *Science* 296: 1260-1263
3. Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, Bartel D P (2000) *Cell* 101: 25-33
4. Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J (2001) *Nature* 409: 363-366
5. Hammond S M, Bernstein E, Beach D, Hannon G J (2000) *Nature* 404: 293-296
6. Elbashir S M, Lendecker W, Tuschl T (2001) *Genes Dev* 15: 188-200
7. Wightman B, Hal, Ruvkun G (1993) *Cell* 75: 855-862
8. Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V (1993) *Cell* 75: 843-854
9. Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V (1999) *Cell* 99: 133-141
10. Ambros V (2000) *Curr Opin Genet Dev* 10: 428-433
11. Chalfie M, Horvitz H R, Sulson J E (1981) *Cell* 24: 59-69
12. Hal, Wightman B, Ruvkun G (1996) *Genes Dev* 10: 3041-3050
13. Moss E G, Lee R C, Ambros V (1997) *Cell* 88: 637-646
14. Olsen M, Ambros V (1999) *Dev Biol* 216: 671-680
15. Grosshans H, Slack F J (2002) *J Cell Biol* 156: 17-21
16. Lee R, Ambros V (2001) *Science* 294: 862-864
17. Lai E C (2002) *Nat Genet* 30: 363-364
18. Reinhart B J, Slack F J, Basson M, Pasquinelli A E, Bettinger J C, Rougvie A E, Horvitz H R, Ruvkun G (2000) *Nature* 403: 901-906
19. Slack F J, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz H R, Ruvkun G (2000) *Mol Cell* 5: 659-669
20. Pasquinelli A E, Reinhart B J, Slack F, Martindale M Q, Kuroda M I, Maller B, Hayward D C, Ball E E, Degan B, Muller P, Ruvkun G (2000) *Nature* 408: 86-89
21. Eddy S R (2001) *Nat Rev Genet* 2: 919-921
22. Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, Li N, Parrish S, Hal, Baillie D, Fire A, Ruvkun G, Mello C C (2001) *Cell* 106: 23-34
23. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli A E, Balint E, Tuschl T, Zamore P D (2001) *Science* 293: 834-838
24. Keeting R F, Fischer S E, Bernstein E, Sijen T, Hannon G J, Plasterk R H (2001) *Genes Dev* 15: 2654-2659
25. Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, Bartel D P (2001) *Science* 294: 858-862
26. Lagos Quintana M, Rauhut R, Lendecker W, Tuschl T (2001) *Science* 294: 853-858
27. Mourelatos Z, Destie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) *Genes Dev* 16: 720-728
28. Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendecker W, Tuschl T (2002) *Curr Biol* 12: 735-739
29. Mathews D H, Sabina J, Zuker M, Turner D H (1999) *J Mol Biol* 288: 911-940
30. Lim L P, Glasner M, Yekta S, Burge C B, Bartel D P (2003) *Science* 299: 1540
31. Ambros V (2001) *Cell* 107: 823-826
32. Plant K E, Routledge J E, Proudfoot N J (2001) *Mol Cell Biol* 21: 6507-6515
33. Ruvkun G (2001) *Science* 294: 797
34. Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier Ewert S, O'Brien J, Lehrach H, Bachelier J P, Brosius J (2001) *EMBO J* 20: 2943
35. Llave C, Kasschau K D, Rector M A, Carrington J C (2002) *Plant Cell* 14: 1605-1619
36. Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P (2002) *Genes Dev* 16: 1616-1626
37. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X (2002) *Curr Biol* 12: 1484-1495
38. Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P (2002) *Cell* 110: 513-520
39. Llave C, Xie Z, Kasschau K D, Carrington J C (2002) *Science* 297: 2053-2056
40. Griffiths Jones S, Bateman A, Marshall N, Khanna A, Eddy S R (2003) *Nucleic Acid Res* 31: 439-441
41. Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim V N (2002) *EMBO J* 21: 4663-4670
42. Zeng Y, Cullen B R (2003) *RNA* 9: 112-123
43. Grosshans H, Slack F J (2002) *J Cell Biol* 156: 17-21
44. Johnson S M, Lin S, Salcik F J (2003) *Dev Biol* 259: 364-379
45. Nakielnny S, Dreyfuss G (1999) *Cell* 99: 677-690
46. Conti E, Izaurralde E (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13: 310-319
47. Hutvagner G, Zamore P D (2002) *Science* 297: 2056-2060
48. Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, Ray A (2002) *Trends Plant Sci* 7: 487-491
49. Cerutti H (2003) *Trends Genet* 19: 39-46
50. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli A E, Balint E, Tuschl T, Zamore P D (2001) *Science* 293: 834-838
51. Keeting R F, Fischer S E, Bernstein E, Sijen T, Hannon G J, Plasterk R H (2001) *Genes Dev* 15: 2654-2659
52. Knight S W, Bass B L (2001) *Science* 293: 2269-2271
53. Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, Ray A (2002) *Trends Plant Sci* 7: 487-491
54. Xie Z, Kasschau K D, Carrington J C (2003) *Curr Biol* 13: 784-789
55. Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill S S (2000) *Gene* 245: 213-221
56. Nicholson R H, Nicholson A W (2002) *Mamm Genome* 13: 67-73
57. Pause A, Sonenberg N (1992) *EMBO J* 11: 2643-2654
58. Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J (2001) *Nature* 409: 363-366
59. Cerutti L, Mian N, Bateman A (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 481-482
60. Hammond S M, Boettcher S, Caudy A A, Kobayashi R, Hannon G J (2001) *Science* 293: 1146-1150
61. Baulcombe D (2001) *Nature* 409: 295-296
62. Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D (2002) *Development* 129: 1085-1094
63. Caudy A A, Myers M, Hannon G J, Nammond S M (2002) *Genes Dev* 16: 2491-2496
64. Cikaluk D E, Tahbaz N, Hendricks L C, DiMattia G E, Hansen D, Pilgrim D, Hobman T C (1999) *Mol Biol Cell* 10: 3357-3372
65. Tahbaz N, Carmichael J B, Hobman T C (2001) *J Biol Chem* 276: 43294-43299
66. Heaton J H, Dlakic W M, Dlakic M, Gelehrter T D (2001) *J Biol Chem* 276: 3341-3347
67. Ashley C T, Wikinson K D, Reines D, Warren S T (1993) *Science* 262: 563-566
68. Wan L, Dockendorff T C, Jongens T A, Dreyfuss G (2000) *Mol Cell Biol* 20: 8536-8547
69. Zeng Y, Wagner E J, Cullen B R (2002) *Mol Cell* 9: 1327-1336
70. Lai E C, Burks C, Posakony J W (1998) *Development* 125: 4077-4088
71. Sempere L F, Sokol N S, Dubrovsky E B, Berger E M, Ambros V (2003) *Dev Biol* 259: 9-18
72. Xu P, Vernooy S Y, Gou M, Hay B A (2003) *Curr Biol* 13: 790-795
73. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P (2000) *N Engl J Med* 343: 1910-1916
74. Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Negrini M, Bullrich F, Croce C M (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15524-15529
75. Kawasaki H, Taira K (2003) *Nature* 423: 838-842
76. Olsen P, Ambros V (1999) *Dev Biol* 216: 671-680

77. Seitz H, Youngson N, Lin S, Dalbert S, Paulsen M, Bachellerie J P, Ferguson-Smith A, Cavaille J (2003) *Nature Genet* **34**: 261-262
78. Rougeulle C, Heard E (2002) *Trends Genet* **18**: 434-437
79. Zeng Y, Wagner E J, Cullen R B (2002) *Mol Cell* **9**: 1327-1333
80. McManus M T, Petersen C, Haines B, Chen J, Sharp P A (2002) *RNA* **8**: 842-850
81. Ambros V, Bartel B, Bartel D P, Burge C, Carrington J C, Chen X, Dreyfuss G, Eddy S R, Griffiths—Jones S, Marshal M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) *RNA* **9**: 277-279
82. Lee Y, Ahn C, Han J, Chol H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim V N (2003) *Nature* **425**: 415-419

# Białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA i ich udział w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na stres

## Detectors of DNA strand breaks and their role in the cellular response to stress

JOANNA ŁANUSZEWSKA<sup>1</sup>, PIOTR WIDŁAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Białka rozpoznające pęknięcia DNA i ich udział w naprawie DNA
  - II-1. Białka związane z mechanizmem NHEJ
  - II-2. Białka związane z mechanizmem HR
  - II-3. Białka związane z mechanizmem BER
- III. Mechanizmy regulujące przebieg cyklu komórkowego indukowane pęknięciami nici DNA
  - III-1. Detektory DSB
  - III-2. Udział białka ATM w regulacji cyklu komórkowego
- IV. Apoptoza indukowana przez uszkodzenia DNA
- V. Telomery a białka rozpoznające pęknięcia DNA
- VI. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** BER — naprawa przez wycięcie zasady; CDK — kinaza zależna od cykliny; DNA-PK — kinaza białkowa zależna od DNA; DSB — dwuniciowe pęknięcie DNA; HR — naprawa przez rekombinację homologiczną; NHEJ — łączenie niehomologicznych końców DNA

### I. Wstęp

Nośnikami informacji genetycznej w komórce eukariotycznej są chromosomy — liniowe cząsteczki DNA związane z rozlicznymi białkami chromatyny. Z końcami chromosomów oddziałują wyspecjalizowane białka tworząc struktury zwane telomerami. Utrzymanie prawidłowej struktury telomerów jest jednym z czynników decydujących o prawidłowym przebiegu cyklu życiowego komórki [1]. Odwracalne przerwy w liniowej strukturze chromosomów generowane enzymatycznie w trakcie cyklu komórkowego są niezbędne do prawidłowego przebiegu repli-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Proteins that recognize DNA breaks and their role in DNA repair
  - II-1. Proteins involved in NHEJ
  - II-2. Proteins involved in HR
  - II-3. Proteins involved in BER
- III. DNA strand breaks and the cell cycle regulation
  - III-1. Detectors of DSB
  - III-2. The role of ATM in cell cycle regulation
- IV. Apoptosis induced by DNA damage
- V. Telomeres and proteins that recognize DNA breaks
- VI. Concluding remarks

kacji i rekombinacji DNA [2, 3]. Ponadto, fragmentacja chromosomów katalizowana przez nukleazy jest zjawiskiem typowym dla końcowych etapów apoptozy [4]. W trakcie życia komórki pęknięcia nici DNA (i w rezultacie przerwanie liniowej ciągłości chromosomów) są również rezultatem procesów “nieplanowanych”, indukowanych przez czynniki uszkadzające DNA. Do czynników uszkadzających DNA, tak zwanych czynników genotoksycznych, należą niektóre rodzaje promieniowania elektromagnetycznego i różnorodne substancje chemiczne pochodzące ze środowiska lub będące produktami metabolizmu komórki. Czynniki te indukują modyfikacje lub utratę zasad i pęknięcia nici DNA. Pęknięcia nici DNA powstają w wyniku: (i) bezpośredniego działania czynników genotoksycznych (promieniowania jonizującego czy reaktywnych form tlenu), (ii) jako etapy pośrednie naprawy zmodyfikowanych zasad lub (iii) jako efekt zablokowania replikacji uszkodzonego DNA. Jeśli pęknięcia nici DNA umiejscowione są w obu niciach w niewielkiej odległości od siebie, mówimy o dwuniciowych pęknięciach DNA, tzw. DSB (ang. *double-strand breaks*).

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> dr hab., Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice, e-mail: widlak@io.gliwice.pl



Uszkodzenia takie indukują rearanżację struktury genów i utratę materiału genetycznego, wskutek czego są silnie toksyczne dla komórek. Szacuje się, że obecność w genomie nawet jednego uszkodzenia typu DSB wystarcza do zablokowania cyklu komórkowego, a brak jego naprawy może być letalny [5].

Podstawowa reakcja komórki na uszkodzenia DNA polega na uruchomieniu procesów jego naprawy. Uszkodzenia typu DSB naprawiane są w dwojaki sposób: (i) za pomocą rekombinacji homologicznej, HR (ang. *homologous recombination*) i/lub (ii) łączenia końców niehomologicznych, NHEJ (ang. *non-homologous end-joining*). Oba typy naprawy odtwarzają liniową ciągłość chromosomów, ale tylko naprawa typu HR zapewnia całkowite odtworzenie informacji zawartej w uszkodzonym fragmencie (mechanizm wolny od błędów). Wzajemna regulacja działania obu systemów naprawczych nie została dokładnie poznana. Jednak wiele danych wskazuje, że, podczas gdy u niższych *Eukaryota* (drożdże) przeważa system HR, u wyższych (kręgowce) udział każdego z tych systemów zależy od fazy cyklu komórkowego: NHEJ przeważa w fazie G1/G0 i wczesnej fazie S, natomiast znaczenie HR wzrasta w późnej fazie S i w G2 [6]. Jednocześnie z rozpoczęciem naprawy, w komórkach zostają uruchomione mechanizmy prowadzące do zablokowania cyklu komórkowego (system punktów kontrolnych, ang. *checkpoints*), co umożliwi naprawę uszkodzeń zanim nastąpi replikacja i podział chromosomów. Mechanizmy naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia komórek przy minimalizacji ryzyka powielenia uszkodzonego materiału genetycznego. W pewnych sytuacjach (bardzo wysoki poziom uszkodzeń, niesprawne mechanizmy naprawy) komórki nie są w stanie naprawić powstałych uszkodzeń DNA. Zwykle takie komórki są usuwane z organizmu na drodze apoptozy. Klonalna ekspansja komórek mających defekty w mechanizmach naprawy DNA i opornych na apoptozę jest często podłożem procesu nowotworowego. Tak więc o wrażliwości komórek na uszkodzenia DNA decyduje wiele powiązanych ze sobą czynników: podatność na powstawanie uszkodzenia, wydajność i dokładność procesów naprawy, sposób regulacji cyklu komórkowego i inne mechanizmy spowodowane uszkodzeniami DNA.

We wszystkich procesach zapoczątkowanych uszkodzeniami DNA zaangażowane są trzy klasy białek. "Efektorami" (lub "wykonawcami") są białka swoiste dla różnych typów odpowiedzi: enzymy naprawcze, inhibitory i aktywatory kinaz białkowych zależnych od cyklin, czy proteazy i nukleazy

apoptotyczne. Białka efektorowe znajdują się pod kontrolą białek regulatorowych, często uruchamianych przez różne rodzaje stresu i uruchamiających różne rodzaje odpowiedzi. Białka takie nazywa się czasem "integratorami", a ich najlepiej znanym przykładem jest czynnik transkrypcyjny p53. Rozpoznanie uszkodzenia i aktywacja białek regulatorowych są zależne od trzeciej klasy białek: "detektorów" (lub "sensorów") [7]. Ostatnie lata przyniosły wręcz lawinowy przyrost wiedzy na temat molekularnych mechanizmów komórkowej odpowiedzi na stres. Informacje o najnowszych osiągnięciach tego obszaru biologii komórki można znaleźć w wielu pracach przeglądowych [8-12], również publikowanych w języku polskim [13]. Przedmiotem niniejszej pracy są białka detektorowe rozpoznające uszkodzenia typu DSB i ich udział w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na uszkodzenia materiału genetycznego.

## II. Białka rozpoznające pęknięcia DNA i ich udział w naprawie DNA

### II-1. Białka związane z mechanizmem NHEJ

Łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ) wymaga obecności kilku swoistych białek jądrowych: kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK), białka Artemis, białka XRCC4 i ligazy IV DNA. Białka te biorą udział zarówno w naprawie DSB, jak i rekombinacji V(D)J w trakcie dojrzewania limfocytów [2]. Białko DNA-PK składa się z dwóch podjednostek: heterodimeru Ku70/Ku86 wiążącego końce DNA oraz podjednostki katalitycznej DNA-PK<sub>CS</sub> o aktywności kinazy białkowej. Decydujące znaczenie dla rozpoznawania pęknięć DNA ma w procesie NHEJ białko Ku, będące głównym białkiem komórkowym mającym zdolność do niezależnego od sekwencji nukleotydów wiązania z wolnymi końcami DNA [14]. Białko Ku rozpoznaje pęknięcia DNA i wiąże się z nimi, a oprócz tego posiada zdolność translokacji wzdłuż helisy DNA, co powoduje, że fragmenty DNA mogą być związane z kilkoma cząsteczkami tego białka [15]. Do właściwego działania białka Ku niezbędna jest dimeryzacja podjednostek Ku70 i Ku86. W wiązaniu DNA biorą udział fragmenty N-końcowe Ku70 i Ku86, fragment centralny Ku86 oraz C-końcowy fragment Ku70 [16]. Znana jest struktura krystaliczna heterodimeru Ku, zarówno samego białka, jak i jego kompleksu z DNA. Heterodimer Ku70/Ku86 tworzy symetryczną strukturę otaczającą dwa skręty helisy DNA i jednocześnie umożliwiającą dostęp innych białek do DNA

[17]. Usunięcie (ang. *knock-out*) genów kodujących podjednostki białka Ku nie powoduje śmierci organizmów, ale znacznie upośledza odporność na promieniowanie jonizujące [18], oraz wpływa na wiele procesów związanych z obróbką końców DNA.

DNA-PK<sub>CS</sub>, podjednostka katalityczna białka DNA-PK, jest serynowo-treoninową kinazą białkową należącą do rodziny białek spokrewnionych z kinazą 3-fosfoinozytolu [19]. W niskim stężeniu soli białko to ma zdolność słabego wiązania z krótkimi fragmentami DNA [20]. Stwierdzono również, że DNA-PK<sub>CS</sub> może stanowić pomost łączący dwa końce cząsteczek DNA [21]. Tworzenie kompleksu z białkiem Ku znacznie zwiększa zdolność wiązania białka DNA-PK<sub>CS</sub> z DNA i przyjmuje się, że taki kompleks po związaniu z wolnymi końcami DNA jest aktywną formą kinazy w warunkach *in vivo* [20]. Do potencjalnych substratów DNA-PK należy wiele białek jądrowych, nie jest jednak jasne, które z nich są rzeczywistymi substratami w warunkach *in vivo*. Przyjmuje się, że znaczenie fizjologiczne ma fosforylacja białek biorących udział w mechanizmie NHEJ: XRCC4, Ku70, Ku86 i samej DNA-PK<sub>CS</sub> [22]. Uważa się, że po związaniu z pęknięciem DNA białko DNA-PK pełni funkcję strukturalną, utrzymując razem oba końce pęknięcia i tworząc platformę dla innych białek naprawczych (np. ligazy DNA), oraz że reguluje aktywność tych białek przez ich fosforylację [21]. Nie jest jasne, czy DNA-PK bierze udział w innych mechanizmach odpowiedzi komórki na promieniowanie. Wiele danych wskazuje, że chociaż w warunkach *in vitro* kinaza ta może fosforylować białko p53, to w napromienionej komórce fosforylacja p53 jest niezależna od DNA-PK [23]. Komórki mające zmutowany gen kodujący podjednostkę DNA-PK<sub>CS</sub> (podobnie jak komórki z mutacjami w genach kodujących Ku) wykazują podwyższoną radiowrażliwość i niesprawny mechanizm rekombinacji V(D)J, czego wynikiem jest ciężkie upośledzenie systemu immunologicznego (zespół SCID, ang. *severe combined immunodeficiency*) [24].

Ligaza IV DNA jest jedyną ligazą katalizującą łączenie końców DNA w trakcie NHEJ [25]. Czynnikiem niezbędnym do jej aktywacji jest białko XRCC4, z którym ligaza IV tworzy kompleks [26]. Białko XRCC4 wykazuje podwyższone powinowactwo do wolnych końców DNA, może więc być dodatkowym czynnikiem rozpoznającym DSB [27]. Inaktywacja zarówno ligazy IV jak i białka XRCC4 prowadzi do śmierci zarodków w późnym stadium życia płodowego, której przyczyną są zaburzenia w dojrzewaniu układu opornościowego i neurogenezie [28]. Promieniowanie jonizujące indukuje w komórkach

fosforylację białka XRCC4 katalizowaną przez DNA-PK, co wpływa na wiązanie tego białka do DNA [29]. Mutacje genu kodującego białko Artemis, które bierze udział w obróbce pętli DNA generowanych przez rekombinazę Rag1/Rag2 w trakcie rekombinacji V(D)J, również zwiększają wrażliwość komórek na czynniki indukujące pęknięcia DNA [30].

## II-2. Białka związane z mechanizmem HR

W mechanizmie rekombinacji homologicznej (HR) zaangażowana jest duża grupa swoistych enzymów i białek strukturalnych. W drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, gdzie mechanizm HR poznany jest najlepiej, są to białka tworzące grupę epistatyczną RAD52: RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, MRE11 i XRS2. W komórkach ludzkich obecne są białka homologiczne (a co najmniej odpowiedniki funkcjonalne) do wszystkich tych białek [31]. Białko Rad52 jest białkiem wiążącym końce DNA i przyjmuje się, że pełni ono funkcję detektora DSB swoistego dla mechanizmu HR [32]. Ponadto, Rad52 stymuluje wymianę nici DNA ułatwiając asocjacje Rad51 z ssDNA i tworzenie filamentu nukleoproteinowego. Promieniowanie jonizujące powoduje akumulację białek biorących udział w rekombinacji homologicznej (Rad51, Rad52 i Rad54) w ogniskach (*foci*) zlokalizowanych w miejscach uszkodzenia, ale tworzące się struktury nie są statyczne: stabilnie związany Rad51 jest miejscem odwracalnego przyłączania Rad52 i Rad54 [33]. W komórkach ssaków i ptaków (w odróżnieniu od drożdży) usunięcie genu Rad52 nie powoduje nadwrażliwości na czynniki indukujące DSB, chociaż istotnie wpływa na rekombinację homologiczną [34]. Uważa się, że wzajemny ilościowy stosunek białek Rad52 i Ku oraz ich współzawodniczenie w wiązaniu DSB wyznacza przebieg naprawy tych uszkodzeń poprzez kierowanie ich bądź na drogę HR bądź NHEJ [35].

Poza białkami swoistymi dla każdego z typów naprawy pęknięć DNA w komórkach obecna jest grupa białek biorących udział zarówno w HR, jak i NHEJ. W komórkach kręgowców do grupy tej należą trzy białka tworzące kompleks: Rad50, Mre11 i Nbs1. Białko Nbs1, nazywane także p95 lub nibryną, jest funkcjonalnym analogiem białka Xrs2 drożdży [36]. Mre11 jest nukleazą wykazującą w warunkach *in vitro* aktywność 3'→5' egzonukleazy [37]. Co ciekawe, w warunkach *in vivo* kompleks zawierający białko Mre11 działa jako 5'→3' egzonukleaza [38]. Usunięcie genu MRE11 powoduje silne osłabienie

wydajności obu mechanizmów naprawy DSB. Jednak mutacje punktowe, hamujące aktywność nukleazową Mre11, nie wpływają na jego aktywność reparycyjną [39]. Uważa się więc, że chociaż aktywność nukleolityczna Mre11 może mieć pewne znaczenie w obróbce końców DSB, to dla naprawy DNA ważniejsze mogą być inne właściwości kompleksu zawierającego Mre11 (na przykład zdolność wyszukiwania mikrohomologii pomiędzy końcami DNA) [10]. Aktywność białka Mre11 zależy od obecności każdego z trzech składników kompleksu. Białko Nbs1 wiąże się z Mre11, stabilizuje kompleks i stimuluje jego aktywność nukleolityczną [40]. Wiązanie kompleksu z końcami DNA odbywa się poprzez nukleazę Mre11 oraz domenę Rad50 wiążącą DNA [41]. Kompleksy Rad50/Mre11/Nbs1 nagromadzają się wkrótce po napromieniowaniu komórek w ogniskach zlokalizowanych w miejscach DSB. Chociaż białko Nbs1 nie wiąże się z DNA, jego domena FHA jest odpowiedzialna za tworzenie kompleksów Rad50/Mre11/Nbs1 w miejscach uszkodzenia DNA [42], natomiast domena C-końcowa jest odpowiedzialna za jądrową lokalizację kompleksu [43].

Silne wiązanie z chromatyną kompleksów zawierających Mre11 obserwuje się już po kilku minutach od napromieniowania komórek [44]. Istotną rolę kompleksu Rad50/Mre11/Nbs1 podkreśla fakt, że całkowite usunięcie genów kodujących którekolwiek z tych białek powoduje śmierć zarodków myszy [10]. Stwierdzono, że mutacje genów kodujących Nbs1 i Mre11 obecne są w dziedzicznych schorzeniach przypominających zespół AT (omówiony poniżej). W przypadku defektów Nbs1 jest to zespół łamliwych chromosomów Nijmegen (ang. *Nijmegen breakage syndrome*) [43], a w wypadku defektów Mre11 - zespół AT-LD (ang. *Ataxia-telangiectasia-like disorder*) [45]. Jedną z charakterystycznych cech komórek AT są zaburzenia w szlakach przekazywania sygnału indukowanego przez uszkodzenia DNA. Wskazuje to, że kompleks Rad50/Mre11/Nbs1 zaangażowany jest również w kontrolę cyklu komórkowego. Ponadto kompleks ten bierze udział w regulacji przebiegu rekombinacji mejozy i w utrzymaniu struktury telomerów [37].

### II-3. Białka związane z mechanizmem BER (ang. *base excision repair*)

Białkiem mającym silne powinowactwo do pęknięć DNA, zarówno jedno, jak i dwuniciowych, jest polimeraza poli(ADP-rybozy), PARP-1. Enzym ten katalizuje syntezę długich rozgałęzionych łańcuchów poli ADP-rybozy (wykorzystując NAD<sup>+</sup> jako

substrat) przyłączanych do reszt glutamylowych, asparaginowych i lizynowych białek akceptorowych. Do białek modyfikowanych przez PARP-1 należą histony, DNA-PK czy p53, jednak podstawowym akceptorem łańcuchów poli ADP-rybozy jest samo białko PARP-1. Wiązanie do końców DNA jest niezbędne do aktywacji enzymu. Synteza ujemnie naładowanych łańcuchów poli ADP-rybozy powoduje oddysocjowanie białka od DNA, polimer jest następnie degradowany przez glikohydrolazę poli(ADP-rybozy), co umożliwia rozpoczęcie całego cyklu od początku [46]. Przyjmuje się, że PARP-1 związany jest z mechanizmami naprawy zmodyfikowanych zasad w procesie BER. PARP-1 tworzy kompleksy z białkami zaangażowanymi w ten proces (XRCC1, polimeraza DNA i ligaza III), wiąże się również z nacięciami nici DNA generowanymi w trakcie naprawy [47]. Jednak mechanizm udziału białka PARP-1 w procesie BER kryje wiele niejasności. Chociaż komórki pozbawione genu PARP-1 charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na czynniki alkilujące DNA i wysoką niestabilnością chromosomów, to szybkość naprawy DNA wydaje się niezmienną [48]. Dane z eksperymentów *in vitro* wykazują, że PARP-1 wiąże się z nacięciami nici DNA będącymi produktami pośrednimi BER i blokuje transkrypcję z uszkodzonej nici DNA umożliwiając przyłączenie enzymów naprawczych w miejscu uszkodzenia [49].

Aktywność PARP-1 jest hamowana przez DNA-PK, być może wskutek współzawodniczenia między PARP-1 i Ku o dostęp do wolnych końców DNA. Wiadomo również, że oba białka mogą tworzyć kompleksy [50]. Zdolność szybkiego wiązania do pęknięć DNA i brak bezpośredniego udziału w ich naprawie skłania do uznania PARP-1 za białko, które ochrania końce DNA przed degradacją nukleolityczną i rekombinacją [51]. Przez łańcuchy poli-ADP-rybozy PARP-1 wiąże się z szeregiem białek jądrowych, m.in. histonów, XPA, DNA-PK czy p53, co może mieć znaczenie funkcjonalne. Wiadomo na przykład, że oddziaływanie z PARP-1 stabilizują białko p53 [52]. Ponadto PARP-1 modyfikuje i wiąże się z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (np. Oct-1, B-Myb czy AP-2). Sugeruje to dodatkową funkcję tego białka jako czynnika spowalniającego transkrypcję genów zawierających uszkodzenia [47]. Postuluje się, że podobną funkcję mogłoby pełnić również białko Ku. W komórkach drożdży białko to tworzy kompleksy z białkami Sir, odpowiadającymi za formowanie nieaktywnej heterochromatyny [53]. Ostatnio zaproponowano dodatkową funkcję białka PARP-1 jako czynnika akty-



wującego proteosomową degradację białek uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu [54].

### III. Mechanizmy regulujące przebieg cyklu komórkowego indukowane pęknięciami nici DNA

#### III-1. Detektory DSB

W chwili obecnej nie jest do końca jasne, które z białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego są białkami sensorowymi. Dane genetyczne i biochemiczne wskazują, że przynajmniej w przypadku uszkodzeń typu DSB funkcję detektora uszkodzeń pełni białko ATM, a prawdopodobnie również kompleks Rad50/Mre11/Nbs1.

ATM jest białkiem zmutowanym w dziedzicznej recesywnej chorobie *ataxia-telangiectasia* (ang. *AT mutated*). Zespół AT charakteryzuje się szeregiem swoistych cech klinicznych. Są to między innymi: postępująca degeneracja kory mózdzku prowadząca do zaburzeń ruchowych (*ataxia*), dylatacja naczyń krwionośnych (*telangiectasia*), opóźnienia wzrostu, przedwczesne starzenie się i silne predyspozycje do nowotworów krwi. Komórki pacjentów z zespołem AT wykazują nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące, łamliwość chromosomów i zaburzenia mechanizmów regulujących cykl komórkowy i apoptozę [55]. Podobny fenotyp związany jest z mutacjami Nbs1 i Mre11. Białko ATM, podobnie jak DNA-PK, należy do rodziny serynowo-treoninowych kinaz białkowych spokrewnionych z kinazą 3-fosfoinozytolu. W reakcji *in vitro* ATM fosforyluje reszty serynowe i treoninowe poprzedzające reszty glutaminowe w wielu białkach [56]. Uważa się, że fizjologicznymi substratami ATM są białka związane z mechanizmami przekazywania sygnału i naprawy DNA, między innymi p53, c-Abl, BRCA1, Nbs1, Mdm2, Chk2, hRad17 [8], FANCD2 [57] i histon H2A.X [58]. Białko ATM wiąże się silnie z chromatyną komórek traktowanych promieniowaniem jonizującym (lecz nie promieniowaniem UV) już w 30 sekund po napromieniowaniu, a jego aktywność enzymatyczna wzrasta kilkakrotnie [59]. W tym samym czasie, w miejscach uszkodzenia obserwuje się katalizowaną przez ATM fosforylację histonu H2A.X, a następnie dzięki wzajemnym oddziaływaniom Nbs1 z ufosforylowanym histonem, nagromadzanie kompleksu Rad50/Mre11/Nbs1 [60]. Są to pierwsze zmiany obserwowane w jądrze napromieniowanej komórki. Mechanizm wiązania białka ATM z DNA nie jest jasny. Część badaczy sugeruje, że do wiązania ATM z DNA niezbędne są dodatkowe białka pomocnicze,

takie jak Ku w wypadku DNA-PK. Możliwe jest, że ATM wiąże się z końcami DNA "przyciętymi" przez kompleks Rad50/Mre11/Nbs1 [10]. Stwierdzono również, że samo ATM wykazuje powinowactwo do dwuniciowego DNA uszkodzonego przez promieniowanie jonizujące [61]. Wskazuje to, że ATM może wiązać się z DNA bez udziału dodatkowych białek pomocniczych. W chwili obecnej istnieją sprzeczne dane czy (i w jakim stopniu) wiązanie kinazy ATM z DNA stymuluje jej aktywność [7]. Ostatnio przedstawiono dowody wskazujące, że indukowane promieniowaniem zmiany struktury chromatyny inicjują autofosforylację i rozpad nieaktywnych dimerów do aktywnych monomerów ATM [62].

Białkiem o dużym podobieństwie strukturalnym i funkcjonalnym do ATM jest ATR. Wiązanie z chromatyną i aktywacja ATR obserwowane są w komórkach napromieniowanych UV lub czynnikami blokującymi replikację [12]. ATR funkcjonuje w kompleksie z białkiem ATRIP (białka homologiczne w drożdżach to Rad26 u *S. pombe* i Lcd1/Ddc2 u *S. cerevisiae*) [63]. Dane genetyczne wskazują, że dwa inne kompleksy białkowe wspomagają funkcje ATR. Jest to kompleks hRad1/hRad9/hHus1, przypominający strukturą białko PCNA i kompleks składający się z białka hRad17 i czynnika replikacyjnego RFC3. Może to sugerować, że ATR rozpoznaje zaburzenia replikacji związane z obecnością uszkodzeń DNA (np. widełki replikacyjne zablokowane w miejscu zawierającym UV-fotoprodukty) [8]. Te same białka mogą być fizjologicznymi substratami ATM i ATR, a funkcje obu kinaz częściowo się nakładają i uzupełniają. To prawdopodobnie jest przyczyną faktu, że mutacje ATM nie są letalne. Usunięcie genu ATR powoduje śmierć na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, jest to jednak prawdopodobnie związane ze swoistym udziałem tego białka w regulacji replikacji [64]. Stwierdzono, że białka ATM i ATR występują w olbrzymich kompleksach nazywanych BASC (ang. *BRCA-associated surveillance complex*). Poza ATM (czy ATR) w kompleksie tym występują inne białka związane z różnymi mechanizmami naprawy DNA: BRCA1, Rad50, Mre11, Nbs1, MLH1, MSH2, MSH6 i BLM [65]. Wielu badaczy sugeruje, że kompleks ten mógłby pełnić funkcję uniwersalnego detektora uszkodzeń DNA, jednak rzeczywisty mechanizm jego funkcjonowania pozostaje niejasny. Ostatnio stwierdzono, że tzw. ciała jądrowe PML (ang. *PML Nuclear Bodies*) - inne wieloskładnikowe kompleksy zaangażowane w komórkową odpowiedź na stres — również gromadzą się w miejscach zawie-

rających ufosforylowany histon H2A.X i kompleksy Rad50/Mre11/Nbs1 [66].

### III-2. Udział białka ATM w regulacji cyklu komórkowego

Zwiększona radiowrażliwość komórek z mutacjami ATM nie wynika z defektów w naprawie DSB, a jej przyczyną są zaburzenia mechanizmów kontrolujących przebieg cyklu komórkowego (ang. *checkpoints*). Poniżej przedstawionych jest kilka mechanizmów regulacji cyklu komórkowego, w których bierze udział białko ATM.

Historycznie pierwszy z wyjaśnionych mechanizmów *checkpoint* odpowiada za stabilną blokadę cyklu komórkowego w fazie G1. Mechanizm ten zależny jest od białka p53, czynnika transkrypcyjnego regulującego aktywność wielu genów kodujących białka biorące udział w naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie [67]. Jednym z genów aktywowanych przez p53 jest WAF1/CIP1 kodujący białko p21, będące inhibitorem kinaz białkowych zależnych od cyklin (CDK, ang. *cycline-dependent kinase*). Dla regulacji cyklu komórkowego najistotniejsze jest wiązanie białka p21 do kompleksów cyklina/CDK, swoistych dla fazy G1 (cycD/CDK4 i cycD/CDK6). Związanie inhibitora blokuje aktywność kinazy i uniemożliwia fosforylację swoistych substratów, między innymi białka pRb [68]. Za aktywację białka p53 odpowiedzialny jest szereg modyfikacji post-translacyjnych, między innymi fosforylacje i acetylacje. Fosforylacja reszt serynowych znajdujących się w części N-końcowej (Ser-15 i -20) stabilizuje białko p53 (zapobiegając wiązaniu białka MDM2) i stymuluje acetylację części C-końcowej (Lys-382) przez acetylotransferazę p300/CBP, co zwiększa jego aktywność jako czynnika transkrypcyjnego [69, 70]. Kinazą fosforylującą resztę Ser-15 jest ATM (a także ATR i DNA-PK) [71], natomiast Ser-20 fosforylowana jest przez Chk2, kinazę fosforylowaną (Thr-68) i aktywowaną przez ATM [69]. Aktywacja obu kinaz ma miejsce w komórkach traktowanych promieniowaniem jonizującym, natomiast promieniowanie UV indukuje aktywację ATR i Chk1, kinazy o funkcji podobnej do Chk2 [7]. Ponadto ATM ma wpływ na stabilizację białka p53 poprzez modyfikację funkcji białka MDM2, czynnika katalizującego ubikwitynację p53 (i w rezultacie jego degradację w proteasomach). ATM fosforyluje białko MDM2 (Ser-395), co osłabia jego oddziaływanie z p53 [72]. Dodatkowo, ATM poprzez fosforylację seryny w pozycji 31 stabilizuje czynnik transkrypcyjny

E2F1, który aktywuje białko p19<sup>ARF</sup> blokujące MDM2 [73].

Poza stabilną blokadą cyklu komórkowego w fazie G1 ATM bierze udział w przejściowej (niezależnej od transkrypcji i białka p53) blokadzie cyklu komórkowego w fazie przejścia G1/S i G2/M. Przejścia te kontrolowane są za pomocą regulacji aktywności odpowiednich kinaz CDK (kompleks cycE/CDK2 w fazie G1/S i kompleks cycB/CDC2 w fazie G2/M). Fosforylacja dwu reszt aminokwasowych (Thr-14 i Tyr-15) jest czynnikiem inaktywującym te kinazy, a ich defosforylacja przez odpowiednie fosfatazy białkowe jest niezbędna do aktywacji. Tę defosforylację katalizują dwa białka: Cdc25A (w fazie G1/S) i Cdc25C (w fazie G2/M) [13]. W komórkach traktowanych promieniowaniem jonizującym obie fosfatazy są inaktywowane w wyniku fosforylacji katalizowanej przez Chk2, która z kolei jest aktywowana przez ATM [74]. Wydaje się, że w komórkach traktowanych promieniowaniem UV za regulację aktywności tych fosfataz odpowiedzialne są białka ATR i Chk1 [7]. Fosforylacja Cdc25A (Ser-123) umożliwia jego ubikwitynację i w rezultacie degradację w proteasomach [9]. Fosforylacja Cdc25C (Ser-216) powoduje jego wiązanie z białkiem 14-3-3 i translokację do cytoplazmy [75]. W zależnej od ATM blokadzie cyklu komórkowego w fazie S zaangażowane jest białko Nbs1 [76]. Innym białkiem zaangażowanym w regulację tego mechanizmu jest czynnik transkrypcyjny BRCA1 aktywowany przez ATM [77]. Ponadto w przekazywanie sygnału zaangażowane jest białko 53BP1, oddziałujące z histonem H2A.X i fosforylowane przez ATM [78].

Oprócz udziału w regulacji cyklu komórkowego, ATM uczestniczy w regulacji apoptozy indukowanej uszkodzeniami DNA (co będzie omówione w dalszej części pracy), oraz ma pewien wpływ na mechanizmy naprawy DNA. ATM fosforyluje i aktywuje kinazę białkową c-Abl [79], która z kolei fosforyluje białko Rad51 ułatwiając tworzenie jego kompleksu z Rad52 [80]. Jednym z wczesnych efektów działania ATM jest fosforylacja histonu H2A.X [58]. Postuluje się, że zmiany struktury chromatyny indukowane fosforylacją tego wariantu histonu mogłyby ułatwiać białkom naprawczym dostęp do uszkodzenia i stymulować naprawę [81].

### IV. Apoptoza indukowana przez uszkodzenia DNA

Apoptoza jest aktywnym procesem autodestrukcyjnym, umożliwiającym usunięcie z organizmu niepotrzebnych lub uszkodzonych komórek. Mecha-

nizm apoptozy wykorzystywany jest również do eliminacji komórek kumulujących nienaprawione uszkodzenia DNA [4]. Końcowe etapy apoptozy indukowanej przez uszkodzenia DNA zależne są od kaspazy-3 i białek przez nią regulowanych. Kaspaza-3 aktywowana jest przez kompleks zwany apoptosomem, w skład którego wchodzi: białko Apaf-1, kaspaza-9 i cytochrom c. Aktywność apoptosomu zależy od uwalniania z mitochondriów cytochromu c, który to proces znajduje się pod kontrolą pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 [82]. Stwierdzono, że deamidacja białka Bcl-X<sub>L</sub> jest ważnym czynnikiem uruchamiającym apoptozę w komórkach z uszkodzonym DNA [83]. Jednak mechanizmy, dzięki którym w odpowiedzi na uszkodzenia DNA dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c i innych białek apoptotycznych są w dalszym ciągu słabo zrozumiałe. W wielu typach komórek uruchomienie apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA zależne jest od białka p53. Białko p53 aktywuje wiele genów kodujących białka pro-apoptotyczne, między innymi białka z rodziny Bcl-2: Bax, Noxa i Puma [84]. Zakłada się, że podobnie jak w wypadku blokady cyklu komórkowego indukowanego przez uszkodzenia DNA, również w trakcie apoptozy aktywacja i stabilizacja p53 zależna jest od kinaz ATM/ATR (bezpośrednio i za pośrednictwem Chk2/Chk1) [85]. Wydaje się również, że chociaż DNA-PK nie bierze udziału w regulacji cyklu komórkowego, to fosforylacja p53 przez tę kinazę może mieć znaczenie dla indukcji apoptozy [86]. Indukowana przez uszkodzenia DNA aktywacja białka p53 inicjuje dwa przeciwstawne procesy: blokadę cyklu komórkowego, która ułatwia naprawę uszkodzeń i przeżycie komórki, oraz uśmiercanie komórek na drodze apoptozy. Wydaje się, że sposób odpowiedzi na uszkodzenia DNA zależy od typu komórek, oraz rodzaju i ilości uszkodzeń. Opisano ciekawy mechanizm pozwalający na zróżnicowanie odpowiedzi zależnej od p53, a polegający na kolejnej modyfikacji różnych domen tego białka. Napromieniowanie komórek indukuje fosforylację seryn w pozycjach 15 i 20, co umożliwia wiązanie p53 z promotorami genów niezbędnych do blokady cyklu komórkowego (np. WAF1/CIP1), i aktywuje gen kodujący białko p53DINP1. Białko to jest koaktywatorem kinazy białkowej fosforylującej resztę Ser-46 białka p53. Taka modyfikacja p53 umożliwia jego wiązanie z promotorem genu kodującego białko p53AIP, zaangażowane w uwalnianie cytochromu c z mitochondriów i indukcję apoptozy [87]. Hipotetycznie kinazą fosforylującą Ser-46 białka p53 mogłaby być kinaza białkowa p38MAPK indukowana przez stres

(np. promieniowanie UV) [88]. Tak więc pro-apoptotyczna aktywność p53 zależna byłaby od kilku czynników uruchamianych w sposób zależny od poziomu uszkodzeń DNA.

W pewnych typach komórek apoptoza indukowana przez czynniki uszkadzające DNA nie jest zależna od białka p53. W komórkach takich dla indukcji apoptozy niezbędna jest aktywność białka ATM [89]. W apoptozie zależnej od ATM, a niezależnej od p53, bierze udział białko p73, czynnik transkrypcyjny z rodziny p53 [90]. Znane są dwa mechanizmy aktywacji p73 przez ATM: w napromieniowanych komórkach ATM fosforyluje i stabilizuje czynnik transkrypcyjny E2F1, który aktywuje gen p73 [91], a dodatkowo, kinaza c-Abl aktywowana przez ATM wiąże się z p73 i aktywuje go przez fosforylację [90]. Ponadto, c-Abl warunkuje aktywację p73 przez acetylotransferazę p300 [92].

Do białek będących substratami kaspaz (głównie kaspazy-3) należą białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA: DNA-PKcs, ATM, PARP-1 oraz Rad51. Inaktywacja tych białek ma prawdopodobnie na celu uniemożliwienie naprawy DNA, procesu zbędnego w umiarkowanych komórkach, a konkurującego z procesami apoptotycznymi o dostęp do źródeł energii [93]. Stwierdzono, że generowane przez kaspazę-3 N-końcowe fragmenty PARP-1 silnie wiążą się z pęknięciami DNA uniemożliwiając wiązanie kompletnych, aktywnych katalitycznie cząsteczek tego białka [94]. Dodatkowo, aktywność jednej z nukleaz potencjalnie biorących udział w apoptotycznej fragmentacji DNA, białka DNAS1L3, regulowana jest przez poliADP-rybozylację. Brak PARP-1 pozwala na usunięcie polimerów ADP-rybozy i aktywację nukleazy [52].

## V. Telomery a białka rozpoznające pęknięcia DNA

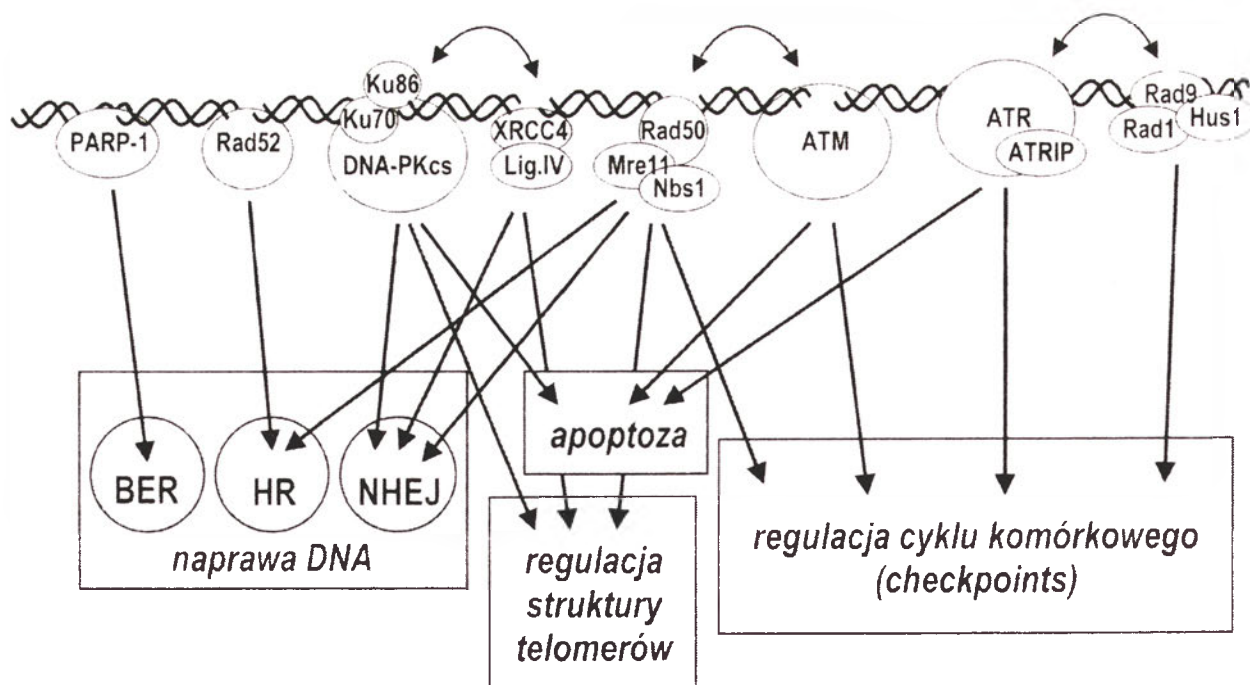
Telomery są strukturami odpowiedzialnymi za utrzymanie odpowiedniej długości końców chromosomów i zapobiegającymi ich łączeniu się ze sobą. Uważa się, że fuzje chromosomów mogą wynikać z zaburzeń w strukturze telomerów powodujących ich nieprawidłowe rozpoznawanie jako pęknięcia DNA mające podlegać naprawie. W rzeczywistości fuzje chromosomów zawierających telomery o nieprawidłowej strukturze katalizowane są przez ligazę IV DNA, białko zaangażowane w mechanizm NHEJ [95]. Telomery zawierają wiele białek swoistych dla tej struktury, oraz szereg białek zaangażowanych w naprawę DNA. Jednym z takich białek jest heterodimer Ku70/Ku86, związany z telomerami zarówno w



komórkach ssaków, jak i w komórkach drożdży [96]. Co ciekawe, w komórkach drożdży białko Ku zlokalizowane jest niemal wyłącznie w telomerach (razem z białkami Sir), a w napromieniowanych komórkach ulega przemieszczeniu z telomerów do miejsc zawierających pęknięcia DNA [97]. Brak białka Ku86 powoduje wystąpienie licznych fuzji chromosomów [98]. Białko Ku nie wiąże się z telomerowym DNA bezpośrednio (tak jak w przypadku DSB) lecz za pośrednictwem innych białek swoistych dla telomerów, na przykład białka TRF1 (ang. *telomere repeat binding factor*) [99]. Szereg danych wskazuje, że kinazy DNA-PKcs [100] i ATM [101] też zaangażowane są w utrzymanie struktury telomerów. W mechanizmy regulujące strukturę telomerów zaangażowane są również kompleksy zawierające Mre11. W komórkach ssaków kompleksy Rad50/Mre11/Nbs1 oddziałują z telomerami, prawdopodobnie biorąc udział w przyłączaniu telomerazy [102]. W komórkach drożdży brak któregośkolwiek z białek kompleksu Rad50/Mre11/Xrs2 powoduje skracanie telomerów lub zahamowanie podziałów komórkowych (tak jak w komórkach pozbawionych telomerazy) [37]. Rola białek rozpoznających pęknięcia DNA w regulacji struktury telomerów nie została dokładnie poznana. Wydaje się jednak, że jest ona niezależna od ich funkcji jako detektorów DSB.

## VI. Uwagi końcowe

Białka oddziałujące z końcami DNA nie są grupą jednorodną, ale pełnią zróżnicowane funkcje w metabolizmie DNA. Do białek tych należą białka naprawcze, białka związane z regulacją cyklu komórkowego oraz różnorodne białka enzymatyczne (np. ligazy czy nukleazy). Wyodrębnioną funkcjonalnie grupę białek stanowią detektory pęknięć DNA będące pierwszym elementem szlaków sygnałowych uruchamianych w komórce przez uszkodzenia DNA. Poznano już strukturę i mechanizm działania wielu z nich, a pozostałe są obiektem intensywnych badań. Jednym z ważnych czynników indukujących pęknięcia DNA jest promieniowanie jonizujące, stosowane w szczególnie wysokich dawkach do celów terapeutycznych, głównie w terapii przeciwnowotworowej. Obecnie przeszło 50% pacjentów z chorobami nowotworowymi leczonych jest promieniowaniem jonizującym, również w procedurach skojarzonych z chemioterapią (innym czynnikiem indukującym uszkodzenia DNA). Jest to stosunkowo bardzo skuteczna metoda terapeutyczna, połączona jednak z pewnym ryzykiem wystąpienia powikłań i niepożądanych skutków ubocznych. Indukcja DSB wydaje się najważniejszą przyczyną toksycznego działania promieniowania i ma decydujące znaczenie dla efektywności terapii (poprzez uszkodzanie komórek nowotworowych), jak i dla skutków ubocznych (poprzez uszkodzanie komórek prawidłowych). Dokładne poznanie mechanizmów komórkowej od-



**Ryc. 1.** Białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA (a także zaburzenia widełek replikacyjnych - ATR i Rad9/Rad1/Hus1) oraz procesy komórkowe, w których uczestniczą. Udokumentowane związki funkcjonalne między poszczególnymi białkami detektorowymi oznaczono strzałkami o dwu ostrzach.

powiedzi na promieniowanie jonizujące, w których rolę nie do przecenienia odgrywają detektory pęknięć DNA, będzie miało olbrzymie znaczenie kliniczne w terapii przeciwnowotworowej i ochronie zdrowych tkanek przed promieniowaniem.

Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych, grant 4P05A01519

Artykuł otrzymano 3 lutego 2003

Zaakceptowano do druku 9 października 2003

## Piśmiennictwo

- Hahn WC, Weinberg RA (2002) *Nature Rev Cancer* **2**: 331-341.
- Bassing CH, Assing CH, Swat W, Alt FW (2002) *Cell* **109**: S45-S55.
- Lieber MR (1998) *Am J Pathol* **153**: 1323-1332.
- Richt T, Allen RL, Wyllie AH (2000) *Nature* **407**: 777-783.
- Evan G, Littlewood T (1998) *Science* **281**: 1317-1322.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) *EMBO J* **17**: 5497-5508.
- Durocher D, Jackson SP (2001) *Curr Opin Cell Biol* **13**: 225-231.
- Abraham RT (2001) *Genes Dev* **15**: 2177-2196.
- Bartek J, Lukas J (2001) *Curr Opin Cell Biol* **13**: 738-747.
- D'Amours D, Jackson SP (2002) *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-327.
- Melo J, Toczyski D (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**: 237-245.
- Shiloh Y (2001) *Curr Opin Gen Dev* **11**: 71-77.
- Grzelakowska — Sztabert B (2002) *Post Biol Kom* **29**: 157-175.
- Featherstone C, Jackson SP (1999) *Mutat Res* **434**: 3-15.
- Bliss TM, Lane DP (1997) *J Biol Chem* **272**: 5765-5773.
- Wang J, Dong X, Reeves WH (1998) *J Biol Chem* **273**: 31068-31074.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) *Nature* **412**: 607-614.
- Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P, Li L, Li GC (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13588-13593.
- Hartley KO, Gell D, Smith GC, Zhang H, Divecha N, Connelly MA, Admon A, Lees — Miller SP, Anderson C W, Jackson SP (1995) *Cell* **82**: 849-856.
- Hammarsten O, Chu G (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 525-530.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G (2002) *EMBO J* **21**: 3192-3200.
- Smith GC, Jackson SP (1999) *Genes Dev* **13**: 916-934.
- Jimenez GS, Bryntesson F, Torres — Arzayus MI, Priestley A, Beeche M, Saito S, Sakaguchi K, Appella E, Jeggo PA, Taccioli GE, Wahl GM, Hubank M (1999) *Nature* **400**: 81-83.
- Zdzienicka M Z (1999) *Biochimie* **81**: 107-116.
- Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR (1997) *Nature* **388**: 495-498.
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR (1997) *Nature* **388**: 492-495.
- Chen L, Trujillo K, Sung P, Tomkinson AE (2000) *J Biol Chem* **275**: 26196-26205.
- Frank KM, Sekiguchi JM, Seidl KJ, Swat TW, Rathbun GA, Cheng H - L, Davidson L, Kangaloo L, Alt FW (1998) *Nature* **396**: 173-177.
- Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998) *J Biol Chem* **273**: 1794-1801.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) *Cell* **108**: 781-794.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001) *Science* **291**: 1284-1289.
- VanDyck E, Stasiak A Z, Stasiak A, West SC (1999) *Nature* **398**: 728-731.
- Essers J, Houtsmuller AB, Van Veelen L, Paulusma C, Nigg A L, Pastink A, Vermeulen W, Hoeijmakers J H J, Kanaar R (2002) *EMBO J* **21**: 2030-2037.
- Rijkers T, VandenOuweland J, Morolli B, Rolink A G, Baarends WM, Van Sloun PPH, Lohman PHM, Pastink A (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 6423-6429.
- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M (2001) *Genes Dev* **15**: 3237-3242.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates III JR, Hays L, Morgan WF, Petrini J H J (1998) *Cell* **93**: 477-486.
- Haber JE (1998) *Cell* **95**: 583-586.
- Moreau S, Morgan EA, Symington LS (2001) *Genetics* **159**: 1423-1433.
- Moreau S, Ferguson JR, Symington LS (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 556-566.
- Pauli TT, Gellert M (1999) *Genes Dev* **13**: 1276-1288.
- DeJager M, Van Noort J, Van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) *Mol Cell* **8**: 1129-1135.
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K - I, Matsuura S, Nakamura A, Shiraiishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, Komatsu K (2001) *J Biol Chem* **276**: 12-15.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes C MR, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) *Cell* **93**: 467-476.
- Mirzoeva OK, Petrini J H J (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 281-288.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NGJ, Raams A, Byrd PJ, Petrini J H J, Taylor A MR (1999) *Cell* **99**: 577-587.
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 405-411.
- Ziegler M, Oei S L (2001) *BioEssays* **23**: 543-548.
- Herceg Z, Wang Z - Q (2001) *Mutat Res* **477**: 97-110.
- Oei S L, Griesenbeck J, Schweiger M, Ziegler M (1998) *J Biol Chem* **273**: 31644-31647.
- Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M (1999) *Oncogene* **18**: 4616-4625.
- Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA (1999) *Mol Cell Biochem* **193**: 23-30.
- Smulson ME, Simbulan — Rosenthal CM, Boulares AH, Yakovleva A, Stoica B, Iyer S, Luo R, Haddad B, Wang Z Q, Pang T, Jung M, Dritschilo A, Rosenthal DS (2000) *Advan Enzyme Regul* **40**: 183-215.
- Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H (1997) *Nature* **388**: 900-903.
- Arnold J, Grune T (2002) *BioEssays* **24**: 1060-1065.
- Rotman G, Shiloh Y (1997) *BioEssays* **19**: 911-917.
- Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB (1999) *J Biol Chem* **274**: 37538-37543.
- Taniguchi T, Garcia — Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim S - T, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD (2002) *Cell* **109**: 459-472.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) *J Biol Chem* **276**: 42462-42467.
- Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G (2001) *J Biol Chem* **276**: 38224-38230.
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K - I, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K (2002) *Curr Biol* **12**: 1846-1851.
- Suzuki K, Kodama S, Watanabe M (1999) *J Biol Chem* **274**: 25571-25575.
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) *Nature* **421**: 499-506.
- Cortez D, Guntuku S, Oin J, Elledge SJ (2001) *Science* **294**: 1713-1716.
- Nghiem P, Park PK, Kim Y - S, Vaziri C, Schreiber SL (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9092-9097.

65. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) *Genes Dev* **14**: 927-939.
66. Carbone R, Pearson M, Minucci S, Pelicci PG (2002) *Oncogene* **21**: 1633-1644.
67. Sherr CJ, Weber JD (2000) *Curr Opin Gen Dev* **10**: 94-99.
68. Ekholm S V, Reed S I (2000) *Curr Opin Cell Biol* **12**: 676-684.
69. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis T D (2000) *Genes Dev* **14**: 278-288.
70. Ito A, Lai C-H, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao T — P (2001) *EMBO J* **20**: 1331-1340.
71. Banin S, Moyall L, Shieh S-Y, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) *Science* **281**: 1675-1679.
72. Maya R, Balass M, Kim S-T, Shkedy D, Leal J — FM, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M (2001) *Genes Dev* **15**: 1067-1077.
73. Lin W-C, Lin F T, Nevins J R (2001) *Genes Dev* **15**: 1833-1844.
74. Falck J, Mailand N, Syljuasen R G, Bartek J, Lukas J (2001) *Nature* **410**: 842-847.
75. Peng C Y, Graves P R, Thoma R S, Wu Z, Shaw A S, Pivnicka — Worms H (1997) *Science* **277**: 1501-1505.
76. Falck J, Petrini J H J, Williams B R, Lukas J, Bartek J (2002) *Nature Genet* **30**: 290-294.
77. Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. (1999) *Science* **286**: 1162-1166.
78. Fernandez — Capetillo O, Chen H — T, Celeste A, Ward I, Romanienko P J, Morales J C, Naka K, Xia Z, Camerini — Otero D, Motoyama N, Carpenter P B, Bonner W M, Chen J, Nussenzweig A (2002) *Nature Cell Biol* **4**: 993-997.
79. Shafman T, Khanna K K, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin M F (1997) *Nature* **387**: 520-523.
80. Chen G, Yuan S — S F, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff S P, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser P J, Park M S, Sung P, Lee E Y — H P (1999) *J Biol Chem* **274**: 12748-12752.
81. Paull T T, Rogakou E P, Yamazaki V, Kirchgessner C U, Gellert M, Bonner W M (2000) *Curr Biol* **10**: 886-895.
82. Kelekara A, Thompson C B (1998) *Trends Cell Biol* **8**: 324-330.
83. Deverman B E, Cook B L, Manson S R, Niederhoff R A, Langer E M, Rosová I, Kulans L A, Fu X, Weinberg J S, Heinecke J W, Roth K A, Weintraub S J (2002) *Cell* **111**: 51-62.
84. Benchimol S (2001) *Cell Death Differ* **8**: 1049-1051.
85. Cohen — Jonathan E, Bernhardt E, McKenna W G (1999) *Curr Opin Chem Biol* **3**: 77-83.
86. Wang S, Guo M, Ouyang H, Li X, Cordon — Cardo C, Kurimasa A, Chen D J, Fuks Z, Ling C C, Li G C (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1584-1588.
87. Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng C C, Taya Y, Monden M, Nakamura Y (2001) *Mol Cell* **8**: 85-94.
88. Bulavin D V, Saito S, Hollander M C, Sakaguchi K, Anderson C W, Appella E, Fornace A J (1999) *EMBO J* **18**: 6845-6854.
89. Bhandoola A, Dolnick B, Fayad N, Nussenzweig A, Singer A (2000) *J Exp Med* **192**: 891-897.
90. Wang J Y (2000) *Oncogene* **19**: 5643-5650.
91. Lissy N A, Davis P K, Irvin M, Kaelin W G, Dowdy S F (2000) *Nature* **407**: 642-645.
92. Constanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole P A, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L B, Landino G, Balsano C, Levrero M (2002) *Mol Cell* **9**: 175-186.
93. Bernstein C, Bernstein H, Payne C M, Garewal H (2002) *Mutat Res* **511**: 145-178.
94. D'Amours D, Sallmann F R, Dixit V M, Poirier G G (2001) *J Cell Sci* **114**: 3771-3778.
95. Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve — Grez H, Jauch A, de Lange T (2002) *Curr Biol* **12**: 1635-1644.
96. Hsu H-L, Gilley D, Blackburn E H, Chen D J (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12454-12458.
97. Haber J E (1999) *Cell* **97**: 829-832.
98. Samper E, Goytisolo F A, Slijpcevic P, van Buul P P W, Blasco M A (2000) *EMBO Reports* **1**: 244-252.
99. Hsu H-L, Gilley D, Galande S A, Hande M P, Allen B, Kim S-H, Li G C, Campisi J, Kohwi — Shigematsu T, Chen D J (2000) *Genes Dev* **14**: 2807-2812.
100. Espejel S, Franco S, Sgura A, Gaed, Bailey S M, Taccioli G E, Blasco M A (2002) *EMBO J* **21**: 6275-6287.
101. Kishi S, Lu K P (2002) *J Biol Chem* **277**: 7420-7429.
102. Tsukamoto Y, Taggart A K, Zakian V A (2001) *Curr Biol* **11**: 1328-1335.



# Polimeraza poli(ADP-rybozy) i jej udział w naprawie DNA

## Poly(ADP-ribose) polymerase and its function in DNA repair

TOMASZ ŚLEDZIŃSKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa i rodzaje polimeraz poli(ADP-rybozy) (PARP)
- III. Struktura chemiczna poli(ADP-rybozy)
- IV. Glikohydrolaza poli(ADP-rybozy) (PARG)
- V. Znaczenie poli(ADP-rybozylacji) w naprawie DNA i utrzymaniu integralności genomu
- VI. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** ADP — adenozyndifosforan; ADPr — ADP-ryboza; AMP — adenozymonofosforan; BER (ang. *base excision repair*) — system naprawy DNA przez wycinanie zasad; BRCT (ang. *C-terminal domain of breast cancer protein BRCA1*) — C-końcowa domena białka BRCA1; DNA — kwas deoksyrybonukleinowy; HMG (ang. *high mobility group protein*) — białka HMG; hnRNP (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) — heterogenna rybonukleoproteina jądrowa; HSSB (ang. *human single-stranded binding protein*) — ludzkie białko wiążące pojedynczą nić DNA; LP-BER (ang. *long path base excision repair*) — system naprawy DNA przez wycinanie zasad długiej łańki; NAD<sup>+</sup> — dwunukleotyd nikotynoamido-adeninowy; NER (ang. *nucleotide excision repair*) system naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów; pADPr — poli(ADP-ryboza); PARG — glikohydrolaza poli(ADP-rybozy); PARP — polimeraza poli(ADP-rybozy); PCNA (ang. *Proliferating cell nuclear antigen*) — antygen jądrowy różnicujących się komórek; RNA — kwas rybonukleinowy; TFII-F (ang. *transcription factor II-F*) — czynnik transkrypcyjny II-F; TRF1 (ang. *telomere-repeat binding factor-1*) — czynnik wiążący telomery; VPARP (ang. *Vault PARP*) — polimeraza poli(ADP-rybozy) związana z kompleksem rybonukleoproteinowym *Vault*; XRCC1 (ang. *X-ray repair cross-complementing group 1*) — białko naprawiające uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem X

### Contents:

- I. Introduction.
- II. Structure and classes of poly(ADP-ribose) polymerases (PARP)
- III. Chemical structure of poly(ADP-ribose)
- IV. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)
- V. Role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA repair and genomic integrity
- VI. Summary

### I. Wstęp

Poli(ADP-rybozylacja) jest potranslacyjną modyfikacją białek zachodzącą w jądrze komórkowym. Proces ten jest jedną z pierwszych odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA. Poli(ADP-rybozylacja) jest katalizowana przez enzymy z rodziny polimeraz poli(ADP-rybozy) z których najlepiej poznana jest polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 oznaczana symbolem PARP1 (EC 2.4.2.30). Enzym ten występuje u wszystkich *Eukaryota* z wyjątkiem drożdży. PARP1 wiąże się z uszkodzoną nicią DNA i syntetyzuje łańcuchy poli(ADP-rybozy) przyłączone kowalencyjnie do różnych białek jądrowych, w tym również do PARP1. Donorem reszt ADP-rybozy w tej reakcji jest komórkowy NAD<sup>+</sup>. Okres półtrwania poli(ADP-rybozy) jest bardzo krótki i już po około minucie od momentu syntezy łańcuchy poli(ADP-rybozy) są enzymatycznie degradowane przez glikohydrolazę poli(ADP-rybozy) oznaczaną symbolem PARG (EC 3.2.1.143). Poli(ADP-rybozylacja) odgrywa istotną rolę w najważniejszych procesach zachodzących w jądrze komórkowym. Ważną grupą białek ulegających poli(ADP-rybozylacji) są histony. Poli(ADP-rybozylacja) histonów powoduje zmiany w strukturze chromatyny, co w istotny sposób wpływa na procesy replikacji i naprawy DNA oraz transkrypcji. Zahamowanie aktywności PARP powoduje zahamowanie procesów naprawy DNA i utratę stabilności genomowej. W tym artykule zostanie

\*Mgr; Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1, tel. 583491463, e-mail: tsledz@amg.gda.pl

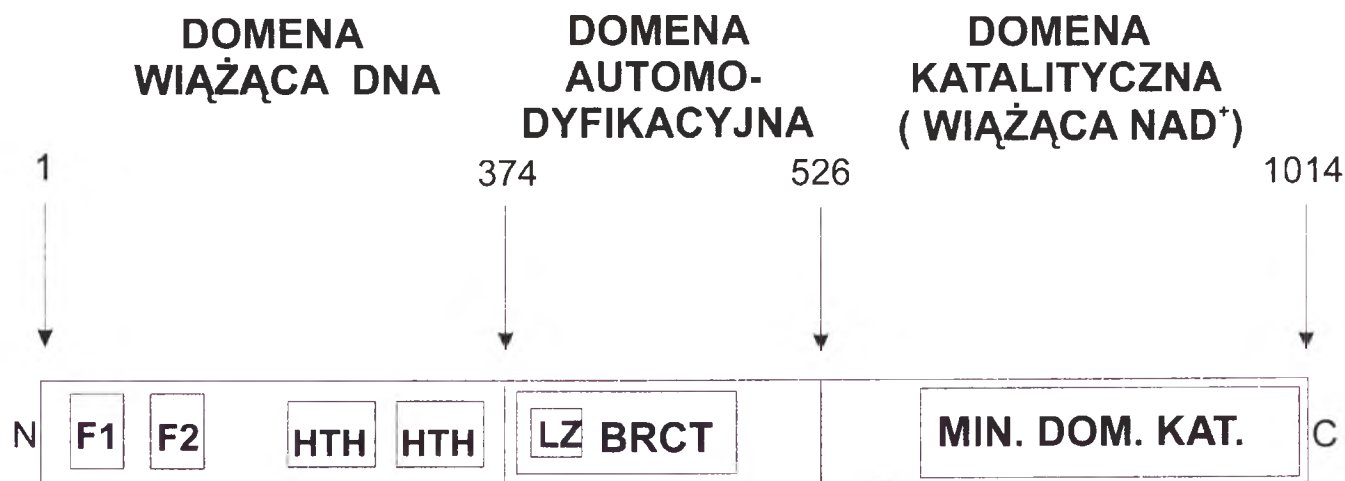
przedstawiona rola poli(ADP-rybozylacji) w naprawie DNA i utrzymaniu stabilności genomu w komórce. Ponadto zostaną omówione inne, znane enzymy z rodziny polimeraz poli(ADP-rybozy).

## II. Budowa i rodzaje polimeraz poli(ADP-rybozy) (PARPs)

Pod koniec lat osiemdziesiątych odkryty został gen kodujący polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1) [1]. W ostatnich latach wykazano również istnienie innych genów kodujących polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARPs). Homologia w obrębie grupy polimeraz poli(ADP-rybozy) ogranicza się do C-końcowej części PARP [1]. Najlepiej poznana jest budowa PARP1 kodowanej u ludzi przez gen *ADPRT*. Białko to ma masę cząsteczkową 113 kDa i składa się z 3 domen: wiążącej DNA, automodyfikacyjnej i katalitycznej (nazywanej również domeną wiążącą  $\text{NAD}^+$ ) [2]. Najbardziej konserwowaną w ewolucji jest domena katalityczna, zlokalizowana w C-końcowej części białka [2] (Ryc. 1).

znają uszkodzenia jednej lub obu nici DNA [5]. Wykazano, że za wiązanie PARP1 do DNA w największym stopniu odpowiedzialne są motywy helisa-skręt-helisa znajdujące się w C-końcowej części domeny wiążącej DNA [6]. PARP1 wiąże się jako homodimer w miejscu przerwania jednej lub obydwu nici DNA [7].

Domena automodyfikacyjna znajduje się w środkowej części enzymu, u ludzi pomiędzy aminokwasami 374 i 525 [3]. W jej skład wchodzi między innymi 15 reszt kwasu glutaminowego (co stanowi ok. 10% aminokwasów w tej domenie), które ulegają poli(ADP-rybozylacji) [4]. Domena ta zawiera w N-końcowej części suwak leucynowy (LZ — Ryc. 1), który warunkuje homodimeryzację PARP1 a także interakcje z innymi białkami [8]. Homodimeryzacja warunkuje aktywność PARP1 [9]. W obszarze od 384 do 479 aminokwasu u ludzi znajduje się domena BRCT (ang. *C-terminal domain of breast cancer protein BRCA1*) (BRCT — Ryc. 1) [10]. Domeny takie spotyka się w różnych białkach regulujących cykl komórkowy i naprawę DNA [10]. Jej obecność w



**Ryc. 1.** Budowa PARP. Objasnienia: F1, F2 - palce cynkowe; HTH - helisa-skręt-helisa; LZ - suwak leucynowy; MIN. DOM. KAT - minimalna domena katalityczna; BRCT (c-terminal domain of breast cancer protein BRCA1) - C-końcowa domena białka BRCA1.

Domena wiążąca DNA znajduje się w N-końcowej części białka. U ludzi zbudowana jest z 373 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 42 kDa. Zawiera dwa palce cynkowe (F1, F2 — Ryc. 1) i dwa motywy helisa-skręt-helisa (HTH — Ryc. 1) [3,4]. Palce cynkowe PARP1 mają nietypową strukturę. Sekwencje Cys-Cys-His-Cys wiążące cynk składają się z 28-30 aminokwasów, podczas gdy u większości białek zawierających palce cynkowe zbudowane są one z 12-13 reszt aminokwasowych. Sekwencje te rozpo-

PARP1 umożliwia interakcje z innymi białkami zawierającymi domenę BRCT i tworzenie z nimi kompleksów odpowiedzialnych między innymi za naprawę DNA [11].

Domena katalityczna nazywana domeną wiążącą  $\text{NAD}^+$  znajduje się w C-końcowej części PARP1. U ludzi ma masę cząsteczkową 55 kDa i zajmuje obszar od 526 do 1014 aminokwasu [3]. Katalizuje inicjację poli(ADP-rybozylacji) substratu, wydłużanie polimeru i tworzenie rozgałęzień poli(ADP-rybozy)

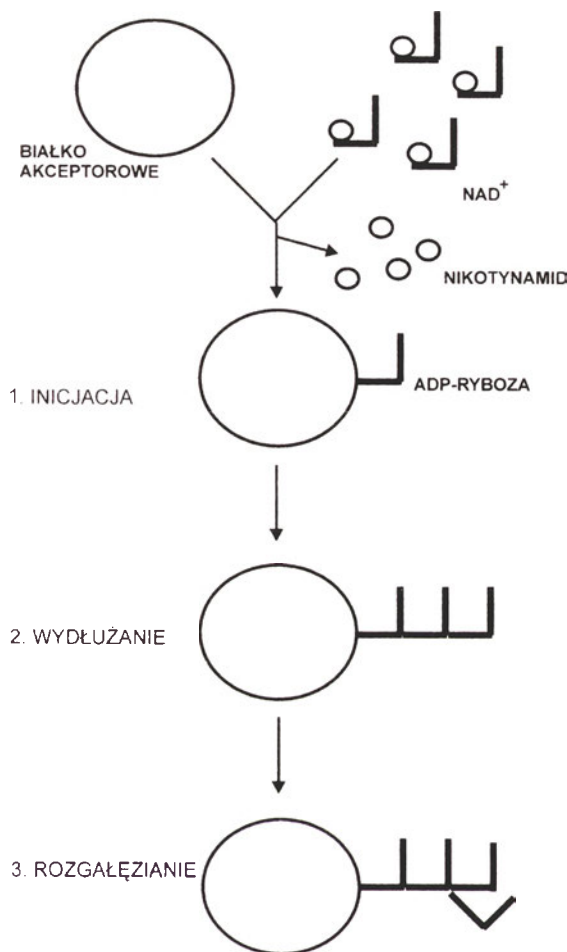
(pADPr) (Ryc. 2) [12,13]. Aktywności te znajdują się w obrębie 40 kDa fragmentu zlokalizowanego w C-końcu białka. Fragment ten nazywa się minimalną domeną katalityczną (MIN. DOM. KAT. — Ryc. 1) [14]. Jest on określany również jako domena homologii PARP, gdyż wykazuje duży stopień homologii u wszystkich enzymów z rodziny PARP [1]. Centrum

ADP-rybozy związanych z białkami akceptorowymi występuje wówczas w formie mono-ADPr (pojedynczych jednostek ADPr związanych z białkiem) lub oligo-ADPr (łańcuchów o długości do 11 jednostek) [18,19]. Aktywność PARP1 i stężenie poli(ADP-rybozy) w komórce może szybko wzrosnąć nawet do 500 razy w przypadku uszkodzenia DNA [20,21]. Powoduje to jednocześnie spadek stężenia komórkowego  $\text{NAD}^+$  [22]. PARP1 jest *in vivo* głównym akceptorem poli(ADP-rybozy) [23]. Poza własną poli(ADP-rybozylacją) PARP1 modyfikuje inne białka. Większość substratów PARP1 stanowią białka jądrowe odpowiedzialne za metabolizm kwasów nukleinowych i stabilność struktury chromatyny [12]. Nawet niewielki stopień poli(ADP-rybozylacji) zmienia w znaczący sposób właściwości modyfikowanych białek ze względu na ujemny ładunek polimeru [24]. Substraty poli(ADP-rybozylacji) klasyfikuje się według ich funkcji. Wyróżnia się grupy białek odpowiedzialne za utrzymywanie struktury chromatyny, syntezę DNA, naprawę DNA, transkrypcję oraz cykl komórkowy (Tabela 1). Poli(ADP-rybozylacja) enzymów zazwyczaj powoduje zahamowanie ich aktywności katalitycznej [24]. Ponadto przyłączenie ujemnie naładowanych reszt poli(ADP-rybozy) upośledza lub znosi zdolność białek do wiązania DNA [25].

O budowie i funkcji innych enzymów z rodziny PARP wiadomo niewiele. Najnowsze informacje zostały przedstawione w Tabeli 2.

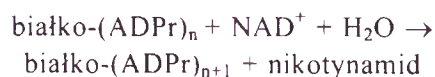
### III. Struktura chemiczna poli(ADP-rybozy)

Poli(ADP-ryboza) jest homopolimerem zbudowanym z jednostek ADP-rybozy połączonych wiązaniami glikozydowymi [26,27]. Polimery ADP-rybozy są przyłączane wiązaniem estrowym do  $\gamma$ -karboksylowych grup reszt kwasu glutaminowego różnych białek [28]. Rzadziej modyfikowane są grupy karboksylowe kwasu asparaginowego [28]. Jednostki polimeru połączone są między sobą wiązaniami glikozydowymi 1'' $\rightarrow$ 2' pomiędzy rybozami (Ryc. 3). Wielkość polimeru bywa różna i może osiągać 200 jednostek ADP-rybozy. Polimery dłuższe niż 80 jednostek ADPr posiadają rozgałęzienia utworzone przez wiązania glikozydowe 1''' $\rightarrow$ 2'' pomiędzy rybozami [29] (Ryc. 3). Rozgałęzienia w polimerze występują nieregularnie, średnio co 20-50 jednostek ADP-rybozy [28]. Długie łańcuchy poli(ADP-rybozy) mają helikoidalną strukturę drugorzędową [30].



Ryc. 2. Synteza polimerów ADP-rybozy.

katalityczne tej domeny zawiera strukturę  $\beta$ - $\alpha$ -pętla- $\beta$ - $\alpha$ , która jest odpowiedzialna za wiązanie  $\text{NAD}^+$  [15]. Jednostki ADP-rybozy (ADPr) pochodzą z hydrolizy  $\text{NAD}^+$ , podczas której powstaje również nikotynamid [16] zgodnie z równaniem reakcji:



Powstający w tej reakcji nikotynamid może być zużywany do resyntezy  $\text{NAD}^+$  lub przekształcany w N-metylo-2-pirydono-5-karboksamid, który jest wydalany z moczem [17]. W komórkach, w których nie dochodzi do uszkodzenia DNA, ilość poli(ADP-rybozy) jest niewielka. Większość jednostek



**Tabela 1.**

Białka ulegające poli(ADP-rybozylacji) i znaczenie tego procesu dla funkcji komórki.

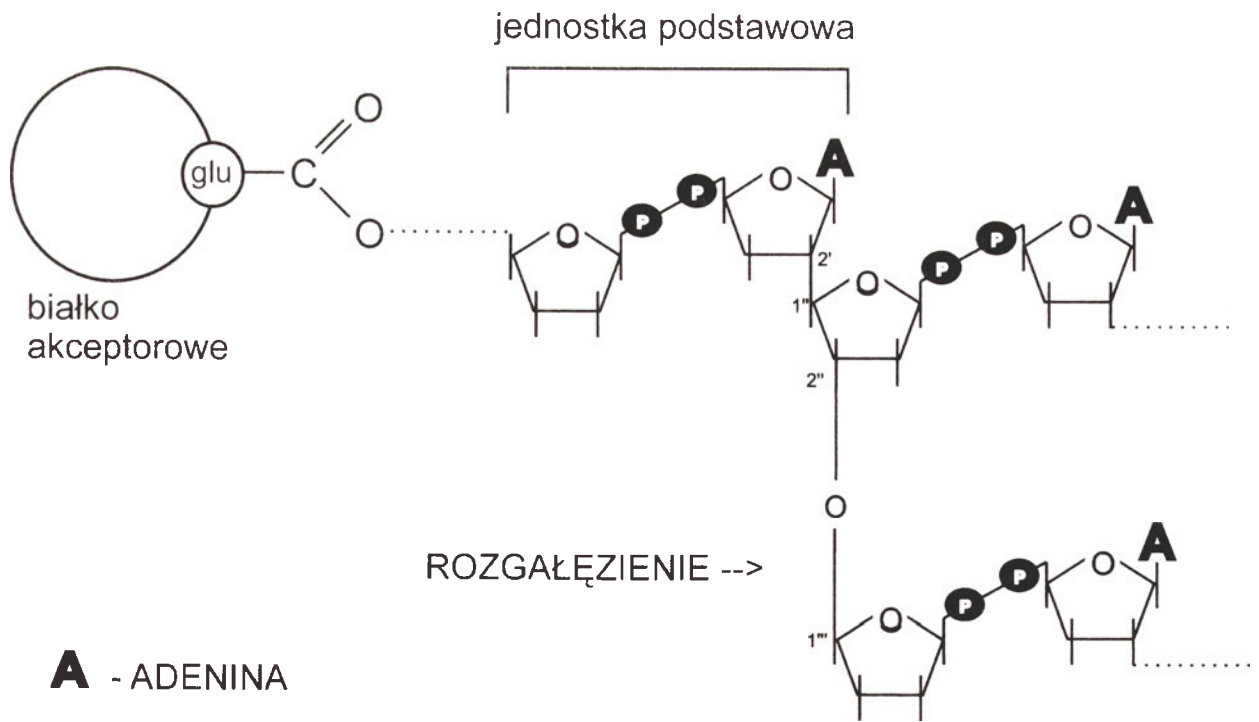
FUNKCJA	AKCEPTOR	PIŚMIENICTWO
Modulacja struktury chromatyny	Histony : H1,H2A,H2B,H3,H4	[85,86]
	Białka HMG	[70]
	PARP	[23]
	Topoizomerazy I, II	[87,88]
Synteza DNA	HSSB	[89]
	Ligazy DNA	[90]
	Polimerazy DNA $\alpha,\beta$	[90]
	Topoizomeraza II	[89]
Naprawa DNA	PARP	[23]
	Ligazy DNA	[90]
	Polimerazy DNA $\alpha,\beta$	[90]
	XRCC1	[63]
	Histony	[85,86]
Transkrypcja	Histony	[91]
	Polimerazy RNA	[92]
	hnRNP	[93]
	Topoizomerazy I, II	[87,94]
	Białka HMG	[70,95]
	TFII-F	[96]
Cykl komórkowy	p53	[97]
	Fos	[98]
	PCNA	[99]

HMG (ang. *high mobility group protein*) – białka HMG; HSSB (ang. *human single-stranded binding protein*) – ludzkie białko wiążące pojedynczą nić DNA; hnRNP (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) – heterogenna rybonukleoproteina jądrowa.; PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) – antygen jądrowy różnicujących się komórek; TFII-F (ang. *transcription factor II-F*) – czynnik transkrypcyjny II-F; XRCC1 (ang. *X-ray repair cross-complementing group 1.*) – białko naprawiające uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem X.

#### IV. Glikohydrolaza poli(ADP-rybozy) (PARG)

Glikohydrolaza pADPr (PARG) jest enzymem odpowiedzialnym za katabolizm pADPr [31]. Zawiera aktywności endoglikozydazy odpowiedzialnej za usuwanie rozgałęzień polimeru i egzoglikozydazy odpowiedzialnej za usuwanie po jednej reszcie ADP-rybozy od końca polimeru [32] (Ryc. 4). U ludzi ma masę cząsteczkową 111 kDa [33]. Zawiera N-końcową domenę regulatorową, centralną domenę lokalizacji jądrowej i C-końcową domenę katalityczną [33] (Ryc. 5). Gdy w komórce nie dochodzi do uszkodzenia DNA, PARG zlokalizowana jest w cytosolu w okolicy jądra komórkowego [34]. W wyniku uszkodzenia DNA PARG przemieszcza się do jądra

komórkowego i degradowuje powstałe w wyniku działania PARP polimery ADP-rybozy. Okres półtrwania pADPr *in vivo* wynosi w takiej sytuacji poniżej 1 min [35]. W komórkach nie traktowanych czynnikami uszkadzającymi DNA, poli(ADP-ryboza) występuje głównie w formie mono- lub oligo-ADPr i jej okres półtrwania wynosi około 7 godzin [20]. Do aktywacji PARG *in vivo* potrzebne jest 5  $\mu$ M stężenie pADPr [20]. *In vitro* długie polimery ADPr są degradowane szybciej od krótkich, co wynika ze współdziałania aktywności endo- i egzoglikozydazy PARG [32,36]. Aktywność endoglikozydazy pozwala również na powstawanie wolnych polimerów ADPr, które mogą oddziaływać na nukleosomy [37]. PARG zapobiega też tworzeniu bardzo długich łańcuchów poli(ADP-rybozy) przyłączonych do



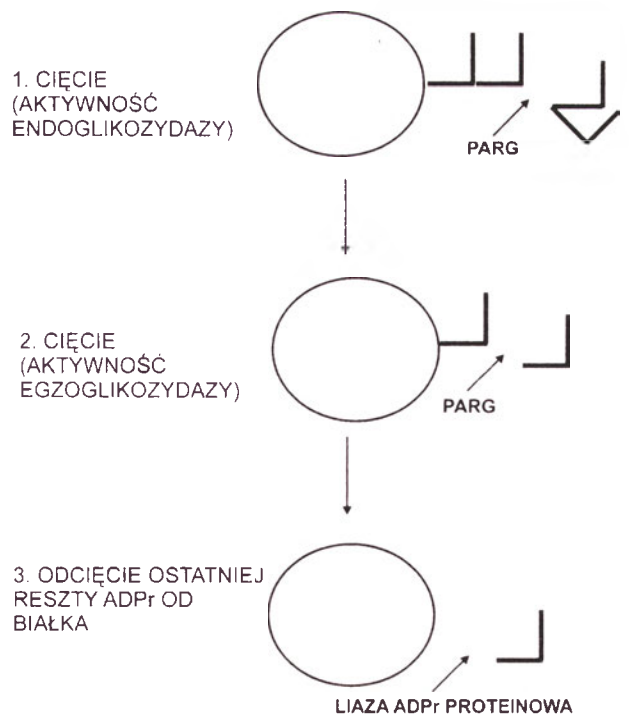
Ryc. 3. Struktura chemiczna poli(ADP-rybozy).

białek akceptorowych [24]. Ostatnia jednostka ADPr z cząsteczki białka jest uwalniana w reakcji katalizowanej przez liazę ADPr-białko (Ryc. 4) [38]. Uwolnione z polimerów jednostki ADP-rybozy są degradowane przez pirofosfatazy ADPr do AMP i rybozo-5-fosforanu [39].

## V. Znaczenie poli(ADP-rybozylacji) w naprawie DNA i utrzymaniu integralności genomu

Wzrost stężenia poli(ADP-rybozylowanych) białek w komórce jest skutkiem uszkodzenia DNA [40] i jest ściśle związany z obniżeniem stężenia  $NAD^+$  w komórce [41]. Związek pomiędzy działaniem PARP z naprawą DNA wykazano stosując inhibitory tego enzymu. Wiążą się one w miejscu katalitycznym PARP, hamując kompetycyjnie aktywność enzymu [42]. Przykładem kompetycyjnych inhibitorów PARP są benzamidy oraz benzamidazole [42,43]. Zastosowanie inhibitorów PARP zmniejsza efektywność procesów naprawy DNA w komórce, a w konsekwencji zwiększa okres półtrwania uszkodzeń DNA [44,45]. Powoduje to utratę stabilności genomowej i nagromadzenie uszkodzonych komórek na przejściu faz  $G_2$  i M cyklu komórkowego [46]. Stan taki charakteryzuje się ponadto zwiększoną częstością zamian siostrzanych chromatyd [47], rekombinacji homologicznych [48] i utratą części powielanych genów [49]. Nasila się proces apoptozy, natomiast zmniejsza się częstość martwicy ko-

mórek, co prawdopodobnie związane jest z ograniczeniem zużycia  $NAD^+$  przez PARP [50,51]. W komórkach pozbawionych genu PARP zaobserwowano skrócenie telomerów i zwiększenie ilości mikrojąder - fragmentów chromatyd, które nie uległy włączeniu do jąder komórek potomnych i których obecność świadczy o niestabilności genomu [52,53]. W populacji komórek z usunięciem (ang. *knockout*) genu kodującego PARP obserwuje się komórki tetraploidal-



Ryc. 4. Rozpad polimerów ADP-rybozy.

N

DOMENA  
REGULATOROWADOMENA  
LOKALIZACJI  
JĄDROWEJDOMENA  
KATALITYCZNA

C

Ryc. 5. Budowa PARP

ne i aneuploidalne, co świadczy o zaburzeniach podziałów komórkowych [54]. Zahamowanie naprawy DNA zaobserwowano również w doświadczeniach z użyciem specyficznego antysensownego RNA do mRNA genu ADPRT [55].

Molekularny mechanizm udziału PARP w naprawie DNA nie został dotychczas wyjaśniony. Zaproponowano cztery różne modele tłumaczące rolę poli(ADP-rybozylacji) w naprawie DNA i utrzymywaniu stabilności genomowej, które zostaną omówione poniżej:

1. Model sygnalizacyjny (ang. *the signalling model*). Model ten zakłada, że poli(ADP-rybozylacja) sygnalizuje pojawienie się uszkodzeń DNA efektorom zaangażowanym w komórkową odpowiedź na uszkodzenie DNA. Automodyfikacja PARP i modyfikacja histonów ma być sygnałem uruchamiającym mechanizmy naprawy DNA [24]. W wielu białkach odpowiedzialnych za naprawę DNA i stabilność genomu stwierdzono obecność dwudziestoaminokwasowej sekwencji wiążącej niekowalencyjnie poli(ADP-rybozę) [56]. Fragment ten może pełnić rolę „czujnika” informującego o uszkodzeniu DNA. Przykładem takiego modelu jest wpływ poli(ADP-rybozylacji) na działanie białka supresorowego p53. W przypadku uszkodzenia DNA następuje wzrost aktywności białka p53, które zatrzymuje cykl komórkowy na przejściu faz G1 i S cyklu komórkowego [57], co zapewnia czas potrzebny do naprawy DNA. Inhibicja PARP blokuje wykrywanie uszkodzeń DNA i wzrost aktywności p53 [58]. Przejście do fazy S komórki z uszkodzonym DNA powoduje dalsze uszkodzenia, co skutkuje dużym nagromadzeniem komórek z uszkodzonym DNA na przejściu faz G2 i M cyklu komórkowego [24]. Aktywacja p53 przez PARP nie może być jednak jedynym mechanizmem tłumaczącym rolę PARP w naprawie DNA. Wykazano bowiem, że myszy pozbawione genu kodującego PARP nie zapadają na nowotwory tak często jak zwierzęta pozbawione p53 [24,59].

2. Model rekrutacyjny (ang. *the recruiting model*). Model ten zakłada, że PARP rozpoznaje uszkodzenia DNA, modyfikuje białka związane z chromatyną w miejscu uszkodzenia i przyciąga w miejsce uszko-

dzenia składniki systemu naprawy DNA wycinającego zasady azotowe (BER, ang. *base excision repair*) [24]. Na powiązanie działania PARP z systemem naprawy BER wskazuje fakt, że poli(ADP-rybozylację) *in vivo* stymulują uszkodzenia typu utraty zasady azotowej, lub pęknięcia pojedynczej nici DNA, które są naprawiane przez system BER [60-62]. PARP jest składnikiem białkowego kompleksu BER, w skład którego wchodzi ponadto ligaza DNA III, polimeraza DNA oraz białko XRCC1 (ang. *X-ray repair cross-complementing group 1*) [63]. Zahamowanie aktywności PARP powoduje inhibicję systemu BER oraz zwiększenie okresu półtrwania uszkodzeń DNA naprawianych przez ten system [64,65]. Stwierdzono też zahamowanie systemu BER w komórkach pozbawionych genu kodującego PARP [65]. Wykazano, że PARP1 stymuluje polimerazę DNA  $\beta$  i endonukleazę Fen1 w systemie BER długiej łańki (LP-BER) [65]. Białko XRCC1 spełnia rolę molekularnego rusztowania dla kompleksu BER i oddziałuje ze wszystkimi jego składnikami [11,63,66]. Białko XRCC1 jest modyfikowane przez PARP, co zmienia jego powinowactwo do składników kompleksu. Wydaje się, że w ten sposób PARP może wpływać na tworzenie i aktywność kompleksu BER [24]. W warunkach niskiego stężenia ATP w komórce, ADP-ryboza powstała w wyniku degradacji polimeru może w reakcji z pirofosforanem powstałym przy wbudowywaniu brakującego nukleotydu dostarczać ATP dla ligazy DNA systemu BER [67] zgodnie z reakcją:



3. Model naprawy zależny od struktury chromatyny (ang. *the chromatin-dependent repair model*). Na naprawę DNA duży wpływ ma obecność histonów w miejscu uszkodzenia [24]. Stwierdzono, że w przypadku uszkodzenia DNA histony przylegające do uszkodzonego miejsca ulegają odwracalnej poli(ADP-rybozylacji) przez PARP [68]. Na skutek zmiany ładunku histonów w wyniku poli(ADP-rybozylacji) dochodzi do miejscowej dekondensacji chromatyny. Wydaje się, że jest to niezbędny warunek aby duże, białkowe kompleksy naprawcze mogły

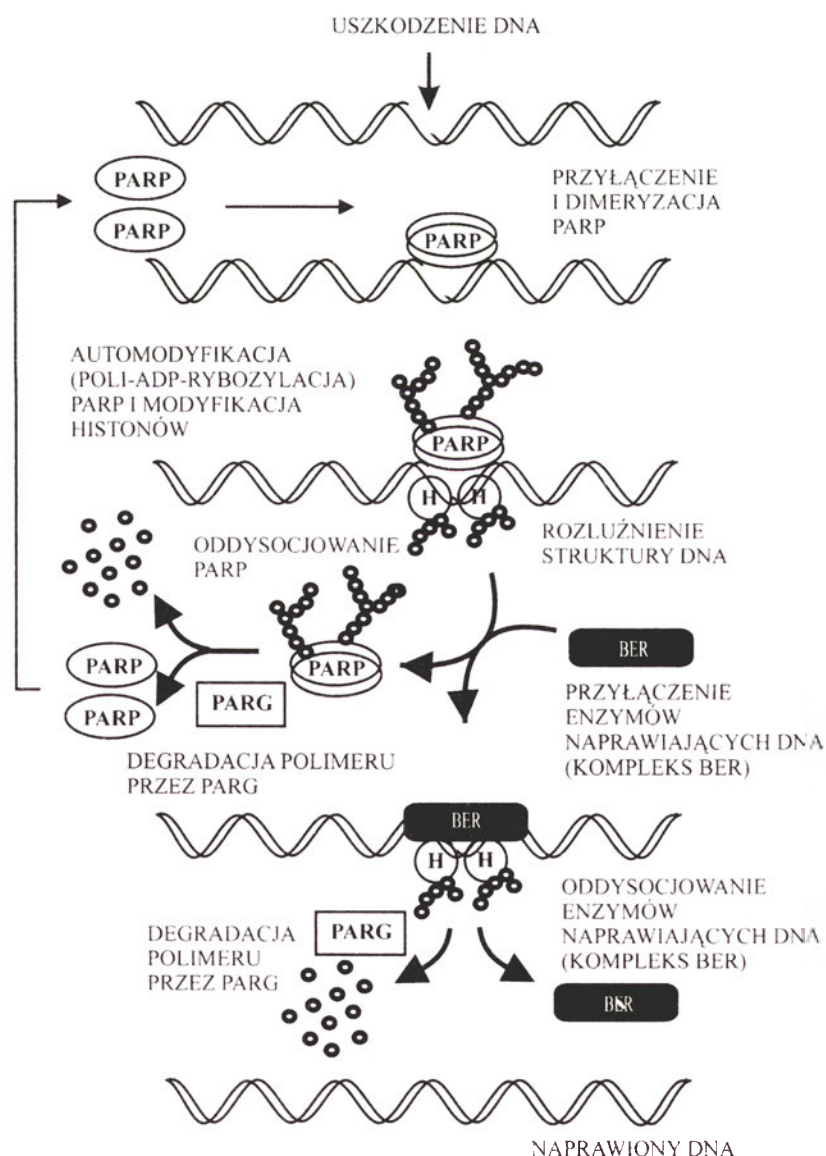


dotrzeć do miejsca uszkodzenia DNA w obrębie silnie skondensowanej chromatyny [24]. Najczęściej modyfikowanymi histonami *in vivo* są H1 i H2B [69]. Stwierdzono również modyfikację przez PARP związanych z chromatyną białek HMG 1, 2, 14 i 17 [70]. Mechanizm modyfikacji struktury chromatyny podczas naprawy DNA przedstawia się następująco: PARP wiąże się z uszkodzonym miejscem DNA i ulega aktywacji, a w konsekwencji autopoli(ADP-rybozylacji). W następstwie wzrostu stężenia poli(ADP-rybozy) w jądrze komórkowym PARG przemieszcza się do jądra, w okolice uszkodzenia DNA i skraca polimery związane z PARP. Powoduje to zmianę preferencji substratowych dla ADP-rybozylacji i modyfikowane są histony. To sprawia, że chromatyna jest utrzymywana w rozluźnionej strukturze. Następnie uszkodzenie DNA jest naprawiane przez odpowiednie enzymy, po czym na skutek dużego napływu PARG do jądra komórkowego polimery

ADP-rybozy ulegają degradacji. W konsekwencji DNA wraca do skondensowanej struktury [24,71].

4. Model antyrekombinacyjny (ang. *the antirecombination model*). Model ten w przeciwieństwie do wcześniejszych zakłada, że PARP hamuje naprawę DNA, a utrzymuje stabilność genomu poprzez zapobieganie rekombinacjom homologicznym. PARP wiąże się z uszkodzonym miejscem DNA i przez modyfikację białek związanych z chromatyną zapobiega rekombinacji homologicznej [64]. Stwierdzono też obecność PARP w multiproteinowym kompleksie rekombinacyjnym [72]. Wykazano również, że zastosowanie inhibitorów PARP powoduje wzrost częstości rekombinacji homologicznych [48].

Na podstawie trzech pierwszych przedstawionych modeli można zaproponować ogólny uproszczony model działania PARP w naprawie DNA. W przypadku uszkodzenia DNA, dwie cząsteczki PARP przyłączają się do miejsca przerwania nici tworząc



Ryc 6. Ogólny mechanizm działania PARP w naprawie DNA. Objaśnienia: BER (ang. *base excision repair*) - system naprawy DNA przez wycinanie zasad; H - histony.

**Tabela 2.**

Polimerazy poli(ADP-rybozy)

GEN LUDZKI *	BIAŁKO	BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJE
ADPRT	PARP1	Odkryta jako pierwsza, i najlepiej poznana polimeraza poliADPr. Odpowiada za większość procesów poli(ADP-rybozylacji) w komórce.
ADPRTL2	PARP2	Budowa C-końcowej części podobna do PARP-1 i prawdopodobnie zbliżona funkcja. Przypuszczalnie inna specyficzność substratowa ze względu na odmienną domenę wiążącą DNA [77,100].
ADPRTL3	PARP3	Ostatnio poznana PARP. Jej domena N-końcowa składa się tylko z 44 aminokwasów. Reszta to domena homologii PARP [101].
ADPRTL1	VPARP ( <i>Vault PARP</i> )	Wchodzi w skład nukleoproteinowego kompleksu o beczułkowatej strukturze (ang. <i>vault complex</i> ) i masie cząsteczkowej aż 13 Mda [102]. Kompleks ten jest zlokalizowany na cytoplazmatycznej powierzchni porów w błonie jądrowej, dlatego uważa się, że może odgrywać rolę w transporcie przez pory w błonie jądrowej [103]. Białka wchodzące w skład tego kompleksu ulegają ADP-rybozylacji, co może wywoływać jego zmiany strukturalne, powodujące zamykanie lub otwieranie porów w błonie jądrowej [104].
TNKS	TANKYRAZA	Bierze udział w replikacji telomerów [80]. Telomeraza – enzym odpowiedzialny za utrzymanie długości telomerów jest negatywnie regulowana przez TRF1, który jest akceptorem poli(ADP-rybozy) [80,105]. Zależna od tankyrazy poli(ADP-rybozylacja) TRF1 zmniejsza powinowactwo tego czynnika do telomerów i w związku z tym ogranicza jego hamujący wpływ na działanie telomerazy [80]. Wydaje się, że tankyraza odgrywa istotną rolę w kontroli długości telomerów

\* - wg klasyfikacji zatwierdzonej przez komitet nomenklatury HUGO (*Human Genome Project*), TRF1 (ang. *telomere-repeat binding factor-1*) – czynnik wiążący telomery

homodimer obejmujący obszar 7 nukleotydów z każdej strony od miejsca uszkodzenia (Ryc. 6). PARP ulega aktywacji i katalizuje własną poli(ADP-rybo-

zylację), co sprawia, że jej ładunek staje się coraz bardziej ujemny. Poli(ADP-rybozylacji) ulegają również histony, co powoduje rozluźnienie chroma-

tyny w miejscu uszkodzenia [24]. Ostatecznie obniżenie ładunku PARP powoduje jej oddysocjowanie od DNA [73,74]. Ponadto automodyfikacja PARP hamuje jej aktywność [24]. Po odłączeniu PARP jej miejsce na DNA zajmują enzymy naprawcze systemu BER. Po oddysocjowaniu PARP od DNA glikohydrolaza pADPr (PARG) hydrolizuje polimery ADPr obecne na PARP i przywraca temu białku zdolność do ponownego wiązania DNA i aktywacji [75]. PARG hydrolizuje również polimery związane z histonami i DNA wraca do skondensowanej struktury [24,71].

Przedstawione dane wskazują, że poli(ADP-rybozylacja) jest istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za naprawę DNA i stabilność genomu. Odmienne wnioski wynikają z badań z użyciem myszy z usunięciem (ang. *knockout*) genu kodującego PARP. Myszy takie rozwijały się normalnie i były płodne, co biorąc pod uwagę częstość uszkodzeń DNA w tkankach embrionalnych podczas replikacji stanowi przesłankę, że PARP nie jest czynnikiem niezbędnym do naprawy DNA [76]. Również badania na fibroblastach z usunięciem (ang. *knockout*) genu kodującego PARP wykazały brak zaburzeń procesów naprawy, zarówno BER i NER (ang. *nucleotide excision repair*) [76]. Rozbieżności te można tłumaczyć faktem że myszy i komórki z wyłączonym genem kodującym PARP1 mają możliwość poli(ADP-rybozylacji) białek przy udziale PARP2, która, jak ostatnio wykazano, również wchodzi w skład kompleksu BER [59,77,78].

Uważa się też, że PARP oprócz roli w naprawie DNA równocześnie zapobiega transkrypcji uszkodzonych genów. Wyciszanie transkrypcji polega na poli(ADP-rybozylacji) czynników transkrypcyjnych, co zapobiega inicjacji transkrypcji uszkodzonych genów [79].

Obok PARP1 rolę w utrzymaniu stabilności genomu odgrywa też inny enzym z rodziny PARP — Tankyryza, która poli(ADP-rybozyluje) czynniki TRF1 odpowiedzialne za hamowanie telomerazy. Enzym ten odgrywa więc istotną rolę w kontroli długości telomerów [80] (Tabela 2).

Stwierdzono, że aktywność PARP w różnych tkankach onizą się wraz z wiekiem [81]. Wykazano też pozytywną korelację pomiędzy aktywnością

PARP i długością życia u różnych gatunków ssaków [81]. Ekspresja genu ADPRT zachodzi na niższym poziomie u ludzi starszych i chorych na progerię w porównaniu z ludźmi młodymi [82]. Przypuszcza się więc, że aktywność PARP może mieć wpływ na długoterminową stabilność genomu a w konsekwencji na długowieczność.

## VI. Uwagi końcowe

W ciągu 40 lat od odkrycia poli(ADP-rybozy) uzyskano dużo informacji na temat znaczenia syntezy tego polimeru dla funkcji komórki. Pewne jest, że poli(ADP-rybozylacja) odgrywa znaczącą rolę w procesie naprawy DNA i utrzymaniu stabilności genomu, jednak nie wyjaśniono ostatecznie, jaki jest molekularny mechanizm działania PARP w tych procesach. Badania prowadzone na *Drosophila* wykazały istotną rolę poli(ADP-rybozylacji) w utrzymaniu stabilności chromatyny w rozwoju embrionalnym [83]. Poli(ADP-rybozylacja) chroni komórkę przed utratą stabilności genomowej, przez indukcję procesów naprawczych, a z drugiej strony doprowadza do śmierci komórki. Wynika to z obniżenia stężenia NAD<sup>+</sup> zużywanego do syntezy polimeru w przypadku rozległych uszkodzeń DNA [60]. Powoduje to obniżenie stężenia ATP w komórce, co może prowadzić do jej śmierci [59,60]. W zależności od rozmiarów uszkodzenia DNA większe znaczenie zyskuje mechanizm działania PARP poprzez modyfikację białek prowadzącą do indukcji systemów naprawy lub przez obniżanie stężenia NAD<sup>+</sup> i ATP prowadzące do śmierci komórki [59]. Ponieważ nadmierna aktywacja PARP prowadzi do śmierci komórek i uszkodzenia narządów, w pewnych sytuacjach korzystne może być zablokowanie aktywności tego enzymu [84]. Dlatego prowadzone są badania nad zastosowaniem inhibitorów PARP w terapii [84].

## Podziękowania

Dziękuję Panu Prof. dr hab. Mariuszowi M. Żydowo i Panu Prof. dr hab. Julianowi Świerczyńskiemu z Katedry i Zakładu Biochemii AMG za cenne wskazówki w czasie redagowania pracy. Praca została wykonana w ramach działalności statutowej (St-41) Ka-



Artykuł otrzymano 17 marca 2003  
Zaakceptowano do druku 4 grudnia 2003

## Piśmiennictwo

- Smith S (2001) *Trends in Biochem Sci* **26**: 174-179
- de Murcia G, Menissier-de Murcia J (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 172-176
- Alkhatib H M, Chen D, Cherney B, Bathia K, Notario B, Giri G, Slattey E, Roeder R G, Smulson M E (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1224-1228
- Uchida K, Morita T, Sato T, Ogura T, Yamashita R, Nogushi S, Suzuki H, Nyunoya H, Miwa M, Sugimura T (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 617-622
- Gradwohl G, Menissier-de Murcia J, Molinete M, S imonin F, Koken M, Hoeijmakers J H J, de Murcia G (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2990-2994
- Buki K G, Kun E (1988) *Biochemistry* **27**: 5990-5
- Weinfeld M, Chaudhry M A, D'Amours D, Pelletier J D, Poirier G G, Povirk L F, Lees-Miller S P (1997) *Radiat Res* **148**: 22-28
- Uchida K, Hanai S, Ishikawa K, Ozawa Y L, Uchida M, Sugimura T, Miwa M (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3481-3485
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (1993) *J Biol Chem* **268**: 22575-22580
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald A F, Altschul S F, Koonin E V (1997) *FASEB J* **11**: 68-76
- Masson M, Niedergang G, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 3563-3571
- Althaus F R, Richter C (1987) *Mol Biol Biochem Biophys* **37**: 1-237
- Ueda K, Hayaishi O (1985) *Annu Rev Biochem* **54**: 73-100
- Simonin F, Poch O, Delarue M, de Murcia G (1993) *J Biol Chem* **268**: 8529-8535
- Ruf A, de Murcia G, Schuiz G E (1998) *Biochemistry* **37**: 3893-3900
- Sugimura T, Fujimura S, Hasegawa S, Kawamura Y (1967) *Biochim Biophys Acta* **138**: 438-441
- Slominska EM, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Leaver N, Rutkowski B, Simmonds HA, Swierczynski J (2002) *Mol Cell Biochem* **231**: 83-88
- Kreimeyer A, Wielckens K, Adamietz P, Hilz H (1984) *J Biol Chem* **259**: 890-896
- Tanaka M, Miwa M, Hayashi K, Kubota K, Matsu-shima T (1977) *Biochemistry* **16**: 1485-1489
- Alvarez-Gonzalez R, Althaus F R (1989) *Mutat Res* **218**: 67-74
- Simonin F, Hofferer L, Panzeter P L, Muller S, de Murcia G, Althaus F R (1993) *J Biol Chem* **268**: 13454-13461
- Singh N S, Poirier G G, Cerutti P A (1985) *EMBO J* **4**: 1491-1494
- Ogata N, Ueda K, Kawaichi M, Hayaishi O (1981) *J Biol Chem* **256**: 4135-4137
- D'Amours D, Desnoyers S, d'Silva I, Poirier G (1999) *Biochem J* **342**: 249-268
- Ferro A M, Olivera B M (1982) *J Biol Chem* **257**: 7808-7813
- Chambon P, Weil J D, Mandel P (1963) *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 39-43
- Skórko R (1979) *Postepy Biochem* **25**: 5-22
- Kraus W L, Lis J T (2003) *Cell* **113**(6): 677-683
- Miwa M, Ishihara M, Takishima S, Takasuka N, Maeda M, Yamaizumi Z, Sugimura T, Yokoyama S, Miyazawa T (1981) *J Biol Chem* **256**: 2916-2921
- Minaga T, Kun E (1983) *J Biol Chem* **258**: 5726-5730
- Ueda K, Oka J, Naruniya S, Miyakawa N, Hayaishi O (1972) *Biochem Biophys Res Commun* **46**: 516-523
- Ikejima M, Gill D M (1988) *J Biol Chem* **263**: 11037-11040
- Jacobson M K, Jacobson E L (1999) *Trends Biochem Sci* **24**(11): 415-417
- Winstall E, Affar E B, Shah R, Bourassa S, Scovassi I, Poirier G G (1999) *Exp Cell Res* **251**: 372-378
- Wielckens K, Schmidt A, George B, Bredehorst R, Hilz H (1982) *J Biol Chem* **257**: 12872-12877
- Braun S A, Panzeter P L, Collinge M A, Althaus F R (1994) *Eur J Biochem* **220**: 369-375
- Thibeault L, Hengartner M, Lagueux J, Poirier G G, Muller S (1992) *Biochim Biophys Acta* **1121**: 317-324
- Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H, Nakanishi K (1984) *J Biol Chem* **259**: 986-993
- Miro A, Costas M J, Garcia-Diaz M, Hernandez M T, Camesell J C (1989) *FEBS Lett* **244**: 123-126
- Juarez-Salinas H, Sims J L, Jacobson M K (1979) *Nature (London)* **282**: 740-741
- Jacobson M K, Levi V, Juarez-Salinas H, Barton R A, Jacobson E L (1980) *Cancer Res* **40**: 1797-1802
- Griffin R J, Pemberton L C, Rhodes D, Bleasdale C, Bowman K, Calvert A H, Curtin N J, Durkacz B W, Newell D R, Porteous J K, Golding B T (1995) *Anti-Cancer Drug Design* **10**: 507-514
- White A W, Almasy R, Calvert A H, Curtin N J, Griffin R J, Hostomsky Z, Maegley K, Newell D R, Srinivasan S, Golding B T (2000) *J Med Chem* **43**: 4084-4097
- Durkacz B W, Shall S, Irwin J (1981) *Eur J Biochem* **121**: 65-69
- Ahnstrom G, Ljungman M (1988) *Mutat Res* **194**: 17-22
- Nozaki T, Masutani M, Akagawa T, Sugimura T, Esumi H (1994) *Jpn J Cancer Res* **85**: 1094-1098
- Oikawa A, Tohda H, Kanai M, Miwa M, Sugimura T (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **97**: 1311-1316
- Waldman A S, Waldman B C (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 5943-5947
- Lunel-Orsini C, Buttin G, de Saint Vincent B R (1996) *Mutat Res* **349**: 63-75
- Szabo C (1998) *Eur J Pharmacol* **350**: 1-19
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Brunwald D, de Murcia G, de Murcia J M (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4753-4757
- Tong W M, Cortes U, Wang Z Q (2001) *Biochim Biophys Acta* **1552**(1): 27-37
- Przybojewska B (1992) *Postepy Hig Med Dosw* **46**(3): 327-332
- Simbulan-Rosenthal C M, Ly D H, Rosenthal D S, Konopka G, Luo R, Wang Z Q, Schultz P G, Smulson M E (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(21): 11274-11279
- Simbulan-Rosenthal G M, Rosenthal D S, Ding R, J ackman J, Smulson M E (1996) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**: 135-156
- Pleschke J M, Kleczkowska H E, Strohm M, Althaus F R (2000) *J Biol Chem* **275**: 40974-40980
- Giaccia A J, Kastan M B (1998) *Genes Dev* **12**: 2973-2983
- Wang X, Ohnishi K, Takahashi A, Ohnishi T (1998) *Oncogene* **17**: 2819-2825
- Herceg Z, Wang Z (2001) *Mutation Research* **477**: 97-110
- Skidmore C J, Davies M I, Goodwin P O M, Halldorson H, Lewis P J, Shall S, Zia'ee A A (1979) *Eur J Biochem* **101**: 135-142
- Schraufstatter I U, Hinshaw D B, Hyslop P A, Spragg R G, Cochrane C G (1986) *J Clin Invest* **77**: 1312-1320
- Zhang J, Dawson V L, Dawson T M, Synder S H (1994) *Science* **263**: 687-689
- Caldecott K W, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 4387-4394
- Satoh M S, Lindahl T (1992) *Nature (London)* **356**: 356-358
- Le Page F, Schreiber V, Dherin C, De Murcia G, Boiteux S (2003) *J Biol Chem* **278**(20): 18471-18477

66. Kubota Y, Nash R A, Klungland A, Schar P, Barnes D E, Lindahl T (1996) *EMBO J* **15**: 6662-6670
67. Oei S L, Ziegler M (2000) *J Biol Chem* **275**(30): 23234-23239.
68. de Murcia G, Huletsky A, Poirier G G (1988) *Biochem Cell Biol* **66**: 626-635
69. Adamietz P, Rudolph A (1984) *J Biol Chem* **259**: 6841-6846
70. Tanuma S, Yagi T, Johnson G S (1985) *Arch Biochem Biophys* **237**: 38-42
71. Lagueux J, Shah G M, Menard L, Thomassin H, Duchaine C, Hengartner C, Poirier G G (1994) *Mol Cell Biochem* **138**: 45-52
72. Borggreffe T, Wabl M, Akhmedov A T, Jessberger R (1998) *J Biol Chem* **273**: 17025-17035
73. Cervantes-Laurean D, Minter D E, Jacobson E L, Jacobson M K (1993) *Biochemistry* **32**: 1528-1534
74. Zahradka P, Ebisuzaki K (1982) *Eur J Biochem* **127**: 579-585
75. Menissier-de Murcia J, Molinete M, Gradwohl G, Simonin F, de Murcia G (1989) *J Mol Biol* **210**: 229-233
76. Wang Z Q, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M, Wagner E F (1995) *Genes Dev* **9**: 509-520
77. Ame J C, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) *J Biol Chem* **274**: 17860-17868
78. Schreiber V, Ame J C, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) *J Biol Chem* **277**(25): 23028-23036.
79. Ziegler M, Oei S L (2001) *Bioessays* **23**(6): 543-548
80. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T (1998) *Science* **282**: 1484-1487
81. Strosznajder J B, Jęsko H, Strosznajder R P (2000) *Acta Biochim Polon* **47**: 331-337
82. Ly D H, Lockhart D J, Lerner R A, Schultz P G (2000) *Science* **287**: 2486-2492
83. Tulin A, Stewart D, Spradling A C (2002) *Genes Dev* **16**(16): 2108-2119.
84. Burkle A (2001) *BioEssays* **23**: 795-806
85. Althaus F R, Hofferer L, Kleczkowska H E, Malanga M, Naegeli H, Panzeter P, Realini C (1993) *Environ Mol Mutagen* **22**: 278-282
86. Krupitza G, Cerutti P (1989) *Biochemistry* **28**: 4054-4060
87. Krupitza G, Cerutti P (1989) *Biochemistry* **28**: 2034-2040
88. Darby M K, Schmitt B, Jongstra-Bilen J, Vosberg H-P (1985) *EMBO J* **4**: 2129-2134
89. Eki T, Hurwitz J (1991) *J Biol Chem* **266**: 3087-3100
90. Yoshihara K, Itaya A, Tanaka Y, Ohashi Y, Ito K, Teraoka H, Tsukada K, Matsukage A, Kamiya T (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 61-67
91. Yu F L (1985) *FEBS Lett* **190**: 109-114
92. Taniguchi T, Suzuki S, Shizuta Y (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **127**: 526-532
93. Kostka G, Schweiger A (1982) *Biochim Biophys Acta* **969**: 139-144
94. Scovassi A I, Mariani C, Negroni M, Negri C, Bertazzoni U (1993) *Exp Cell Res* **206**: 177-181
95. Tsai Y J, Aoki T, Maruta H, Abe H, Sakagami H, Hatano T, Okuda T, Tanuma S (1992) *J Biol Chem* **267**: 14436-14442
96. Rawling J M, Alvarez-Gonzalez R (1997) *Biochem J* **324**: 249-253
97. Wesierska-Gadek J, Schmid G, Cerni C (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 96-102
98. Amstad P A, Krupitza B, Cerutti P A (1992) *Cancer Res* **52**: 3952-3960
99. Simbulan-Rosenthal G M, Rosenthal D S, Ding R, Jackman J, Smulson M E (1996) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**: 135-156
100. Berghammer H, Ebner M, Marksteiner R, Auer B (1999) *FEBS Lett* **449**: 259-263
101. Johansson M (1999) *Genomics* **57**: 442-445
102. Kickhoefer V A (1996) *Trends Cell Biol* **6**: 174-178
103. Chugani D C, Rome L H, Kedersha N L (1993) *J Cell Sci* **106**: 23-29
104. Kickhoefer V A, Siva A C, Kedersha N L, Inman E M, Ruland C, Streuli M, Rome L H (1999) *J Cell Biol* **146**: 917-928
105. Griffith J D, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R M, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) *Cell* **97**: 503-514

# Uszkodzenie komórki — rola mitochondriów

## Damage of cell — role of mitochondria

ANNA ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN\*

*Spis treści:*

- I. Wstęp
- II. Uszkodzenie komórki w wyniku niedotlenienia
- III. Uszkodzenie komórki w wyniku peroksydacji lipidów
- IV. Rola mitochondriów w uszkodzeniu komórki
- IV-1. Rola akonitazy w uszkodzeniu mitochondriów

**Wykaz stosowanych skrótów:** AIF — czynnik indukujący apoptozę; GPx — peroksydaza glutationowa (mGPx — mitochondrialna); cGMP — guazynomonofosforan; GSH — glutation zredukowany; GSSG — glutation utleniony; HIF-1 — czynnik indukujący hipoksję; ICDH — dehydrogenaza izocytrynianowa; LTB<sub>4</sub> — leukotrieny B<sub>4</sub>; MnSOD — manganowa dysmutaza ponadtlenkowa; NADH — zredukowana forma dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; PAF — czynnik aktywujący płytki; ROS — reaktywne formy tlenu; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa

### I. Wstęp

Komórki uszkodzone w wyniku zadziałania bodźców chemicznych lub fizycznych są eliminowane w dwojaki sposób. Eliminacja zachodzi albo w wyniku apoptozy, albo w wyniku martwicy [1-3]. Proces apoptozy (programowana śmierć komórki) jest niezbędny do zachowania homeostazy liczby i struktury komórek osobników dorosłych. Apoptoza jest zatem fizjologiczną drogą eliminacji komórek, której towarzyszy kondensacja chromatyny i fragmentacja jąder komórkowych [4]. W procesie tym dochodzi także do zmiany potencjału międzybłonowego mitochondriów i uwolnienia z mitochondriów do cytoplazmy czynników indukujących apoptozę (AIF, ang. *apoptosis inducing factor*). Pojawiają się również ciała apoptotyczne [5]. Proces martwiczy natomiast dotyczy ostrego, nieskompensowanego i niesterowanego obumierania komórek, któremu towarzyszą procesy zapalne [1, 6].

Martwicę cechuje narastający obrzęk mitochondriów oraz siateczki śródplazmatycznej. Szybko też

*Contents:*

- I. Introduction
- II. Cell damage as an effect of hypoxia
- III. Cell damage as an effect of lipid peroxidation
- IV. Role of mitochondria in cellular damage
- IV-1. Role of aconitase in mitochondrial damage

dochodzi do wzrostu objętości komórek z przerwaniami błony plazmatycznej i uwolnieniem składników wewnątrzkomórkowych. W wyniku uszkodzenia błony komórkowej z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórki napływają jony sodu i wapnia, które są gwałtownie wychwytywane przez mitochondria, co prowadzi do zahamowania procesu fosforylacji oksydacyjnej [1, 2, 7, 8]. Jony te aktywują też endogenne fosfolipazy i proteazy [6, 8-10]. Późnym objawem zaawansowanej martwicy jest uszkodzenie jądra komórkowego, w którym chromatyna zbija się w małe agregaty [2].

Do najczęściej wymienianych przyczyn uszkodzenia komórki należą: zakłócenie oksydacyjnej fosforylacji, destabilizacja homeostazy wodno-elektrolitowej, naruszenie struktury błon komórkowych, zaburzenia procesu syntezy białek strukturalnych i enzymatycznych, jak też naruszenie procesów reparacyjnych [1]. Najbardziej spektakularnym przykładem uszkodzenia komórki jest jej ostre niedotlenienie. Zaburzenie struktury i funkcji komórek dokonuje się także na drodze peroksydacji lipidów błonowych wywołanej przez różne czynniki chemiczne i fizyczne [11-13]. Wymienione powyżej pierwotne przyczyny uszkodzenia komórki mogące prowadzić do jej martwicy są niezależne od czynnika uszkadzającego.

### II. Uszkodzenie komórki w wyniku niedotlenienia

Ostre niedotlenienie prowadzi do rozprzęgnięcia procesu fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. W wyniku zaburzenia procesów oksydacyjnych w komórce dochodzi do wzrostu poziomu NADH [14]. Kumulacja NADH powoduje przewagę

\*Dr n. med., Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Białymstoku, 15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2c, blok D; e-mail: anhusa@wp.pl



procesów redukcyjnych, a w efekcie wzrost stężenia mleczanów, obniżenie stopnia przemiany pirogronianów do acetylo-CoA i zahamowanie cyklu kwasu cytrynowego. W komórce dochodzi wtedy do spadku stężenia ATP, a wzrostu stężenia ADP, AMP i nieorganicznych fosforanów [1, 9, 14]. W odpowiedzi na spadek stężenia ATP komórka uruchamia alternatywne źródła wytwarzania energii - glikolizę beztlenową [15]. Uruchomienie tego procesu zapewnia komórce energię potrzebną do podtrzymania pompy sodowo-potasowej oraz wapniowej, jednakże powoduje także wzrost stężenia mleczanów w komórce, a co za tym idzie zakwaszenie środowiska komórki [6, 9].

Podczas niedotlenienia wewnątrz izolowanych komórek pH obniża się do wartości 6,3; mitochondria ulegają depolaryzacji, a poziom ATP może obniżyć się do 1% wartości podstawowej, jednakże nie dochodzi do zmiany przepuszczalności mitochondriów, a żywotność komórek jest wyższa niż 90% [16]. Natomiast przywrócenie normalnych warunków tlenowych i powrót pH do wartości 7,2 powoduje zmiany przepuszczalności mitochondriów. Spadek pH w trakcie niedotlenienia chroni zatem komórki przed śmiercią [17-20].

Wzrost przepuszczalności mitochondriów powodowany jest otwarciem porów w ich błonie wewnętrznej, co prowadzi do wzrostu przepuszczalności błony i umożliwia przechodzenie przez nią jonów, a nawet niskocząsteczkowych białek [3, 16, 21]. W wyniku tego dochodzi do depolaryzacji mitochondriów, ich obrzmienia i rozprzężenia procesu oksydacyjnej fosforylacji [16, 21].

Nieznaczny nawet spadek pH przyspiesza uwalnianie związanych z białkami jonów metali przejściowych, takich jak  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , co może dodatkowo zakłócić wytwarzanie ATP w komórce na korzyść generacji anionorodnika ponadtlenkowego [22-25].

Wczesną konsekwencją niedotlenienia komórki jest także obniżenie zawartości glikogenu w komórce w wyniku aktywacji fosfofruktokinazy. Przenikanie mleczanów oraz jonów sodu, potasu i wapnia do siateczki śródplazmatycznej powoduje jej obrzmienie i utratę rybosomów, a w wyniku tego procesu, jak również wskutek kondensacji chromatyny brzeżnej, następuje zahamowanie syntezy białek.

W komórce, w wyniku obniżenia poziomu ATP i glikogenu, dochodzi do zaburzenia podstawowych jej funkcji, a przede wszystkim zatrzymania pompy  $Na^+-K^+$  i  $Ca^{2+}$ , w efekcie czego do wnętrza komórki napływają jony  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$ , a do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jony  $K^+$  i  $Mg^{2+}$ . Zaburzenie stężenia jonów w otoczeniu komórki i w jej wnętrzu powoduje,

że do komórki zaczyna przepływać woda, co prowadzi do obrzmienia [6, 7, 9, 10].

Niedobór tlenu powoduje zmniejszenie syntezy fosfolipidów błonowych, a wskutek tego dochodzi do zaburzenia funkcji błon plazmatycznych, które tracą swoją integralność i enzymy komórkowe wydostają się na zewnątrz [1]. W surowicy krwi obserwuje się wtedy wzrost aktywności enzymów o lokalizacji cytoplazmatycznej, jak i subkomórkowej.

### III. Uszkodzenie komórki wskutek peroksydacji lipidów błonowych

Błony komórkowe zawierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe podatne na działanie wolnych rodników tlenowych, które zapoczątkowują proces peroksydacji lipidów błonowych [26, 27, 28].

Peroksydację lipidów błonowych powodują nie tylko substancje chemiczne czy też ekspozycja na promieniowanie jonizujące, ale także różnego rodzaju procesy zachodzące w organizmie. Są to między innymi stany zapalne o różnym podłożu, starzenie się organizmu, czy też procesy niedokrwienia-reperfuzji w wątrobie, sercu, nerkach, jelicie, mózgu [11-13]. Niedokrwienie - przerwanie dopływu krwi do narządu lub jego części - pojawia się np. w czasie zabiegów chirurgicznych takich jak transplantacje lub chorób, np. zawału serca i może prowadzić nawet do martwicy. Paradoksalnie ponowny napływ krwi, czyli reperfuzja, niesie za sobą niebezpieczeństwo dalszych uszkodzeń tkankowych [11, 13]. Uszkodzenia tkankowe powstające w czasie procesu niedokrwienia-reperfuzji generowane są przez nadtlenki, które oddziałują z komórkami nabłonkowymi. W wyniku tego produkowane są mediatory zapalenia, takie jak PAF (czynnik aktywujący płytki) - syntetyzowany z fosfolipidów błonowych przez fosfolipazę  $A_2$  i  $LTB_4$  (leukotrieny  $B_4$ ) [13, 29-31].

Zwiększone tworzenie się reaktywnych form tlenu i indukowaną przez nie dysfunkcję komórek obserwowano w wielu chorobach, np. w arytmii, nadciśnieniu, uszkodzeniu mięśni szkieletowych, uszkodzeniu neuronów w chorobie Parkinsona, cukrzycy, chorobie Alzheimera [32-35].

Szlaki metaboliczne, w wyniku których powstają reaktywne formy tlenu (ROS), to: 1) układ ksantyna (X)/oksydaza ksantynowa (XO), 2) układ cyklooksygenaz szlaku metabolicznego kwasu arachidonowego, 3) układ transportu elektronów w mitochondriach, 4) układ aktywowanych neutrofilii, 5) układ białek amyloidu  $\beta$  [35]. Szlaki metaboliczne prowadzące do tworzenia reaktywnych form tlenu są do-

brze poznane, jednakże nie do końca wyjaśnione jest, jaki udział mają poszczególne źródła ich tworzenia.

W fazie początkowej tego typu uszkodzenia komórek dochodzi zwykle do wiązania ksenobiotyku przez błony komórkowe oraz błony siateczki śródplazmatycznej. Przy udziale monoooksygenaz zależnych od cytochromu P450 wytwarzane są wolne rodniki, które uruchamiają peroksydację lipidów wszystkich błon, w tym błon mitochondrialnych. Układ monoooksygenaz odpowiedzialny jest między innymi za utlenianie ksenobiotyków i wymaga do swojego działania donora elektronów. Może nim być NADPH lub  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , a w rezultacie powstaje pewna ilość reaktywnych form tlenu [5, 36, 37].

W uszkodzonych mitochondriach dochodzi do obniżenia stężenia ATP wskutek zmniejszenia nasilenia procesu fosforylacji oksydacyjnej [1, 6]. Uszkodzone mitochondria mają także zmniejszoną zdolność redukcji utlenionego NADP. Prowadzi to do upośledzenia układu antyoksydacyjnego związanego z peroksydazą glutationową i powoduje kumulację utlenionej formy glutationu [38, 39].

Jak stwierdzono, około 2% tlenu zużytkowanego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy w wyniku jednoelektronowej redukcji ulega przekształceniu do anionorodnika ponadtlenkowego [3, 40]. W wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez mitochondria zaangażowane są następujące enzymy: bursztynilo-koenzym Q, koenzym Q  $\text{H}_2$ -reduktaza cytochromu C i NADH-koenzym Q. W prawidłowych warunkach powstające rodniki tlenowe są neutralizowane przez reduktazę NADP-koenzym Q, a także przez autooksydację koenzymu Q [3, 41]. W większości przypadków anionorodnik ponadtlenkowy jest generowany na poziomie koenzymu Q, chociaż należy zauważyć, że dehydrogenaza NADH pełni tu także bardzo ważną rolę [3].

Wolne rodniki mogą być wytwarzane nie tylko w mitochondriach. Siateczka śródplazmatyczna hepatocytów zawiera układ desaturazy, który wprowadza wiązania podwójne do łańcuchów kwasów tłuszczowych. Ten układ odpowiedzialny jest także za transport elektronów przekazywanych z NADPH przez układ flawinowy na cytochrom  $\text{b}_5$ , który z kolei przekazuje elektrony desaturazie. Formy zredukowane zarówno flawoenzymu, jak i cytochromu  $\text{b}_5$ , mogą reagować z tlenem i w ten sposób wytwarzać anionorodnik ponadtlenkowy [42].

Najlepiej poznane zostały interakcje pomiędzy wolnymi rodnikami a lipidami zawartymi w błonach komórkowych i subkomórkowych. Błony komórkowe i subkomórkowe zbudowane są z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w których występują

sprężone wiązania podwójne, co sprawia, że są szczególnie wrażliwe na procesy peroksydacji lipidów [27, 43]. Pierwszym etapem peroksydacji lipidów jest oderwanie przez wolny rodnik atomu wodoru od alkilowej grupy  $\alpha$ -metylenowej będącej w bezpośrednim sąsiedztwie jednego bądź dwu wiązań podwójnych między atomami węgla [3, 28, 29]. W procesie tym dochodzi do powstania rodnika lipidowego. W obecności tlenu rodnik lipidowy przekształcany jest do lipidowego rodnika ponadtlenkowego, który może reagować z następnymi grupami  $\alpha$ -metylenowymi. Pierwsze produkty rozpadu lipidów cechują się dużą labilnością i mogą łatwo rozpaść się do kolejnych produktów. Proces ten stymulowany jest przez obecność wolnych jonów metali przejściowych, które poprzez reakcję Fentona nasilają rozpad hydroksynadtlenków do odpowiednich rodników peroksydowych i alkoksydowych, jak też powodują zwiększenie wytwarzania wolnych rodników [3, 28, 29].

Wolne rodniki tlenowe mogą reagować także z białkami, powodując ich oksydację. Na działanie wolnych rodników szczególnie wrażliwe są niektóre aminokwasy, takie jak cysteina, metionina, tyrozyna, histydyna. W wyniku reakcji wolnych rodników z aminokwasami powstają karbonylowe pochodne aminokwasów oraz bityrozyna [17, 43]. W wyniku tego procesu dochodzi do zakłócenia funkcjonowania wielu białek poprzez zaburzenie procesów ich fosforylacji i defosforylacji, a także zwiększenie ich wrażliwości na proteolizę [17, 44].

Wolne rodniki tlenowe biorą też udział w procesach oksydacji kwasów deoksyrybonukleinowych i rybonukleinowych. Szczególnie niebezpieczne jest oksydacyjne uszkodzenie DNA, ponieważ może mieć charakter mutagenny [45-48]. Uszkodzenie DNA w wyniku stresu oksydacyjnego uważane jest za przyczynę wielu stanów patologicznych, między innymi chorób nowotworowych, miażdżycy, jak i procesów starzenia się organizmów.

Oksydacyjne uszkodzenie kwasów rybonukleinowych jest, jak się uważa, mniej niebezpieczne, ponieważ kwasy te mają krótki półokres trwania i podlegają ciągłej resyntezie [45].

Wolne rodniki pełnią w organizmie także pożyteczną funkcję, głównie regulatorową. Sądzi się, że wolne rodniki tlenowe są niezbędne w tak podstawowych procesach życiowych jak podział komórek [49]. Także w procesie różnicowania i dojrzewania komórek biorą udział reaktywne formy tlenu [50]. Wykazano również, że działanie tzw. wtórnego przekaznika, jakim jest cykliczne GMP, regulowane jest przez anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wo-

doru i rodnik hydroksylowy [51]. Obecność anionorodnika ponadtlenkowego warunkuje prawidłową agregację krwinek płytkowych oraz syntezę zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia krwi [52, 53].

#### IV. Rola mitochondriów w uszkodzeniu komórki

W badaniach nad uszkodzeniem komórki szczególna uwaga poświęcona jest mitochondriom. Uszkodzenie mitochondriów może wynikać z dwóch patofizjologicznych przyczyn: osłabienia procesów fosforylacji oksydacyjnej, co prowadzi do obniżenia wytwarzania energii (ATP) w mitochondriach i toksyczności reaktywnych form tlenu [3, 54, 55]. W normalnie funkcjonującym łańcuchu oddechowym u ssaków, elektrony są przenoszone z NADH na utlenioną formę koenzymu Q. Forma zredukowana koenzymu Q przenosi elektrony na oksydazę cytochromu C, przechodząc z powrotem w formę utlenioną [3]. Hamując mitochondrialny transport elektronów *in vitro* poprzez użycie antymycyny A, inhibitora III kompleksu enzymatycznego, wykazano wzrost produkcji w mitochondriach anionorodnika ponadtlenowego i nadtlenu wodoru. Wzrost ten sugeruje, że zablokowanie łańcucha oddechowego powoduje kumulację elektronów na początkowym etapie, a konkretnie w I kompleksie enzymatycznym (reduktaza NADH-koenzym Q) mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów i koenzymie Q, skąd są one przenoszone bezpośrednio na tlen molekularny, powodując w efekcie powstanie anionorodnika tlenowego [54]. Mitochondrialny anionorodnik ponadtlenkowy jest usuwany przez MnSOD, powstaje  $H_2O_2$  konwertowany następnie do  $H_2O$  przez izofর্মę I peroksydazy glutationowej (GPx1).

Obecnie przypuszcza się, że toksyczność rodnika ponadtlenkowego związana jest przede wszystkim z tym, że rodnik ten utlenia eksponowane na niego klastry [4Fe-4S] w podatnych na to enzymach. W wyniku tego dochodzi do uwolnienia żelaza i inaktywacji enzymu. Wolne żelazo katalizuje reakcje utleniania w komórkach poprzez reakcję Fentona, prowadząc do powstawania rodnika hydroksylowego [56]. Anion ponadtlenkowy jest bardziej wybiórczy w swoich chemicznych reakcjach w porównaniu z innymi reaktywnymi formami tlenu np. rodnikiem hydroksylowym [56]. Enzymy zawierające klastry [4Fe-4S], chronione są przed inaktywacją przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), która zapobiega równocześnie powstawaniu nadmiaru wolnego żelaza w komórce [56].

Do enzymów, które zawierają wrażliwe na rodnik ponadtlenkowy klastry [4Fe-4S] należą: mitochondrialna akonitaza, homoakonitaza biorąca udział w biosyntezie lizyny oraz izomeraza izopropyl-jabłczanowa (w szlaku biosyntezy leucyny) [56].

Produkcja ROS w mitochondriach jest ściśle regulowana przez mitochondrialne enzymy antyoksydacyjne, włączając w to MnSOD, peroksydazę glutationową wodoronadtlenków lipidów i klasyczną peroksydazę glutationową (cGPx) [57]. GPx jest w zasadzie jedynym enzymem usuwającym nadtlenek wodoru tworzony w mitochondriach [5, 57, 58]. Katalaza metabolizująca  $H_2O_2$  jest bowiem nieobecna w mitochondriach większości komórek zwierzęcych, stąd wynika kluczowa rola, jaką w usuwaniu tego rodnika pełni właśnie peroksydaza glutationowa. Dlatego też glutation zredukowany (GSH), antyoksydant i zmiatacz rodników, ale także kofaktor potrzebny do działania mGPx, jest tak niezbędny do obrony mitochondriów przed nadtlentkiem wodoru [57, 59]. GSH jest, jak wiadomo, syntetyzowany w cytosolu, skąd jest transportowany do mitochondriów. Natomiast GSSG (utleniony glutation), z którego regenerowany jest GSH, nie może być transportowany z mitochondriów do cytosolu. Wzrasta zatem rola mitochondrialnego NADPH, który jest wykorzystywany w reakcjach redukcji GSSG do GSH przez mitochondrialną reduktazę glutationową. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, kluczowy enzym cyklu pentozowego, zapewniający odpowiedni poziom NADPH, jest nieobecna w mitochondriach [59-63]. Jej funkcję musi zatem przejąć inny enzym. Uważa się, że enzymem tym jest dehydrogenaza izocytrynianowa. U ssaków istnieją trzy izoenzymy dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH): mitochondrialna  $NAD^+$ -zależna ICDH, mitochondrialna  $NADP^+$ -zależna ICDH i cytozolowa  $NADP^+$ -zależna ICDH. Badania Jo i wsp. [59] wykazały, że indukowana przez ROS  $NADP^+$ -zależna ICDH jest głównym enzymem odpowiedzialnym za wytwarzane mitochondrialnego NADPH, prowadząc do wzrostu stężenia GSH, potrzebnego do obrony przed rodnikami.

Mitochondria będąc jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu są równocześnie bardzo wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne [59]. ROS mogą bezpośrednio uszkadzać enzymy mitochondrialne, jak też powodować mutacje w mitochondrialnym DNA. Jednocześnie, ROS mogą zmieniać potencjał międzybłonowy mitochondriów, który jest wskaźnikiem integralności błon mitochondrialnych [3, 59]. Mitochondrialne reaktywne formy tlenu w warunkach niedotlenienia aktywują transkrypcję genów



kodujących enzymy glikolityczne, jak również czynnik indukujący hipoksję (HIF-1), co sugeruje, że mitochondrialne ROS pośredniczą w "porozumiewaniu się" pomiędzy jądrem i mitochondriami [5, 59].

#### IV-1. Rola akonitazy w uszkodzeniu mitochondriów

Jak już wspomniano, ostatnio podkreśla się rolę enzymów zawierających klaster żelazowo-siarkowy w oksydacyjnym uszkodzeniu mitochondriów. Szczególna uwaga poświęcona jest akonitazie.

Akonitaza jest żelazowo-siarkowym enzymem występującym w mitochondriach i cytoplazmie. Mitochondrialna akonitaza (hydrataza cytrynianowo-izocytrynianowa EC 4.2.1.3) jest enzymem cyklu kwasu cytrynowego [63-65]. Akonitaza należy do klasy enzymów zwanych hydratatazami. Katalizuje reakcję izomeryzacji cytrynianu do izocytrynianu, a produktem pośrednim jest cis-akonitynian. Enzym ten zawiera klaster [4Fe-4S], który wchodzi w reakcje z grupami hydroksylowymi lub karboksylowymi jako substratami [66]. W klastrze [4Fe-4S] trzy atomy żelaza związane są bezpośrednio z cysteinylową i nieorganiczną siarką, szkieletem enzymu, czwarty zaś jest atomem labilnym, unikalnym w tym sensie, że nie jest związany z cysteiną, a raczej z grupą hydroksylową substratu lub wody [65]. Wiązanie żelazo-siarka stanowi wolne miejsce koordynacyjne, które pełni rolę centrum aktywnego akonitazy [67].

W warunkach zwiększonej produkcji anionorodnika nadtlenkowego aktywność akonitazy jest hamowana, co stwierdzono zarówno w komórkach bakterii, jak i w komórkach ssaków [66, 68, 69]. Ostatnio przeważa pogląd, że reakcja pomiędzy mitochondrialną akonitazą a anionem nadtlenkowym pełni kluczową rolę w procesie oksydacyjnego uszkodzenia mitochondriów [70]. Natomiast wzrost aktywności mitochondrialnej Mn-SOD chroni akonitazę przed inaktywacją [67, 71].

Aktywna akonitaza mitochondrialna zawiera klaster [4Fe-4S]<sup>2+</sup>, który jest atakowany i utleniany przez endogenny anionorodnik nadtlenkowy i przechodzi w stabilną formę nieaktywną zawierającą klaster [3Fe-4S]<sup>1+</sup>. Sądzi się, że w procesie inaktywacji akonitazy dochodzi do uwolnienia atomu żelaza na +2 stopniu utlenienia, utlenienia klastru wchodzącego w skład centrum aktywnego, a także tworzenia nadtlenu wodoru. Uwolniony jon Fe<sup>2+</sup> reaguje z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w reakcji Fentona, co prowadzi do jego utlenienia oraz wytworzenia się rodnika hydroksylowego [65, 71].

Utlenienie mitochondrialnej akonitazy może zachodzić także przy udziale nadtlenu wodoru. W

procesie tym generowane są także rodniki hydroksylowe, jednakże szybkość tych reakcji jest dużo mniejsza w porównaniu z procesem powodowanym rodnikiem nadtlenkowym [65, 71-73]. W prowadzonych *in vitro* badaniach zakończeń nerwów akonitaza ulega całkowitemu zahamowaniu przy stężeniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wynoszącym 50 μmoli [73]. Również badania N u l t o n - P e r s s o n i S z w e d a [72] prowadzone na izolowanych mitochondriach serca wykazały hamowanie aktywności akonitazy pod wpływem nadtlenu wodoru. Zdolność usuwania nadtlenu wodoru przez homogenaty i mitochondria wątroby, serca i mięśni szkieletowych jest miarą ich zdolności antyoksydacyjnej. Największą mają homogenaty wątroby, a w dalszej kolejności homogenaty serca i mięśni [74].

Reaktywacja akonitazy jest zależna od żelaza. Wykazano, że anionorodnik nadtlenkowy i żelazo mają przeciwstawny wpływ na aktywność tego enzymu [68, 75]. Reaktywacja enzymu *in vivo* zachodzi prawdopodobnie przez redukcję utlenionego klastru [3Fe-4S]<sup>1+</sup> do formy [3Fe-4S]<sup>0</sup> i następnie włączeniu jonu żelazowego [75-77]. Reaktywacja enzymu po utlenieniu przez anionorodnik nadtlenkowy jest całkowita, natomiast w przypadku utlenienia przez nadtlenek wodoru tylko częściowa, ponieważ nadtlenek wodoru powoduje uszkodzenie struktury białkowej enzymu [65].

W normalnym stanie redoks inaktywacja akonitazy przez anionorodnik nadtlenkowy jest procesem odwracalnym. Jednakże procesy, które prowadzą do znacznego wzrostu wytwarzania tych anionorodników, jak to ma miejsce na przykład w procesie starzenia, przyczyniają się do odpowiednio zwiększonej produkcji nadtlenu wodoru i rodników hydroksylowych [65, 75, 78]. Te ostatnie mogą powodować nieodwracalną inaktywację akonitazy [75].

Przypuszcza się, że reakcja między anionem nadtlenkowym i mitochondrialną akonitazą zwiększając oksydacyjne uszkodzenie mitochondriów leży także u podstaw patofizjologii niektórych przewlekłych chorób sercowo-naczyniowych [65]. Rola akonitazy została chyba najlepiej poznana w procesach starzenia się. Obecnie przypuszcza się, że zmiany występujące wraz z wiekiem są konsekwencją nagromadzenia się oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczek białek [70, 71, 75]. Oksydacyjnie zmodyfikowane białka tracąc strukturalną integralność i zdolności katalityczne przestają pełnić swoje funkcje. Uszkodzenie oksydacyjne białek wydaje się zatem mieć kluczowe znaczenie w procesie starzenia się. Podczas procesu starzenia się akonitaza w mitochondriach jest oksydacyjnie modyfikowana i inaktywo-

wana. W warunkach doświadczalnych inaktywacja akonitazy przez fluorooctan prowadzi do skrócenia czasu życia, co zdaniem autorów świadczy o zależności pomiędzy aktywnością tego enzymu a długością życia zwierząt doświadczalnych [75].

Akonitaza jest enzymem, o czym już wspomiano, katalizującym izomeryzację cytrynianu do izocytrynianu, reakcję podstawową dla metabolicznych funkcji komórki [65, 75]. U muchy enzym ten stanowi 15% białek macierzy mitochondrium. Obserwowane przez Yan i wsp. [75] obniżenie o 62% aktywności akonitazy mitochondrialnej u muchy w wyniku procesu starzenia się wywierało niekorzystny wpływ na proces fosforylacji oksydacyjnej.

Inaktywacja akonitazy może prowadzić do blokowania przepływu elektronów do tlenu, a przez to powodować kumulację zredukowanych metabolitów. Warunki takie, nazywane "stressem redukcyjnym", mogą prowadzić do nasilenia produkcji reaktywnych form tlenu poprzez autoutlenienie zredukowanych metabolitów, co w konsekwencji prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia cząsteczek. Tak więc, oksydacyjna inaktywacja akonitazy zapoczątkowuje kaskadę reakcji prowadzących do oksydacyjnego uszkodzenia komórek [65, 75]. To zjawisko może być przyczyną gwałtownego wzrostu stężenia utlenionych białek w procesie starzenia się, co zostało udokumentowane u ludzi, gryzoni i owadów [75, 77, 78].

Wydaje się zatem, że niezależnie od mechanizmów działania, kluczową rolę w zaburzeniu funkcji komórki odgrywa uszkodzenie mitochondriów.

Artykuł otrzymano 3 czerwca 2003

Zaakceptowano do druku 17 listopada 2003

## Piśmiennictwo

1. Siegel A, Kamiński M (1994), *Acta Pol Toxicol* **2**: 95-103
2. Corcoran G B, Sidharth D R (1992), *Toxicol Appl Pharmacol* **113**: 167-183
3. Kowaltowski A J, Vercesi A E (1999), *Free Radic Biol Med* **26**: 463-471
4. Neamati N, Fernandez A, Wright S, Kiefer J, McConkey D J (1995), *J Immunol* **154**: 3788-3795
5. Adachi M, Ishii H (2002), *Free Radic Biol Med* **32**: 487-494
6. Fawthrop D J, Boobis A R, Davies D S (1991), *Archiv Toxicol* **65**: 437-444
7. Herman B, Nieminen A L, Gores G J, Lemaster J J (1988), *FASEB J* **2**: 146-156
8. Lipton P (1999), *Physiol Rev* **79**: 1432-1516
9. Kamedulis L M, Corcoran G B (1991), *FASEB J* **5**: A1277-A1282
10. Rasmussen H, Barrett P, Smallwood J, Bollag W, Isales C (1990), *Environ Health Perspect* **84**: 17-25
11. Kloner R A, Przyklenk K, Whittaker P (1989), *Circulation* **80**: 1115-1127
12. Opie L H (1989), *Circulation* **80**: 1049-1062
13. Plewka A, Rutkowski T, Kamiński M (2000), *Acta Pol Toxicol* **8**: 161-177
14. Moore S J, Ho I K, Hume A S (1991), *Toxicol Appl Pharmacol* **109**: 412-420
15. Halperin M L, Connors H P, Relman A S, Karnowski M L (1986), *J Biol Chem* **244**: 384-390
16. Ting Q, Nieminen A L, Herman B, Lemasters J J (1997), *Cell Physiol* **42**: C1783-C1792
17. Bond J M, Herman B, Lemasters J J (1991), *Biochem Biophys Res Commun* **719**: 798-803
18. Bonventre J V, Cheung J C (1985), *Am J Physiol* **249**: C149-C159
19. Currin R T, Gores G J, Thurman R G, Lemasters J J (1991) *FASEB J* **5**: 207-210
20. Gores G J, Nieminen A L, Wray B E, Herman B, Lemasters J J (1989), *J Clin Invest* **83**: 386-396
21. Gunter E J, Pfeiffer D R (1990), *Am J Physiol* **258**: C755-C786
22. Halliwell B, Gutteridge J M (1985), *Molec Aspects Med* **8**: 89-133
23. Siesjo B K (1988), *Neurochem Pathol* **9**: 31-38
24. Kitakaze M, Weisfeldt M L, Marbas E (1988), *J Clin Invest* **82**: 920-927
25. Tan I K, Chua A S, Toh A K (1992), *J Clin Lab Anal* **6**: 324-328
26. Heberlein W, Wodopia R, Bartsch P, Mairbaurl H (2000), *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**: L640-L648
27. Buettner G R (1993), *Arch Biochem Biophys* **300**: 535-543
28. Chevion M (1988), *Free Radic Biol Med* **5**: 27-37
29. Kubes P, Suzuki M, Granger D N (1990), *Am J Physiol* **258**: G158-G163
30. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace J L, Granger D N (1990), *Am J Physiol* **259**: G300-G305
31. Lehr H A, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K (1991), *J Clin Invest* **81**: 2036-2041
32. Downey A K (1990), *Ann Rev Physiol* **52**: 487-504
33. Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K (1997), *J Neurochem* **68**: 265-271
34. Nazaki M, Kakei M, Koriyama N, Tanaka H (1995), *Diabetes* **44**: 878-883
35. Kourie J I (1998), *Am J Physiol* **275**: C1-C24
36. Jakoby W B, Ziegler D M (1990), *J Biol Chem* **265**: 29715-29718
37. White R E (1991), *Pharmacol Ther* **49**: 21-42
38. Reed D J (1990), *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 603-631
39. Dringer R (2000), *Proc Neurobiol* **62**: 649-671
40. Mates J M, Perez-Gomez C, De Castro I N (1999), *Clin Biochem* **32**: 595-603
41. Beyer R E (1990), *Free Radic Biol Med* **8**: 545-565
42. Liczmański A E (1988), *Postępy Biol* **34**: 293-310
43. Eichenberger K, Bohni P, Winsterhalter K H, Kawato S, Richter C (1982), *FEBS Lett* **142**: 59-62
44. Davies K J, Delsignore M E (1987), *J Biol Chem* **260**: 9908-9913
45. Ames B N, Shigenada M K, Hagen T M (1993), *Proc Natl Acad Sci* **90**: 7915-7922
46. Ceriello A (1993), *Diabetology* **36**: 1119-1125
47. Emerit I, Cerutti P (1981), *Nature* **293**: 144-152
48. Scherer N M, Deamer D W (1986), *Arch Biochem Biophys* **246**: 589-601
49. Gondko R (1995), *Postępy Biochem* **41**: 243-247
50. Nagy K, Pasti G, Bene L, Nagy I (1993), *Free Radic Res Commun* **19**: 1-15
51. Ullrich V, Brune B, Hecker G, Schmidt K U, Mulsch A, Busse R (1989), *Free Radic Res Commun* **36**: 265-274
52. Kanabus-Kamińska J K, Girardot J M (1984), *Archiv Biochem Biophys* **228**: 646-652
53. Scott J A, Rabito C A (1988), *Free Radic Biol Med* **5**: 237-249
54. Esposito L A, Melov S, Panov A, Cottrelli B A, Wallace D C (1999), *Proc Natl Acad Sci* **96**: 4820-4825
55. Nicholls D G, Budd S L (2000), *Physiol Rev* **80**: 316-344
56. Srinivasan C, Liba A, Imlay J A, Valentine J S, Butler Gralla E (2000), *J Biol Chem* **275**: 29187-29192

57. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, Chiba N, Nakagawa Y (1999), *J Biol Chem* **274**: 4924-4933
58. Lu S C (1999), *FASEB J* **13**: 1169-1183
59. Jo S H, Son M K, Koh H J, Lee S M, Song I H, Kim Y O, Lee Y S, Jeong K S, Kim W B, Park J W, Song B J, Huh T L (2001), *J Biol Chem* **276**: 16168-16176
60. Tian W N, Braustein L G, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton R C (1999), *Am J Physiol* **276**: C1121-C1131b
61. Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton R C (2000), *J Biol Chem* **275**: 40042-40047
62. Slekar K H, Kosman D J, Cizewski Culotta V (1996), *J Biol Chem* **271**: 28831-28836
63. Salvemini F, Franze A, Iervolino A, Filosa S, Salzano S, Ursini M V (1999), *J Biol Chem* **274**: 2750-2757
64. Gardner P R, Nguyen D D H, White C W (1994), *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12248-12252
65. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy M C (2000), *J Biol Chem* **275**: 14064-14069
66. Strohmeier Gort A, Imlay J A (1998), *J Bacteriol* **180**: 1402-1410
67. Eisenstein R S, Blemings K P (1998), *J Nutr* **128**: 2295-2298
68. Gardner P R, Raineri I, Epstein L B, White C W (1995), *J Biol Chem* **270**: 13399-13405
69. Gardner P R, Fridovich I (1992), *J Biol Chem* **267**: 8757-8763
70. Downey A K (1990), *Ann Rev Physiol* **52**: 487-504
71. Fridovich I (1997), *J Biol Chem* **272**: 18515-18-517
72. Nulton-Persson A C, Szweda L I (2001), *J Biol Chem* **276**: 23357-23361
73. Tretter L, Adam-Vizi V (2000), *J Neurosci* **20**: 8972-8979
74. Venditti P, Masullo P, Meo S D (2001), *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 293-301
75. Yan L-J, Levine R L, Sohal R S (1997), *Proc Natl Acad Sci* **94**: 11168-11172
76. Hentze M W, Kuhn L C (1996), *Proc Natl Acad Sci* **93**: 8175-8182
77. Kennedy M C, Antholine W E, Beinert H (1997), *J Biol Chem* **272**: 20340-20347
78. Carney J M, Starke-Reed P E, Oliver C N, Landum R W, Cheng M S, Wu J F, Floyd R A (1991), *Proc Natl Acad Sci* **88**: 3633-3636



# Struktura i funkcja białkowych domen PDZ

## Structure and function of the PDZ domains

MICHAŁ MILEWSKI\*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura domeny PDZ
- III. Rozpoznawanie C-końcowych motywów aminokwasowych
- IV. Funkcja domen PDZ
  - IV-1. Tworzenie wielobiałkowych kompleksów funkcjonalnych
  - IV-2. Lokalizacja białek
  - IV-3. Rozwój organizmu i polaryzacja komórkowa
  - IV-4. Selektywna proteoliza
- V. Domeny PDZ a choroby człowieka
- VI. Występowanie domen PDZ
- VII. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** CAL – (ang. *CFTR-associated ligand*) białko związane z CFTR; CAP70 – (ang. *CFTR-associated protein 70 kDa*) białko o masie cząsteczkowej 70 kDa, związane z białkiem CFTR; CFTR – (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) białko regulujące transbłonowe przewodnictwo chlorków, związane z patogenezą mukowiscydozy; DHR – (ang. *Discs-large homology region*) region homologiczny do fragmentu białka Dlg; Dlg – (ang. *Discs-large*) białko, którego mutacje prowadzą do nowotworowego przerostu dysku imaginalnego u muszki owocowej; Dsh – (ang. *dishevelled*) białko, którego mutacje prowadzą do zaburzenia polaryzacji włosków na powierzchni ciała muszki owocowej; E3KARP – (ang. *NHE3 kinase A regulatory protein*) białko regulujące NHE3 przy udziale kinazy białkowej A; ERM – (ang. *ezrin-radixin-moesin protein family*) rodzina białek obejmująca między innymi ezrynę, radyksynę i moezynę; FERM – (ang. *four-point-one, ezrin, radixin, moesin domain*) domena charakterystyczna dla białek z nadrodziny 4.1, obejmującej między innymi białka ERM; GLUT1 – (ang. *glucose transporter 1*) transporter glukozy 1; GLUT1CBP – (ang. *GLUT1 C-terminal binding protein*) białko wiążące C-koniec białka GLUT1; GRIP – (ang. *glutamate receptor interacting protein*) białko oddziałujące z receptorem kwasu glutaminowego; htrA – (ang. *high temperature requirement A*) białko związane z opornością na wysoką temperaturę; InaD – (ang. *inactivation no afterpotential D protein*) białko wymagane

Contents:

- I. Introduction
- II. The structure of the PDZ domain
- III. Recognition of the C-terminal amino acid motifs
- IV. The function of the PDZ domains
  - IV-1. Formation of multiprotein functional complexes
  - IV-2. Localization of proteins
  - IV-3. Development and cell polarity
  - IV-4. Selective proteolysis
- V. PDZ domains and human diseases
- VI. Distribution of PDZ domains
- VII. Final remarks

dla prawidłowego funkcjonowania systemu fototransdukcyjnego; Kir2.3 – (ang. *K<sup>+</sup> inward rectifier 2.3*) kanał potasowy, wykazujący dowewnętrzną rektyfikację; LIM – (ang. *Lin11, Isl1, Mec13 domain*) domena występująca między innymi w białkach Lin11, Isl1, oraz Mec13; LIMK1 – (ang. *LIM kinase 1*) kinaza zawierająca domenę LIM; LIN – (ang. *abnormal cell lineage*) białko, którego mutacje prowadzą do otrzymania linii komórkowej o nieprawidłowym fenotypie; MAGUK – (ang. *membrane-associated guanylate kinase*) rodzina kinaz guanylowych związanych z błoną komórkową; N – (ang. *notch*) białko, którego mutacje prowadzą do zaburzenia rozwoju skrzydeł (pojawienia się karbów na krawędziach skrzydeł) u muszki owocowej; NHE3 – (ang. *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3*) wymiennik sodowo-protonowy 3; NHERF – (ang. *NHE3 regulatory factor*) czynnik regulujący NHE3; NINAC – (ang. *neither inactivation nor afterpotential C*) niekonwencjonalna miozyna, której mutacje prowadzą do zaburzenia systemu fototransdukcyjnego; nNOS – (ang. *neuronal nitric oxide synthase*) neuronowa syntaza tlenu azotu; NRDB – (ang. *non-redundant data base*) nienadmiarowa baza danych; PAR3 – (ang. *partitioning defective 3*) białko, którego mutacje prowadzą do zaburzenia procesu asymetrycznego podziału komórki; PDZ – (ang. *PSD95, Dlg, ZO1 domain*) domena występująca m.in. u białek PSD95, Dlg oraz ZO1; PH – (ang. *pleckstrin homology domain*) domena o sekwencji homologicznej do fragmentu plekstryny; PICK1 – (ang. *protein interacting with C kinase 1*) białko oddziałujące z kinazą białkową C; PIP<sub>2</sub> – (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PKC – (ang. *protein kinase C*) kinaza białkowa C; PLC – (ang. *phospholipase C*) fosfolipaza C; PSD95 – (ang. *post-synaptic density protein 95 kDa*) białko o masie cząsteczkowej 95 kDa, wystę-

\*Dr, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, 01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17A, email: milewski@immd.med.pl

pujące w zagęszczeniu postsynaptycznym; PTPL1 – (ang. *protein tyrosine phosphatase-like 1*) białko podobne do fosfatazy tyrozynowej; PTS1 – (ang. *peroxisomal targeting sequence 1*) peroksisomalna sekwencja lokalizacyjna; RIL – (ang. *reversion-induced LIM protein*) białko z domeną LIM, którego ekspresja ulega indukcji w wyniku fenotypowej rewersji komórek transformowanych onkogenem; SAP97 – (ang. *synapse-associated protein 97 kDa*) białko o masie cząsteczkowej 97 kDa, występujące w synapsach; SH2 – (ang. *Src homology 2 domain*) homologiczna do regionu białka Src domena 2; SH3 – (ang. *Src homology 3 domain*) homologiczna do regionu białka Src domena 3; SNTA1 – (ang. *syntrophin, alpha 1*) alfa-syntrofina 1; TAZ – (ang. *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) koaktywator transkrypcyjny z motywem wiązaniem przez domenę PDZ; Tiam1 – (ang. *T-lymphoma invasion and metastasis protein 1*) białko związane z inwazją i przerzutami chłoniaka T-komórkowego; TPR – (ang. *tetratricopeptide repeat*) domena białkowa zawierająca powtórzenia 34-aminokwasowej sekwencji; TRP – (ang. *transient receptor potential*) kanał wapniowy biorący udział w regulacji okresowych zmian potencjału błonowego; TRPL – (ang. *TRP-like*) białko podobne do TRP; Wg – (ang. *wingless*) białko, którego mutacje prowadzą do utraty skrzydeł u muszki owocowej; ZO1 – (ang. *zonula occludens 1*) białko obwódki zamykającej.

## I. Wstęp

Na początku ubiegłego dziesięciolecia zauważono obecność homologicznych sekwencji aminokwasowych powtarzających się kilkukrotnie w synaptycznym białku PSD95 (ang. *post-synaptic density protein 95 kDa*), w supresorze nowotworowym Dlg (ang. *Discs-large*) muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, oraz w białku ZO1 (ang. *zonula occludens 1*), występującym w obwódce zamykającej komórek nabłonkowych [1, 2]. Od pierwszych liter nazw tych trzech białek wywodzi się obecna nazwa odkrytej w ten sposób domeny PDZ, choć początkowo na jej określenie używano też wymiennie dwóch innych skrótów – DHR (ang. *Discs-large homology region*), lub też GLGF (od charakterystycznego motywu aminokwasowego Gly-Leu-Gly-Phe, występującego w tej domenie).

Zarówno powszechność występowania domen PDZ, jak i ich intrygująca zdolność do swoistego wiązania C-końcowych motywów aminokwasowych, sprawiają, że domeny te stają się coraz częściej obiektem zainteresowania badaczy reprezentujących różne dziedziny nauk biologicznych. Wyszukane są liczne hipotezy dotyczące wyjątkowej roli domen PDZ w funkcjonowaniu różnego typu komórek, zwłaszcza tych o wysoce wyspecjalizowanej funkcji, jak np. komórki nerwowe lub nabłonkowe.

W prezentowanym opracowaniu, oprócz podsumowania obecnego stanu wiedzy na temat struktury i funkcji tych domen przedstawiono także wybrane przykłady procesów komórkowych przebiegających z ich udziałem.

## II. Struktura domeny PDZ

Stosując krystalografię rentgenowską udało się ustalić strukturę przestrzenną domeny PDZ białka PSD95 [3], a następnie kilkunastu innych domen PDZ. Na tej podstawie można wnioskować o ogólnym planie ich budowy. Sekwencja domeny PDZ, licząca około 80-100 aminokwasów obejmuje zwykle sześć włókien  $\beta$  ( $\beta$ A- $\beta$ F) oraz dwie helisy  $\alpha$  ( $\alpha$ A i  $\alpha$ B) (Ryc. 1). W obrębie domeny wyróżnić można kilka krótkich konserwowanych ewolucyjnie motywów aminokwasowych, spośród których szczególną uwagę badaczy przykuł wspomniany wcześniej motyw GLGF. Motyw ten położony jest w N-końcowej części jednej ze struktur  $\beta$  ( $\beta$ B) i początkowo uznawany był za charakterystyczny znak rozpoznawczy domeny PDZ. Porównując sekwencje różnych domen PDZ można jednak dojść do wniosku, że niewiele jest aminokwasów, których obecność jest niezbędna dla zachowania struktury i funkcji tej domeny. Oprócz glicyny w trzeciej pozycji motywu GLGF, do najczęściej zachowywanych ewolucyjnie aminokwasów należą asparagina usytuowana pomiędzy strukturami  $\beta$ D i  $\beta$ E, histydyna w N-końcowej części helisy  $\alpha$ B, glicyna i kwas asparaginowy poprzedzające strukturę  $\beta$ D, oraz alanina w obrębie stosunkowo krótkiej helisy  $\alpha$ A.

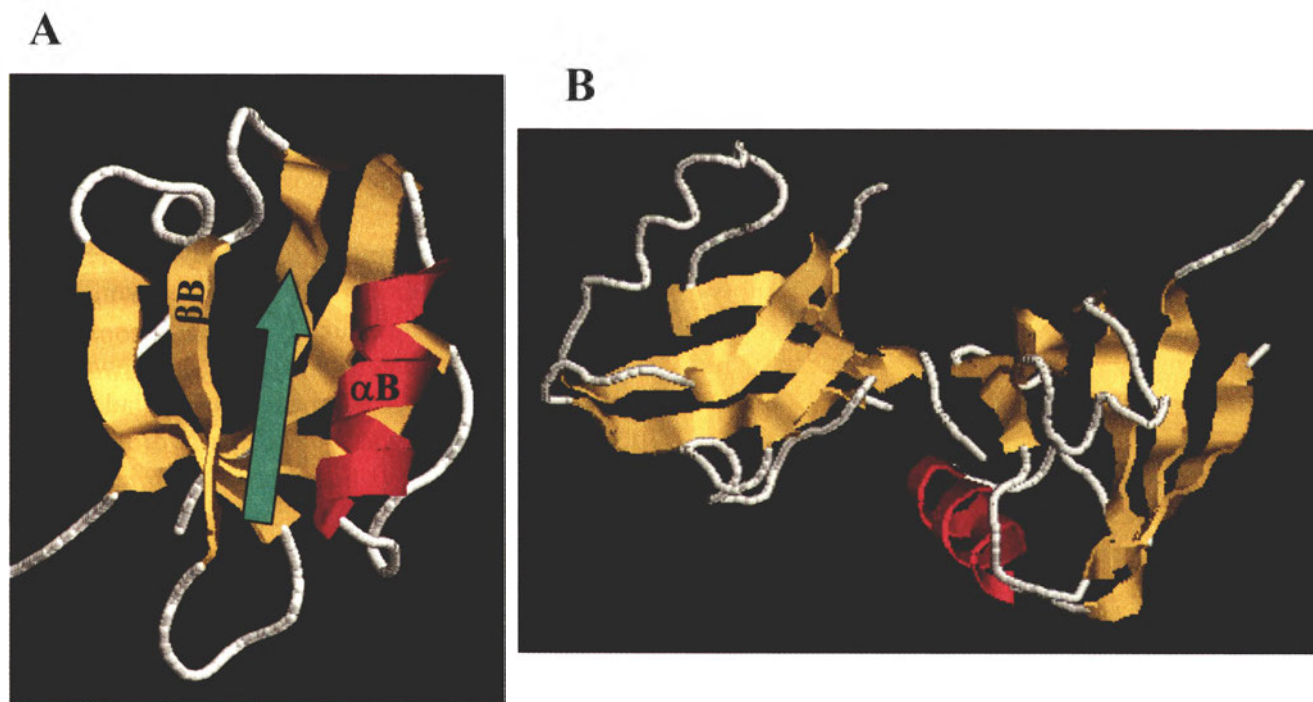
Najistotniejszym elementem strukturalnym domeny PDZ jest szczelina tworzona przez struktury  $\alpha$ B i  $\beta$ B, która na jednym swym końcu ograniczona jest motywem GLGF, leżącym na pętli łączącej  $\beta$ A i  $\beta$ B. Powstaje w ten sposób kieszeń, która bierze bezpośrednio udział w swoistym oddziaływaniu domeny PDZ z karboksylowym końcem wiązanej peptydu. Peptyd ten wpasowuje się antyrównolegle w przestrzeń pomiędzy  $\alpha$ B i  $\beta$ B, uzupełniając niejako strukturę samej domeny (Ryc. 2). Przyjmuje się, że kluczową rolę w tym wiązaniu odgrywa motyw GLGF, oddziałujący z ostatnim, C-końcowym aminokwasem wiązanej sekwencji.

Choć początkowo podejrzewano, że interakcje domeny PDZ są ze swej natury ograniczone do oddziaływania jedynie z C-końcowymi motywami aminokwasowymi, to okazało się jednak, że także pewne wewnątrzbiałkowe sekwencje mogą być wiązane przez przynajmniej niektóre domeny PDZ. Takie wewnętrzne sekwencje aminokwasowe przyjmują kon-



	$\beta$ A	$\beta$ B	$\beta$ C	$\alpha$ A	$\beta$ D	$\beta$ E	$\alpha$ B	$\beta$ F																																																																													
1 CAL	RKVL	LLKEDH	-EGLGISITGGK----	EHGVP	ILISEI	HPGQPADRC	GGLHVGDA	ILAVNGVNL	RDTKHK	EAVTIL	SQQRGE	IEFEV	VYVAPE																																																																								
2 SNTA1	RRVT	VRKADA	-GGLGISIKGGR----	ENKMP	ILISKI	FKGLAADQ	TEALFVGDA	ILSVNGED	LLSSAT	HDEAVQ	VLLKKT	GKEV	VLVVVKMKDV																																																																								
3 LIN7-PDZ2	PRVVE	LPKTD	-EGLGFNIMGGK----	EQNSP	IYISRVI	PGGVADRH	GGLKRGD	QLLSVNGVS	VEGEQ	HEKAVELL	KAAQGS	VKLVVRYTPRV																																																																									
4 LIN7-PDZ3	PRVVE	LPKTE	-EGLGFNIMGGK----	EQNSP	IYISRI	IPGGIADRH	GGLKRGD	QLLSVNGVS	VEGEH	HEKAVELL	KAAQGS	VKLVVRYTPKV																																																																									
5 LIN7-PDZ1	PRVVE	LPKTD	-EGLGFNIMGGK----	EQNSP	IYISRI	IPGGVAERH	GGLKRGD	QLLSVNGVS	VEGEH	HEKAVELL	KAAQGS	VKLVVRYTPKV																																																																									
6 PSD95-PDZ3	PRRIV	IHRGS	-TGLGFNIVGG----	EDGE	GIFISFI	LAGGPADLS	GELRKGDI	LSVNGVD	LRNAS	HEQAAI	ALKNAG	QVTVTI	IAQYKPEE																																																																								
7 SAP97-PDZ3	PRKVV	LHRGS	-TGLGFNIVGG----	EDGE	GIFISFI	LAGGPADLS	GELRKGDI	LSVNGVD	LRNAS	HEQAAI	ALKNAG	QVTVTI	IAQYKPEE																																																																								
8 PSD95-PDZ1	YEEIT	TLERGN	-SGLGFSIAGGTDNPHIGDDPSIFITKIIPGGAAAQDGRLLRVNDSLIFVNEVDVREVT	THSA	AVEALKE	AGSIV	RLVY	VMRRKPP																																																																													
9 SAP97-PDZ1	YEEIT	TLERGN	-SGLGFSIAGGTDNPHIGDDSSIFITKIITGGAAAQDGRLLRVNDCILQVNEVDV	RDVTH	SKAVEALKE	AGSIV	RLVY	VKRRKPV																																																																													
10 PSD95-PDZ2	VMEIK	LKIKGP	-KGLGFSIAGGVGNQHIPGDN	SIYVT	KIEGGAA	HKDGLR	LQIGDK	ILAVNSVGL	EDVM	HEDAVA	ALKNTY	DVVYLK	VAKPSNA																																																																								
11 SAP97-PDZ2	IMEIK	LKIKGP	-KGLGFSIAGGVGNQHIPGDN	SIYVT	KIEGGAA	HKDGLR	LQIGDK	ILAVNSVGL	EEVTH	EEAVTAL	KNTS	DFVYLK	VAKPTSM																																																																								
12 NHERF-PDZ1	PRLCC	LKIKGP	-NGYGFHLHGEK----	GK	-LGQY	IRLVE	PGSPA	EAKG	-LLAG	DRLE	VEVNGEN	VEKET	HQQV	VSRI	RAALNA	VRLV	VDPE	TD																																																																			
13 E3KARP-PDZ1	PRLC	RLVRGE	-QYGFHLHGEK----	GR	-RGQ	FIR	VEPG	SPAE	AAA--	LAG	DRLE	VEVNG	VNE	VEG	THHQ	VVQRI	KAVE	GQ	TRLL	VVDQ	ETD																																																																
14 NHERF-PDZ2	PRLC	TMKKGP	-SGYGFNLHSDK----	SK	-PGQ	FIR	SVD	PDS	PAE	ASG	-LRA	QDR	IVE	NG	VCM	EGKQ	HGD	VVSA	I	RAGG	DE	T	KLLV	VDRE	TD																																																												
15 E3KARP-PDZ2	PRLC	HLR	KIKGP	-QYGFNLHSDK----	SR	-PGQ	YIR	SVD	PGS	PAAR	SG	-LRA	QDR	LI	EV	NGQ	N	VEGL	R	HAE	V	VAS	I	KARE	DE	ARLL	VVDPE	TD																																																									
16 CAP70-PDZ3	PRIV	E	MKKS	-NGYGFYLRAGS----	EQ	-KGQ	I	KD	IS	GS	PAE	EAG	-LKN	ND	L	V	AV	NG	S	VE	T	LD	H	D	S	V	VEM	I	R	KG	G	D	Q	T	S	L	L	V	D	K	E	T																																											
17 CAP70-PDZ2	PRLC	YL	VKGE	-GSYGFSLKT	VQ----	GK	-KGV	Y	M	T	I	T	P	Q	G	V	A	M	R	A	G	-V	L	A	D	D	H	L	E	V	N	G	N	E	D	A	S	H	E	K	V	E	K	S	R	V	M	F	L	V	D	K	E	T																															
18 CAP70-PDZ4	PKL	C	R	L	A	K	G	E	-NGYGFHLNAIR----	GL	-P	G	S	F	I	K	E	V	Q	K	G	P	A	D	L	A	G	-L	E	D	E	V	I	E	V	N	G	V	N	L	D	E	P	Y	E	K	V	D	R	I	Q	S	S	G	K	N	V	T	L	L	V	C	G	K	A	Y																			
19 PTP1-PDZ1	TLV	N	L	K	K	D	A	K	-YGLGFQIIGGEKMG--	R	L	D	L	G	I	F	I	S	S	V	A	P	G	G	P	A	D	F	H	G	C	L	K	P	G	D	R	L	I	S	V	N	S	V	S	L	E	G	V	S	H	H	A	A	I	E	I	L	Q	N	A	P	E	D	V	T	L	V	I	S	Q	P	K	E	K										
20 CAP70-PDZ1	P	R	E	C	L	S	K	Q	E	G	-QNYGFFLRIEK----	D	T	-E	G	H	L	V	R	V	E	K	S	P	A	E	K	A	G	-L	Q	D	R	V	L	R	I	N	G	V	F	V	D	K	E	H	M	Q	V	D	L	V	R	K	S	N	S	V	T	L	L	V	D	G	S	Y																			
21 PTP1-PDZ2	I	F	E	V	E	L	A	K	N	-NSLGISVTGGVN--	T	S	V	R	H	G	G	I	Y	V	K	A	V	I	P	Q	G	A	E	S	D	G	R	I	H	K	G	R	V	L	A	V	N	G	V	S	L	E	G	A	T	H	K	Q	A	V	E	T	L	R	N	T	G	Q	V	H	L	L	L	E	K	G	Q	S	P										
22 PTP1-PDZ3	E	L	L	I	T	L	I	K	S	E	K	A	S	L	G	F	T	V	T	K	N	----	Q	R	-I	G	C	Y	V	H	D	V	I	Q	D	-P	A	K	S	D	G	R	L	K	P	G	D	R	L	I	K	V	N	D	T	V	T	N	M	T	H	T	D	A	V	N	L	L	R	A	A	S	K	T	V	R	L	V	I	G	R	V	L	E	L
23 RIL	P	H	S	V	T	L	R	G	P	S	-P	W	G	F	R	L	V	G	R	----	D	F	S	A	P	L	T	I	S	R	V	H	A	G	S	K	A	S	L	A	-L	C	P	G	D	L	I	Q	A	I	N	G	E	S	T	E	L	M	T	H	L	E	A	Q	N	R	I	K	G	C	H	D	H	L	T	L	S	V	S	R	P	E	G	R	
24 nNOS	V	I	S	V	R	L	F	K	R	K	V	G	L	G	F	L	V	K	E	----	V	S	K	P	P	V	I	S	D	L	I	R	G	G	A	E	Q	S	G	L	I	Q	A	G	D	I	I	L	A	V	N	G	R	P	L	V	D	L	S	D	S	A	L	E	V	L	R	G	I	A	S	E	T	H	V	L	I	L	R	G	P	E			
25 LIN10-PDZ1	C	K	D	V	F	E	K	Q	K	E	I	L	G	V	V	I	V	E	S	G	W	-	S	I	L	P	T	V	I	A	N	M	H	G	G	P	A	E	K	S	G	K	L	N	I	G	D	Q	I	M	S	I	N	G	T	S	L	V	L	P	L	S	T	C	Q	S	I	K	G	L	E	N	Q	S	R	V	K	L	N	I	V	R	C	P	
26 LIN2	V	R	L	V	Q	F	Q	K	N	T	D	E	P	M	G	I	T	L	K	M	N	----	E	L	-N	H	C	I	V	A	R	I	M	H	G	G	M	I	H	R	Q	T	L	H	V	G	D	E	I	R	E	I	N	G	I	S	V	A	N	Q	T	V	E	L	Q	K	M	L	R	E	M	R	G	S	I	T	F	K	I	V	P	S	Y	R	
27 GLUT1CBP	R	K	E	V	E	F	K	S	E	-D	A	L	G	L	T	I	T	D	N	----	G	A	-G	Y	A	F	I	K	R	I	K	E	G	S	V	I	D	H	I	H	L	I	S	V	G	D	M	E	A	I	N	G	Q	S	L	L	G	C	R	H	Y	E	V	A	R	L	L	K	E	L	P	R	G	R	T	F	T	L	K	L	T	E	P	R	
28 LIN10-PDZ2	T	V	L	I	R	R	P	D	L	R	-Y	Q	L	G	F	S	V	O	N	G	----	-I	I	C	S	L	M	R	G	-I	A	E	R	G	V	R	V	G	H	R	I	E	I	E	I	N	G	O	S	V	V	A	T	P	H	E	K	I	V	H	I	L	S	N	A	V	G	B	I	H	M	K	T	M	P	A	A	M	Y						

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych domen PDZ wybranych białek człowieka. Sekwencje tworzące struktury helikalne oznaczono barwą czerwoną, a sekwencje odpowiadające struktynom  $\beta$  przypisano barwę żółtą. Aminokwasy odpowiadające motywowi GLGF, tworzącemu część struktury  $\beta$ B, przedstawiono wytłuszczonym drukiem.

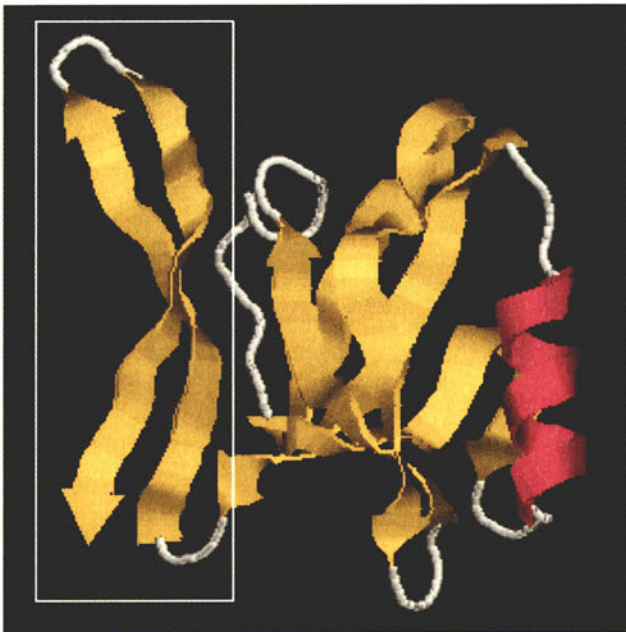
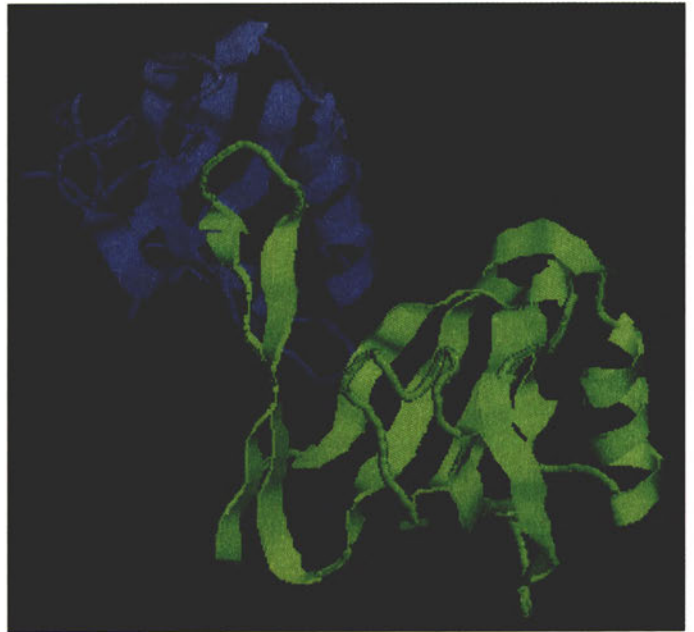


Ryc. 2. Przestrzenna struktura kompleksu utworzonego przez domenę PDZ i C-końcowy peptyd liganda. (A) Zielona strzałka przedstawia położenie C-końcowego peptydu, umieszczonego w obrębie kieszeni tworzonej przez helisę  $\alpha$ B oraz wstęgę  $\beta$ B domeny PDZ białka NHERF. (B) Schemat przedstawia w wzajemne położenie liganda (po lewej stronie), oraz wiążącej jego karboksylowy koniec domeny PDZ białka LIN2 (po prawej stronie) [69].

formację spinki  $\beta$ , która naśladując strukturę karboksylowego końca peptydu jest w stanie wpasować się w kieszeń wiążącą, tworzoną przez domenę PDZ [4]. Co ciekawe, sekwencje przyjmujące tego typu konformację obecne są czasem tuż za N-końcową częścią domeny PDZ, jak to ma np. miejsce w przypadku

neuronowej syntazy tlenu azotu (nNOS - ang. *neuronal nitric oxide synthase*), co sprawia, że domena PDZ tego białka może być swoistym ligandem dla domeny PDZ innego białka, w tym przypadku syntrofiny (Ryc. 3) [5]. Inne domeny PDZ mogą również tworzyć homo- lub heterodimery, choć strukturalne



**A****B**

**Ryc. 3.** Przestrzenna struktura kompleksu tworzonego przez domenę PDZ i wewnętrzną sekwencję aminokwasową białka nNOS. (A) Struktura spinki  $\beta$  (w ramce), sąsiadująca z domeną PDZ białka nNOS. (B) Komplex tworzony przez domenę PDZ syntrofiny (barwa niebieska) ze strukturą spinki  $\beta$  towarzyszącej domenie PDZ białka nNOS (barwa zielona).

podstawy tych oddziaływań są odmienne. W niektórych przypadkach nie obserwuje się np. kompetycji między procesem dimeryzacji a wiązaniem liganda [6].

### III. Rozpoznawanie C-końcowych motywów aminokwasowych

Rozpoznawanie swoistych C-końcowych motywów aminokwasowych przez poszczególne domeny PDZ odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu zawierających te domeny białek. Dość wcześnie zauważono, że domeny PDZ wykazują pewne preferencje odnośnie wiązania określonych motywów aminokwasowych *in vitro* [7], choć określenie poziomu swoistości tego rodzaju interakcji zachodzących *in vivo* w komórce jest niestety znacznie trudniejsze. Poszczególne domeny mogą różnić się dość znacznie pod względem zakresu różnorodności rozpoznawanych ligandów. Różnice dotyczą także siły wiązania C-końcowych motywów przez poszczególne domeny PDZ, dla których obserwuje się szeroki zakres wartości stałych dysocjacji ( $K_d$ S), sięgający od  $10^{-8}$  do  $10^{-6}$  M.

O swoistości wiązania karboksylowego końca peptydu decydują w głównej mierze oddziaływania z aminokwasami umieszczonymi odpowiednio w pozycji 0 i -2 C-końcowej sekwencji. Wynika to w pewnym sensie ze struktury całego kompleksu, jako że w sekwencji wiązanego peptydu, uzupełniającej

strukturę harmonijki  $\beta$  w domenie PDZ, reszty aminokwasowe w pozycji 0 i -2 zwrócone są w kierunku kieszeni wiążącej tworzonej przez domenę PDZ, podczas gdy reszty w pozycjach -1 i -3 przyjmują przeciwną orientację. Istnieją ponadto przesłanki sugerujące, że także aminokwasy na dalszych pozycjach mogą przyczyniać się do specyficzności oddziaływań z domenami PDZ, aczkolwiek nie dysponujemy dotąd modelem strukturalnym, wyjaśniającym tego typu oddziaływania.

Ostatni aminokwas (pozycja 0) C-końcowego motywu wiązanego przez domenę PDZ posiada zawsze łańcuch boczny o właściwościach hydrofobowych. Najczęściej jest to walina, leucyna lub izoleucyna, rzadziej fenyloalanina lub alanina. Swoistość wiązania poszczególnych aminokwasów hydrofobowych w tej pozycji wykazuje dość dużą zmienność. Przykładowo, niektóre domeny PDZ białek Dlg i PSD95 wiążą preferencyjnie C-końcową walinę, choć z niewiele mniejszym powinowactwem mogą też wiązać leucynę lub izoleucynę [7]. Tymczasem domena PDZ-1 białka NHERF (ang. *NHE3 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3) regulatory factor*), preferująca zdecydowanie C-końcową leucynę, nie toleruje waliny w tej pozycji, choć wiąże także peptydy zakończone izoleucyną lub fenyloalaniną [8]. Strukturalne podstawy tych różnic nie są jeszcze dokładnie poznane.

W zależności od reszty aminokwasowej usytuowanej w pozycji -2 wiązanego motywu, domeny PDZ dzieli się zazwyczaj na trzy klasy (Tabela 1).

Tabela 1

Klasyfikacja domen PDZ w oparciu o rozpoznawane C-końcowe sekwencje.

Motyw aminokwasowy*	Przykładowa sekwencja	Ligand (białko)	Domena PDZ	Ref.
Klasa I				
-X-S/T-X-Φ>	-D-T-R-L>	CFTR	NHERF (PDZ-1)	[8]
	-T-T-R-V>	neurolegina	PSD95 (PDZ-3)	[63]
	-E-S-L-V>	napięcio-zależny kanał sodowy	syntrofina	[64]
Klasa II				
-X-Φ-X-Φ>	-E-Y-F-I>	glikoforyna C	p55	[65]
	-E-F-Y-A>	syndekan	syntenina	[66]
	-S-V-E-V>	efryna B2	GRIP (PDZ-6)	[67]
Klasa III				
-X-D/E-X-Φ>	-V-D-S-V>	receptor melatoniny	nNOS	[68]

\* X oznacza dowolny aminokwas, a Φ aminokwas hydrofobowy.

Przyjmuje się powszechnie, że za specyficzność wiązania aminokwasu w tej pozycji odpowiedzialny jest oddziałujący z nim pierwszy aminokwas helisy αB (pozycja αB1) w domenie PDZ. W przypadku domen PDZ należących do klasy I, histydyna w pozycji αB1 zapewnia silne wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową seryny lub treoniny w pozycji -2 C-końcowego peptydu. Z kolei domeny klasy II, zawierające na ogół hydrofobowy aminokwas w pozycji αB1 (zwykle walinę lub leucynę), wiążą C-końcowe motywy zawierające w pozycji -2 również aminokwas o właściwościach hydrofobowych (najczęściej tyrozinę lub fenyloalaninę). Najpóźniej wyodrębniona klasa III obejmuje domeny wiążące motywy zawierające w pozycji -2 ujemnie naładowaną resztę aminokwasową (asparaginian lub glutaminian). Wiązanie wodorowe z boczną grupą karboksylową takiego aminokwasu zapewniane jest najczęściej przez grupę hydroksylową tyrozyny znajdującej się w pozycji αB1 domeny PDZ. Co ciekawe, w niektórych domenach PDZ, zaliczanych na ogół do klasy II, mamy do czynienia z odwróceniem charakterystycznych dla klasy III pozycji oddziałujących ze sobą aminokwasów. Przykładowo, domena PDZ białka Tiam1 (ang. *T-lymphoma invasion and metastasis protein 1*) zawiera asparaginian w pozycji αB1 i wiąże preferencyjnie peptydy posiadające tyrozinę w pozycji -2 [7]. Warto także zauważyć, że niektóre domeny PDZ wymykają się omawianej tu ogólnej klasyfikacji. Przykładem może być domena PDZ białka PICK1 (ang. *protein interacting with C kinase 1*), która zawiera lizynę w pozycji αB1, a zdolna jest do wiązania peptydów specyficznych zarówno dla I, jak i II klasy [9, 10].

Ważną rolę w funkcjonowaniu domen PDZ odgrywa regulacja ich oddziaływania z docelowymi sekwencjami aminokwasowymi. Wiadomo, że funkcje regulacyjne może w niektórych przypadkach pełnić fosforylacja reszt aminokwasowych w obrębie motywu wiązanego przez domenę PDZ. Przykładowo, fosforylacja seryny w pozycji -2 karboksylowego końca receptora adrenergicznego β<sub>2</sub> lub kanału potasowego Kir2.3 (ang. *K<sup>+</sup> inward rectifier 2.3*) zapobiega wiązaniu się tych białek z domenami PDZ, należącymi odpowiednio do białek PSD95 oraz NHERF [11, 12]. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że również inne czynniki, wpływające na przestrzenną organizację poszczególnych elementów strukturalnych wiązanych peptydów, mogą regulować przebieg procesu oddziaływania domen PDZ z ligandami.

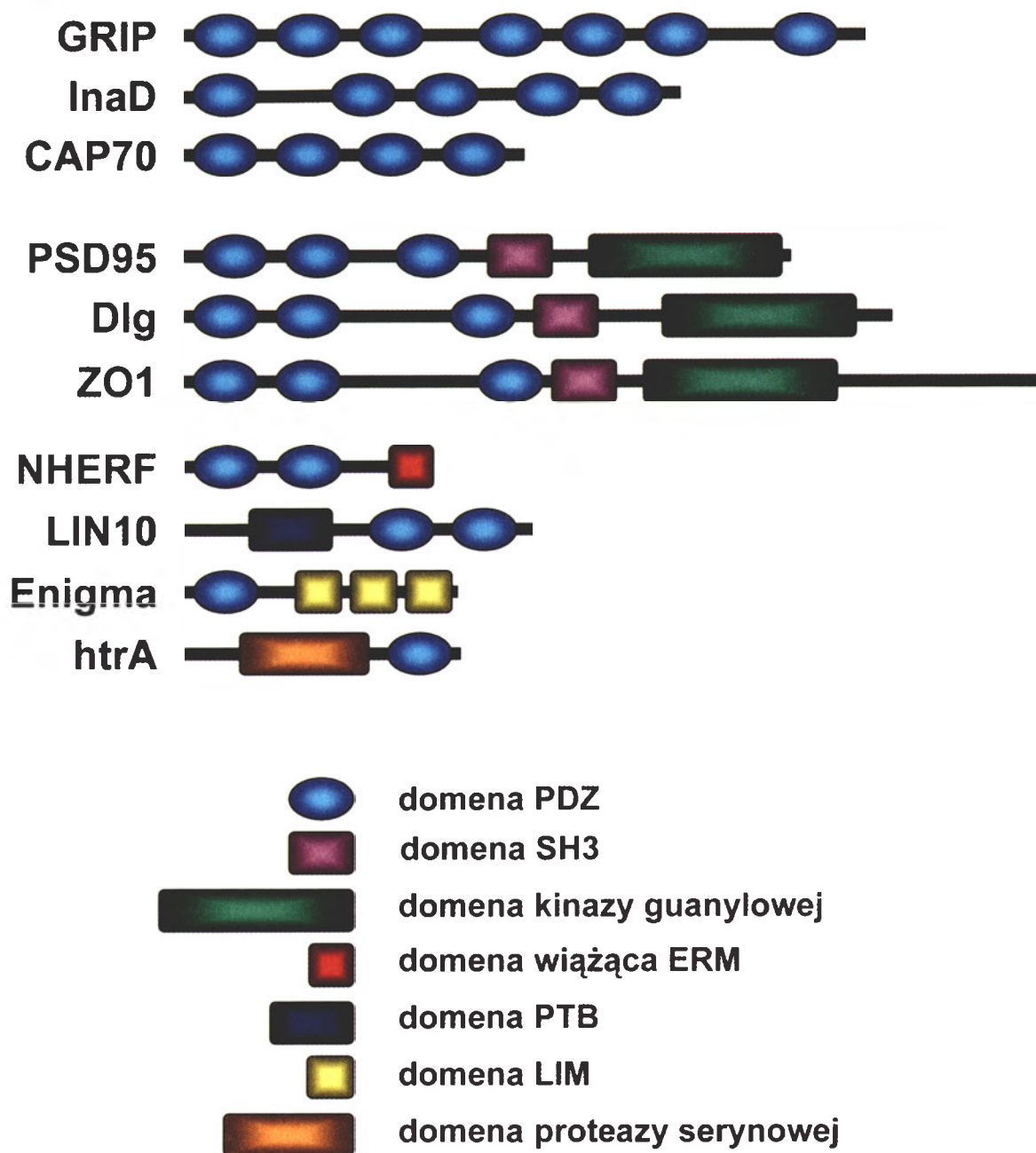
#### IV. Funkcja domen PDZ

Funkcja domeny PDZ sprowadza się w zasadzie do zapewnienia specyficznego wiązania pomiędzy białkiem posiadającym domenę PDZ a karboksylowym końcem innego białka, choć należy również pamiętać o dodatkowej zdolności domeny PDZ do wiązania niektórych wewnątrzbiałkowych sekwencji aminokwasowych, oraz do oddziaływania z innymi domenami PDZ. Domena PDZ należy więc do dość licznej grupy domen, których głównym zadaniem jest doprowadzenie do połączenia się określonych białek. Podobną funkcję pełnią między innymi domeny PTB (ang. *phosphotyrosine-binding*), SH2 (ang. *Src homology 2*), SH3 (ang. *Src homology 3*), oraz domena LIM (*Lin11, Isl1, Mec13*), choć w ich

przypadku wiązana sekwencja nie obejmuje C-końcowego aminokwasu liganda. Warto przy tym zwrócić uwagę na fakt, że oddziaływanie domen PDZ z karboksylowymi końcami innych białek może mieć nie tylko statyczny, ale i dynamiczny charakter, co znacznie zwiększa potencjalne możliwości udziału białek zawierających te domeny w rozmaitych procesach komórkowych. Najlepszym dowodem na to, że funkcja domen PDZ nie musi ograniczać się jedynie do zapewnienia stabilnego wiązania pomiędzy poszczególnymi peptydami, jest udział niektórych tych domen w modulowaniu aktywności różnych białek, jak to ma chociażby miejsce w przypadku wzmacniania aktywności kanału chlorkowego CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) poprzez oligomeryzację za-

chodzącą przy udziale domen PDZ białka CAP70 (ang. *CFTR-associated protein 70 kDa*) [13], lub też w przypadku regulowania aktywności czynnika transkrypcyjnego TAZ (ang. *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) poprzez interakcje zachodzące z udziałem jego C-końcowego motywu wiążącego domenę PDZ [14].

Choć spotyka się białka zbudowane wyłącznie z kilku domen PDZ, to jednak w zdecydowanej większości zawierających tę domenę białek jest ona zaledwie jednym z wielu różnych elementów strukturalnych (Ryc. 4). W zależności od obecności dodatkowych elementów strukturalno-funkcjonalnych podzielić można białka zawierające domeny PDZ na szereg grup, z których jedynie nieliczne doczekały się szerszego opracowania. Przykładem może być tu-



Ryc. 4. Przykłady zróżnicowania strukturalnego białek zawierających domeny PDZ.



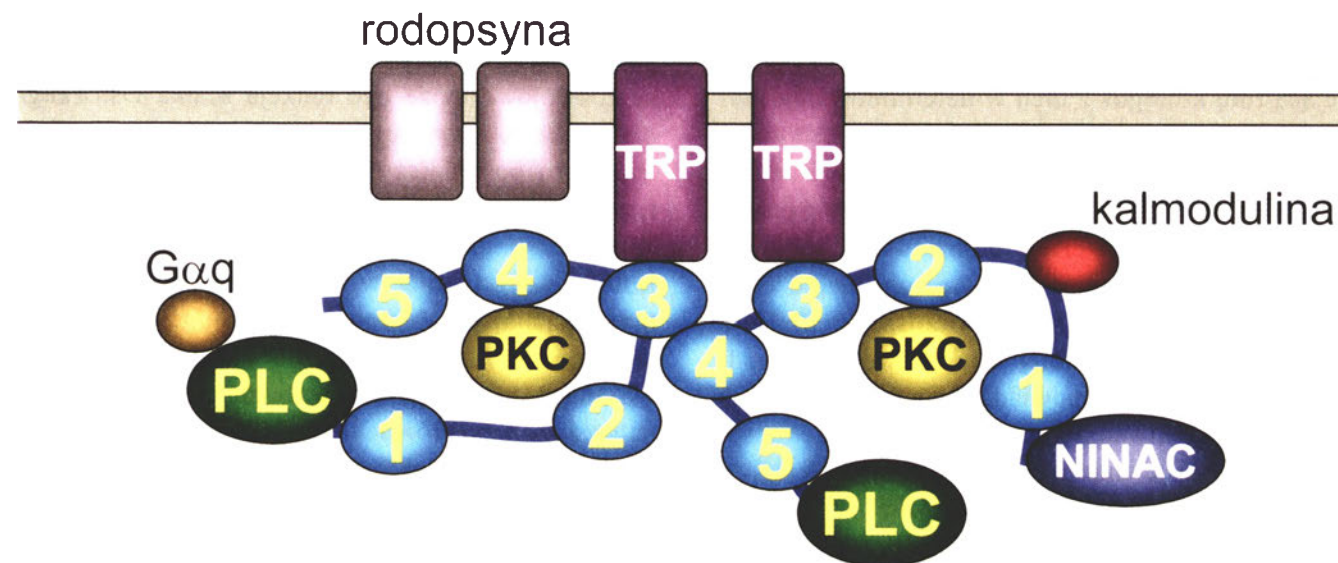
taj jedna z najwcześniej zidentyfikowanych i najintensywniej badanych grup białek zawierających domeny PDZ, określana zbiorczym terminem MAGUK (ang. *membrane-associated guanylate kinase*) [15], do której należą między innymi PSD95, Dlg, ZO1 i SAP97 (ang. *synapse-associated protein 97 kDa*). Białka te odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu synaps oraz w tworzeniu wyspecjalizowanych struktur błonowych w miejscach tzw. połączeń zamykających w komórkach nabłonkowych [16-18]. Oprócz domen PDZ zawierają one zawsze wspomnianą wyżej domenę SH3 oraz domenę kinazy guanylowej.

#### IV-1. Tworzenie wielobiałkowych kompleksów funkcjonalnych

Białka zawierające liczne domeny PDZ stanowią często rodzaj rusztowania, na którym wspiera się konstrukcja wielobiałkowych kompleksów funkcjonalnych. Jeśli poszczególne domeny PDZ takiego białka różnią się swoistością wobec wiązanych C-końcowych sekwencji aminokwasowych, umożliwia to jednoczesne wiązanie różnych białek, które biorą udział w następujących po sobie etapach tego samego procesu. Ma to szczególne znaczenie w przypadku funkcjonowania komórkowych szlaków sygnałowych, gdzie zapewnienie poszczególnym elementom szlaku bezpośredniego sąsiedztwa jest często niezbędnym warunkiem sprawnego przekazywania sygnału.

Przykładem kompleksu białkowego tworzonego przy udziale domen PDZ może być organizacja kaskady sygnałowej związanej z procesem przetwarzania sygnału świetlnego w oku muszki owocowej [19]. Szkielet całego kompleksu fototransdukcyjnego zlokalizowanego w błonie rabdomerowej komórki fotoreceptorowej stanowi w tym przypadku białko InaD (ang. *inactivation no afterpotential D*), zawierające pięć różnych domen PDZ (Ryc. 5). Dzięki oddziaływaniu tych domen z innymi białkami tworzy się kompleks podbłonowy zawierający między innymi trzy kluczowe składniki kaskady sygnałowej, a mianowicie fosfolipazę C (*PLC* – ang. *phospholipase C*), kanał kationowy TRP (ang. *transient receptor potential*) oraz specyficzną dla oka kinazę białkową C (*PKC* – ang. *protein kinase C*). Te trzy białka są stałymi składnikami kompleksu fototransdukcyjnego tworzonego przez białko InaD, podczas gdy pozostałe elementy kompleksu, takie jak rodopsyna, kanał kationowy TRPL (ang. *TRP-like*), kalmodulina, niekonwencjonalna miozyna III (*NINAC* – ang. *neither inactivation nor afterpotential C*), oraz białko Gaq, oddziałują w bardziej dynamiczny sposób z InaD, przy czym interakcje z domenami PDZ mogą mieć tu czasami charakter pośredni. W oddziaływaniu te mogą być także zaangażowane inne sekwencje białka InaD, położone pomiędzy domenami PDZ, jak to ma np. miejsce w przypadku interakcji między InaD i kalmoduliną. Dodatkowym elementem, rozbudowującym architekturę całego omawianego kompleksu, są oddziaływania pomiędzy poszczególnymi domenami PDZ białka InaD, umożliwiające tworzenie multimerów.

Przykłady innych białek, biorących udział w organizowaniu złożonych kompleksów przy udziale domen PDZ, obejmują między innymi PSD95 i GRIP (ang. *glutamate receptor interacting protein*), białka wchodzące w skład kompleksów pośredniczących w przekazywaniu sygnałów nerwowych przez błonę synaptyczną [20], oraz białko NHERF, stanowiące



Ryc. 5. Schemat przedstawiający udział domen PDZ w strukturze kompleksu fototransdukcyjnego tworzonego przez białko InaD (objaśnienia w tekście).

kluczowy element kompleksu organizującego różne receptory i kanały jonowe w błonie wierzchołkowej komórek nabłonkowych [21, 22].

#### IV-2. Lokalizacja białek

Oddziaływania z udziałem domen PDZ są odpowiedzialne za prawidłową subkomórkową lokalizację wielu białek. Przykładowo, wspomniany powyżej kanał jonowy TRP wykazuje zaburzoną lokalizację w komórce fotoreceptorowej po wprowadzeniu odpowiedniej mutacji do sekwencji domeny PDZ białka InaD, oddziałującej z tym właśnie kanałem [23]. Inny przykład stanowić może neuronowa syntaza tlenu azotu (nNOS), cytoplazmatyczne białko posiadające domenę PDZ, której obecność warunkuje prawidłową lokalizację nNOS w pobliżu błony cytoplazmatycznej [24]. Za lokalizację tę odpowiedzialne jest wspomniane wcześniej wiązanie zachodzące pomiędzy domeną PDZ białka nNOS a podobną domeną PDZ innego białka syntrofiny [25, 26]. Syntrofina jest z kolei elementem kompleksu białkowego dystrofiny, związanego ściśle z błoną cytoplazmatyczną komórek mięśniowych [27].

Najwięcej znanych przypadków lokalizacji subkomórkowej, zależnej od oddziaływania z domenami PDZ, dotyczy integralnych białek błonowych, głównie kanałów jonowych oraz receptorów błonowych [28, 29]. Przykładowo, C-końcowy motyw D-T-R-L> białka CFTR jest niezbędny dla zapewnienia prawidłowej lokalizacji tego kanału chlorkowego w wierzchołkowej błonie komórek nabłonkowych [30-32]. Choć znane są aż cztery białka, CAP70 [13], NHERF [8, 33, 34], E3KARP (ang. *NHE3 kinase 4 regulatory protein*) [35], oraz CAL (ang. *CFTR-associated ligand*) [36], których domeny PDZ mogą oddziaływać z karboksylowym końcem CFTR, to brak jest jednak dotychczas dowodów na decydującą rolę któregoś z nich w determinowaniu prawidłowej lokalizacji CFTR. Na podstawie dotychczasowych badań wydaje się dość prawdopodobne, że każde z tych białek odpowiada za inny etap procesu lokalizowania CFTR w błonie wierzchołkowej komórek nabłonkowych. Tak więc np. białko CAL uczestniczyć może w procesie transportu CFTR z aparatu Golgiego do błony komórkowej [36], podczas gdy NHERF odpowiada prawdopodobnie za przebieg odzyskiwania (recyklingu) CFTR z endosomów po procesie endocytozy [37].

Niektórzy badacze zwracają uwagę na zdolność wielu białek zawierających domeny PDZ do wiązania się z elementami cytoszkieletu komórkowego, a zwłaszcza z mikrofilamentami aktynowymi,

tworzącymi specyficzne struktury podbłonowe w różnych typach komórek, m.in. w komórkach nabłonkowych. Niektóre z tych białek, jak chociażby ZO1 lub afadyna, wykazują zdolność do bezpośredniego wiązania się z mikrofilamentami aktynowymi [38, 39]. Z kolei wspomniane już powyżej NHERF i E3KARP, a także ludzki homolog białka Dlg (hDLG), wiążą się z cytoszkieletem aktynowym w sposób pośredni dzięki oddziaływaniu z N-końcową domeną FERM (ang. *four-point-one, ezrin, radixin, moesin*), występującą u białek z rodziny ERM (ang. *ezrin-radixin-moesin*) oraz u innych białek z nadrodziny białek 4.1 wiążących aktynę (ang. *band 4.1 actin-binding proteins*) [40-42]. W większości wymienionych przypadków, możliwość oddziaływania z cytoszkieletem odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu białek zawierających domeny PDZ oraz ich ligandów. Dlatego sugeruje się, że białka zawierające te domeny stanowią istotny element strukturalnej i funkcjonalnej łączności pomiędzy białkami błonowymi i wewnątrzkomórkowymi strukturami cytoszkieletowymi, przyczyniając się w ten sposób zarówno do regulowania lokalizacji białek w błonie komórkowej, jak i do zachowania płynności przepływu sygnałów między błoną cytoplazmatyczną a wnętrzem komórki.

Niektóre domeny PDZ wydają się ponadto brać udział w bezpośrednim oddziaływaniu z lipidowymi składnikami błony cytoplazmatycznej, takimi jak np. fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP<sub>2</sub>) [43]. Sugeruje to możliwość regulowania błonowej lokalizacji białek zawierających domeny PDZ poprzez zmiany w miejscowym stężeniu fosfatydyloinozytolu w obrębie błony komórkowej.

#### IV-3. Rozwój organizmu i polaryzacja komórkowa

Przykładem zaangażowania domen PDZ w procesy rozwojowe może być funkcja białka Dsh (ang. *dishevelled*), występującego u muszki owocowej. Białko to pośredniczy w krytycznym dla rozwoju tego organizmu oddziaływaniu pomiędzy białkami Wg (ang. *wingless*) oraz N (ang. *notch*) [44]. Istotny jest przy tym fakt, że w tej niezmiernie ważnej aktywności białka Dsh kluczową rolę odgrywa właśnie jego domena PDZ [45]. Spośród wielu procesów rozwojowych, przebiegających z udziałem domen PDZ, na szczególne wyróżnienie zasługuje proces polaryzacji komórek w niektórych tkankach. Przykładowo, białko PAR3 (ang. *partitioning defective 3*), zawierające trzy domeny PDZ, jest wymagane do zajęcia polaryzacji w komórkach zarodkowych *C. elegans*,

który to proces ma fundamentalne znaczenie dla dalszego prawidłowego rozwoju zarodka nicienia [46].

Proces polaryzacji komórki polega na zaburzeniu strukturalnej symetrii komórkowej, czemu towarzyszy wyodrębnienie się odmiennych funkcjonalnie biegunów komórki. Z najbardziej widoczną polaryzacją mamy do czynienia w komórkach nerwowych, gdzie występują wyraźne strukturalne i funkcjonalne różnice pomiędzy aksonami i dendrytami, a także w komórkach nabłonkowych, w których widoczne jest wyodrębnienie powierzchni wierzchołkowej oraz podstawno-bocznej. Wydaje się, że niektóre mechanizmy utrzymywania polaryzacji w obu tych typach komórek są bardzo podobne, przy czym wierzchołkowa błona komórek nabłonkowych odpowiada z reguły presynaptycznej (aksonowej) lokalizacji w neuronach, a z kolei błona podstawno-boczna odpowiada postsynaptycznej (dendrytowej) lokalizacji w komórkach nerwowych. Potwierdzeniem tej reguły może być chociażby fakt, że istotną rolę w utrzymywaniu spolaryzowanej lokalizacji niektórych białek w komórkach nerwowych i nabłonkowych odgrywa ten sam konserwowany ewolucyjnie kompleks trzech kluczowych białek posiadających domeny PDZ [47]. Białka te, noszące nazwy LIN2 (ang. *abnormal cell lineage 2*), LIN7 i LIN10, odpowiedzialne są za podstawno-boczną lokalizację niektórych białek błonowych w komórkach nabłonkowych [48], oraz za postsynaptyczną lokalizację białek w dendrytach neuronów [49, 50]. W obu przypadkach główną rolę odgrywają oddziaływania pomiędzy karboksylowymi końcami białek błonowych a odpowiednimi domenami PDZ kompleksu LIN2/LIN7/LIN10. Znane są też inne białka, których domeny PDZ pośredniczą w spolaryzowanej dystrybucji białek w komórce, jak chociażby omawiane powyżej białka uczestniczące w zapewnianiu swoistej wierzchołkowej lokalizacji kanału chlorkowego CFTR.

#### IV-4. Selektyna proteoliza

Znaczną część spośród kilkuset prokariotycznych białek zawierających tzw. domeny PDZ-podobne stanowią białka posiadające aktywność peptydazy [51]. Przykładem może być periplazmatyczne białko htrA (ang. *high temperature requirement A*) bakterii *Escherichia coli*, posiadające oprócz domeny PDZ-podobnej także domenę proteazy serynowej (patrz Ryc. 5). Przypuszcza się, że połączenie aktywności proteolitycznej ze zdolnością do rozpoznawania swoistych C-końcowych sekwencji aminokwasowych ma szczególne znaczenie w procesie selektyw-

nej degradacji białek [52]. W przypadku bakterii *Escherichia coli*, domeny PDZ-podobne miałyby rozpoznawać białka stanowiące substrat dla proteazy, przy czym substratami tymi byłyby głównie białka o wadliwej strukturze, do których dołączony został wcześniej 11-aminokwasowy karboksylowy koniec, stanowiący sygnał dla degradacji [53]. Ponieważ omawiane tu proteazy wykazują różną lokalizacją w komórce bakterii, selektywna degradacja wadliwych białek zachodzić może zarówno w periplazmie, jak i w błonie komórkowej lub cytoplazmie.

#### V. Domeny PDZ a choroby człowieka

Wydaje się oczywiste, że skoro niektóre białka zawierające domeny PDZ pełnią ważną funkcję w rozwoju komórki i całego organizmu, to mutacje zaburzające funkcjonowanie tych białek powinny prowadzić do wystąpienia chorób o bardzo wyraźnym fenotypie, przynajmniej w tych wypadkach, gdy mutacje te nie są letalne dla zarodka. Tak więc delecja ludzkiego genu kodującego białko homologiczne do wspomnianego powyżej białka Dsh muszki owocowej, prowadzi do wystąpienia poważnych zaburzeń rozwojowych, określanych nazwą zespołu DiGeorge'a [54]. Także inny zespół ciężkich wad rozwojowych o podłożu genetycznym, noszący nazwę zespołu Williama, powodowany jest przez delecje genu kodującego białko zawierające domenę PDZ, a mianowicie kinazę LIMK1 (ang. *LIM kinase 1*) [55, 56].

Stosunkowo łagodne objawy kliniczne towarzyszą natomiast zaburzeniu opisywanych powyżej interakcji pomiędzy karboksylowym końcem białka CFTR a domenami PDZ kilku innych białek. W przeciwieństwie do większości z około 1000 znanych mutacji w genie *CFTR*, zidentyfikowana kilka lat temu mutacja S1455X, równoznaczna z delecją 26 C-końcowych aminokwasów kodowanego przez ten gen białka, nie prowadzi do wystąpienia mukowiscydozy, jednej z najczęstszych chorób o autosomalnym recesywnym trybie dziedziczenia w naszej populacji [57]. Spośród typowych objawów tej choroby, obejmujących m.in. nawracające ciężkie infekcje płuc oraz niewydolność trzustkową, mutacji S1455X (gdy występuje w parze z inną, tzw. „silną” mutacją) towarzyszy jedynie podwyższony poziom chlorków w pocie. Jak wykazały badania *in vitro*, mutacja ta nie zaburza samej funkcji kanału chlorkowego, a jedynie prowadzi do częściowego zaburzenia subkomórkowej lokalizacji białka CFTR w niektórych tkankach nabłonkowych, co wydaje się tłumaczyć



łagodność obserwowanego fenotypu klinicznego [30, 57].

Dalsze badania przyniosą zapewne znacznie więcej informacji na temat genetycznych chorób człowieka związanych z białkami zawierającymi domeny PDZ. Wydaje się to szczególnie prawdopodobne w przypadku chorób onkologicznych, jako że niektóre z omawianych tu białek wydają się mieć właściwości supresorów nowotworowych. Mutacje we wspomnianym wcześniej białku Dlg prowadzą do nowotworowej proliferacji komórek nabłonkowych muszki owocowej [58]. Z kolei niektórym delecjom białka Tiam1 (ang. *T-lymphoma invasion and metastasis protein 1*), obejmującym m.in. jego domenę PDZ, towarzyszy drastyczne podwyższenie ryzyka pojawienia się nowotworów u myszy [59].

## VI. Występowanie domen PDZ

Od czasu opisanego pierwszych domen PDZ, liczba znanych białek zawierających tego typu moduły strukturalne systematycznie rośnie i obecnie znamy ich już ponad tysiąc (wliczając w to homologi poszczególnych białek występujące w różnych gatunkach). Według szacunków opartych na analizie baz danych typu NRDB (ang. *non-redundant data base*) genom człowieka zawiera 312 różnych genów kodujących białka posiadające przynajmniej jedną domenę PDZ. W całkowicie zsekwencjonowanym genomie muszki owocowej *D. melanogaster* genów takich jest 121, u nicienia *Caenorhabditis elegans* 87, natomiast w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* występują jedynie trzy takie geny. Stosunkowo niewiele znamy roślinnych białek posiadających domeny PDZ, przy czym z ogólnej liczby 32 zidentyfikowanych dotychczas roślinnych genów kodujących tego typu białka, aż 22 przypada na zsekwencjonowany niedawno genom rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana*.

Przeważająca większość znanych nam domen PDZ występuje w organizmach eukariotycznych, w tym głównie u zwierząt. Znanych jest też jednak około 300 białek bakteryjnych, zawierających wspomniane wcześniej domeny, określane jako PDZ-podobne. Według jednej z hipotez, dużą rolę w rozpowszechnianiu się domen PDZ odgrywać mógł w tym wypadku transfer horyzontalny zachodzący pomiędzy genomami organizmów eukariotycznych i prokariotycznych [51].

## VII. Uwagi końcowe

Domena PDZ nie jest jedyną domeną białkową zdolną do swoistego oddziaływania z karboksylowymi końcami innych białek [60]. To co odróżnia ją jednak od pozostałych tego typu domen, takich jak chociażby domeny TPR (ang. *tetratricopeptide repeat*), rozpoznające C-końcowy peroksysomalny sygnał lokalizacyjny PTS1 (ang. *peroxisomal targeting sequence 1*), to wielka różnorodność motywów aminokwasowych rozpoznawanych przez poszczególne domeny PDZ. Różnorodność ta, w połączeniu z powszechnym występowaniem domen PDZ, stwarza ogromne możliwości odnośnie wykorzystywania C-końcowych motywów jako swego rodzaju identyfikatorów poszczególnych białek, pozwalających na swoiste regulowanie ich lokalizacji oraz modulowanie ich funkcji. Może być to oczywiście wykorzystane w praktyce do projektowania odpowiednich modyfikacji strukturalnych (w obrębie samych domen PDZ, jak i rozpoznawanych przez nie motywów), prowadzących do pożądaných zmian w lokalizacji i funkcji wybranych białek. Pierwsze tego typu doświadczenia zakończyły się już sukcesem [61, 62], co daje nadzieje na szersze wykorzystanie omawianej strategii w przyszłości.

Artykuł otrzymano 1 września 2003

Aakceptowano do druku 24 października 2003

## Piśmiennictwo

1. Cho K O, Hunt C A, Kennedy M B (1992) *Neuron* **9**: 929-942
2. Willott E, Balda M S, Fanning A S, Jameson B, Van Itallie C, Anderson J M (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7834-7838
3. Doyle D A, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R (1996) *Cell* **85**: 1067-1076
4. Oschkinat H (1999) *Nat Struct Biol* **6**: 408-410
5. Hillier B J, Christopherson K S, Prehoda K E, Bredt D S, Lim W A (1999) *Science* **284**: 812-815
6. Xu X Z, Choudhury A, Li X, Montell C (1998) *J Cell Biol* **142**: 545-555
7. Songyang Z, Fanning A S, Fu C, Xu J, Marfatia S M, Chishti A H, Crompton A, Chan A C, Anderson J M, Cantley L C (1997) *Science* **275**: 73-77
8. Wang S, Raab R W, Schatz P J, Guggino W B, Li M (1998) *FEBS Lett* **427**: 103-108
9. Staudinger J, Lu J, Olson E N (1997) *J Biol Chem* **272**: 32019-32024
10. Xia J, Zhang X, Staudinger J, Hagan R L (1999) *Neuron* **22**: 179-187
11. Cao T T, Deacon H W, Reczek D, Bretscher A, von Zastrow M (1999) *Nature* **401**: 286-290
12. Cohen N A, Brenman J E, Snyder S H, Bredt D S (1996) *Neuron* **17**: 759-767
13. Wang S, Yue H, Derin R B, Guggino W B, Li M (2000) *Cell* **103**: 169-179

14. Kanai F, Marignani P A, Sarbassova D, Yagi R, Hall R A, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley L C, Yaffe M B (2000) *EMBO J* **19**: 6778-6791
15. Anderson J M (1996) *Curr Biol* **6**: 382-384
16. Craven S E, Brecht D S (1998) *Cell* **93**: 495-498
17. Garner C C, Nash J, Haganir R L (2000) *Trends Cell Biol* **10**: 274-280
18. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A (2000) *Semin Cell Dev Biol* **11**: 315-324
19. Tsunoda S, Zuker C S (1999) *Cell Calcium* **26**: 165-171
20. Hata Y, Nakanishi H, Takai Y (1998) *Neurosci Res* **32**: 1-7
21. Shenolikar S, Weinman E J (2001) *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F389-F395
22. Voltz J W, Weinman E J, Shenolikar S (2001) *Oncogene* **20**: 6309-6314
23. Chevesich J, Kreuz A J, Montell C (1997) *Neuron* **18**: 95-105
24. Brenman J E, Chao D S, Gee S H, McGee A W, Craven S E, Santillano D R, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters M F, Froehner S C, Brecht D S (1996) *Cell* **84**: 757-767
25. Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S (1999) *J Biol Chem* **274**: 2193-2200
26. Adams M E, Mueller H A, Froehner S C (2001) *J Cell Biol* **155**: 113-122
27. Froehner S C, Adams M E, Peters M F, Gee S H (1997) *Soc Gen Physiol Ser* **52**: 197-207
28. Kornau H C, Seeburg P H, Kennedy M B (1997) *Curr Opin Neurobiol* **7**: 368-373
29. Ponting C P, Phillips C, Davies K E, Blake D J (1997) *Bioessays* **19**: 469-479
30. Moyer B D, Denton J, Karlson K H, Reynolds D, Wang S, Mickle J E, Milewski M, Cutting G R, Guggino W B, Li M, Stanton B A (1999) *J Clin Invest* **104**: 1353-1361
31. Moyer B D, Duhaime M, Shaw C, Denton J, Reynolds D, Karlson K H, Pfeiffer J, Wang S, Mickle J E, Milewski M, Cutting G R, Guggino W B, Li M, Stanton B A (2000) *J Biol Chem* **275**: 27069-27074
32. Milewski M I, Mickle J E, Forrest J K, Stafford D M, Moyer B D, Cheng J, Guggino W B, Stanton B A, Cutting G R (2001) *J Cell Sci* **114**: 719-726
33. Hall R A, Ostedgaard L S, Premont R T, Blitzer J T, Rahman N, Welsh M J, Lefkowitz R J (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8496-8501
34. Short D B, Trotter K W, Reczek D, Kreda S M, Bretscher A, Boucher R C, Stutts M J, Milgram S L (1998) *J Biol Chem* **273**: 19797-19801
35. Sun F, Hug M J, Lewarchik C M, Yun C H, Bradbury N A, Frizzell R A (2000) *J Biol Chem* **275**: 29539-29546
36. Cheng J, Moyer B D, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle J E, Cutting G R, Li M, Stanton B A, Guggino W B (2002) *J Biol Chem* **277**: 3520-3529
37. Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B, Karlson K H, Collawn J, Milewski M, Cutting G R, Guggino W B, Langford G, Stanton B A (2002) *J Biol Chem* **277**: 40099-40105
38. Fanning A S, Jameson B J, Jesaitis L A, Anderson J M (1998) *J Biol Chem* **273**: 29745-29753
39. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M, Nishioka H, Itoh M, Mizoguchi A, Aoki T, Fujimoto T, Matsuda Y, Tsukita S, Takai Y (1997) *J Cell Biol* **139**: 517-528
40. Lue R A, Brandin E, Chan E P, Branton D (1996) *J Cell Biol* **135**: 1125-1137
41. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 113-143
42. Bretscher A, Edwards K, Fehon R G (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 586-599
43. Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small J V, Vandekerckhove J, David G, Gettemans J (2002) *Mol Cell* **9**: 1215-1225
44. Axelrod J D, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N (1996) *Science* **271**: 1826-1832
45. Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R (1995) *Genes Dev* **9**: 1087-1097
46. Etemad-Moghadam B, Guo S, Kempfues K J (1995) *Cell* **83**: 743-752
47. Rongo C (2001) *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 349-359
48. Kaech S M, Whitfield C W, Kim S K (1998) *Cell* **94**: 761-771
49. Borg J P, Straight S W, Kaech S M, Taddeo-Borg M, Kroon D E, Karnak D, Turner R S, Kim S K, Margolis B (1998) *J Biol Chem* **273**: 31633-31636
50. Butz S, Okamoto M, Sudhof T C (1998) *Cell* **94**: 773-782
51. Ponting C P (1997) *Protein Sci* **6**: 464-468
52. Levchenko I, Smith C K, Walsh N P, Sauer R T, Baker T A (1997) *Cell* **91**: 939-947
53. Parsell D A, Silber K R, Sauer R T (1990) *Genes Dev* **4**: 277-286
54. Pizzuti A, Novelli G, Mari A, Ratti A, Colosimo A, Amati F, Penso D, Sangiuolo F, Calabrese G, Paika G, Silani V, Gennarelli M, Mingarelli R, Scarlato G, Scambler P, Dallapiccola B (1996) *Am J Hum Genet* **58**: 722-729
55. Tassabehji M, Metcalfe K, Fergusson W D, Carette M J, Dore J K, Donnai D, Read A P, Proschel C, Gutowski N J, Mao X, Sheer D (1996) *Nat Genet* **13**: 272-273
56. Frangiskakis J M, Ewart A K, Morris C A, Mervis C B, Bertrand J, Robinson B F, Klein B P, Ensing G J, Everett L A, Green E D, Proschel C, Gutowski N J, Noble M, Atkinson D L, Odelberg S J, Keating M T (1996) *Cell* **86**: 59-69
57. Mickle J E, Macek M, Jr., Fulmer-Smentek S B, Egan M M, Schwiebert E, Guggino W, Moss R, Cutting G R (1998) *Hum Mol Genet* **7**: 729-735
58. Woods D F, Bryant P J (1991) *Cell* **66**: 451-464
59. Van Leeuwen F N, van der Kammen R A, Habets G G, Collard J G (1995) *Oncogene* **11**: 2215-2221
60. Chung J J, Shikano S, Hanyu Y, Li M (2002) *Trends Cell Biol* **12**: 146-150
61. Schneider S, Buchert M, Georgiev O, Catimel B, Halford M, Stacker S A, Baechli T, Moelling K, Hovens C M (1999) *Nat Biotechnol* **17**: 170-175
62. Reina J, Lacroix E, Hobson S D, Fernandez-Ballester G, Rybin V, Schwab M S, Serrano L, Gonzalez C (2002) *Nat Struct Biol* **9**: 621-627
63. Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl T W, Sudhof T C (1997) *Science* **277**: 1511-1515
64. Gee S H, Madhavan R, Levinson S R, Caldwell J H, Sealock R, Froehner S C (1998) *J Neurosci* **18**: 128-137
65. Marfatia S M, Morais-Cabral J H, Kim A C, Byron O, Chishti A H (1997) *J Biol Chem* **272**: 24191-24197
66. Hsueh Y P, Yang F C, Kharazia V, Naisbitt S, Cohen A R, Weinberg R J, Sheng M (1998) *J Cell Biol* **142**: 139-151
67. Torres R, Firestein B L, Dong H, Staudinger J, Olson E N, Haganir R L, Brecht D S, Gale N W, Yancopoulos G D (1998) *Neuron* **21**: 1453-1463
68. Stricker N L, Christopherson K S, Yi B A, Schatz P J, Raab R W, Dawes G, Bassett D E, Jr., Brecht D S, Li M (1997) *Nat Biotechnol* **15**: 336-342
69. Daniels D L, Cohen A R, Anderson J M, Brunger A T (1998) *Nat Struct Biol* **5**: 317-325

# Transport krótkołańcuchowych kwasów monokarboxylo- wych przez błonę plazmatyczną

## Transport of short-chain monocarboxylic acids through plasma membrane

MAGDALENA MAC\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Krótkołańcuchowe kwasy monokarboxylo-
- III. Rodzina nośników kwasów monokarboxylo-  
(MCT)
- IV. Fizjologiczna funkcja różnych białek MCT
- V. Struktura białek MCT
- VI. Regulacja ekspresji białek MCT

**Wykaz stosowanych skrótów:** CHO — (ang. *chinese hamster ovary cells*) komórki jajnika chomika chińskiego; CIN —  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonian; DEPC — dietylopirowęglan; DIDS — 4, 4'-diizotocyjano-2,2'-stilbeno-disulfonian; GLUT — (ang. *glucose transporter*) transporter glukozy; KIC — kwas  $\alpha$ -ketoizokapronowy; KIV — kwas  $\alpha$ -ketoizowalerianowy; KMV — kwas  $\alpha$ -keto- $\beta$ -metylowalerianowy; MCT — (ang. *monocarboxylate transporter*) transporter kwasów monokarboxylo-  
wych; MSUD — (ang. *maple syrup urine disease*) choro-  
ba syropu klonowego; PCMB — p-chlorortęciobenzoesan

### I. Wstęp

Sprawne i prawidłowe funkcjonowanie organizmu jest możliwe dzięki systemom transportującym, znajdującym się w błonach komórkowych, które pozwalają wymieniać substancje pomiędzy komórkami, a także pomiędzy ich organellami. Transport niskocząsteczkowych związków przez błony komórkowe może odbywać się na zasadzie dyfuzji lub przy udziale białek, które w błonie komórkowej tworzą kanały, nośniki i pompy. Jeśli do przebiegu procesu transportu wymagane jest dostarczenie energii, to najczęściej pochodzi ona albo z hydrolizy ATP albo z gradientu stężenia jonów w poprzek błony. Transportery charakteryzują się dużą różnorodnością. Klasyfikujemy je w zależności od: rodzaju substancji

### Contents:

- I. Introduction
- II. Short-chain monocarboxylic acids
- III. Monocarboxylate transporters family (MCT)
- IV. Physiological role of different MCT proteins
- V. Structure of MCT protein
- VI. Regulation of MCT expression

przez nie przenoszonych, lokalizacji w błonach komórkowych oraz specyficzności tkankowej. Białka transportowe można klasyfikować w rodziny i nadrodziny białek na podstawie ich podobnego mechanizmu działania, pełnienia podobnych funkcji, specyficzności substratowej, lokalizacji tkankowej i komórkowej czy zapisu genetycznego. Przykładem rodzin transporterów mogą być: rodzina transporterów glukozy Glut1 – Glut7 [1-3], rodzina zależnych od sodu transporterów neurotransmiterów [4], czy rodzina transporterów kwasów monokarboxylo-  
wych MCT1 – MCT9, omawiana w tym opracowaniu. W pracy zostaną opisane mechanizmy przenoszenia kwasów monokarboxylo-  
wych przez błonę plazmatyczną, oddzielającą wewnątrz komórki od jej otoczenia.

Transport krótkołańcuchowych kwasów monokarboxylo-  
wych przez błony plazmatyczne komórek ssaków ma fundamentalne znaczenie dla prawidłowego przebiegu reakcji metabolicznych zachodzących w organizmach. W latach osiemdziesiątych prowadzono liczne badania dotyczące mechanizmów przenoszenia kwasów monokarboxylo-  
wych, szczególnie kwasu mlekowego, przez błony plazmatyczne, głównie erytrocytów i komórek nowotworowych. Stwierdzono wówczas, że kwasy monokarboxylo-  
we mogą być transportowane do wnętrza komórek poprzez (i) dyfuzję niezdisocjowanego kwasu, która stanowi mniej niż 5% całego procesu akumulacji [6, 7] oraz (ii) transport nośnikowy, w którym uczestniczy białko błony plazmatycznej [8].

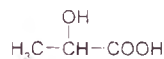
\*Dr. Pracownia Procesów Transportu w Błonach Biologicznych, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, e-mail magdab@nencki.gov.pl



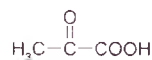
W zależności od mechanizmu działania transportera, w transporcie nośnikowym anion kwasu monokarboksyowego może być przenoszony wraz z kationem sodu lub protonem [9], albo na wymianę z innym anionem nieorganicznym [10, 11]. Obecnie prowadzone badania koncentrują się na poznaniu mechanizmu transportu kwasów monokarboksyowych przez błonę plazmatyczną, który występuje najpowszechniej, czyli na przeniesieniu anionu kwasu monokarboksyowego jednocześnie z protonem, oraz rzadziej, z kationem sodu. Nośnik biorący udział w tym procesie występuje w kilku postaciach izoformicznych. Różnią się one między sobą specyfnością substratową, wrażliwością na inhibitory oraz występowaniem w błonach komórek w zależności od pełniących przez nie funkcji. Obecnie uważa się, że kwasy monokarboksyowe są przenoszone przez błony plazmatyczne głównie w symporcie z protonem (MCT) [5]. Proces ten czerpie energię z gradientu stężeń anionu kwasu monokarboksyowego i protonu, który istnieje po obu stronach błony plazmatycznej. Dotychczas poznano dziewięć białek należących do tej rodziny.

## II. Krótkołańcuchowe kwasy monokarboksyowe

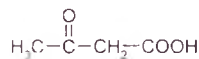
Kwasy monokarboksyowe o krótkich łańcuchach powstają w organizmie w szeregu szlaków metabolicznych. Charakteryzują się dużą różnorodnością - przykłady przedstawiono na Rycinie 1. Związki te biorą udział w przemianach metabolicznych aminokwasów, cukrów, kwasów tłuszczowych i lipidów. Na przykład kwas pirogronowy, który jest końcowym produktem glikolizy, w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia może przekształcać się w kwas mlekowy, który odgrywa jedną z ważniejszych ról w metabolizmie komórkowym. Transport kwasu mlekowego jest jednym z najlepiej poznanych i najpowszechniej badanych procesów transportu kwasów monokarboksyowych. Ze względu na swoją prostą budowę i liczne funkcje pełnione w organizmie, kwas mlekowy jest jako substrat modelowy wykorzystywany do badań transportu przez błony komórkowe [9, 12-15]. Dla niektórych tkanek, takich jak: białe mięśnie szkieletowe, erytrocyty, komórki nowotworowe, mleczan jest końcowym produktem procesu glikolizy. Kwas mlekowy musi zostać uwolniony z komórki, aby glikoliza mogła nadal zachodzić. Gdy produkcja kwasu mlekowego przewyższa jego uwalnianie, jego wewnątrzkomórkowe stężenie wzrasta i obniża się wewnątrzkomórkowe pH, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania aktywno-



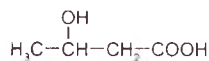
KWAS MLEKOWY



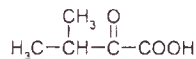
KWAS PIROGRONOWY



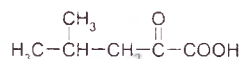
KWAS ACETOCTOWY



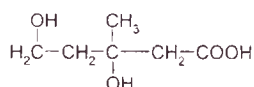
KWAS HYDROKSYMASŁOWY



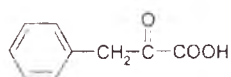
KWAS KETOIZOWALERIANOWY



KWAS KETOIZOKAPRONOWY



KWAS MEWALONOWY



KWAS FENYLOPIROGRONOWY

Ryc. 1. Przykłady krótkołańcuchowych kwasów monokarboksyowych występujących powszechnie w komórce.

ści enzymów procesu glikolizy i niemożności uzyskania energii tą drogą. W niektórych tkankach np. w mózgu, sercu, czerwonych mięśniach szkieletowych mleczan jest wykorzystywany jako substrat energetyczny. W takich tkankach mleczan musi być dostarczony do wnętrza komórek [9, 16].

Inny kwas monokarboksyowy, jakim jest kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy, jest metabolitem pośrednim przemian kwasów tłuszczowych. Kwas mewalony pełni istotne funkcje w biosyntezie związków steroidowych i cholesterolu. Kwasy monokarboksyowe o rozgałęzionych łańcuchach takie jak KIV, KIC, czy KMV, są produktami pierwszego etapu katabolizmu aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, odpowiednio: waliny, leucyny i izoleucyny. Zaburzenia metabolizmu kwasów monokarboksyowych są przyczyną występowania wielu chorób metabolicznych. Jako przykład można wymienić neurotoksyczne działanie wysokich stężeń ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach, np. w chorobie syropu klonowego - MSUD [17-19]. Choroba ta polega na braku lub uszkodzeniu enzymu katalizującego oksydacyjną dekarboksylację  $\alpha$ -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach węglowych. Uszkodzenie to prowadzi do nadmiernego nagromadzenia się tych

związków w organizmie, zwłaszcza KIC i leucyny, czego konsekwencją jest niedorozwój umysłowy i fizyczny [20, 21]. Z drugiej strony kwasy te mogą mieć znaczenie terapeutyczne. Stwierdzono, że ketokwasy likwidują nadmiar glutaminy w warunkach hyperamonemii związanych z encefalopatią wątrobową lub w defektach cyklu mocznikowego [22-25]. Jest to związane z uczestnictwem tych kwasów w cyklu leucyna – glutaminian zachodzącym między astrocytami i neuronami w mózgu, gdzie wpływają one na poziom syntezy glutaminy i glutaminianu [22, 26-28]. Leucyna, jako aminokwas łatwo przechodzący przez barierę krew – mózg, utworzoną przez komórki śródbłonna naczyń włosowatych, jest donorem grup aminowych do produkcji glutaminianu [29]. W astrocytach leucyna ulega transaminacji przekazując grupę aminową na  $\alpha$ -ketoglutaran. Prowadzi to do powstania glutaminianu, który jest następnie przekształcany w glutaminę, dzięki aktywności syntazy glutaminianowej, enzymu występującego wyłącznie w astrocytach [30]. Szkielet węglowy leucyny pozostaje natomiast w KIC, który wraz z glutaminą jest uwalniany przez astrocyty. Oba związki są następnie pobierane przez neurony, gdzie z glutaminy powstaje glutaminian. KIC ulega natomiast retransaminacji do leucyny przy wykorzystaniu grup aminowych pochodzących z glutaminianu [31]. W ten sposób nie dochodzi do nagromadzenia w neuronie glutaminianu. Jego nadmiar jest cytotoksyczny [32]. Nowo powstała leucyna jest uwalniana przez neurony i może ponownie zostać pobrana przez astrocyty w celu wyprodukowania glutaminianu. Zatem terapeutyczna skuteczność tych związków jest warunkowana ich wydajnym transportem przez błony plazmatyczne.

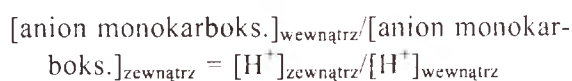
### III. Rodzina nośników kwasów monokarboksyłowych (MCT)

Intensywne badania nad charakterystyką funkcjonalną białek transportujących kwasy monokarboksyłowe do wnętrza i na zewnątrz komórki przez błony komórkowe ssaków, doprowadziły do wyodrębnienia rodziny nośników dla kwasów monokarboksyłowych – MCT [9, 33]. Rozpoczęto identyfikację poszczególnych białek transportowych należących do tej rodziny.

#### III-1. MCT1

Sekwencję pierwszego nośnika ustalono dzięki metodzie klonowania w materiale pochodzącym z komórek jajnika chomika chińskiego – CHO. Ziden-

tyfikowane białko nazwano izoformą MCT1 [34]. Stwierdzono, metodą rozdziału elektroforetycznego oznakowanego białka na żelu agarozowym, że MCT1 jest białkiem o masie 45 kDa [35]. Ustalono obecność nośnika MCT1 w komórkach ludzkich, szczurzych i mysich, wykazując około 95% identyczności tego białka w stosunku do pierwotnie poznanego MCT1 w komórkach CHO [36-38]. Właściwości kinetyczne transportera MCT1 najlepiej scharakteryzowano w erytrocytach i komórkach nowotworu wysiękowego Ehrlicha [9, 39]. Uzyskane dane potwierdzono w warunkach ekspresji białka MCT1 w oocytach *Xenopus* [40]. Stwierdzono, że proton jest pierwszym jonem wiążącym się do transportera. Po związaniu do transportera kolejnego jonu – anionu kwasu monokarboksyłowego następuje przeniesienie obydwu jonów przez błonę plazmatyczną i ich uwolnienie po jej drugiej stronie. Proces ten jest całkowicie odwracalny i równowaga zostaje osiągnięta, gdy:



Etapem limitującym transport jest powrót nośnika do konformacji umożliwiającej ponowne związanie substratu. Krótkołańcuchowe kwasy monokarboksyłowe są dobrymi substratami nośnika MCT1 [8, 9]. Przykładowe wartości  $K_m$  w komórkach nowotworu wysiękowego Ehrlicha dla młeczanu wynoszą: 4,5 mM, pirogronianu — 0,72 mM,  $\beta$ -hydroksymaślanu — 12,5 mM [39]. Specyficzność substratowa nośnika obniża się wraz ze wzrostem długości łańcucha kwasu monokarboksyłowego, jego rozgałęzień i pierścieni aromatycznych. Podstawienia łańcucha przy węglu C2 są preferowane nad C3. Aktywność nośnika MCT1 jest hamowana przez szereg związków: aromatyczne kwasy monokarboksyłowe takie jak CIN i fenylopirogonian, inhibitory transportu anionów — stylbenodisulfoniany np. DIDS, kwas trifluorotoluidynonikotynowy, flawonoidy — floretyna [41], kwercetyna [35], organiczne związki rtęci — mersalyl i PCMB [8]. Jednak żadnego z wymienionych wyżej związków nie można traktować jako specyficznego inhibitora transportu kwasów monokarboksyłowych przez nośnik MCT1 [5]. MCT1 jest izoformą najbardziej rozpowszechnioną i obecną we wszystkich tkankach, często ze specyficzną lokalizacją w każdej z nich (patrz Tabela 1) [42].

Tabela 1

Lokalizacja tkankowa nośników MCT. W nawiasach podano nomenklaturę nośników MCT z przed 1999 roku [5]

Izofорма MCT	Lokalizacja tkankowa
<b>MCT 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• serce [34, 62, 99-101]</li> <li>• mięśnie szkieletowe [43, 49, 55, 62, 102-105]</li> <li>• mózg: astroglej, ependymocyty, mikronaczynia, komórki endotelialne [44, 46, 64, 74-76]</li> <li>• komórki astrogleju hodowane <i>in vitro</i> [60, 106]</li> <li>• błona apikalna nabłonka barwnikowego siatkówki kurcząt i szczura [107]</li> <li>• ucho wewnętrzne [108, 109]</li> <li>• erytrocyty [34]</li> <li>• nerka: błona basolateralna komórek epitelialnych kanalików proksymalnych [43]</li> <li>• żołądek: błona basolateralna komórek epitelialnych [43]</li> <li>• okrężnica i jelito ślepe [43, 110]</li> <li>• jądra: główka plemnika [43]</li> <li>• łożysko [33]</li> </ul>
<b>MCT2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mózg: astrocyty [44, 76]</li> <li>• mózdzek: komórki Purkiniego [111]</li> <li>• ucho wewnętrzne [108, 109]</li> <li>• mikronaczynia siatkówki, komórki Müllera [112]</li> <li>• nerka: błony komórek kanalików zbiorczych [43]</li> <li>• hepatocyty [43]</li> <li>• komórki ścienne gruczołu właściwego żołądka [43]</li> <li>• jądra: ogon plemnika [43, 45]</li> </ul>
<b>MCT3 (REMP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• błona basolateralna nabłonka barwnikowego siatkówki kurcząt i szczura [50-52]</li> </ul>
<b>MCT4 (MCT3)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mięśnie szkieletowe [49, 55, 58, 62, 103]</li> <li>• serce [33]</li> <li>• łożysko [33]</li> </ul>
<b>MCT5 (MCT4)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• łożysko [33]</li> </ul>
<b>MCT6 (MCT5)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nerka [33]</li> <li>• łożysko [33]</li> </ul>
<b>MCT7 (MCT6)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mózg [33]</li> <li>• łożysko [33]</li> </ul>
<b>MCT8 (XPCT)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mózg [33]</li> <li>• łożysko [33]</li> <li>• wątroba [33]</li> <li>• serce [33]</li> </ul>

### III-2. MCT2

Dalsze badania doprowadziły do uzyskania sekwencji i funkcjonalnej ekspresji drugiej izoformy należącej do rodziny MCT — MCT2, która wykazuje 60% identyczności z izoformą MCT1 [41]. Jak dotąd obecność MCT2 potwierdzono w tkankach mysich, szczurzych i ludzkich [44-47]. Ostatnie badania pozwoliły na bardziej szczegółowe scharakteryzowanie tej izoformy dzięki uzyskaniu ekspresji tego białka w oocytach *Xenopus laevis* [47-48]. W porów-

naniu jednak z białkiem MCT1 znacznie mniej wiadomo na jego temat. Określono specyficzność substratową tego białka i stwierdzono, że MCT2 odpowiada za transport kwasu pirogronowego, a nie kwasu mlekowego do szczurzych komórek mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych [49]. Podobne wyniki uzyskano po przeprowadzeniu ekspresji ludzkiego białka MCT2 w oocytach *Xenopus*. Stwierdzono, iż nośnik ten ma wysokie powinowactwo do pirogronianu ( $K_m$  25  $\mu$ M) [47]. Te obserwacje zostały potwierdzone dla szczurzego MCT2, ekspresję którego



przeprowadzono także w oocytach *Xenopus* [48]. Białko MCT2 wykazuje dziesięć razy większe powinowactwo do poszczególnych substratów takich jak mleczan, pirogronian, niż białka MCT1 i MCT4, i co ciekawe, występuje w komórkach, w których zachodzi potrzeba szybkiego pobrania substratu do komórki i szybkiego obniżenia jego zewnątrzkomórkowego stężenia. W przeciwieństwie do MCT1, MCT2 nie jest wrażliwe na związek reagujący z grupami SH — PCMB [43, 48]. Izoforma MCT2 jest mniej rozpowszechnionym białkiem niż izoforma MCT1. Często natomiast towarzyszy występowaniu MCT1 w takich narządach jak wątroba, nerki, jądra i mózg, lecz jej dokładna lokalizacja jest różna od lokalizacji MCT1 w danej tkance. Przykładowo w nerce, MCT1 jest obecny w błonie bazolateralnej komórek epitelialnych kanalików proksymalnych, podczas gdy MCT2 w tej samej nerce jest obecny w błonach komórek kanalików zbiorczych [43]. MCT2 jest izoformą, która w swojej lokalizacji tkankowej wykazuje dość duże rozbieżności gatunkowe. Na przykład stwierdzono obecność MCT2 w izolowanych błonach komórkowych pochodzących z mózgu szczura, ale wykazano jego brak w błonach komórkowych, pochodzących z mózgu chomika [45].

### III-3. MCT3

Kolejną zsekwencjonowaną izoformą transportera MCT było białko zidentyfikowane w nabłonku barwnikowym siatkówki kurcząt, o wielkości 55 kDa [50]. Białko początkowo nazwane białkiem 'REMP' (ang. *Retinal Epithelial Membrane Protein*) po potwierdzeniu przynależności do rodziny nośników MCT przemianowane zostało na MCT3. Stwierdzono, że białko to wykazuje 43% identyczności z izoformą MCT1 i 45% z izoformą MCT2 [50]. MCT3 znaleziono jedynie w błonach bazolateralnych nabłonka barwnikowego siatkówki, który tworzy barierę krew-siatkówka [51, 52]. MCT3 reguluje poziom mleczanu w nerwowej części siatkówki. Jest białkiem odpowiedzialnym za wypływ mleczanu z nabłonka barwnikowego siatkówki do naczyń oka, reguluje przy tym również pH i osmolarność w subsiatkówkowej przestrzeni [53]. Dzięki ekspresji białka MCT3 w drożdżach poznano jego właściwości kinetyczne. Jest to transport zależny od pH, wartość  $K_m$  dla mleczanu w pH 7,2 wynosi 5,8 mM. MCT3 jest niewrażliwe na  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonian, floretynę, PCMB. Transport mleczanu przez białko jest blokowany przez DEPC, który reagując z histydyną, prawdopodobnie

znajdującą się w miejscu wiążącym substrat, uniemożliwia związanie substratu do nośnika [54].

### III-4. MCT4

Izoforma MCT4 jest szeroko rozpowszechniona w ludzkich i szczurzych komórkach mięśni szkieletowych, w ludzkim sercu, w krwinkach białych oraz w wielu ssaczych liniach komórkowych [33, 55]. Białko to zostało sklonowane w tym samym czasie, co poprzednia izoforma (MCT3) i początkowo również nazwano je białkiem MCT3 charakterystycznym dla mięśni. Według nowej, obecnej nomenklatury nadano mu nazwę MCT4. Dane kinetyczne, otrzymane w eksperymentach przeprowadzanych w pęcherzykach sarkolemy [56], a także na liniach komórek nabłonkowych pochodzących z nerki małpy (COS) oraz wołu (NBL1) [55], wykazały podobne wartości  $K_m$  dla transportu mleczanu jak wartości otrzymane w przypadku transportu przez nośnik MCT1. Wartości te nie zostały potwierdzone przez dane otrzymane w warunkach ekspresji białka MCT4 w oocytach *Xenopus*, gdzie  $K_m$  dla mleczanu wynosi 34 mM [57]. Wartość ta znacznie przewyższa wartości  $K_m$  uzyskane dla wcześniej poznanych białek: MCT1 (3,5 mM [40]) oraz MCT2 (0,5 mM [48]). Zatem charakterystyczną cechą transportera MCT4 wydaje się być jego bardzo niskie powinowactwo do substratu w porównaniu z nośnikami MCT1 i MCT2. Stwierdzono zahamowanie transportu przy udziale nośnika MCT4 przez CHC, DIDS, PCMB i floretynę [57]. Znaczące ilości mRNA kodującego białko MCT4 znaleziono, poza mięśniami [55, 58], w jądrach, jelicie cienkim, śliniankach przyusznych, płucach i mózgu [55]. Białko to występuje zatem w tkankach, których komórki uzyskują energię przeprowadzając reakcję glikolizy, której końcowym produktem jest mleczan. Sugeruje się, że MCT4 jest odpowiedzialne za transportowanie mleczanu z wnętrza na zewnątrz komórki [49, 55, 57].

### III-5. MCT5 – MCT9

Na podstawie poszukiwania w bazach danych homologicznych sekwencji do znanych izoform (MCT1 — MCT4) wyodrębniono kolejne izoformy, nazwano je odpowiednio MCT5 — MCT9 [5,33]. Nie ma jeszcze dokładnych danych dotyczących funkcjonalnej ekspresji i charakterystyki tych białek, ale zbadano metodą *Northern-blot* ich tkankową dystrybucję w organizmie człowieka [33]. Znaleziono mRNA dla białka MCT8 (XPCT) w ludzkiej wątrobie i w sercu [33]. Homolog tego białka zidentyfiko-

wano w mysiej nerce i wątrobie [59]. Wiadomości dotyczące lokalizacji tkankowej nośników MCT przedstawiono w Tabeli 1. Sekwencje kodujące białka MCT zidentyfikowano również w genomach innych organizmów poza ssakami. Sześć białek mogących należeć do rodziny MCT znaleziono u *Caenorhabditis elegans*, cztery u *Saccharomyces cerevisiae* oraz siedem u *Drosophila melanogaster* [5].

#### IV. Fizjologiczna funkcja różnych białek MCT

Istnienie różnych izoform białek MCT musi mieć znaczenie fizjologiczne związane albo z ich wyjątkowymi właściwościami albo z ich regulacją. MCT1 jest białkiem przystosowanym do zaopatrywania komórki w substraty energetyczne takie jak: związki ketonowe i mleczan, oraz w warunkach niedotlenienia do uwalniania mleczanu z komórek [39, 40, 60]. Szczególnie wysokie powinowactwo nośnika MCT1 do mleczanu stwierdzono w miocytach [61, 62] oraz w neuronach [63]. Podstawową fizjologiczną funkcją nośnika MCT2 jest, tak jak w przypadku MCT1, zaopatrywanie komórek w mleczan i związki ketonowe wykorzystywane w metabolizmie energetycznym. W przeciwieństwie do MCT1 białko to jest obecne w komórkach, które rzadko uwalniają mleczan do środowiska zewnętrznego, oraz w komórkach, gdzie zachodzi potrzeba szybkiego obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia substratu [5]. Znaleziono ekspresję białka MCT2 w neuronach w mózgu dorosłych osobników, wykorzystujących mleczan dostarczony im przez komórki astrogleju [44, 46, 64]. Jak dotąd jedynym białkiem należącym do rodziny MCT, którego dystrybucja tkankowa jest ściśle ograniczona, jest białko MCT3. Występuje ono wyłącznie w nabłonku barwnikowym siatkówki, gdzie pełni funkcję utrzymania odpowiedniego poziomu mleczanu w siatkówce [65]. Białko MCT4 jest nośnikiem o niskim powinowactwie, preferencyjnie uwalniającym mleczan z komórek, które przeprowadzają glikolizę, gdzie mleczan jest jej końcowym produktem [57]. Fizjologiczne znaczenie pozostałych izoform do tej pory nie zostało poznane. Pewną wskazówką o roli pełnionej przez konkretne białka MCT jest ich dystrybucja tkankowa. Poniżej zostaną omówione przykłady fizjologicznej roli pełnionej przez białka MCT w mięśniach szkieletowych i w mózgu.

##### IV-1. Mięśnie szkieletowe

Mięśnie szkieletowe są głównym producentem kwasu mlekowego w organizmie, szczególnie białe

mięśnie szkieletowe, których komórki zawierają mało mitochondriów. Proces glikolizy kończy się w tych komórkach na powstaniu kwasu mlekowego, który musi zostać usunięty z komórki. Z drugiej strony mięśnie czerwone, o wysokiej aktywności oksydacyjnej, posiadające dużo mitochondriów wykorzystują kwas mlekowy jako substrat energetyczny i wymagają dostarczenia go do wnętrza komórki. Kwas mlekowy jest zatem w komórkach mięśniowych istotnym metabolitem pośrednim, który wymaga szybkiego transportu przez sarkolemę w obu kierunkach w zależności od typu włókien mięśniowych i od ich obciążenia wykonywaną pracą [42, 66, 67]. W mięśniach wykazano ekspresję głównie białek MCT1 i MCT4, oraz niewielkie ilości MCT2 [34, 43, 55, 68]. Ekspresja białka MCT1 w komórce mięśniowej koreluje z jej zawartością mitochondriów. Mięśnie, takie, jak np. mięsień płaszczkowaty (łac. *soleus*), zawierające głównie wolno kurczące się włókna utleniające, wykazują wysoką ekspresję białka MCT1, podczas gdy mięśnie, takie jak np. mięsień brzuchaty łydki (łac. *gastrocnemius*), czy mięsień piszczelowy (łac. *tibialis interior*) zawierające włókna szybko kurczące się, nie wykazują ekspresji białka MCT1 [42, 55, 68]. Przytoczone przykłady sugerują, że ekspresja białka MCT1 we włóknach mięśniowych odzwierciedla zapotrzebowanie tych komórek na kwas mlekowy, który musi zostać dostarczony do wnętrza komórek w celu użycia go jako substratu energetycznego. Białko MCT4 znaleziono we wszystkich szczurzych mięśniach szkieletowych, lecz z minimalną obecnością tego białka w mięśniach zawierających utleniające włókna wolno kurczące się takie jak w mięśniu płaszczkowatym (łac. *soleus*) [55]. Wydaje się, że izoforma MCT4 jest odpowiedzialna za wpływ mleczanu z komórek, który powstaje w procesie glikolizy. Białe krwinki, w których proces glikolizy kończy się powstaniem mleczanu, wykazują ekspresję MCT4 jako jedynego białka z rodziny białek MCT [55]. Transportery MCT jako współtransportery przenoszące anion kwasu monokarboksylowego wraz z protonem uczestniczą w regulacji pH. Najlepiej poznano i opisano ten proces w mięśniach. Utrzymanie w komórce odpowiedniego pH zachodzi dzięki utrzymaniu równowagi między akumulacją protonów wewnątrz komórki, a ich usuwaniem przez transportery zlokalizowane w błonie plazmatycznej [69]. Stwierdzono, w badaniach na szczurach, że współtransporter mleczan/proton ma wyższą zdolność uwalniania protonów na zewnątrz komórki niż wymiennik  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  lub systemy transportowe zależne od dwuwęglanów [70]. Zatem współtransporter

mleczan/proton może funkcjonować jako system regulujący pH w komórkach. Należy jednak zaznaczyć, że aktywność tego nośnika zależy głównie od gradientu mleczanu po obu stronach błony, a tylko nieznacznie od zmian wewnątrzkomórkowego pH. Jest to podstawowa cecha odróżniająca ten system regulacji pH od klasycznego mechanizmu, jakim jest wymiennik  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ , którego działanie jest silnie aktywowane, gdy wewnątrzkomórkowe pH spada. Wiadomo jednak, że podczas intensywnego wysiłku, nośnik mleczan/proton jest głównym transporterem uwalniającym protony na zewnątrz komórki mięśniowej. Stwierdzono, że protony uwolnione przez ten nośnik stanowią 2/3 wszystkich uwolnionych z komórki protonów [71].

## IV-2. Mózg

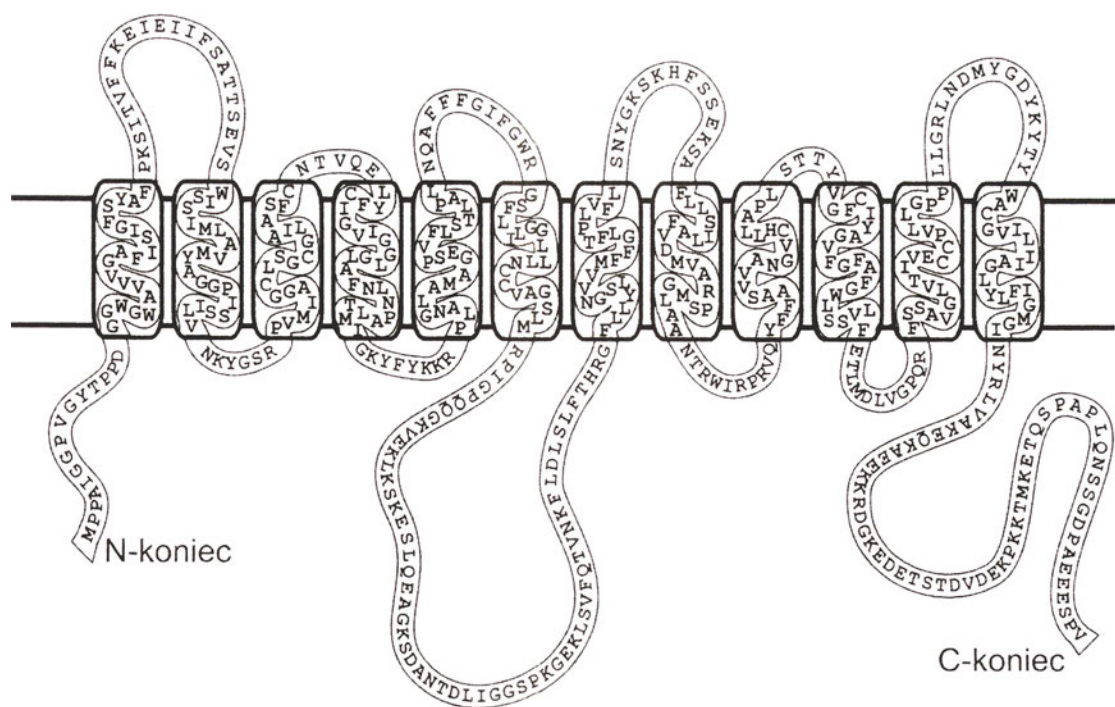
Glukoza jest głównym substratem energetycznym mózgu dorosłych osobników, a istniejąca bariera krew – mózg jest stosunkowo mało przepuszczalna dla mleczanu i ciał ketonowych [72]. W pewnych jednak warunkach takich jak głód, czy cukrzyca przepuszczalność bariery krew – mózg wzrasta i kwasy monokarboksylowe mogą być substratem energetycznym mózgu [73]. Kwasy monokarboksylowe są znaczącym substratem energetycznym mózgu noworodków i organizmów młodych [74, 75]. W komórkach endotelialnych, tworzących barierę krew – mózg, znaleziono bardzo niewiele białka MCT2, natomiast wykazano duży poziom ekspresji białka MCT1, którego detekcja jest większa w mózgach noworodków [44, 75, 76]. Wydaje się, więc, że MCT1 jest białkiem odpowiedzialnym za transport mleczanu i ciał ketonowych przez barierę krew – mózg. Ekspresja tego białka może zmieniać się w rozwoju osobniczym (także badania własne) i jej zmiany, na przykład w komórkach nerwowych, można regulować dietą osobników [78]. W normalnych warunkach u dorosłych organizmów poziom kwasów monokarboksylowych we krwi jest niski, glukoza jest zatem głównym substratem energetycznym mózgu. Inaczej jest w okresie ssania, gdy młode odżywiają się wysokotłuszczową dietą (mleko matki). W takich warunkach poziom kwasów monokarboksylowych we krwi jest wysoki. Kwasy monokarboksylowe są wówczas głównym substratem energetycznym mózgu (ponad 50% [79]). *Leino* i wsp. wykazali, że u dorosłych szczurów poddanych diecie ketogennej (91% tłuszczów i 9% białka) przez okres 6 tygodni w porównaniu do szczurów karmionych dietą standardową, wzrasta poziom białka MCT1 oraz białka GLUT1 (transporter glukozy) w komórkach endote-

lialnych mózgu oraz w neuropilach. Istnieją rozbieżne dane dotyczące obecności izoform MCT w mózgu. MCT1 jest izoformą obecną w komórkach astrogleju, potwierdzono to także w komórkach astroglowych hodowanych *in vitro*. Również w neuronach stwierdzono obecność MCT1, lecz jego ekspresja jest niższa niż w astrogleju [45, 46, 64]. *Gerhart* i wsp. [76] nie stwierdzili obecności izoformy MCT2 w neuronach [75]. Z kolei inni badacze potwierdzili obecność w neuronach obu izoform MCT1 i MCT2 [46]. Jeszcze inni wykazali ekspresję białka MCT2 w neuronach [60, 81], w przypadku dorosłego mózgu głównie w neuropilach [82]. Na podstawie metody *Northern-blot* stwierdzono, że w mózgu nie ma lub jest bardzo mało białek MCT4, MCT5 i MCT6, natomiast zaobserwowano wysoki poziom ekspresji białek MCT7 i MCT8 [33]. Ostatnio stwierdzono, że w wielu stanach patologicznych układu nerwowego występują zaburzenia ekspresji MCT1 [83]. Białko to może ulegać wzmożonej ekspresji w odpowiedzi na wysoki wewnątrzkomórkowy i zewnątrzkomórkowy poziom mleczanu. Komórki nowotworowe charakteryzuje stan niedotlenienia, niskie wewnątrzkomórkowe pH oraz uzyskiwanie energii na drodze glikolizy, której końcowym produktem jest kwas mlekowy. Efektem tego jest powstanie wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego mleczanu, co jest skorelowane ze wzrostem ekspresji nośnika MCT1. Z drugiej strony wiele komórek nowotworowych korzysta z mleczanu jako głównego substratu energetycznego, który jest dostarczany do wnętrza komórki przez nośnik MCT1. Zablockowanie nośnika, czyli zablokowanie drogi, którą jest dostarczany do komórki główny substrat energetyczny, mogłoby przyczynić się do śmierci komórki nowotworowej [83].

## V. Struktura białek MCT

Na podstawie badań dotyczących struktury białka MCT1 stworzono jego model topologiczny, który jest charakterystyczny dla białek należących do rodziny nośników MCT (Rycina 2) [33, 45, 50, 84, 85]. Białko modelowe posiada 12 transbłonowych domen z C- i N-końcami leżącymi po stronie cytoplazmatycznej błony plazmatycznej komórki, oraz z dużą wewnątrzkomórkową pętlą znajdującą się pomiędzy 6 a 7 domeną transbłonową. W obrębie rodziny MCT odcinki transbłonowe (hydrofobowe) są najsilniej konserwowane, natomiast najslabiej - odcinki pomiędzy domenami zakotwiczone w błonie (hydrofilowe), szczególnie: N-końiec poprzedzający 1 domenę, odcinek pętli pomiędzy 6 i 7 domeną oraz C-końiec kończący 12 domenę. Przypuszcza się, iż





Ryc. 2. Model topologiczny białka MCT1 (na podstawie [85]).

odcinki niekonserwowane, czyli zmienne, są odpowiedzialne za specyficzność substratową poszczególnych izoform MCT oraz za regulację procesu transportu [42]. Stwierdzono, że połowa cząsteczki MCT od N-końca (domeny 1 - 6) jest silniej konserwowana niż druga połowa od C-końca (domeny 7 - 12). Jest to cecha charakterystyczna dla większości rodzin transporterów [86]. Dodatkowo obie części cząsteczki białka odpowiadają za różne funkcje pełnione przez nośnik. Domeny położone bliżej C-końca determinują specyficzność substratową transportera, natomiast domeny N-końca warunkują zakotwiczenie białka w błonie komórkowej, utrzymanie całej struktury białka oraz odpowiadają za przyłączenie odpowiedniego kationu w celu przeniesienia anionu kwasu monokarboksyłowego przez błonę komórkową [42]. Wykazano, że 8 i 10 domena transbłonowa transportera zawiera miejsca krytyczne dla rozpoznania substratu [87]. Miejscowo specyficzne mutacje w obrębie tych domen zmieniają właściwości transportera pod względem specyfiki substratowej, np. spontaniczna mutacja fenyloalaniny w cysteinę w pozycji 360 MCT1 w dziesiątej domenie transbłonowej powoduje transportowanie przez nośnik miewalonianu [88].

## VI. Regulacja ekspresji białek MCT

Stosunkowo niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji białek MCT w różnych tkankach. Najwięcej informacji dotyczy regulacji ekspresji MCT w mięśniach. Dane świadczące o wzroście poziomu mRNA podczas znacznego wzrostu ekspresji białka MCT1 w mózgu noworodków sugerują regulację na poziomie transkrypcji. Ostatnio opublikowano po raz pierwszy analizę promotora genu kodującego białko MCT1 i wskazano miejsca potencjalnego wiązania się różnych czynników transkrypcyjnych [89]. Z drugiej strony uważa się, że regulacja ekspresji białka MCT odbywa się na poziomie translacji. W procesie tym może mieć znaczenie fakt, że w przypadku białka MCT1 region mRNA nieulegający translacji od strony 3' (3' UTR) jest bardzo długi (1.6 kb). Wiadomo, że ten region odgrywa rolę w regulacji procesu translacji, albo poprzez zapętlanie się i oddziaływanie z regionem nieulegającym translacji od strony 5' (5' UTR), albo przez połączenie z czynnikami regulującymi, które uniemożliwiają zajście procesu translacji [90]. Istnieje również możliwość, że pewna pula MCT1 mRNA jest przechowywana w rybonukleoproteinach i jeśli jest wymagane zwiększenie podaży białka MCT1, na przechowywanej matrycy mRNA przeprowadzany jest proces translacji. Sygnałami, które mogłyby warunkować rozpo-

częście procesu translacji może być przykładowo zwiększone stężenie mleczanu w komórce lub stan niedotlenienia [5]. Aktywność białek MCT może być regulowana poprzez oddziaływanie z białkami pomocniczymi. Wiadomo, że białko MCT1 oddziałuje specyficznie z glikoproteina o masie cząsteczkowej 70 kDa (GP70) [91]. Glikoproteina ta jest białkiem błonowym, należącym do nadrodziny immunoglobulin, występującym w tkankach płodowych [92, 93]. W większości tkanek dorosłych organizmów ekspresja tego białka jest słaba, lecz wykryto w nich blisko spokrewnione białko oddziałujące z MCT1 i MCT4 [94, 95], znane pod nazwą OX-47, CD147, basigin, CE9, neruothelin, M6 lub EMMPRIN [96-98]. Regulacja aktywności białek MCT w wyniku interakcji z tymi białkami może polegać albo na bezpośrednim oddziaływaniu na aktywność katalityczną transportera, albo na regulacji translokacji białka MCT do błony plazmatycznej.

## VII. Podsumowanie

Rodzina nośników kwasów monokarboksylowych (MCT) jest kolejnym przykładem rodziny białek, których funkcją jest przenoszenie podobnych związków niskocząsteczkowych przez błony plazmatyczne. Białka MCT uczestniczą w regulacji metabolizmu energetycznego komórki, utrzymują homeostazę i kontrolują pH. Ich ekspresja może zmieniać się w trakcie rozwoju organizmów, w procesach nowotworzenia i w chorobach metabolicznych. Dlatego prowadzone są dalsze badania, przede wszystkim nad regulacją ekspresji genów oraz dystrybucją tkankową tych białek w celu ewentualnego wykorzystania ich do celów terapeutycznych.

## Podziękowania

Autorka dziękuje Pani Prof. Katarzynie Nałęcz za pomoc i cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy oraz firmie L'Oreal za wsparcie finansowe w postaci stypendium „L'Oreal dla kobiet i nauki”.

Praca wykonana przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych grant nr 3 PO4A 036 22.

Artykuł otrzymano 4 stycznia 2001  
Zaakceptowano do druku 1 grudnia 2003

## Piśmiennictwo

1. Mueckler M (1994) *Eur J Biochem* **219**: 713-725
2. Olson AL, Pessin JE (1996) *Annu Rev Nutr* **16**: 235-256
3. Tirone TA, Brunicardi FC (2001) *World J Surg* **25**: 461-467
4. Worral DM, Williams DC (1994) *Biochem J* **297**: 425-36

5. Halestrap AP, Price NT (1999) *Biochem J* **343**: 281-299
6. Halestrap AP, Denton RM (1974) *Biochem J* **138**: 313-316
7. Walter A, Gutknecht J (1984) *J Membr Biol* **77**: 255-264
8. Deuticke B, Beyer E, Forst B (1982) *Biochim Biophys Acta* **684**: 96-110
9. Pooler RC, Halestrap AP (1993) *Am J Physiol* **264**: C761-C782
10. Reithmeier RAF (1994) *Curr Opin Cell Biol* **6**: 583-594
11. Vaihkonen LK, Heinonen OJ, Hyypää S, Nieminen M, Poso AR (2001) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**: R19-R24
12. Spencer TL, Lehninger AL (1976) *Biochem J* **154**: 405-414
13. Halestrap AP (1976) *Biochem J* **156**: 193-207
14. Dubinsky WP, Racker E (1978) *J Membr Biol* **44**: 25-36
15. Edlund GL, Halestrap AP (1988) *Biochem J* **249**: 117-126
16. Denton RM, Halestrap AP (1979) *Essays Biochem* **15**: 37-77
17. Coitinho AS, DeMello CF, Lima TT, DeBastiani J, Figuera MR, Wajner M (2001) *Brain Res* **894**: 68-73
18. Tanaka K, Rosenberg L (1983) W: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS (red) *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw Hill Book Co., New York, str. 440-473
19. Cremer JE, Teal HM, Cunningham VJ (1982) *J Neurochem* **39**: 674-677
20. Tanaka K (1986) W: Odessey R (red) *Problems and potential of branched-chain amino acids in physiology and disease*. Elsevier Publishers BV, Amsterdam, str. 201-282
21. Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B (1994) *Int J Neurosci* **79**: 21-45
22. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Pleasure D, Stern J (1994) *J Neurochem* **63**: 1508-1515
23. Batshaw M, Brusilow S, Walser M (1975) *N Engl J Med* **292**: 1085-1090
24. Cooper AJ, Plum F (1987) *Physiol Rev* **67**: 440-519
25. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, DeJoseph MR (1993) *J Neurochem* **60**: 1000-1006
26. Yudkoff M (1997) *Glia* **21**: 92-98
27. Yudkoff M, Daikhin Y, Lin ZP, Nissim I, Stern J, Pleasure D (1994) *J Neurochem* **62**: 1192-1202
28. Yudkoff M, Nissim I, Daikhin Y, Lin ZP, Nelson D, Pleasure D, Erecinska M (1993) *Dev Neurosci* **15**: 343-350
29. Hutson SM, Wallin R, Hall TR (1992) *J Biol Chem* **267**: 15681-15686
30. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) *Science* **195**: 1356-1358
31. Bixel MG, Hamprecht B (1995) *J Neurochem* **65**: 2450-2461
32. Dreyer EB, Zhang D, Lipton SA (1995) *Neuroreport* **6**: 942-944
33. Price NT, Jackson VN, Halestrap AP (1998) *Biochem J* **329**: 321-328
34. Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS (1994) *Cell* **76**: 865-873
35. Pooler RC, Halestrap AP (1992) *Biochem J* **283**: 855-62
36. Carpenter L, Pooler RC, Halestrap AP (1996) *Biochim Biophys Acta* **1279**: 157-163
37. Garcia CK, Li X, Luna J, Francke (1994) *Genomics* **23**: 500-503
38. Jackson VN, Price NT, Halestrap AP (1995) *Biochim Biophys Acta* **1238**: 193-196
39. Carpenter L, Halestrap AP (1994) *Biochem J* **304**: 751-60
40. Bröer S, Schneider HP, Bröer A, Rahman B, Hamprecht B, Deitmer JW (1998) *Biochem J* **333**: 167-74
41. Wang X, Pooler RC, Halestrap AP, Levi AJ (1993) *Biochem J* **290**: 249-258
42. Juel C, Halestrap AP (1999) *J Physiol (Lond)* **517**: 633-642
43. Garcia CK, Brown MS, Pathak RK, Goldstein JL (1995) *J Biol Chem* **270**: 1843-1849
44. Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR (1998) *Glia* **22**: 272-281
45. Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP (1997) *Biochem J* **324**: 447-453

46. Koehler-Stec EM, Simpson IA, Vannucci SJ, Landschulz K T, Landschulz W H (1998) *Am J Physiol* **275**: E516-E524
47. Lin R Y, Vera J C, Chaganti R S, Golde D W (1998) *J Biol Chem* **273**: 28959-28965
48. Bröer S, Bröer A, Schneider H P, Stegen C, Halestrap A P, Deitmer J W (1999) *Biochem J* **341**: 529-535
49. Bonen A (2000) *Med Sci Sports Exerc* **32**: 778-789
50. Yoon H, Fanelli A, Grollman E F, Philp N J (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **234**: 90-94
51. Philp N J, Yoon H, Grollman E F (1998) *Am J Physiol* **274**: R1824-R1828
52. Yoon H, Philp N J (1998) *Exp Eye Res* **67**: 417-424
53. Zeuthen T, Hamann S, la Cour M (1996) *J Physiol* **497**: 3-17
54. Grollman E F, Philp N J, McPhee P, Ward R D, Sauer B (2000) *Biochemistry* **39**: 9351-7
55. Wilson M C, Jackson V N, Heddle C, Price N T, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter O F, Halestrap A P (1998) *J Biol Chem* **273**: 15920-15926
56. Juel C (1991) *Biochim Biophys Acta* **1065**: 15-20
57. Dimmer K S, Friedrich B, Lang F, Deitmer J W, Bröer S (2000) *Biochem J* **350**: 219-27
58. Pilegaard H, Terzis G, Halestrap A, Juel C (1999) *Am J Physiol* **276**: E843-E848
59. Debrand E, Heard E, Avner P (1998) *Genomics* **48**: 296-303
60. Bröer S, Rahman B, Pellegrini G, Pellerin L, Martin J L, Verleysdonk S, Hamprecht B, Magistretti P J (1997) *J Biol Chem* **272**: 30096-30102
61. Wang X, Levi A J, Halestrap A P (1994) *Am J Physiol* **267**: H1759-69
62. Wang X, Levi A J, Halestrap A P (1996) *Am J Physiol* **270**: H476-H484
63. Nedergaard M, Goldman S A (1993) *Am J Physiol* **265**: R282-9
64. Pellerin L, Pellegrini G, Martin J L, Magistretti P J (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3990-3995
65. Yoon H, Donoso L A, Philp N J (1999) *Genomics* **60**: 366-70
66. Juel C (1997) *Physiol Rev* **77**: 321-58
67. Bonen A, Baker S K, Hattah H (1997) *Can J Appl Physiol* **22**: 531-52
68. McCullagh K J, Poole R C, Halestrap A P, O'Brien M, Bonen A (1996) *Am J Physiol* **271**: E143-50
69. Juel C, Pilegaard H (1998) *Pflugers Arch* **436**: 560-4
70. Juel C (1995) *Biochim Biophys Acta* **1265**: 127-32
71. Juel C, Bangsbo J, Graham T, Saltin B (1990) *Acta Physiol Scand* **140**: 147-59
72. Partridge W M (1988) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **28**: 25-39
73. Robinson A M, Williamson D H (1980) *Physiol Rev* **60**: 143-87
74. Pellerin L, Pellegrini G, Bittar P G, Charnay Y, Bouras C, Martin J L, Stella N, Magistretti P J (1998) *Dev Neurosci* **20**: 291-299
75. Leino R L, Gerhart D Z, Drewes L R (1999) *Brain Res Dev Brain Res* **113**: 47-54
76. Gerhart D Z, Enerson B E, Zhdankina O Y, Leino R L, Drewes L R (1997) *Am J Physiol* **273**: E207-E213
77. Vannucci S J, Nehlig A, Koehler-Stec E M, Landschulz W H, Simpson I A (1998) *J Neurochem* **70**, Suppl. 1: S68
78. Leino R L, Gerhart D Z, Duelli R, Enerson B E, Drewes L R (2001) *Neurochem Int* **38**: 519-527
79. Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A (1993) *Prog Neurobiol* **40**: 163-221
80. Waniewski R A, Martin D L (1998) *J Neurosci* **18**: 5225-33
81. Pierre K, Pellerin L, Debernardi R, Riederer B M, Magistretti P J (2000) *Neuroscience* **100**: 617-27
82. Pierre K, Magistretti P J, Pellerin L (2002) *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 586-95
83. Froberg M K, Gerhart D Z, Enerson B E, Manivel C, Guzman Paz M, Seacotte N, Drewes L R (2001) *Neuroreport* **12**: 761-765
84. Henderson P J F (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 708-721
85. Poole R C, Sansom C E, Halestrap A P (1996) *Biochem J* **320**: 817-824
86. Sauer M H J (1994) *Microbiol Rev* **58**: 71-93
87. Rahman B, Schneider H P, Bröer A, Deitmer J W, Bröer S (1999) *Biochemistry* **38**: 11577-11584
88. Kim C M, Goldstein J L, Brown M S (1992) *J Biol Chem* **267**: 23113-23121
89. Cuff M A, Shirazi-Beechey S P (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 1048-56
90. Miyamoto S, Chiorini J A, Urcelay E, Safer B (1996) *Biochem J* **315**: 791-8
91. Poole R C, Halestrap A P (1997) *J Biol Chem* **272**: 14624-8
92. Ozawa M, Huang R P, Furukawa T, Muramatsu T (1988) *J Biol Chem* **263**: 3059-62
93. Guenette R S, Sridhar S, Herley M, Mooibroek M, Wong P, Tenniswood M (1997) *Dev Genet* **21**: 268-78
94. Wilson M C, Heddle C, Kirk P, Roberts M, Meredith D, Barclay A N, Brown M H, Halestrap A P (1999) *J Physiol* **517P**: 58P
95. Kirk P, Wilson M C, Halestrap A P, Barclay A N, Brown M H (1998) *Immunology* **95s1**: 9.8
96. Fossum S, Mallett S, Barclay A N (1991) *Eur J Immunol* **21**: 671-9
97. Seiberger H, Unger C M, Risau W (1992) *Neurosci Lett* **140**: 93-7
98. Schuster V L, Lu R, Kanai N, Bao Y, Rosenberg S, Pried, Ronco P, Jennings M L (1996) *Biochim Biophys Acta* **1311**: 13-19
99. Bonen A, Miskovic D, Tonouchi M, Lemieux K, Wilson M C, Marette A, Halestrap A P (2000) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**: E1067-E1077
100. Halestrap A P, Wang X, Poole R C, Jackson V N, Price N T (1997) *Am J Cardiol* **80**: 17A-25A
101. Johannsson E, Nagelhus E A, McCullagh K J, Seersted O M, Blackstad T W, Bonen A, Ottersen O P (1997) *Circ Res* **80**: 400-407
102. Baker S K, McCullagh K J, Bonen A (1998) *J Appl Physiol* **84**: 987-994
103. Baker S K, Tarnopolsky M A, Bonen A (2001) *Muscle Nerve* **24**: 394-398
104. McCullagh K J, Poole R C, Halestrap A P, O'Brien M, Bonen A (1996) *Am J Physiol* **271**: E143-E150
105. Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap A P, Bangsbo J (1999) *Am J Physiol* **276**: E255-E261
106. Hanu R, McKenna M, O'Neill A, Resneck W G, Bloch R J (2000) *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C921-C930
107. Bergersen L, Johannsson E, Veruki M L, Nagelhus E A, Halestrap A, Seersted O M, Ottersen O P (1999) *Neuroscience* **90**: 319-331
108. Shimozono M, Liu J, Scofield M A, Wangemann P (1998) *J Membr Biol* **163**: 37-46
109. Shimozono M, Scofield M A, Wangemann P (1997) *Hear Res* **114**: 213-222
110. Ritzhaupt A, Wood I S, Ellis A, Hosie K B, Shirazi-Beechey S P (1998) *J Physiol (Lond)* **513**: 719-732
111. Bergersen L, Waerhaug O, Helm J, Thomas M, Laake P, Davies A J, Wilson M C, Halestrap A P, Ottersen O P (2001) *Exp Brain Res* **136**: 523-534
112. Gerhart D Z, Leino R L, Drewes L R (1999) *Neuroscience* **92**: 367-375



# Bakteryjne systemy transportu cukrów

## Bacterial systems of sugar transport

MAŁGORZATA MARCZAK<sup>1</sup>, ANDRZEJ MAZUR<sup>2</sup>,  
ANNA SKORUPSKA<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Typy zidentyfikowanych systemów transportu
- III. Rodziny transporterów uczestniczących w przenoszeniu mono- i oligosacharydów oraz ich pochodnych
  - III-1. Poriny
  - III-2. Aktywne transportery wtórne
    - III.2-1. Główna nadrodzina transporterów wtórnych MFS
    - III-3. System fosfotransferazy (PTS)
    - III-4. Aktywne transportery pierwotne
      - III.4-1. Nadrodzina transporterów ABC
  - III-3. System fosfotransferazy (PTS)
  - III-4. Aktywne transportery pierwotne
    - III.4-1. Nadrodzina transporterów ABC
- IV. Transport polisacharydów
  - IV-1. System pobierania alginianu u *Sphingomonas* sp. szczep A1
  - IV-2. Systemy eksportu polisacharydów
    - IV.2-1. Permeazy ABC-2
    - IV.2-2. Transportery specyficzne dla polisacharydów (PST)
    - IV.2-3. Pomocnicze białka błony zewnętrznej (OMA)
    - IV.2-4. Błonowo-peryplazmatyczne białka pomocnicze (MPAPCP)
- V. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** aa — aminokwas(y); ABC (ang. *ATP-binding cassette*) - kasetta wiążąca ATP; CM (ang. *cytoplasmic membrane*) - błona cytoplazmatyczna; EPS — egzopolisacharyd; KPS — polisacharyd kapsularny; LOS — lipooligosacharyd; LPS — lipopolisacharyd; MFS (ang. *major facilitator superfamily*) — główna nadrodzina transporterów wtórnych; MPA (ang. *membrane-periplasmic auxiliary*) - błonowo-peryplazmatyczne białka pomocnicze; OM (ang. *outer membrane*) - błona zewnętrzna; OMA (ang. *outer membrane auxiliary*) - pomocnicze białka błony zewnętrznej; P<sub>i</sub> - pirofosforan; PCP (ang. *polysaccharide co-polymerase(s)*) — kopolimeryzy polisacharydów; PEP — fosfoenolpirogonian; pmf (ang. *proton motive force*) — siła protonomotoryczna; PST (ang. *polysaccharide-specific transporter*) - transporter specyficzny dla polisacharydów; PTS (ang. *phosphotransferase system*) - system fosfotransferazy; RND (ang. *heavy metal resistance/modulation cell division*) — rodzina białek odpowiedzialnych za oporność na metale ciężkie, indukowanie brodawek na roślinach i podziały komórkowe; smf (ang. *sodium motive force*) — siła sodowomotoryczna; TC (ang. *transporter classification*) - system klasyfikacji

### Contents:

- I. Introduction
- II. Types of identified transport systems
- III. Families of transporters involved in translocation of mono- and oligosaccharides and their derivatives
  - III-1. Porins
  - III-2. Secondary active transporters
    - III.2-1. Major facilitator superfamily (MFS)
    - III-3. Phosphotransferase system (PTS)
    - III-4. Primary active transporters
      - III.4-1. ABC-transporter superfamily
  - III-3. Phosphotransferase system (PTS)
  - III-4. Primary active transporters
    - III.4-1. ABC-transporter superfamily
- IV. Transport of polysaccharides
  - IV-1. Alginate uptake system of *Sphingomonas* sp. strain A1
  - IV-2. Polysaccharide export systems
    - IV.2-1. ABC-2-type permease family
    - IV.2-2. Polysaccharide-specific transporter (PST) superfamily
    - IV.2-3. Outer membrane auxiliary (OMA) proteins
    - IV.2-4. Membrane-periplasmic auxiliary (MPA) proteins
- V. Conclusions

kacji transporterów: TCA — kwasy teichojoye; TMS (ang. *transmembrane segment*) — segment transbłonowy; TRAP-T (ang. *tripartite ATP-independent periplasmic transporter*) — trójskładnikowy transporter peryplazmatyczny niezależny od ATP.

## I. Wprowadzenie

Węglowodany stanowią przeważającą część materii organicznej na Ziemi i pełnią różnorodne funkcje we wszystkich organizmach. Cukrowce są substratami energetycznymi, materiałami zapasowymi i strukturalnymi oraz odgrywają kluczową rolę w procesach rozpoznania komórkowego.

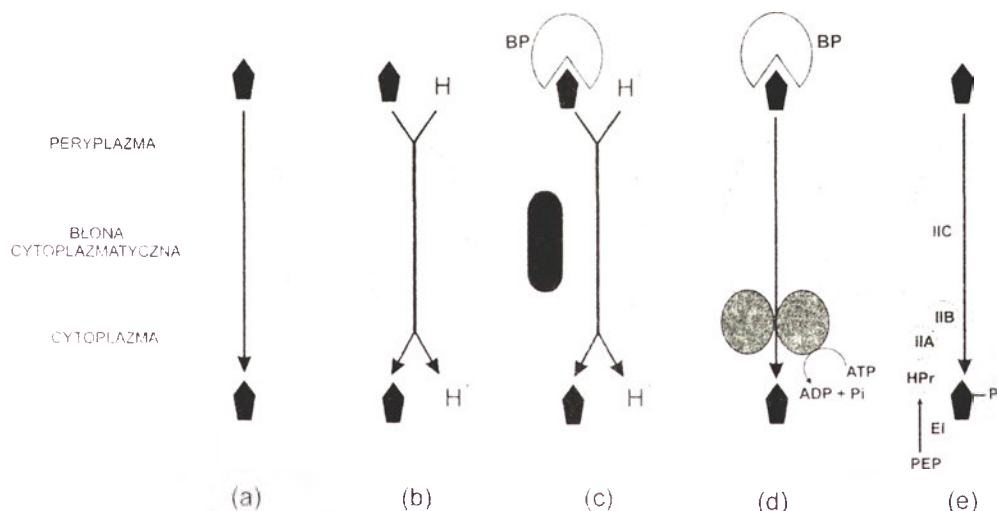
Przedstawione opracowanie jest podsumowaniem wiedzy dotyczącej białek bakteryjnych biorących udział w transporcie cukrów prostych, ich pochodnych oraz polisacharydów.

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr, <sup>3</sup>prof. dr hab., Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: mmarczaka@biotop.umcs.lublin.pl

## II. Typy zidentyfikowanych systemów transportu

W przenoszeniu substancji przez osłony komórkowe pośredniczą integralne białka błonowe. Zwykle funkcjonują one w połączeniu z białkami (domenami) receptorowymi oraz białkami (domenami) cytoplazmatycznymi odpowiedzialnymi za dostarczanie energii do transportu i pełniącymi funkcje regulacyjne [1-3]. Każdy taki kompleks białek (domen białkowych) stanowi system transportu, określany również jako transporter, permeaza lub system permeazy [4]. W komórkach bakteryjnych blisko 10% genów koduje białka transportujące [5].

Na podstawie cech strukturalnych i rodzaju wykorzystywanego źródła energii wyróżnia się cztery zasadnicze grupy transporterów — wszystkie zidentyfikowano u bakterii [6]. Pierwszą grupę tworzą białka pośredniczące w dyfuzji ułatwionej (Ryc. 1a) [4]. Przykładem może być białko GlpF *E. coli* funkcjonujące w przenoszeniu glicerolu (rodzina błonowych kanałów MIP; ang. *major intrinsic proteins*). Do grupy tej należą również poryny zewnętrznych błon bakterii gramujemnych [4].



**Ryc. 1.** Typy systemów transportu funkcjonujących u bakterii: a) kanał uczestniczący w dyfuzji ułatwionej; b) aktywny transporter wtórny (tu: symporter); c) transporter typu TRAP: BP, białko wiążące substrat; d) transporter aktywny pierwotny (tu: system importu oparty o permeazę typu ABC); e) bakteryjny system fosfotransferazy; IIA, IIB, IIC, HPr, EI — komponenty białkowe systemu translokacji grupowej; PEP — fosfoenolopirogronian.

Druga grupa to białka uczestniczące w aktywnym transporcie. Translokacja substratu (import lub eksport) wymaga nakładu energii, której źródłem jest zazwyczaj ATP (Ryc. 1d) [2, 7, 8].

Grupa trzecia to białka zaangażowane w aktywny transport wtórny, w którym przemieszczanie określonego substratu zazwyczaj zachodzi dzięki gradientowi elektrochemicznemu jonów  $H^+$  lub  $Na^+$  (siła protonomotoryczna - pmf lub sodowomotoryczna - smf) lub innego związku (Ryc. 1b) [9]. Do tej

grupy można zaliczyć również trójskładnikowy transporter aktywny niezależny od ATP, czyli system TRAP-T. W systemie tym błonowa permeaza uzależniona od pmf lub smf współdziała z peryplazmatycznym białkiem wiążącym substrat [5, 10] (Ryc. 1c), co upodabnia ten typ transportu do bakteryjnych importerów funkcjonujących z udziałem białek nadrodziny ABC (zawierających domenę wiążącą ATP) [2].

Ostatnią grupę transporterów stanowi system translokacji grupowej, którego najlepiej poznanym przykładem jest bakteryjny system fosfotransferazy (PTS) (Ryc. 1e), omówiony w dalszej części artykułu (podrozdział III-3) [1, 11].

Najnowszy system klasyfikacji transporterów, czyli system TC, zaproponowany przez Saiera w analogii do systemu EC klasyfikacji enzymów, oparty jest na zależnościach funkcjonalno-filogenetycznych [4, 12]. Wyróżnia się w nim cztery główne klasy białek transportujących (numer klasy jest równocześnie pierwszym numerem kodu TC przypisanego każdemu uwzględnionemu w tym systemie białku). Są to: 1) kanały i pory (m.in. poryny bakterii gramu-

jemnych, podrozdział III-1); 2) transportery zależne od potencjału elektrochemicznego (m.in. nadrodzina białek MFS, podrozdział III.2-1); 3) białka pośredniczące w aktywnym transporcie pierwotnym (m.in. nadrodzina transporterów ABC, podrozdział III.4-1); 4) system translokacji grupowej (bakteryjny system PTS, podrozdział III-3).

System TC wyróżnia dodatkowo grupę białek pomocniczych (TC # 8), które ułatwiają transport przez błony biologiczne, nie uczestnicząc bezpośrednio w

samym procesie przenoszenia. Białka, dla których brak ścisłych danych dotyczących sposobu dostarczenia energii do przenoszenia cząsteczek zgrupowano w klasie TC # 9 [4, 12].

### III. Rodziny transporterów uczestniczących w przeniesieniu mono- i oligosacharydów oraz ich pochodnych

#### III-1. Poryny

Poryny stanowią odrębną podklasę w klasie białek tworzących kanały błonowe (TC # 1.B) [12, 13]. Są to zwykle homotrimery ściśle zasocjowanych ze sobą podjednostek. Każda z nich zbudowana jest z 250-450 aminokwasów tworzących strukturę  $\beta$ -baryłki, uformowaną z 16 (poryny ogólnej dyfuzji), 18 (poryny specyficzne) lub 22 (kanały bramkowane ligandem) antyrównoległych nici typu  $\beta$  [14, 15].

Poryny ogólnej dyfuzji tworzą w błonie zewnętrznej otwarte, wypełnione wodą kanały. Ich selektywność w stosunku do substratów jest modulowana

przez aminokwasy obdarzone ładunkiem, zlokalizowane we wnętrzu poryny [15]. Białka te umożliwiają wnikanie do peryplazmy cząsteczek nie większych niż 600 Da [16].

Poryny specyficzne uczestniczą w dyfuzji ułatwionej cukrów (np. rodzina poryn cukrów SP; TC# 1.B.3) (Tab. 1). W przeciwieństwie do poryn ogólnej dyfuzji, które nie wiążą przenoszonych cząsteczek, poryny specyficzne ściśle wiążą amfifilowe cząsteczki przenoszonych cukrów i ułatwiają ich dyfuzję dzięki lokalnemu zwiększeniu stężenia substratu. Wraz ze wzrostem długości łańcuchów cukrowych siła wiązania substratu rośnie, powodując jednocześnie zmniejszenie szybkości jego przenoszenia [17, 18]. Wykazano, że za wiązanie cukrów odpowiada zgrupowanie aminokwasów aromatycznych oddziałujące za pomocą wiązań van der Waalsa z hydrofobową powierzchnią pierścienia cukrowego oraz zgrupowanie reszt aminokwasów polarnych, tworzących wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi cukrów. Tworzenie i zrywanie tych wiązań jest czynnikiem warunkującym przemieszczanie substratu w kanale [19-22]. W przeniesieniu cukru z

**Tabela 1.**

Poryny bakterii gramujemnych zaangażowane w transport mono- i oligosacharydów, ich pochodnych (a) oraz eksport polisacharydów (b) (na podstawie [4, 12, 24, 27])

TC #	Nazwa rodziny	Typy transportowanych substratów cukrowych	Przykład
<b>(a)</b>			
1.B.3	<b>SP</b> (ang. <i>sugar porin</i> )	maltooligosacharydy; rafinoza; sacharoza; $\beta$ -glikozydy	<b>LamB (MalL)</b> <i>Escherichia coli</i>
1.B.10	<b>Tsx</b> (ang. <i>nucleoside-specific channel-forming outer membrane porin</i> )	rybo- i deoksyrybonukleozydy	<b>Tsx</b> <i>Escherichia coli</i>
1.B.15	<b>RafY</b> (ang. <i>raffinose porin</i> )	rafinoza i inne oligosacharydy	<b>RafY</b> <i>Escherichia coli</i>
1.B.19	<b>OprB</b> (ang. <i>glucose-selective porin</i> )	monosacharydy	<b>OprB</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1.B.17	<b>OMF</b> (ang. <i>outer membrane factor</i> )	lipooligosacharydy (LOS)	<b>NodT2</b> <i>Rhizobium leguminosarum</i>
1.B.35	<b>KdgM</b> (ang. <i>oligogalacturonate-specific porin</i> )	oligogalakturonidy (produkty rozkładu pektyn)	<b>KdgM</b> <i>Erwinia chrysanthemi</i>
<b>(b)</b>			
1.B.13	<b>AEP</b> (ang. <i>alginate export porin</i> )	alginian (polimannouronian)	<b>AlgE</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1.B.18	<b>OMA</b> (ang. <i>outer membrane auxiliary</i> )	egzopolisacharydy (EPS), polisacharydy kapsularne (KPS)	<b>ExoF</b> <i>Sinorhizobium meliloti</i>



peryplazmy do cytoplazmy mogą być zaangażowane kompleksy transporterów typu ABC [23], np. kompleks MalEFGK dla maltozy (TC # 3.A.1.1.1) [4, 24].

### III-2. Aktywne transportery wtórne

Białka tej grupy (TC # 2) (Tab. 2) katalizują uniport (przemieszczanie cząsteczek określonego typu bez równoczesnego przemieszczania innych cząsteczek), symport (akumulowanie substancji wbrew gradientowi jej stężenia z równoczesnym przeniesieniem - kotransportem - kationu) lub antiport (eksport substratu napędzany równoczesnym napływaniem do komórki innego związku lub  $H^+$ ). Wiele transporterów należących do tej klasy może uczest-

niczyć w więcej niż jednym procesie przenoszenia (np. uniportcie i symportcie). U bakterii dominuje symport sprzężony z  $H^+$  [25, 26].

#### III.2-1. Główna nadrodzina transporterów wtórnych MFS

Nadrodzina MFS (TC # 2.A.1) jest bardzo zróżnicowana i obejmuje grupę kilkudziesięciu rodzin białek [27-29]. Przynależność do tej nadrodziny wynika z obecności charakterystycznych motywów aminokwasowych zlokalizowanych w różnych częściach białka oraz specyficznego ułożenia w błonie cytoplazmatycznej. Członkowie rodziny MFS to w większości białka o 12 segmentach transbłonowych (TMS) (wyjątkowo obecne są dodatkowe dwa TMS) [4]. Uważa się, że topologia tych białek jest efektem

Tabela 2.

Rodziny aktywnych transporterów wtórnych specyficznych dla cukrów prostych i ich pochodnych oraz oligosacharydów [24]

TC #	Nazwa rodziny	Typy transportowanych substratów	Występowanie	Przykłady
2.A.1	<b>MFS</b> (ang. <i>major facilitator superfamily</i> )	m.in. poliiole, leki, neuroprzebieżniki, aminokwasy, peptydy, nukleozydy, cukry, organiczne i nieorganiczne aniony	B, A, E	permeaza laktozy ( <b>LacY</b> ) <i>E. coli</i>
2.A.2	<b>GPH</b> (ang. <i>glycoside-pentoside-hexuronide: cation symporter</i> )	melibioza, laktoza, sacharoza, rafinoza, glukuronidy, pentozydy	B, A, E	permeaza melibiozy ( <b>MelB</b> ) <i>E. coli</i>
2.A.6	<b>RND</b> (ang. <i>heavy metal resistance/nodulation/ cell division</i> )	m.in. lipooligosacharydy	B, A, E	białka <b>NolGHI</b> <i>S. meliloti</i>
2.A.8	<b>Gnt</b> (ang. <i>gluconate : H symporter</i> )	kwask glukonowy	B	permeaza kwasu glukonowego ( <b>GntP</b> ) <i>Bacillus subtilis</i>
2.A.9	<b>RhaT</b> (ang. <i>L-rhamnose transporter</i> )	L-ramnoza, D-glukoza	B	transporter ramnozy ( <b>RhaT</b> ) <i>E. coli</i>
2.A.10	<b>KDGT</b> (ang. <i>2-keto-3-deoksygluconate transporter</i> )	kwask 2-keto-3-deoksyglukonowy	B	transporter kwasu 2-keto-3-deoksyglukonowego ( <b>KdgT</b> ) <i>E. chrysanthemi</i>
2.A.21	<b>SSS</b> (ang. <i>solute : sodium symporter</i> )	m.in. cukry, nukleozydy	B, A, E	symporter pantotnian : $Na^+$ ( <b>PanF</b> ) <i>E. coli</i>
2.A.41	<b>CNT</b> (ang. <i>concentrative nucleoside transporter</i> )	nukleozydy	B, A, E	symporter nukleozyd : $H^+$ ( <b>NupC</b> ) <i>E. coli</i>
2.A.12	<b>AAA</b> (ang. <i>ATP : ADP antiporter</i> )	ATP, ADP	B, E	translokaza ATP/ADP <i>Rickettsia prowazekii</i>

Objaśnienia: B - Bacteria; A - Archaea; E - Eukaryota

wewnętrznej, tandemowej duplikacji sekwencji kodującej białko o sześciu TMS [28].

Wszystkie białka MFS charakteryzuje podobny mechanizm transportu [28, 30]. Najwięcej informacji dotyczących funkcjonowania transporterów wtórnych pochodzi z prac nad permeazą laktozy *E. coli*, LacY (TC # 2.A.1.5.1), która katalizuje import  $\beta$ -galaktozydów sprzężony z przeniesieniem protonu ( $H^+$  symport) [31]. LacY funkcjonuje jako tzw. przenośnik wahadłowy (ang. *oscillating pore*). Związanie protonu i cukru do miejsc wiążących po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej sprawia, że białko transportujące ulega zmianie konformacyjnej. Prowadzi ona do reorientacji tych miejsc względem błony i uwolnienia protonu i laktozy w cytoplazmie. Cykl transportu kończy się powrotem miejsc wiążących do pozycji wyjściowej [30].

**Tabela 3.**

Rodziny permeaz bakteryjnego systemu fosfotransferazy PTS (na podstawie [4, 27])

TC #	Nazwa rodziny	Typy transportowanych substratów
4.A.1	<b>Glc</b> (ang. <i>glucose-glucoside</i> )	glukoza, N-acetyloglukozamina, $\alpha$ - i $\beta$ -glikozydy
4.A.2	<b>Fru</b> (ang. <i>fructose-mannitol</i> )	fruktoza, mannitol
4.A.3	<b>Lac</b> (ang. <i>lactose-N,N'-diacetylchitobiose-<math>\beta</math>-glucoside</i> )	laktoza, N,N'-diacetylchitobioza, celobioza, disacharyd chitynowy
4.A.4	<b>Gut</b> (ang. <i>glucitol</i> )	glucitol
4.A.5	<b>Gat</b> (ang. <i>galactitol</i> )	galaktitol
4.A.6	<b>Man</b> (ang. <i>mannose-fructose-sorbose</i> )	m.in. glukoza, mannoza, fruktoza, glukozamina, N-acetyloglukozamina
4.A.7	<b>L-Asc</b> (ang. <i>L-ascorbate</i> )	kwas askorbinowy

### III-3. System fosfotransferazy (PTS)

System fosfotransferazy zależny od fosfoenolopirogronianu (TC # 4.A) jest wykorzystywany wyłącznie przez bakterie do pobierania cukrów i ich pochodnych np. glukozy, fruktozy, laktozy, mannitolu, N-acetyloglukozaminy. Transport, w którym pośredniczy system PTS jest powiązany z równoczesną fosforylacją substratu i zachodzi dzięki sekwencyjnej reakcji przenoszenia fosforanu z fosfoenolopirogronianu na cukier [1, 4]



Transporter PTS budują białka pomocnicze EI (TC # 8.A.7) i HPr (TC # 8.A.8), odpowiedzialne za dostarczanie energii z fosfoenolopirogronianu oraz 3 lub 4 białka (domeny), tworzące kompleks enzymu II (EII), czyli właściwej permeazy PTS (Ryc. 1e). Białka (domeny) IIA i IIB są wysoce specyficzne dla przenoszonych cukrów, białko IIC odpowiada natomiast za przemieszczanie cukru przez błonę i jego fosforylację (fosforan jest przenoszony na cukier z ufosforylowanego białka IIB) [1, 32].

System PTS pełni kluczową rolę regulatorową w kontrolowaniu metabolizmu związków węgla u bakterii; białka (domeny) przenoszące reszty fosforanowe w PTS regulują aktywność operonów uczestniczących w pobieraniu/katabolizmie związków węgla [32-34]. Wśród permeaz PTS wyróżniono 7 rodzin [4, 24] (Tab. 3).

### III-4. Aktywne transportery pierwotne

#### III-4-1. Nadrodzina transporterów ABC

Białka z kasetą wiążącą ATP (ABC) stanowią jedną z najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych grup białek spotykanych u *Bacteria*, *Archaea* i *Eukaryota* [7, 24]. Do chwili obecnej w bazie danych GenBank zdeponowano ponad 5800 sekwencji białek (domen) z motywem kasety ABC, nadającej tym białkom potencjalną zdolność wiązania i hydrolizy ATP.

Permeazy typu ABC to wieloskładnikowe transportery zdolne do przenoszenia zarówno małych cząsteczek, jak i makromolekuł. Energia z rozkładu

ATP wykorzystywana jest w takich procesach jak: 1) pobieranie substancji, m.in. cukrów, aminokwasów, 2) wydzielanie na zewnątrz komórki polisacharydów, antybiotyków oraz toksyn, 3) naprawa uszkodzeń DNA, translacja czy regulacja ekspresji genów [35-37].

Typowy transporter ABC złożony jest z dwu domen (białek) transbłonowych (po sześć TMS każda) tworzących szlak przenoszenia substratu przez błonę komórkową oraz dwu konserwatywnych, eksponowanych do cytoplazmy, domen (białek) z kasetą ABC, niezbędnych do hydrolizy ATP napędzającej transport [38]. Systemy importu angażują dodatkowo białko wiążące substrat. U bakterii gramujemnych jest ono zlokalizowane w peryplazmie, natomiast u bakterii gramodatnich jest to lipoproteina zakotwiczona w błonie cytoplazmatycznej lub białko elektrostatycznie związane ze ścianą komórkową [39-41]. Geny kodujące te trzy składniki systemu z reguły tworzą operon [7].

Bakteryjne transportery ABC są z reguły zbudowane z czterech odrębnych łańcuchów polipeptydowych, lecz w niektórych przypadkach jeden polipeptyd może zawierać zarówno domenę transbłonową jak i miejsce wiązania nukleotydu [2, 42] lub domenę transbłonową i wiążącą substrat [43]. Transportery ABC *Eukaryota* są najczęściej białkami wielodomenowymi.

Najbardziej konserwatywnym elementem, którego obecność wyznacza przynależność białka do nadrodziny transporterów ABC jest tzw. moduł ABC (Ryc. 2) Wyróżnić w nim można kilka charakterystycznych sekwencji aminokwasowych: motyw Walkera A (pętla P), motyw Walkera B [44], reszty glutaminy i asparaginy w helikalnej pętli Q rozdzielającej motywy A i B oraz resztę histydyny w regionie „przełącznika” (ang. *switch*), który ułatwia zmiany konformacyjne, jakie wyzwala w białku hydroliza ATP [45, 46]. W kasecie obecna jest również pętla D [35] i krótki region LSGGQ, nazywany również sekwencją podpisu lub łącznikiem [38, 45, 47, 48]. Ze względu na te podobieństwa uważa się, że wszystkie

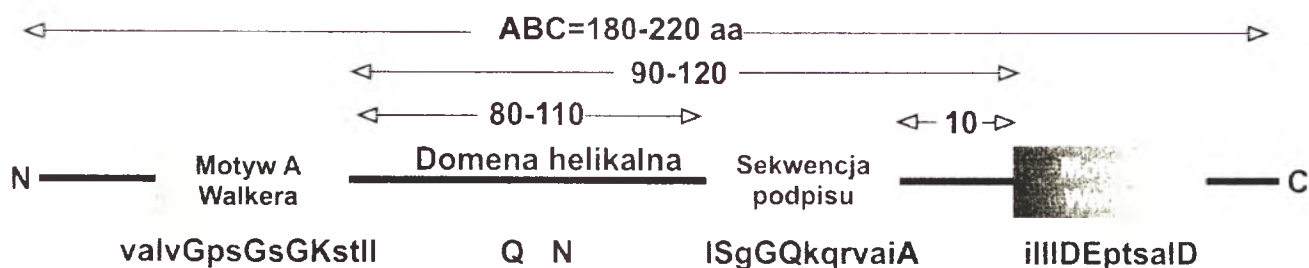
kasety ABC wiążą i hydrolizują ATP w podobny sposób [49].

Proces transportu rozpoczyna się od związania substratu z określoną domeną permeazy. Sygnał o związaniu substratu jest przekazywany do miejsc hydrolizy nukleotydu i powoduje wzrost ich powinowactwa do ATP. Dwie ściśle ze sobą współpracujące kasety ABC katalizują hydrolizę ATP. Rearanżacje domen błonowych wywołują jednokierunkowe przemieszczanie substratu. Gdy substrat przejdzie przez błonę, transporter wraca do stanu wyjściowego dzięki oddysocjowaniu ADP i  $P_i$  [49].

Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Saiera [4] do nadrodziny transporterów ABC zalicza się obecnie 60 rodzin białek, w większości występujących tylko u bakterii [4, 24]. Permeazy odpowiedzialne za pobieranie substancji sklasyfikowano w 22 rodziny, z czego 3 są zaangażowane w import cukrów i ich pochodnych (Tab. 4a).

#### IV. Transport polisacharydów

Zdolność do wytwarzania polisacharydów jest szeroko rozpowszechniona wśród prokariotów. Bakterie syntetyzują i wydzielają całą gamę złożonych węglowodanów. Należą tu: egzopolisacharydy (EPS), polisacharydy kapsularne (KPS), lipopolisacharydy (LPS), lipooligosacharydy (LOS) i kwasy teichojowe (TCA) [50]. Biosynteza zewnątrzkomórkowych polisacharydów, m. in. EPS odbywa się na nośnikach lipidowych związanych z błoną wewnętrzną, po jej stronie cytoplazmatycznej [51]. W przypadku bakterii gramujemnych zewnątrzkomórkowe polisacharydy, aby osiągnąć swoje docelowe miejsce, muszą pokonać trzy bariery, tzn. błonę cytoplazmatyczną, błonę zewnętrzną oraz rozdzielającą je przestrzeń peryplazmatyczną [52]. Eksport polisacharydów często jest sprzężony z ich polimeryzacją i wymaga specyficznych systemów transportu związanych z białkami zlokalizowanymi w obydwu błonach.



Ryc. 2. Schemat organizacji domeny ABC. W sekwencjach motywów A i B Walkera oraz peptydu łącznikowego niezmiennie reszty aminokwasowe zaznaczono dużymi literami, aminokwasy silnie konserwatywne - małymi.



Tabela 4.

Transportery typu ABC katalizujące pobieranie cukrów prostych, oligocukrów i polisacharydów (a) oraz wydzielanie cukrów złożonych (podgrupa ABC-2) (b) (na podstawie [4, 24, 27, 50])

TC #	Nazwa rodziny transporterów	Transportowane substraty	Przykłady
<b>(a)</b>			
3.A.1.1	<b>CUT-1</b> (ang. <i>carbohydrate uptake transporter-1</i> )	trehaloza, laktoza, sacharoza, sorbitol, maltooligosacharydy, mannitol, maltoza, cyklodekstryny, melibioza	<b>MalEFGK</b> <i>E. coli</i>  <b>AlgSM1M2Q1Q2</b> <i>Sphingomonas</i> sp. A1
3.A.1.2	<b>CUT-2</b> (ang. <i>carbohydrate uptake transporter-2</i> )	L-arabinoza, ksyloza, glukoza, fukoza, galaktoza, alloza, fruktoza, ryboza	<b>RbsABCD</b> <i>E. coli</i>
3.A.1.5	<b>PepT</b> (ang. <i>peptide/opine/nickel uptake transporter</i> )	m.in. celobioza, celooligosacharydy	<b>CbtABCDF</b> <i>Sulfolobus solfataricus</i>
<b>(b)</b>			
3.A.1.101	<b>CPSE</b> (ang. <i>capsular polysaccharide exporter</i> )	polisacharyd kapsularny (KPS)	<b>KpsMT</b> <i>E. coli</i>
3.A.1.102	<b>LOSE</b> (ang. <i>lipooligosaccharide exporter</i> )	lipooligosacharydy chitynowe (LOS)	<b>NodIJ</b> <i>Rhizobium galegae</i>
3.A.1.103	<b>LPSE</b> (ang. <i>lipopolysaccharide exporter</i> )	lipopolisacharyd (LPS)	<b>RfbAB</b> <i>K. pneumoniae</i>
3.A.1.104	<b>TAE</b> (ang. <i>teichoic acid exporter</i> )	kwasy teichojoyowe (TCA)	<b>TagGH</b> <i>B. subtilis</i>
3.A.1.106	<b>LipidE</b> (ang. <i>putative lipid A exporter</i> )	lipid A (składnik LPS)	<b>MsbA</b> <i>E. coli</i>
3.A.1.108	<b>GlucanE</b> (ang. <i>β-glucan exporter</i> )	cykliczne β-glukany	<b>NdvA</b> <i>S. meliloti</i>
3.A.1.114	<b>DevE</b> (ang. <i>probable glycolipid exporter</i> )	glikolipidy	<b>DevAC</b> <i>Anabaena</i> sp. szczep PCC7120

Zewnątrzkomórkowe polisacharydy mogą być też wykorzystywane przez drobnoustroje jako źródło węgla. Bakterie z reguły degradują je z wykorzystaniem zewnątrzkomórkowych enzymów typu glikanaz i pobierają niskocząsteczkowe produkty tego rozkładu. Wyjątkiem od tej reguły jest system pobierania alginianu przez *Sphingomonas* sp. [53].

#### IV-I. System pobierania alginianu u *Sphingomonas* sp. szczep A1

Alginian jest liniowym heteropolisacharydem wydzielanym przez niektóre gatunki patogenów, np. *Pseudomonas aeruginosa*. Na powierzchni komórek

*Sphingomonas* hodowanych w podłożu z alginianem tworzy się zagłębienie i polimer w formie wysokocząsteczkowej jest wprowadzany bezpośrednio do komórki [54].

System transportu alginianu określany jako „super-kanal” funkcjonuje w oparciu o transporter ABC (rodzina CUT-1; TC # 3.A.1.1.; Tab. 4a) i jest złożony z białek wiążących alginian zlokalizowanych w peryplazmie (AlgQ1, AlgQ2), permeaz błonowych (AlgM1, AlgM2) oraz białka z kasetą ABC (AlgS). Polimer zagęszczony w zagłębieniu jest przechwytywany przez AlgQ1 i AlgQ2 w peryplazmie, a następnie przekazywany do transportera ABC, który wprowadza polimer bezpośrednio do cy-

toplazmy. Po wejściu do cytoplazmy polisacharyd jest degradowany z udziałem liaz [53, 54].

## IV-2. Systemy eksportu polisacharydów

Systemy transportu, katalizujące wydzielanie do środowiska cukrów złożonych można podzielić na dwie grupy. Pierwszą tworzą transportery, w którym właściwą permeazą jest białko typu ABC-2, drugą zaś stanowi grupa transporterów specyficznych dla polisacharydów funkcjonujących z udziałem białek błonowych z nadrodziny PST [50].

### IV.2-1. Permeazy ABC-2

Grupa permeaz ABC-2 obejmuje co najmniej 7 rodzin specyficznych substratowo transporterów występujących u bakterii gramujemnych i gramododatnich (Tab. 4b).

Rodziny transporterów przedstawione w tabeli 4b zaangażowane są zarówno w eksport polisacharydów jak i makrocząsteczek zawierających składnik cukrowy, bądź ich biosyntetycznych prekursorów. Systemy te wykorzystują integralne białka błony cytoplazmatycznej zawierające segmenty transbłonowe, które w połączeniu z białkiem wyposażonym w domenę ABC katalizują eksport substratu cukrowego [2, 38, 55, 56]. Systemy transportu polisacharydów kapsularnych mogą wymagać do swojej aktywności dodatkowych białek pomocniczych np. zlokalizowanych w błonie zewnętrznej [50, 57].

### IV.2-2. Transportery specyficzne dla polisacharydów (PST)

Transportery typu PST sklasyfikowano w obrębie nadrodziny flipaz leków, połączeń oligocukrowo-tłuszczowych i polisacharydów (MOP; ang. *Multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide flipase superfamily*; TC # 2.A.66). Białka PST wyróżnia charakterystyczna topologia błonowa: wszystkie posiadają 12 segmentów transbłonowych (TMS) oraz końce N- i C- zlokalizowane w cytoplazmie. Znamienne jest również brak homologii na poziomie struktury pierwszorzędowej pomiędzy przedstawicielami tej grupy, jak również innymi białkami bakteryjnymi dostępnymi w bazach danych. Jedynym obszarem białek PST, w którym występuje podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej jest część N-końcowa, obejmująca pierwszy i drugi segment transbłonowy [50]. Białka PST są podobne do wtórnych przenośników funkcjonujących na zasadzie antyportu sprzężonego z  $H^+$  [24] (Tab. 5).

Transportery PST(1) uczestniczące w eksporcie EPS lub KPS charakteryzuje obecność hydrofilowej, zlokalizowanej w cytoplazmie pętli złożonej z około 80 reszt aminokwasowych, która występuje pomiędzy 6 a 7 segmentem transbłonowym (TMS6-TMS7). Transportery te działają wspólnie z pomocniczymi białkami błony zewnętrznej OMA i błonowo-peryplazmatycznymi białkami pomocniczymi typu MPA (zgodnie z nomenklaturą zaproponowaną przez M o r o n ę i wsp. [62] określanymi również jako kopolimerazy polisacharydów - PCP).

Białka PST(2), eksportujące komponenty LPS, mają krótką (ok. 15 aminokwasów) pętlę pomiędzy

**Tabela 5.**

Przykłady transporterów specyficznych dla polisacharydów (PST) [50, 51, 67, 69, 70, 71]

TC #	Podgrupa PST	Białko (aa)	Gatunek bakterii	Eksportowany substrat
2.A.66.2	PST (1)	GumJ (498)	<i>Xanthomonas campestris</i>	EPS
		ExoT (582)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	EPS
		AmsL (446)	<i>Erwinia amylovora</i>	EPS
		CapF (396)	<i>Staphylococcus aureus</i>	KPS
		PssT (484)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	EPS
	PST (2)	RfbE (418)	<i>Shigella flexneri</i>	LPS
		RfbX1 (415)	<i>Escherichia coli</i>	LPS
		RfbX2 (396)	<i>Shigella dysenteriae</i>	LPS
		RfbX3 (437)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LPS
		TrsA (418)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	LPS

Tabela 6.

Przykłady pomocniczych białek błony zewnętrznej OMA [50, 72]

Funkcja	Białko OMA (aa)	Bakteria
eksport KPS	OtnA (260)	<i>Vibrio cholerae</i>
	Orf4 (378)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	BexD (394)	<i>Haemophilus influenzae</i>
	CtrA (387)	<i>Neisseria meningitidis</i>
	VexA (355)	<i>Salmonella typhi</i>
eksport EPS	GumB (213)	<i>Xanthomonas campestris</i>
	ExoF (421)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
	AmsH (377)	<i>Erwinia amylovora</i>
	EpsA (377)	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	PssN (403)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

TMS6 a TMS7 i mogą działać niezależnie od białek pomocniczych OMA i MPA [50, 58]. Mogą one

funkcjonować, podobnie jak flipazy, w specyficznej translatacji łańcucha O-swoistego LPS (związanego

Tabela 7.

Przykłady błonowo-peryplazmatycznych białek pomocniczych MPA/PCP [50, 60, 62, 72]

Podgrupa MPA/PCP	Białko (aa)	Liczba super-helis	Bakteria	Funkcja w eksporcie i/lub polimeryzacji
PCP1 <sup>a</sup> (Wzz)	Wzz (325)	-	<i>Shigella flexneri</i>	antygen O-swoisty LPS
	Wzz (338)	-	<i>E. coli</i> K12	
MPA1-C (PCP2a)	Wzc (720)	3	<i>E. coli</i> K12	KPS
	AmsA (726)	2	<i>E. amylovora</i>	EPS
	ExoP (786)	4	<i>S. meliloti</i>	
	EpsB (750)	1	<i>R. solanacearum</i>	
	PssP (746)	4	<i>R. leguminosarum</i>	
MPA1+C (PCP2b)	EpsA (259)	1	<i>Lactococcus lactis</i> subs.	EPS
	EpsB* (231)	n.b.	<i>cremoris</i>	
	EpsC (230)	1	<i>Streptococcus thermophilus</i> Sli6	
	EpsD* (249)	n.b.		KPS
	CapA (211)	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CapB* (228)	n.b.		
	CpsC (231)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
CpsD* (227)	n.b.			
MPA2 (PCP3)	CtrB (387)	2	<i>N. meningitidis</i>	KPS
	KpsE (382)	3	<i>E. coli</i>	
	BexC (377)	4	<i>H. influenzae</i>	

Objaśnienia: <sup>a</sup> - białka typu Wzz, które nie zostały zaliczone do grupy MPA przez Paulsen i wsp. [50]; \* - białko z motywem kasyety ABC; n.b. - nie badano



z lipidowym nośnikiem) z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej [24].

#### IV.2-3. Pomocnicze białka błony zewnętrznej (OMA)

Pomocnicze białka błony zewnętrznej OMA stanowią unikalny dla bakterii gramujemnych składnik systemów eksportu polisacharydów. Należą do nadrodziny poryn (TC # 1.B.18) (Tab. 1b). Gen kodujący białko typu OMA zwykle zlokalizowany jest w pobliżu genów kodujących pozostałe składniki kompleksu transportera, tworząc operon lub grupę genów. W części N-końcowej białek OMA znajduje się sekwencja rozpoznawana przez peptydazę sygnałną II. Zawiera ona niezmienną resztę cysteinową, która po strawieniu części N-końcowej białka może ulegać acylacji kwasem tłuszczowym, co prowadzi do powstania lipoproteiny OMA [50, 59]. Przykłady białek zaliczanych do OMA przedstawiono w Tabeli 6.

#### IV.2-4. Błonowo-peryplazmatyczne białka pomocnicze MPA

Błonowo-peryplazmatyczne białka MPA mają dwa segmenty transbłonowe kotwiczące je w błonie cytoplazmatycznej oraz dużą, hydrofilową domenę zlokalizowaną w peryplazmie [50, 60]. Białka te kontrolują syntezę polisacharydów i regulują stopień ich polimeryzacji [60, 61]. W obrębie domeny peryplazmatycznej białek MPA występują sekwencje tworzące super-helisy (ang. *coiled-coils*), które mogą być zaangażowane w oddziaływanie z innymi składnikami transportera. Uważa się, że ilość super-helis jest skorelowana ze stopniem polimeryzacji i jest specyficzna dla rodzaju polisacharydu, w którego biosyntezie bierze udział dane białko MPA [90]. Przykłady białek zaliczanych do grupy MPA przedstawiono w Tabeli 7.

Białka, które odpowiadają za regulację długości łańcucha O-swoistego LPS należą do grupy Wzz (Tab. 7). Tylko nieliczne z nich mogą tworzyć regiony typu super-helis w domenie peryplazmatycznej [60].

Do białek z podgrupy MPA1 (TC # 8.A.3) należą zarówno białka bakterii gramododatnich jak i gramujemnych. Do podgrupy MPA1-C zaliczane są te białka bakterii gramujemnych, które biorą udział w polimeryzacji i eksporcie EPS i KPS oraz charakteryzują się obecnością dużej, hydrofilowej C-końcowej domeny z kasetą ABC. W ich N-końcowej części wykrywa się liczne super-helisy, co wskazuje, że mogą one oddziaływać z innymi składnikami systemu transportu (np. z białkiem PST lub OMA) [62]. Ostatnio wykazano, że białka należące do tej podgrupy mają aktywność autofosforylującej kinazy tyrozynowej, która bierze udział w biosyntezie egzopolisacharydów (EPS) [50, 63-66].

Białka z podgrupy MPA1+C bakterii gramododatnich nie mają C-końcowej domeny z motywem ABC. Funkcjonalnym analogiem domeny C-końcowej w tej podgrupie białek jest odrębne białko (stąd nazwa MPA1+C). Białka z tej podgrupy biorą udział w biosyntezie i eksporcie polisacharydów kapsularnych (KPS) [50, 60].

W podgrupie MPA2 (TC # 8.A.4) znajdują się wyłącznie białka bakterii gramujemnych, zaangażowane w biosyntezę polisacharydów kapsularnych. Podobnie jak białka z grupy MPA1-C tworzą one struktury typu super-helis, ale nie mają motywu ABC. Białka z tej podgrupy współdziałają z permeazami z rodziny ABC-2 [50, 60].

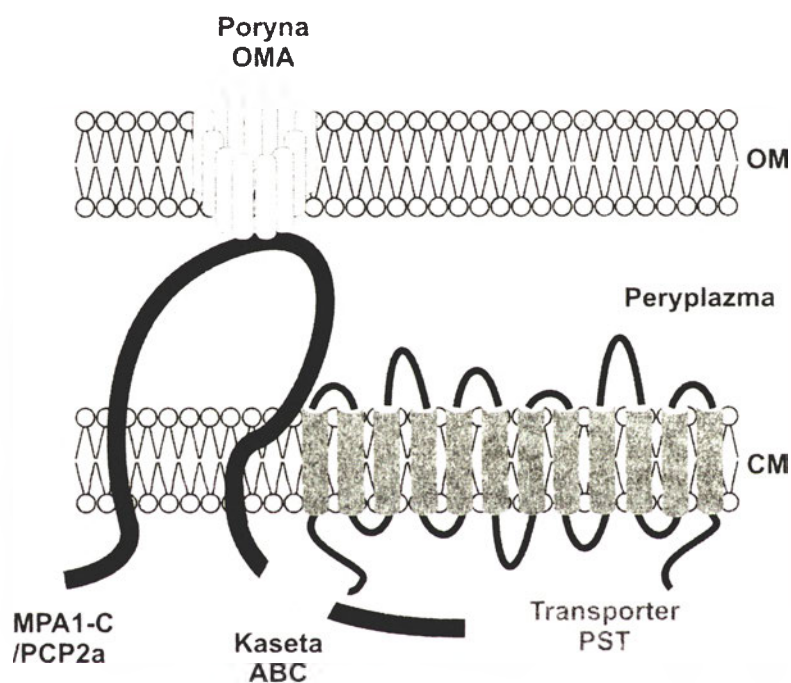
Biorąc pod uwagę rodzaj transportera oraz białek pomocniczych bakteryjne systemy odpowiedzialne za eksport polisacharydów sklasyfikowano w sześciu grupach [50] (Tab. 8).

Tabela 8.

Organizacja wieloskładnikowych systemów eksportu polisacharydów [50]

Grupa	Bakteria	Substrat	Rodzaj transportera	Białka pomocnicze	
				typu MPA/PCP	typu OMA
I	Gram <sup>+</sup>	KPS, EPS	PST (1)	MPA1-C/PCP2a	OMA
II	Gram <sup>+</sup>	KPS	PST (1)	MPA1+C/PCP2b	-
III	Gram <sup>+</sup>	LPS	PST (2)	-	-
IV	Gram <sup>+</sup>	KPS	ABC-2	MPA2/PCP3	OMA
V	Gram <sup>+</sup>	TCA, leki	ABC-2	-	-
VI	Gram <sup>+</sup>	LPS, LOS	ABC-2	-	-

Dokładny mechanizm funkcjonowania systemów transportu polisacharydów nie jest znany. Istnieją jedynie hipotezy dotyczące możliwych sposobów działania niektórych ich komponentów. Zaproponowany schemat działania systemu eksportu typu I (Tab. 8) złożonego z białek PST, OMA i MPA wskazuje na fizyczną asocjację jego składników zlokalizowanych w obydwu błonach bakterii gramujemnych. Transbłonowe segmenty białka MPA1-C asocjując z transporterem PST umożliwiają polisacharydom pokonanie błony cytoplazmatycznej. Peryplazmatyczna domena MPA1-C oddziałuje z białkiem OMA, które tworząc kanał w błonie zewnętrznej pozwala transportowanemu substratowi cukrowemu pokonać drugą barierę w drodze na zewnątrz komórki [50, 67] (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Schemat organizacji systemu transportu typu I odpowiedzialnego za eksport egzopolisacharydu u bakterii gramujemnych. OM - błona zewnętrzna, CM - błona cytoplazmatyczna.

Przedstawiony model swoją budową przypomina systemy zaangażowane w transport białek, peptydów, jonów metali czy leków. Podobnie jak opisany powyżej system eksportu polisacharydów typu I, systemy transportu innych makrocząsteczek wykorzystują komponenty białkowe zlokalizowane w błonie wewnętrznej (permeazy typu MFS, RND lub ABC) i zewnętrznej (białka OMF). Szczególną rolę odgrywają białka należące do rodziny błonowych białek fuzyjnych MFP, które „spinając” obydwie błony umożliwiają transport substratów na zewnątrz komórki [52, 56, 68].

## V. Podsumowanie

Do niedawna charakterystyka i klasyfikacja białek uczestniczących w procesach transportu komórkowego była stosunkowo słabo zaawansowana w porównaniu np. z systemem klasyfikacji białek enzymatycznych. Postęp, jaki w ostatnich latach dokonał się w dziedzinie sekwencjonowania genomów sprawił, że liczba dostępnych w bazach danych sekwencji kodujących białka o potencjalnych funkcjach transporterów znacząco się zwiększyła.

Próby klasyfikowania białek transporterowych w oparciu o zależności funkcjonalno-filogenetyczne zaowocowały stworzeniem systemu TC. Wśród rozpoznanych transporterów wyróżnić można zarówno proste systemy jednobiałkowe, jak i systemy wie-

loskładnikowe. Katalizują one przenoszenie różnych substancji przez osłony komórkowe na zasadzie dyfuzji ułatwionej lub transportu aktywnego, angażującego jedno lub więcej źródeł energii, napędzającej proces przenoszenia substratu. Rosnąca nieustannie ilość informacji o sekwencjach genów kodujących potencjalne transportery sprawia, że liczebność białek w poszczególnych rodzinach, jak i ilość samych rodzin, ulega szybkim zmianom. Przypuszczalnie istnieją systemy wykorzystujące nieopisane dotąd mechanizmy transportu. Korzyścią płynącą z dostępności danych o sekwencjach nukleotydowych różnych genomów będzie możliwość pełniejszego scharakteryzowania szlaków metabolicznych, jakie organizmy wykorzystują do pobiera-

nia substratów odżywczych, ich przetwarzania oraz wydzielania poza komórkę zbędnych produktów przemiany materii.

Usystematyzowanie danych dotyczących sekwencji białek o potencjalnych funkcjach transporterów w połączeniu z analizą struktur przestrzennych umożliwi zrozumienie problemów dotyczących ewolucji systemów transportu, jak również mechanizmów ich funkcjonowania.

Praca wykonana ze środków Komitetu Badań Naukowych w ramach grantu badawczego nr 6P04A 05818.

Artykuł otrzymano 31 marca 2003

Zaakceptowano do druku 24 października 2003

## Piśmiennictwo

1. Reizer J, Saier MH Jr (1997) *Curr Opin Struct Biol* 7: 407-415
2. Saurin W, Hofnung M, Dassa E (1999) *J Mol Evol* 48: 22-41
3. Tomii K, Kanehisa M (1998) *Genome Res* 8: 1048-1059
4. Saier MH Jr (2000b) *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 354-411
5. Driessen AJM, Rosen BP, Konings WN (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 397-401
6. Nakaido H, Saier MH Jr (1992) *Science* 258: 936-942
7. Higgins CF (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113
8. Schmitt L, Tampè R (2002) *Curr Opin Struct Biol* 12: 754-760
9. Maloney PC, Wilson TH (1996) W: Neidhardt FC (red) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington DC, str. 1130-1148
10. Forward JA, Behrendt MC, Wyborn R, Cross R, Kelly DJ (1997) *J Bacteriol* 179: 5482-5493
11. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993) *Microbiol Rev* 57: 543-594
12. Saier MH Jr (1998) *Adv Microb Physiol* 40: 81-136
13. Saier MH Jr (2000) *J Membrane Biol* 175: 165-180
14. Schulz GE (1996) *Curr Opin Struct Biol* 6: 485-490
15. Klebba PE, Newton MCS (1998) *Curr Opin Microbiol* 1: 238-248
16. Cowan SW (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3: 501-507
17. Benz R, Schmid A, Greetje H, Vos-Scheperkeuter H (1987) *J Membr Biol* 100: 21-29
18. Andersen C, Jordy M, Benz R (1995) *J Gen Physiol* 105: 385-401
19. Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenbusch JP (1995) *Science* 267: 512-514
20. Klebba PE, Hofnung M, Charbit A (1994) *EMBO J* 13: 4670-4675
21. Gelder P, Dumas F, Winterhalter M (2000) *Biophys Chem* 85: 153-167
22. Dutzler R, Schirmer T, Karplus M, Fischer S (2002) *Structure* 10: 1273-1284
23. Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, Boos W, Schlösser A (1998) *Mol Microbiol* 29: 685-694
24. <http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport>
25. Varela MF, Wilson TH (1996) *Biochim Biophys Acta* 1276: 21-34
26. West IC (1997) *Biochim Biophys Acta* 1331: 213-234
27. Saier MH Jr (2000a) *Mol Microbiol* 35: 699-710
28. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34
29. Saier MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Jack DL, Jahn PS, Lew K, Liu J, Pao S S, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS (1999) *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 257-279.
30. Walmsley AR, Barret MP, Bringaud F, Gould GW (1998) *Trends Biochem Sci* 23: 476-481
31. Lolkema JS, Poolman B, Konings WN (1998) *Curr Opin Microbiol* 1: 248-253
32. Saier MH Jr, Chauvaux S, Deutscher J, Reizer J, Ye J-J (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 267-271
33. Saier MH Jr (1995) *Energy Convers Mgmt* 36: 741-746
34. Ye J-J, Saier MH Jr (1996) *J Bacteriol* 178: 3557-3563
35. Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur L M, Carney JP, Tainer JA (2000) *Cell* 101: 789-800
36. Dassa E, Bouige P (2001) *Res Microbiol* 152: 211-229
37. Dassa E, Hofnung M, Paulsen IT, Saier MH Jr (1999) *Mol Microbiol* 4: 887-889
38. Ames GF-L, Mimura CS, Shyamala V (1990) *FEMS Microbiol Rev* 75: 429-446
39. Tam R, Saier MH Jr (1993) *Microbiol Rev* 57: 320-346
40. Kempf B, Gade J, Bremer E (1997) *J Bacteriol* 179: 6213-6220
41. Turner MS, Timms P, Hafner LM, Giffard PM (1997) *J Bacteriol* 179: 3310-3316
42. Chang G, Roth CB (2001) *Science* 293: 1793-1800
43. Obis D, Guillot A, Gripon JC, Renault P, Bolotin A, Mistou MY (1999) *J Bacteriol* 181: 6238-6246
44. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) *EMBO J* 1: 945-951
45. Schneider E, Hunke S (1998) *FEMS Microbiol Rev* 22: 1-20
46. Holland B, Blight MA (1999) *J Mol Biol* 293: 381-399
47. Mourez M, Hofnung M, Dassa E (1997) *EMBO J* 16: 2066-2077.
48. Bartosz G (1998) *Post Bioch* 44: 136-150.
49. Locher KP, Lee AT, Rees DC (2002) *Science* 296: 1091-1098
50. Paulsen IT, Beness AM, Saier MH Jr (1997) *Microbiology* 143: 2685-2699
51. Reuber TL, Walker GC (1993) *Cell* 74: 269-280
52. Dinh T, Paulsen IT, Saier MH Jr (1994) *J Bacteriol* 176: 3825-3831
53. Momma K, Okamoto M, Mishima Y, Mori S, Hashimoto W, Murata K (2000) *J Bacteriol* 182: 3998-4004
54. Mishima Y, Momma K, Hashimoto W, Mikami B, Murata K (2001) *FEMS Microbiol Lett* 204: 215-221
55. Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr (1992) *Protein Sci* 1: 1326-1332
56. Saier MH Jr, Tam R, Reizer A, Reizer J (1994) *Mol Microbiol* 4: 841-847
57. Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH Jr (1997) *FEMS Microbiol Lett* 156: 1-8
58. Chung YJ, Krueger C, Metzgar D, Saier MH Jr (2001) *J Bacteriol* 183: 1012-1021
59. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) *Mol Microbiol* 37: 239-253
60. Morona R, Van Den Bosch L, Daniels C (2000) *Microbiology* 146: 1-4
61. Franco AV, Liu D, Reeves PR (1998) *J Bacteriol* 180: 2670-2675
62. Mazur A, Król JE, Wielbo J, Urbanik-Sypniewska T, Skorupska A (2002) *MPMI* 15: 388-397
63. Doublet P, Vincent C, Grangeasse A, Cozzzone B, Duclos B (1999) *FEBS Lett* 445: 137-143
64. Ilan O, Bloch Y, Frankel G, Ullrich H, Geider K, Rosenshine I (1999) *EMBO J* 18: 3241-3248
65. Morona JK, Paton JC, Miller DC, Morona R (2000) *Mol Microbiol* 35: 1431-1442
66. Grangeasse C, Doublet P, Cozzzone AJ (2002) *J Biol Chem* 277: 7127-7135
67. Mazur A, Król JE, Marczak M, Skorupska A (2003) *J Bacteriol* 185: 2503-2511
68. Dong Q, Mergeay M (1994) *Mol Microbiol* 14: 1271-1280
69. Klana JD, Schnaitman CA (1993) *Mol Microbiol* 9: 393-402
70. Liu D, Cole RA, Reeves PR (1996) *J Bacteriol* 178: 4239-4248
71. Paulsen IT, Sliwinski MK, Saier MH Jr (1998) *J Mol Biol* 227: 573-592
72. Mazur A, Król JE, Skorupska A (2001) *DNA Seq* 12: 1-12



# Dendrymery w zastosowaniach terapeutycznych

## Dendrimers in therapeutic applications

BARBARA KLAJNERT<sup>1</sup>, TOMASZ PRZYGODZKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Budowa i właściwości dendrymerów
- II. Zastosowanie dendrymerów w medycynie
  - II-1. Dendrymery jako cząsteczki transportujące leki i czynniki diagnostyczne
  - II-2. Rola dendrymerów w terapii genowej
    - II-2-1. Najczęściej stosowane wektory
    - II-2-2. Dendrymery jako wektory
- III. Toksyczność dendrymerów
- IV. Podsumowanie

### I. Budowa i właściwości dendrymerów

Od czasu zsyntetyzowania pierwszych polimerów, chemia polimerów stała się bardzo szybko rozwijającą się gałęzią wiedzy. Skupiała się ona na liniowych polimerach, które znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach życia. Konwencjonalne, liniowe polimery zawierają jedynie sporadyczne rozgałęzienia. Tymczasem stosunkowo niedawno dowiedziano, iż właściwości polimerów w dużej mierze zależą od stopnia ich rozgałęzienia.

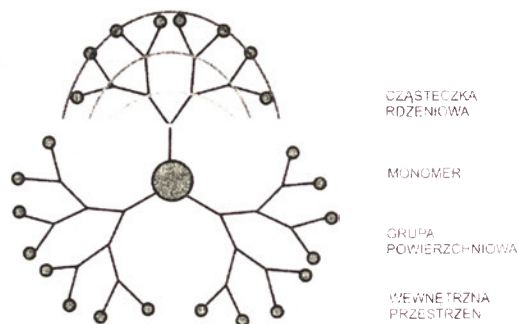
W połowie lat osiemdziesiątych zespół kierowany przez Tomalę pierwszy uzyskał silnie rozgałęzione polimery nazwane przez nich dendrymerami [1]. Nazwa dendrymer (ang. *dendrimer*) pochodzi od greckiego słowa „dendron” oznaczającego drzewo i dobrze oddaje regularny charakter rozgałęzień występujących w tej makrocząsteczce. W tym samym czasie inna grupa badaczy kierowana przez Nowaka zsyntetyzowała podobne związki i nadała im nazwę arborole (ang. *arborols*), od łacińskiego słowa „arbor”, również oznaczającego drzewo [2]. W początkowym okresie, w odniesieniu do nowej grupy polimerów, stosowano jeszcze inne określenie – cząsteczki kaskadowe (ang. *cascade molecules*). Bardzo szybko jednak nazwa dendrymer stała się powszechnie stosowana i jest obecnie najlepiej utrwalona.

### Contents:

- I. Dendrimers' structure and properties
- II. Dendrimers' medical applications
  - II-1. Dendrimers as carrier molecules for drugs and diagnostic agents
  - II-2. Dendrimers' role in gene therapy
    - II-2-1. Most frequently used vectors
    - II-2-2. Dendrimers as vectors
- III. Dendrimers' toxicity
- IV. Summary

Wkrótce po pierwszych doniesieniach odnośnie dendrymerów w innych placówkach badawczych rozpoczęto prace nad syntezą nowych związków. W latach dziewięćdziesiątych lawinowo wzrastała liczba artykułów dotyczących tej tematyki. Pojawiały się doniesienia o coraz to nowych, zsyntetyzowanych typach makromolekuł, różniących się między sobą budową chemiczną, zachowujących jednak podobną strukturę. W Tabeli 1 zestawiono najczęściej spotykane w literaturze rodzaje dendrymerów. Wszystkie dendrymery posiadają w swoim centrum cząsteczkę rdzeniową, do której warstwami przyłączone są rozgałęzione monomery. Im więcej jest warstw monomerów tym wyższa jest tzw. generacja dendrymeru. Konsekwencją takiej budowy jest obecność wolnych przestrzeni wewnątrz makromo-

GENERACJA 4  
GENERACJA 3



Ryc. 1. Schemat budowy dendrymeru.

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>mgr, Katedra Biologii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. (042) 635 41 44, fax (042) 635 44 74, e-mail: aklaajn@biol.uni.lodz.pl (B. Klajnert), tomaszpa@biol.uni.lodz.pl (T. Przygodzki)

Tabela 1.

Budowa różnych typów dendrymerów

Dendrymer	Rdzeń	Monomer
Poliamidoaminowy	$=NCH_2CH_2N=$	$-CH_2CH_2CONHCH_2CH_2N=$
Polipropylenoiminowy	$=NCH_2CH_2CH_2CH_2N=$	$-CH_2CH_2CH_2N=$
Polieterowy	$=C=$	$-C_6H_4OCH_2CH_2CH_2-$
Karbokrzemowy	$=Si=$	$-CH_2CH_2CH_2Si=$

lekuly oraz liczne grupy funkcyjne na powierzchni (Ryc. 1).

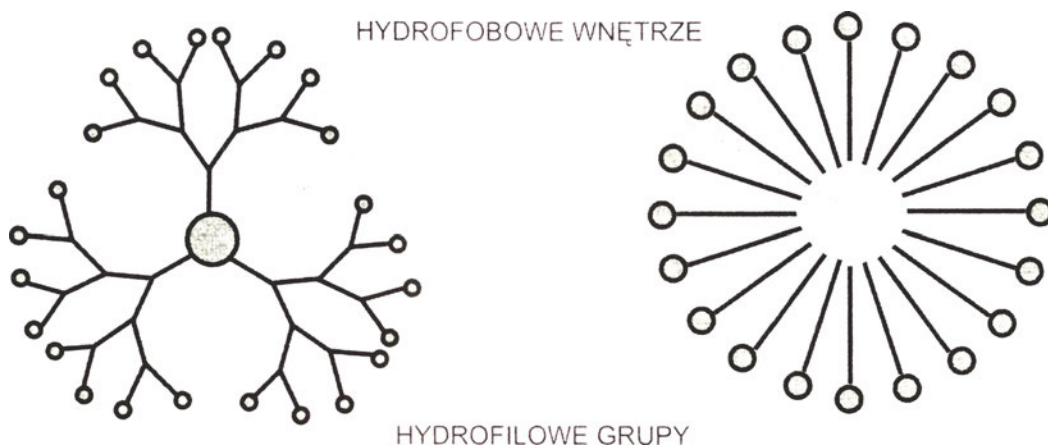
W odróżnieniu od polimerów liniowych dendrymery charakteryzują się monodispersyjnością. Ich rozmiar i masa molowa mogą być precyzyjnie kontrolowane podczas syntezy. Wraz ze wzrostem generacji dendrymeru zmienia się jego kształt. Dendrymery niższych generacji (pierwszej i drugiej) mają otwartą strukturę i dyskopodobny kształt. Wyższe generacje przyjmują strukturę kulistą [3]. Przyrostowi cząsteczki dendrymeru towarzyszy wzrost jej upakowania w obszarze zewnętrznym. To powoduje, iż dendrymer nie może rozrastać się w nieskończoność. W pewnym momencie, ze względu na ograniczenia przestrzenne, kolejna warstwa monomerów nie może się przyłączyć. Zjawisko to nosi nazwę efektu starburst (ang. *starburst effect*) [4].

Obecność licznych grup funkcyjnych na powierzchni dendrymerów powoduje, iż są one lepiej rozpuszczalne i wykazują wyższą reaktywność niż ich liniowe analogi [5]. Rozpuszczalność dendrymerów zależy od charakteru grup na powierzchni. Dendrymery zakończone grupami hydrofilowymi rozpuszczają się w środowisku wodnym, a te z grupami hydrofobowymi w rozpuszczalnikach niepolarnych.

Odpowiednio zsyntetyzowane dendrymery, posiadające hydrofobowe wnętrze i hydrofilowe grupy po-

wierzchniowe, zachowują się podobnie do micel, mają bowiem zdolność zwiększania rozpuszczalności składników trudno rozpuszczalnych w środowisku wodnym [6] (Ryc. 2). Przewaga dendrymerów nad micelami leży w ich jednocząsteczkowości (ang. *unimolecular micelles*). Micele, które składają się z wielu cząsteczek stabilizowanych oddziaływaniami elektrostatycznymi, ulegają rozpadowi poniżej stężenia krytycznego. Dendrymery nawet w niskich stężeniach są związkami trwałymi. T w y m a n i w s p. zmodyfikowali dendrymer poliamidoaminowy uzyskując, zamiast aminowych grup funkcyjnych, grupy hydroksylowe. Tak zsyntetyzowany dendrymer wykazywał zdolność rozpuszczania w wodzie hydrofobowych substancji m.in. tiokonazolu [7, 8].

Specyficzne właściwości dendrymerów wynikają z faktu obecności w ich wnętrzu wolnych przestrzeni. Okazuje się, że są one wystarczająco obszerne, by mogły pomieścić się w nich mniejsze cząsteczki. Pierwszy, który zaobserwował tę właściwość dendrymerów był M e i j e r. Zamykał on cząsteczki różu bengalskiego i kwasu p-nitrobenzoesowego wewnątrz dendrymerów polipropylenoiminowych [9, 10]. Aby zapobiec niekontrolowanemu wpływowi tych związków, aminowe grupy funkcyjne zostały zastąpione resztami L-feniloalaniny, które utworzyły szczelną otoczkę tzw. „pudełko dendrymero-



Ryc. 2. Porównanie struktury dendrymeru i miceli.

we” (ang. *dendritic box*). Hydroliza aminokwasów powodowała rozpad tej otoczki i uwolnienie cząsteczek zamkniętych wewnątrz dendrymeru (Ryc. 3). Grupa Meijera wykonała doświadczenia, w których udało się zamknąć cztery cząsteczki różu bengalskiego lub dziesięć cząsteczek kwasu p-nitrobenzoowego w jednym dendrymerze.



Ryc. 3. Schemat "pudełka dendrymerowego" Meijera.

## II. Zastosowanie dendrymerów w medycynie

Specyficzna struktura dendrymerów znacząco wpływa na ich właściwości, a co za tym idzie, możliwe zastosowania. Wśród możliwości aplikacyjnych na szczególne zainteresowanie zasługują te, w których dendrymery można by wykorzystać w diagnostyce i terapii.

### II-1. Dendrymery jako cząsteczki transportujące leki i czynniki diagnostyczne

Liczna grupa potencjalnych zastosowań dendrymerów bazuje na obecności wolnych przestrzeni wewnątrz cząsteczki. W przestrzeniach tych mogą być zamykane i przenoszone leki. Enkapsulacja leku zapewnia odizolowanie go od środowiska zewnętrznego, a tym samym ochronę przed inaktywacją. Dodatkowym efektem, jaki się uzyskuje, jest spowolnienie uwalniania się leku. Właściwość ta jest szczególnie istotna w przypadku leków przeciwnowotworowych, pozwala bowiem obniżyć ich toksyczność. Zaletę tę wykorzystano do zamykania wewnątrz dendrymerów poliamidoaminowych adriamycyny i metotreksatu [11]. W miejsce końcowych grup aminowych przyłączone zostały łańcuchy polietylenoglikolowe. Istnieją przesłanki pozwalające sądzić, iż zabieg ten może wydłużyć czas krążenia dendrymerów w krwiobiegu, zapobiec akumulacji w wątrobie oraz zmniejszyć oddziaływania pomiędzy białkami

osocza a dendrymerami. Efekt taki obserwuje się między innymi przy przyłączeniu łańcuchów polietylenoglikolowych do liposomów. Badając zdolność dendrymerów poliamidoaminowych do przeniesienia w swoim wnętrzu cytostatyku 5-Fluorouracylu dowiedziono, że otoczenie cząsteczki dendrymeru łańcuchami polietylenoglikolowymi zwiększa po-

jemność dendrymeru, opóźnia uwalnianie leku i obniża hemotoksyczność takiego kompleksu [12]. Istotnym aspektem przy przenoszeniu leków zamkniętych wewnątrz dendrymeru jest liczba cząsteczek, które mieszczą się w wewnętrznych przestrzeniach makromolekuły. L i u i wsp. tak dobrali monomer (4,4-bis-4'-hydroksyfenylopentanol), aby uzyskać odpowiednio duże przestrzenie do przenoszenia leku przeciwnowotworowego – indometacyny [13]. Powolne uwalnianie się indometacyny w bezpośrednim otoczeniu komórek nowotworowych uzyskano syntetyzując dendrymer poliaryloeterowy z resztami kwasu foliowego, jako grupami funkcyjnymi [14]. Wykorzystano tu fakt, iż reszty kwasu foliowego wykazują duże powinowactwo do komórek nowotworowych.

Znaczna grupa możliwych zastosowań dendrymerów w medycynie opiera się na wykorzystaniu dużej liczebności grup funkcyjnych na powierzchni. Dendrymery modyfikuje się tak, aby ich zewnętrzna otoczką była substancja aktywna. Poprzez fakt, że jedna cząsteczka dendrymeru może na swojej powierzchni przynieść wiele cząsteczek leku uzyskuje się intensyfikację efektu terapeutycznego. Z a n i n i i R o y zsyntetyzowali dendrymer poliamidoaminowy otoczony resztami kwasu sialowego [15]. Sialodendrymery, hamując proces hemaglutynacji, zapobiegają przyłączaniu się wirusa do komórek, a tym samym chronią organizm przed infekcją. Przyłączając do powierzchni dendrymeru lek pre-



ciwnowotworowy uzyskuje się, oprócz możliwości przenoszenia dużej liczby jego cząsteczek, zmniejszenie jego skutków ubocznych poprzez stopniowe odłączanie się leku od powierzchni dendrymeru. Z h u o i wsp. zsyntetyzowali dendrymer poliamidoaminowy o cyklicznym rdzeniu i przyłączyli do niego cytostatyk 5-Fluorouracyl [16]. Na drodze hydrolyzy lek powoli odłączał się od makromolekuły, a tym samym zmniejszała się jego toksyczność.

Interesującym zastosowaniem dendrymerów jest użycie ich jako cząsteczek łączących przeciwciała z radioaktywnymi znacznikami. Przeciwciała modyfikowane radioizotopem mają potencjalnie duże zastosowanie w tzw. ukierunkowanej terapii oraz diagnostyce nowotworów. Niestety, niejednokrotnie przyłączenie wystarczającej, z punktu widzenia pożądanego efektu, liczby cząsteczek radioizotopu prowadzi do tak znacznej modyfikacji powierzchni przeciwciała, iż białko to traci swoją immunoreaktywność [17]. Przyłączenie dendrymeru do powierzchni przeciwciała jest możliwe przy użyciu tylko jednego wiązania chemicznego. Następnie wykorzystując dużą liczebność grup funkcyjnych dendrymeru, można przyłączyć do niego bardzo wiele izotopów (Ryc. 4). Zmodyfikowane dendrymery poliamidoaminowe wykorzystano do przenoszenia izotopu  $^{10}\text{B}$  w terapii wychwytu neutronów boru stosowanej w leczeniu nowotworów mózgu [18].



Ryc. 4. Dendrymer jako cząsteczka łącząca (ang. *linker molecule*) radioizotopy z przeciwciałem.

W leczeniu miejscowych stanów zapalnych celowe jest przezskórne podawanie niesterydowych leków przeciwzapalnych. Unika się wtedy ubocznych skutków działania leku na przewód pokarmowy, jak również redukuje się jego nefrotoksyczność. Cząsteczki leku kompleksuje się z czynnikami umożliwiającymi ich transport przez skórę. Prowadzono badania nad użyciem do tego celu dendrymerów poliamidoaminowych [19]. Jako leku użyto indometacyny. Uzyskano dużą efektywność transportu indometacyny przez skórę, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazano, że ibuprofen (inny niesterydowy lek przeciwzapalny) skompleksowany z den-

drymerami poliamidoaminowymi (generacji trzeciej i czwartej) znacznie szybciej wnika do komórek niż jego nieskompleksowany odpowiednik [20]. Obliczono, że do 78 cząsteczek ibuprofenu może tworzyć kompleks z jedną cząsteczką dendrymeru poliamidoaminowego generacji czwartej. Stabilność tego kompleksu zapewniają oddziaływania jonowe pomiędzy aminowymi grupami dendrymeru i karboksylową grupą leku.

Podjęto również próby zastosowania dendrymerów jako nośników dla kontrastów w obrazowaniu rezonansem magnetycznym [21]. W tej diagnostycznej metodzie podane dożylnie czynniki kontrastujące gromadzą się w badanej tkance wzmacniając sygnał rezonansowy. Najczęściej stosuje się kompleksy jonów gadolinu z kwasem dietylenotriaminopentaoctowym. Kilka grup badawczych zsyntetyzowało dendrymery na powierzchni których chelatowane były jony gadolinu [22, 23]. Badania wykazały, iż zastosowanie dendrymerów polepszyło jakość kontrastowania.

## II-2. Rola dendrymerów w terapii genowej

Terapia genowa jest nowym pomysłem na leczenie chorób o podłożu genetycznym. Polegać ma na wprowadzeniu do komórek pacjenta genu odpowiadającego za syntezę białka, którego niedobór, lub brak, są przyczyną choroby. W przeprowadzonych do tej pory próbach gen przed dostarczeniem do komórki włączany był do plazmidu, który czasem dodatkowo wyposażano w sekwencje kontrolujące ilość, okres syntezy, oraz lokalizację białka. Wyróżnia się terapię *ex vivo* – gdy pobrane z ciała pacjenta komórki są transfekowane, a następnie wszczepiane ponownie, oraz *in vivo* – gdy czynnik transfekujący podawany jest do organizmu pacjenta.

### II-2-1. Najczęściej stosowane wektory

Jednym z podstawowych problemów terapii jest efektywne wprowadzenie materiału genetycznego do komórki. Obecnie znanych jest kilka metod. Jedną z nich jest zastosowanie wirusów. Przebadano pod tym kątem takie ich rodzaje, jak, m.in. retrowirus i adenowirus. Wektory retrowirusowe dają możliwość wprowadzenia genów do komórek gospodarza na stałe, jako że włączają swój materiał genetyczny do materiału komórki. Taka stała integracja zmniejsza jednak możliwości przerwania terapii w przypadku wystąpienia efektów ubocznych, ponadto może powodować aktywację onkogenów lub inaktywację genów supresji nowotworowej. Adenowirusy pozba-

wione są tych właściwości, ale za to powodują zwykle odpowiedź immunologiczną organizmu i to ogranicza ich zastosowanie w przypadku, gdy dostarczenie genu musi być co jakiś czas powtarzane. W efekcie prób zastosowania terapii genowej z wykorzystaniem wektorów wirusowych zanotowano sukcesy, jak na przykład wprowadzenie do białych krwinek dziewczynki cierpiącej na zespół niedoboru odporności brakującego genu deaminazy adenozykowej [24]. Wiąże się z nią niestety również porażka, jak śmierć we wrześniu 1999-ego roku chłopca, u którego za pomocą wektorów adenowirusowych starano się usunąć dziedziczny niedobór karbamoiltransferazy ornitynowej. Nastąpiła wówczas silna reakcja odpornościowa na adenowirusy [25]. W związku z potencjalnymi, oraz faktycznymi zagrożeniami ze strony wektorów wirusowych, szuka się innych sposobów dostarczania genów do komórek.

Należą do nich metody oparte na kompleksach liposomów z DNA. Stosuje się w tym celu liposomy utworzone z lipidów kationowych i fosfatydylocholino - w celu zrównoważenia ujemnych ładunków DNA. Badania dowiodły jednak, że wyższą skuteczność transfekcji osiąga się wykorzystując tzw. liposomy czułe na pH (ang. *pH-sensitive*), czyli takie, które formuje się z fosfatydyloetanolaminy [26]. Te liposomy ulegają fuzji z błoną endosomalną łatwiej niż oparte na fosfatydylocholinie.

Inną ciekawą metodą jest dostarczanie DNA w postaci kompleksów z polipeptydami. Najczęściej stosuje się polilizynę ze względu na dodatni ładunek tworzącego ją aminokwasu. Peptydy te są dodatkowo łączone z ligandami, takimi jak asjaloglikoproteiny, transferyna, insulina czy kwas foliowy, których zadaniem jest rozpoznawanie receptorów powierzchniowych zaangażowanych w proces endocytozy. Ta ostatnia cecha umożliwia również miejscowo specyficzne dostarczanie genu. W tej metodzie głównym czynnikiem ograniczającym transfer genu do komórki jest konieczność opuszczenia pęcherzyka endocytarnego przez kompleks DNA/peptyd. Jednak duża efektywność transfekcji za pomocą wirusów skłoniła badaczy do wykorzystania białek ich płaszcza do przyspieszenia tego procesu. I tak np. dołączenie do kompleksów peptydu otrzymanego z N-terminalnego fragmentu glikoproteiny płaszcza wirusa grypy spowodowało silny wzrost wydajności transfekcji *in vitro* [27].

## II-2-2. Dendrymery jako wektory

Ostatnie lata przyniosły wreszcie zainteresowanie dendrymerami jako nośnikami dla DNA w procesie

transfekcji. Stosowane są w tym przypadku dendrymery o terminalnych grupach aminowych, które w pH fizjologicznym posiadają ładunek dodatni i dzięki temu tworzą kompleksy z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi DNA. Kompleksy te są, podobnie jak inne wcześniej wspomniane czynniki transfekcyjne, wprowadzane do komórki na drodze endocytozy.

Zespół B i e l i Ń s k i e j przeprowadził badania nad transfekcją *in vitro* wykorzystując dendrymery poliamidoaminowe [28]. Za ich pomocą udało się wprowadzić do komórek plazmid zawierający gen lucyferazy i uzyskać trwałą (4-6 miesięcy) jego ekspresję. Później blokowano tę ekspresję za pomocą oligonukleotydów antysensownych wprowadzanych do komórek również przy udziale dendrymerów. Wykazano, że efektywność transfekcji zależy od generacji dendrymeru (najwyższą uzyskano dla generacji 7), oraz stosunku liczby grup fosforanowych DNA do liczby terminalnych grup aminowych dendrymeru (najwyższa przy stosunku 1:10). Jednocześnie cytotoksyczność kompleksów DNA/dendrymer generacji 7, w stężeniach stosowanych do transfekcji okazała się niższa od innych wykorzystywanych w tym celu czynników, tj. DEAE dekstran oraz Lipofectamina (liposomy oparte na lipidach kationowych). Również inne badania potwierdzają większą wydajność transfekcji, gdy stosuje się dendrymery wyższych generacji oraz gdy w kompleksie jest nadmiar grup aminowych [29]. Dużą skuteczność wykazują też częściowo zdegradowane (ang. *fractured*) dendrymery poliamidoaminowe oraz dendrymery polietylenoiminowe. Degradację dendrymerów poliamidoaminowych uzyskuje się poprzez solwolizę wiązań amidowych. Eksperymenty nad transfekcją *in vivo* pokazały większą efektywność wymienionych dwóch grup dendrymerów w stosunku do liposomów formowanych z lipidów kationowych [30]. Do tworzenia kompleksów z DNA wykorzystuje się również polilizynowe dendrony (ich budowa przypomina jedną, rozbudowaną gałąź dendrymeru) [31]. Kompleksy te charakteryzują się dużą stabilnością i odpornością na procesy degradacji, co może przedłużyć czas trwania DNA w warunkach fizjologicznych.

Wykazano możliwość transfekcji zarówno *in vitro* jak i *in vivo* komórek skóry za pomocą kompleksów DNA/dendrymer przyłączonych do biodegradowalnych membran poli(DL-laktydo-koglikozydowych) bądź opartych na pochodnych celulozy, kolagenu czy fibronektyny [32].

Dużą wydajność transferu genów za pomocą wyższych generacji dendrymerów poliamidoaminowych

związana jest prawdopodobnie m.in. z trwałością kompleksów, jakie tworzą z DNA. Cecha ta jest wynikiem ich dużego dodatniego ładunku powierzchniowego, sferycznego kształtu, oraz średnicy zbliżonej do średnicy histonów [33]. Dane uzyskane za pomocą skaningowego mikroskopu sił pozwalają stwierdzić, że kuliste cząsteczki dendrymeru są otoczone przez DNA [34]. Zwraca się też uwagę na to, że powierzchnia błony komórkowej oraz endosomu posiada ujemny ładunek pochodzący od niektórych lipidów, glikolipidów, czy białek. Posiadanie przez kompleksy DNA/dendrymer nadmiarowego ładunku dodatniego może więc ułatwiać ich oddziaływanie z tymi strukturami [35]. Postulowana jest również zdolność dendrymerów do buforowania środowiska endosomu, wynikająca z dużej liczby nieuprotynowanych drugo- i trzeciorzędowych grup aminowych [36]. Ich uprotynowanie ma powodować osmotyczne zwiększanie się objętości cząstek i w konsekwencji powodować destabilizację błony endosomu [37]. W a g n e r nazywa dendrymery polietylenoiminowe ze względu na tę właściwość „protonową gąbką”. Jednocześnie zbuforowanie kwaśnego (pH 5-6) środowiska endosomu ma chronić DNA przed degradacją. Zwraca się również uwagę na możliwość dopasowania cząstki dendrymeru do DNA oraz białek powierzchniowych komórki. W przypadku dendrymerów wyższych generacji jest to utrudnione ze względu na dużą gęstość grup powierzchniowych. Dlatego wyższą wydajność transfekcji osiąga się dla wspomnianych wcześniej częściowo zdegradowanych dendrymerów. Takie cząstki, w których 17-33% gałęzi jest „przyciętych”, wykazują większą giętkość w warstwach powierzchniowych i dzięki temu łatwiej asocjują z DNA czy białkami zaangażowanymi w proces endocytozy [38].

Pewną przeszkodę w transfekcji *in vivo* stanowi może oddziaływanie kompleksów DNA/dendrymer z glikozoaminoglikanami, polisacharydami o złożonej budowie, występującymi w substancji międzykomórkowej. Związki te posiadają ładunek ujemny pochodzący od licznych reszt karboksylowych i siarczanowych. Badania dowiodły, że dodanie glikozoaminoglikanów do układu, w którym prowadzono transfekcję *in vitro* za pomocą liposomów kationowych, częściowo zdegradowanych dendrymerów poliamidoaminowych oraz dendrymerów polietylenoiminowych, gwałtownie obniżało jej skuteczność w przypadku dwóch ostatnich grup związków [39]. Autorzy badań przypuszczają, że jest to wynik utracenia przez kompleksy DNA dendrymer właściwości buforujących, o których wspomniano wcześniej, wskutek oddziaływań z glikozyaminoglikanami. Aby po-

lepszyć efektywność transfekcji zsyntetyzowano dendrymery poliamidoaminowe z przyłączonymi  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstrynami [40, 41].

### III. Toksyczność dendrymerów

W obliczu rosnących możliwości zastosowania dendrymerów do celów biomedycznych kluczowym problemem staje się poznanie ich oddziaływania z układami biologicznymi.

R o b e r t s i wsp. badali toksyczność dendrymerów poliamidoaminowych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [42]. Badania cytotoksyczności dendrymerów na fibroblastach chomika chińskiego były przeprowadzone dla trzech generacji: trzeciej, piątej i siódmej. Wyniki dowiodły, iż przeżywalność komórek silnie zależy od stężenia dendrymerów, jego generacji oraz czasu ekspozycji. Obserwowano wzrost toksyczności dendrymerów wraz ze wzrostem generacji, wzrostem stężenia i wydłużaniem czasu kontaktu z komórkami.

Badania *in vivo* były przeprowadzone na myszach Swiss-Webster, którym podawano w zastrzykach dendrymery rozpuszczone w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej. Stosowano trzy stężenia w przeliczeniu na masę ich ciała:  $5 \cdot 10^{-6}$  mmol/kg,  $5 \cdot 10^{-5}$  mmol/kg oraz  $5 \cdot 10^{-4}$  mmol/kg. Ogólna kondycja zwierząt podczas sześciomiesięcznej obserwacji była dobra. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w ciężarze zwierząt poddawanych iniekcjom w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. W pobranych próbkach wątroby stwierdzono jednak występowanie licznych wakuoli. Ten sam zespół zbadał stopień akumulacji dendrymerów w różnych organach. Podawane dendrymery znakowane były węglem  $^{14}\text{C}$ . W przypadku wszystkich badanych generacji zawartość dendrymerów we krwi po dwóch godzinach od podania była bliska zeru. Generacja trzecia wykazywała największą akumulację w nerkach i śledzionie. Zarówno generacja piąta jak i siódma silnie akumulowały się w trzustce. Po czterech godzinach od podania dendrymerów generacji siódmej zaobserwowano ich wysokie stężenie w mocz.

Szersza grupa dendrymerów była testowana w badaniach M a l i k a i wsp. [43]. Oprócz całościowych generacji dendrymerów poliamidoaminowych (G1, G2, G3 i G4) badali oni również generacje połówkowe zawierające na powierzchni grupy karboksylowe (G1.5, G2.5, G3.5, G5.5, G7.5 i G9.5) oraz dendrymery polipropylenoiminowe o grupach aminowych (G2, G3, G4) i grupach karboksylowych (G1.5,



G2.5, G3.5) na powierzchni. Następnie badali dendrymery karbokrzemowe z otoczką polietylenową (G1, G2) i dendrymery polieterowe o karboksylowych grupach powierzchniowych (G0, G2). Żywotność komórek linii B16F10, CCRF oraz HepG2 była oceniana na podstawie metody z MTT, a wpływ na erythrocyty na podstawie pomiaru stopnia hemolizy. Wyniki ich eksperymentów potwierdziły, iż dendrymery kationowe posiadające na powierzchni grupy aminowe są cytotoksyczne. Ponadto powodują one zmiany morfologiczne erythrocytów, prowadząc do hemolizy. Niemniej w porównaniu z innymi polimerami kationowymi dendrymery poliamidoaminowe są znacznie mniej toksyczne. Takie badania porównawcze były prowadzone pod kątem zastosowania polimerów kationowych w terapii genowej [44]. Autorzy sugerują, że globularna struktura dendrymerów może być bezpośrednią przyczyną ich większej niż dla innych polimerów biokompatybilności. Z publikacji Malika i wsp. wynika, iż anionowe dendrymery posiadające na powierzchni grupy karboksylowe oraz dendrymery z otoczką polietylenową nie są cytotoksyczne oraz nie mają działania hemolitycznego w szerokim zakresie stężeń [43]. Wyniki te zostały potwierdzone przez dalsze badania, z których wynika, iż otoczenie dendrymerów łańcuchami laurowymi również zmniejsza ich toksyczność [45].

Zespół Malika stosując dendrymery wyznakowane jodem  $^{125}\text{I}$  badał szybkość usuwania ich z krwiobiegu [43]. Generacje całościowe dendrymerów poliamidoaminowych (G3 i G4) po godzinie od podania były obecne we krwi jedynie w 2% wyjściowej dawki, tymczasem generacje połówkowe (G2.5, G3.5 i G5.5) wykazywały w tym samym czasie od 10 do 20 razy wyższe stężenie we krwi.

#### IV. Podsumowanie

Ostatnie lata przyniosły wzmożone zainteresowanie zastosowaniem dendrymerów w medycynie ze szczególnym naciskiem położonym na możliwą do spełnienia rolę tych polimerów jako nośników materiału genetycznego i cząsteczek transportujących dla leków. Autorzy wielu prac o charakterze przeglądowym podkreślają duże potencjalne możliwości takich zastosowań dla dendrymerów [46]. Precyzyjna struktura dendrymerów oraz ich wymiary czynią z nich najlepsze jak dotychczas syntetyczne odpowiedniki białek i wirusów [47]. Dendrymery mają wiele zalet i są niezwykle obiecującymi substancjami, niemniej jednak daleko jest do tego, by mogły one spełnić wszystkie pokładane w nich nadzieje. Prawie dwadzieścia lat po uzyskaniu pierwszych

dendrymerów, ich synteza jest wciąż trudna i pracochłonna, wiele jest też niewiadomych odnośnie ich toksyczności i wpływu na układy biologiczne.

Artykuł otrzymano 20 października 2003  
Zaakceptowano o druku 21 grudnia 2003

#### Piśmiennictwo

1. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J.R., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. (1985) *Polym J* 17: 117-132
2. Newkome G.R., Yao Z.Q., Baker G.R., Gupta V.K. (1985) *J Org Chem* 50: 2003-2006
3. Caminati G., Turro N.J., Tomalia D.A. (1990) *J Am Chem Soc* 112: 8515-8522
4. Fischer M., Vögtle F. (1999) *Angew Chem Int Ed* 38: 884-905
5. Fréchet J.M.J. (1994) *Science* 263: 1710-1715
6. Newkome G.R., Moorefield C.N., Baker G.R., Saunders M.J., Grossman S.H. (1991) *Angew Chem Int Ed* 30: 1178-1180
7. Twyman L.J., Beezer A.E., Esfand R., Hardy M.J., Mitchell J.C. (1999) *Tetrahedron Lett* 40: 1743-1746
8. Beezer A.E., King A.S.H., Martin I.K., Mitchell J.C., Twyman L.J., Wain C.F. (2003) *Tetrahedron* 59: 3873-3880
9. Jansen J.F.G.A., de Brabander van den Berg E.M.M., Meijer E.W. (1994) *Science* 266: 1226-1229
10. Jansen J.F.G.A., Meijer E.W. (1995) *J Am Chem Soc* 117: 4417-4418
11. Kojima C., Kono K., Maruyama K., Takagishi T. (2000) *Bioconjugate Chem* 11: 910-917
12. Bhadra T., Bhadra S., Jain S., Jain N.K. (2003) *Int J Pharm* 257: 111-124
13. Liu M., Kono K., Fréchet J.M.J. (2000) *J Controlled Release* 65: 121-131
14. Liu M., Fréchet J.M.J. (1999) *Polym Mater Sci Eng* 80: 167-168
15. Zanini D., Roy R. (1998) *J Org Chem* 63: 3486-3491
16. Zhuo R.X., Du B., Lu Z.R. (1999) *J Controlled Release* 57: 249-257
17. Roberts J.C., Adams Y.E., Tomalia D., Mercer-Smith J.A., Lavalley D.K. (1990) *Bioconjugate Chem* 2: 305-308
18. Barth R.F., Adams D.M., Soloway A.H., Alam F., Darby M.V. (1994) *Bioconjugate Chem* 5: 58-66
19. Chauhan A.S., Sridevi S., Chalasani K.B., Jain A.K., Jain S.K., Jain N.K., Divan P.V. (2003) *J Controlled Release* 90: 335-343
20. Kolhe P., Misra E., Kannan R.M., Kannan S., Lieh-Lai M. (2003) *Int J Pharm* 259: 143-160
21. Konda S.D., Aref M., Wang S., Brechbiel M., Wiener E.C. (2001) *Magn Reson Mater Phys Biol Med* 12: 104-113
22. Wiener E.C., Auteri F.P., Chen J.W., Brechbiel M.W., Gansow O.A., Schneider D.S., Belford R.L., Clarkson R.B., Lauterbur P.C. (1996) *J Am Chem Soc* 118: 7774-7782
23. Bryant L.H., Brechbiel M.W., Wu C., Bulte J.W.M., Herynek V., Frank J.A. (1999) *J Magn Reson Imaging* 9: 348-352
24. Tomlinson E., Rolland A.P. (1996) *J Controlled Release* 39: 357-372
25. Beardsley T. (2000) *Świat Nauki* 104: 23-24
26. Legendre J.Y., Szoka Jr. F.C. (1992) *Pharm Res* 9: 1235-1242
27. Wagner E., Zatloukal K., Cotten M., Kiriappos H., Mechtler K., Curiel D.T., Birnstiel M.L. (1992) *Proc Natl Acad Sci* 89: 6099-6103
28. Bielinska A.U., Kukowska-Latallo J.F., Johnson J., Tomalia D.A., Baker J.R. (1996) *Nucleic Acids Res* 24: 2176-2182
29. Haensler J., Szoka Jr. F.C. (1993) *Bioconjugate Chem* 4: 372-379
30. Turunen M.P., Hiltunen M.O., Ruponen M., Virkamäki L., Szoka Jr. F.C., Urtti A., Ylä-Herttuala S. (1999) *Gene Therapy* 6: 6-11

31. Ramaswamy C, Sakthivel T, Wilderspin AF, Florence AT (2003) *Int J Pharm* 254: 17-21
32. Bielinska AU, Yen A, Wu HL, Zahos KM, Sun R, Weiner ND, Baker Jr. JR, Roessler BJ (2000) *Biomaterials* 21: 877-887
33. Richmond TJ, Fink JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1994) *Nature* 311: 532-537
34. Gossl I, Shu L, Schluter AD, Rabe JP (2002) *J Am Chem Soc* 124: 6860-6865
35. Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6982-6986
36. Tang MX, Redeman CT, Szoka FC (1996) *Bioconjugate Chem* 7: 703-714
37. Wagner E (1998) *J. Controlled Release* 53: 155-158
38. Shah DS, Sakthivel T, Toth I, Florence AT, Wilderspin AF (2000) *Int J Pharm* 208: 41-48
39. Ruponen M, Ylä-Herttuala S, Urtti A (1999) *Biochim Biophys Acta* 1415: 331-341
40. Arima H, Kihara F, Hirayama F, Uekama K (2001) *Bioconjugate Chem* 12: 476-484
41. Roessler BJ, Bielinska AU, Janczak K, Lee I, Baker JR (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 283: 124-129
42. Roberts JC, Bhargat MK, Zera RT (1996) *J Biomed Material Res* 30: 53-65
43. Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener J-W, Meijer EW, Paulus W, Duncan, R (2000) *J Controlled Release* 65: 133-148
44. Fisher D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T (2003) *Biomaterials* 24: 1121-1131
45. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A (2003) *Int J Pharm* 252: 263-266
46. Domański DM, Faber M (2000) *Postepy biochemii* 46: 234-246
47. Esfand R, Tomalia DA (2001) *Drug Discovery Today* 6: 427-436

# Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi

## Plant receptor histidine kinases and multistep phosphate relay to response regulators

STANISŁAW KOWALCZYK<sup>1</sup>, ANNA HETMANN<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Bakteryjne i drożdżowe dwuskładnikowe systemy regulacyjne
  - II-1. Domeny białkowe pośredniczące w przepływie fosforanu
- III. Roślinne homologi bakteryjnych kinaz histydynowych
  - III-1. Rodzina receptorów etylenu
    - III-1.1. Szlak transdukcji sygnału etylenowego
  - III-2. Kinazy histydynowe z rodziny AHK
    - III-2.1. Rodzina receptorów cytokinin
    - III-2.2. AtHK1 - roślinnym osmosensorem
  - III-3. Fitochromy - kinazami białkowymi regulowanymi przez światło
- IV. Białka tworzące dwuskładnikowe systemy regulacyjne w *Arabidopsis thaliana*
  - IV-1. Białka AHP
  - IV-2. Regulatory i pseudoregulatory odpowiedzi
  - IV-3. Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptorowe kinazy histydynowe
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** APRR – białko podobne do regulatora odpowiedzi (ang. *Arabidopsis Pseudo-Response Regulator*); ARR – regulator odpowiedzi *A. thaliana* (ang. *Arabidopsis Response Regulator*); CC – domena uczestnicząca w oddziaływaniach białko-białko (ang. *coiled coil*); CHASE – domena wiążąca cytokininę (ang. *Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular*); *cki* – mutant *A. thaliana* (ang. *cytokinin independent*); *cre1* – mutant *A. thaliana* (ang. *cytokinin response1*); *ctr1* – mutant *A. thaliana* (ang. *constitutive triple response*); *EIL* – geny podobne do *EIN3* (ang. *EIN-like genes*); *ein2* – mutant *A. thaliana* (ang. *ethylene insensitive*); EREBP – białko wiążące się z elementem odpowiedzi etylenowej (ang. *Ethylene Response Element Binding Protein*); *etr1* – mutant *A. thaliana* (ang. *ethylene resistant*); *etr2* – mutant *A. thaliana* (ang. *ethylene response2*); GAF – domena występująca m.in. w KH (ang. *cGMP binding phosphodiesterases, adenylate cyclases, transcription factor FhlA*); HKRD – subdomena w białku fitochromowym (ang. *Histidine Kinase-Related Domain*); HPT – domena uczestnicząca w przenoszeniu fosforanu (ang. *histidine-containing phospho-transfer domain*); IP – izopentenylo-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Bacterial and yeast two-component regulatory systems
  - II-1. Protein domains involved in phosphate relay
- III. Plant homologs of bacterial histidine kinases
  - III-1. Ethylene receptor family
    - III-1.1. Ethylene signal transduction pathway
  - III-2. AHK family of histidine kinases
    - III-2.1. Cytokinin receptor family
    - III-2.2. AtHK1 as an osmosensor
  - III-3. Phytochromes as light-modulated protein kinases
- IV. Two-component signaling elements in *Arabidopsis thaliana*
  - IV-1. Histidine-containing phosphotransfer proteins
  - IV-2. Response regulators and response regulator-like proteins
  - IV-3. Receptor histidine kinases signaling pathways
- V. Concluding remarks

denina; KH – kinaza histydynowa; 1-MCP – 1-metylocyklopropen (antagonista etylenu); NDPK2 – kinaza nukleozydodifosforanowa2 (ang. *Nucleoside Diphosphate Kinase2*); PIF3 – białko oddziałujące z fitochromem (ang. *Phytochrome-Interacting Factor3*); PKS1 – białko fosforylowane przez fitochrom (ang. *Phytochrome Kinase Substrate1*); PRD – subdomena w białku fitochromowym (ang. *PAS repeat domain*); *ran1* – mutant *A. thaliana* (ang. *responsive-to-antagonist1*); RL – domena podobna do odbiornika (ang. *receiver-like*); RR – regulator odpowiedzi (ang. *response regulator*); *toc* – mutant *A. thaliana* (ang. *timing of CAB expression*); *wol* – mutant *A. thaliana* (ang. *woden leg*)

### I. Wstęp

Organizmy jedno- i wielokomórkowe odbierają różnorodne bodźce i odpowiednio reagują na zmiany zachodzące w środowisku zewnętrznym. Dzięki badaniom z połowy lat 80-tych wiemy, że organizmy prokariotyczne wykorzystują w tym celu układy regulacyjne nazywane dwuskładnikowymi systemami transdukcji sygnałów. Prototypowy dwuskładnikowy system regulacyjny tworzy para białek, w której jedno jest kinazą histydynową, a drugie regulatorem

<sup>1</sup>Dr hab., prof. UMK, <sup>2</sup>mgr, Zakład Biochemii Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, e-mail: ania stef @ chem.uni.torun.pl



odpowiedzi. Transdukcja sygnału w takim systemie polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z receptora na regulator odpowiedzi. W niektórych bakteryjnych systemach regulacyjnych pojawiają się jednak dodatkowe moduły pomostowe pośredniczące w przepływie grupy fosforanowej z kinazy histydynowej na regulator odpowiedzi. Modułowa struktura łańcucha transdukcji sygnału sprzyjała konstruowaniu różnorodnych systemów sygnałnych, które w rozwoju ewolucyjnym pojawiły się zarówno u niższych, jak i wyższych eukariontów. Białka homologiczne z poszczególnymi elementami bakteryjnych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych zidentyfikowano i częściowo poznano w drożdżach, *Neurospora crassa*, *Dictyostelium discoideum* [1,2], a także w kilku roślinach wyższych [3,4]. Jednak nie sprawdziły się pierwotne przypuszczenia o powszechności występowania dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w organizmach eukariotycznych, jak się bowiem okazało genomy *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, myszy, a także człowieka nie zawierają genów kinaz histydynowych.

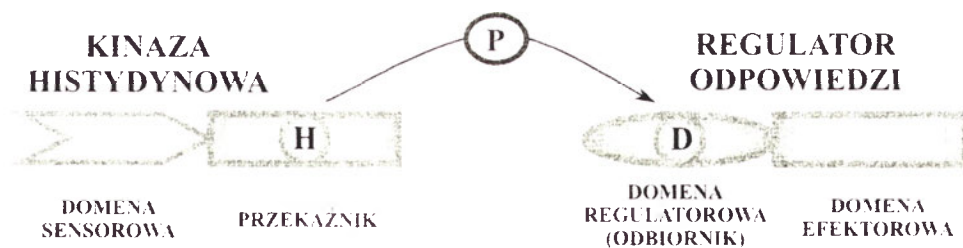
Niniejsza praca jest próbą podsumowania osiągnięć związanych z badaniami roślinnych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, które zostały zapoczątkowane przed 10-ciu laty sklonowaniem genu *A. thaliana* kodującego kinazę histydynową.

## II. Bakteryjne i drożdżowe dwuskładnikowe systemy regulacyjne

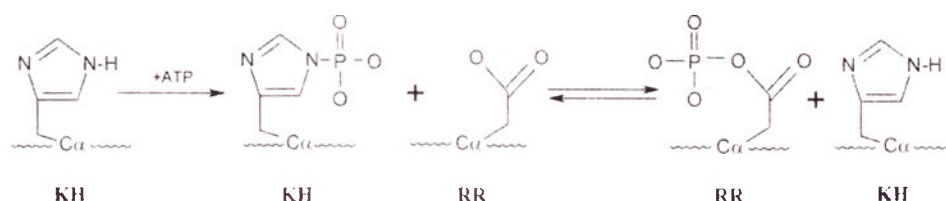
Najprostszy dwuskładnikowy system regulacyjny tworzy para białek, z których jedno jest sensorową kinazą histydynową (KH), a drugie regulatorem odpowiedzi (RR) (ang. *response regulator*) (Ryc. 1A). Domena N-końcowa KH, zlokalizowana zwykle w błonie lub położona po zewnętrznej stronie błony komórkowej, odbiera bodziec chemiczny lub fizyczny. Percepcji sygnału przez domenę sensorową towarzyszy wzrost bądź zahamowanie aktywności katalitycznej w wewnątrzkomórkowej części kinazy określanej jako przekaźnik (ang. *transmitter*). Aktywacja kinazy prowadzi do autofosforylacji pierścienia imidazolowego histydyny i utworzenia wysokoenergetycznego wiązania fosforoamidowego, którego hydrolizie towarzyszy zmiana energii swobodnej rzędu -12 do -14 kcal/mol [5]. Przepływ informacji w dwuskładnikowym układzie sygnałnym polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z przekaźnika na resztę kwasu asparaginowego położoną w domenie regulatorowej (odbiorniku) RR i utworzeniu wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego (Ryc. 1B).

Przykładem typowego dwuskładnikowego systemu regulacyjnego u *E. coli* jest układ sygnałny, w którym kinaza histydynowa EnvZ pełni funkcję osmosensora, a regulator odpowiedzi OmpR jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów *OmpF* i *OmpC* (Ryc. 2A) [6]. Informacja o zmianach ciśnienia osmotycznego, odbierana przez domenę sensorową kinazy EnvZ, jest przekazywana na OmpR, który reguluje syntezę poryn OmpF i

A

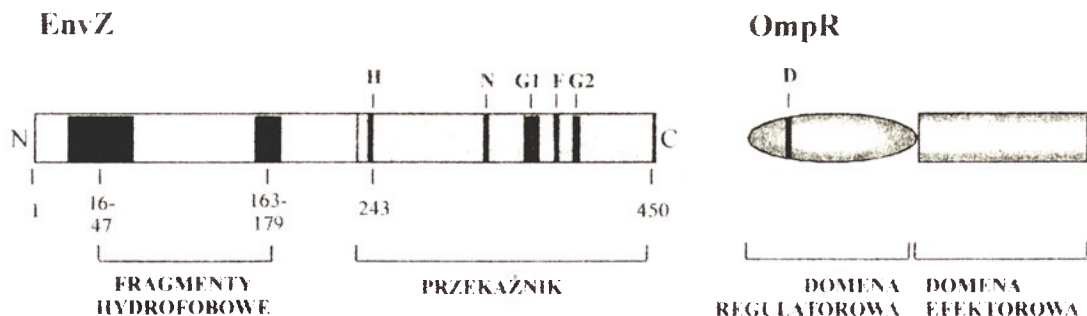


B

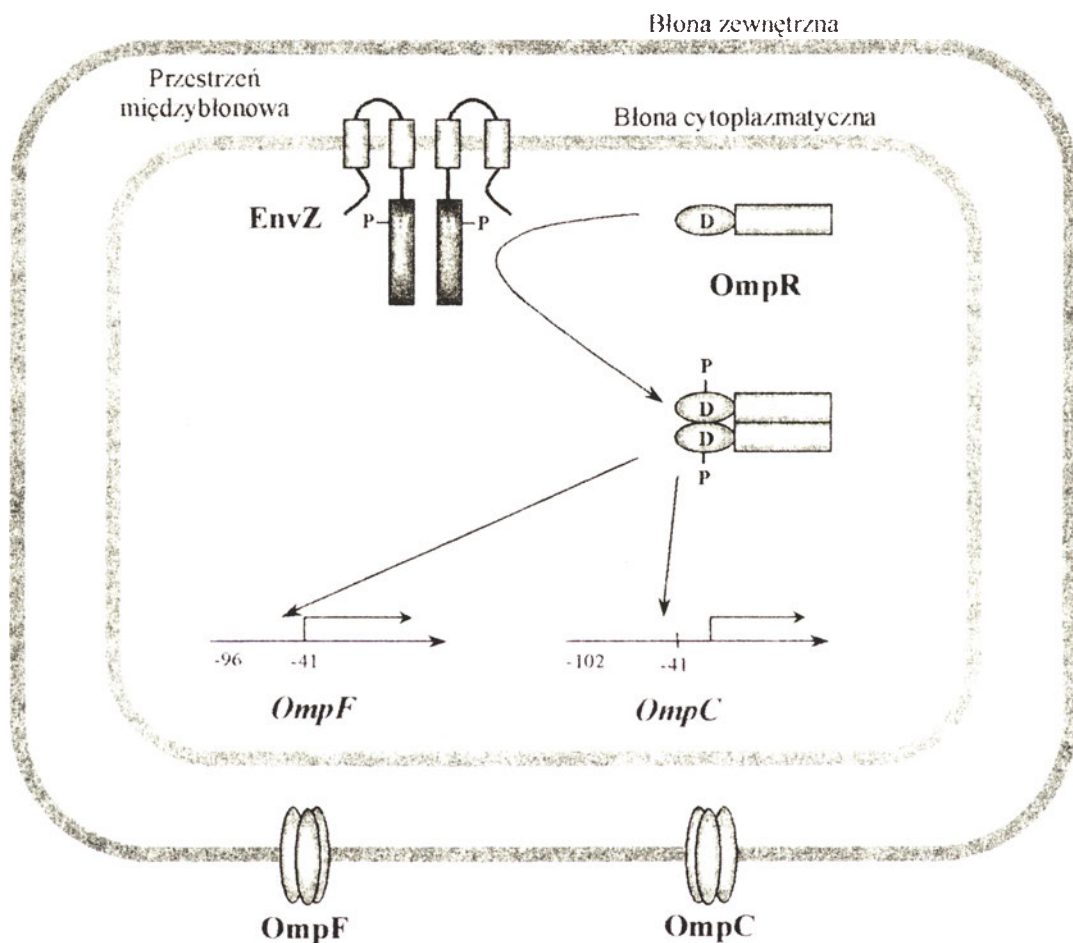


**Ryc. 1.** Schemat dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału. A – transfer grupy fosforanowej z histydyny położonej w przekaźniku KH na resztę kwasu asparaginowego zlokalizowaną w domenie regulatorowej RR; B – autofosforylacja pierścienia imidazolowego histydyny i transfer fosforanu na resztę kwasu asparaginowego.

A



B



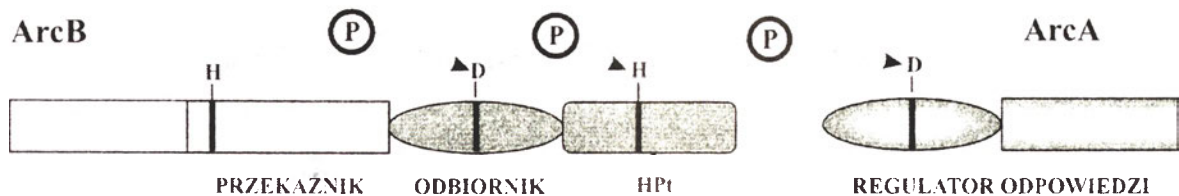
**Ryc. 2.** Schemat budowy i zasada działania bakteryjnego systemu regulacyjnego EnvZ-OmpR. A – schemat budowy kinazy histydynowej EnvZ i regulatora odpowiedzi OmpR; B – system regulacyjny EnvZ-OmpR kontroluje syntezę porów OmpF i OmpC w odpowiedzi na zmiany ciśnienia osmotycznego. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [6,7,10,12], zmodyfikowano).

OmpC budujących w zewnętrznej błonie dwa rodzaje kanałów wodnych o różnej średnicy porów (Ryc. 2B). Homodimer kinazy EnvZ, zlokalizowany w błonie wewnętrznej, wykazuje w warunkach małego ciśnienia osmotycznego nieznaczną aktywność kinazową i wysoką aktywność fosfatazową względem fosfoasparaginianu w OmpR. Rosnącemu ciśnieniu osmotycznemu towarzyszy wzrost aktywności kinazowej, krzyżowa fosforylacja reszt histydynowych w homodimerze osmosensora i transfer grupy fosforanowej z EnvZ na OmpR. Fosforylacja OmpR umożliwia jego dimeryzację oraz wymusza określone

zmiany konformacyjne w domenie efektorowej, które modyfikują powinowactwo RR do sekwencji promotorowych w genach *OmpF* i *OmpC*. Promotor genu *OmpF*, wykazujący duże powinowactwo do  $(OmpR\sim P)_2$ , aktywowany jest w warunkach małej osmolarności, podczas gdy ekspresja genu *OmpC*, którego promotor ma małe powinowactwo do  $(OmpR\sim P)_2$ , jest aktywowana dopiero wówczas, gdy wzrośnie stężenie  $(OmpR\sim P)_2$  [6,7].

Inne bakteryjne dwuskładnikowe systemy regulacyjne zawierają dodatkowe moduły, które pośredniczą w przepływie grupy fosforanowej między ki-

nazą histydynową a regulatorem odpowiedzi. Niektóre KH obok domeny przekaźnika zawierają w części C-końcowej domenę odbiornika występującą w RR i wtedy noszą one nazwę hybrydowych kinaz histydynowych [5]. W innych systemach regulacyjnych obecny jest jeszcze dodatkowy moduł HPt (ang. *histidine-containing phospho-transfer domain*), który może być zlokalizowany w części C-końcowej hybrydowej kinazy np. w kinazie ArcB u *E. coli* (Ryc. 3) lub w odrębnym białku [1].



Ryc. 3. Przepływ fosforanu w bakteryjnym systemie regulacyjnym ArcB/ArcA (wg [10]).

Genom *E. coli* zawiera 62 geny kodujące różne elementy dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, a wśród nich 29 genów kodujących KH, w tym tylko pięć kinaz typu hybrydowego. Pojedynczy gen koduje samodzielne białko zawierające domenę HPt, a 32 geny kodują RR [8]. Genomy innych bakterii zawierają różną liczbę genów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych i np. *Bacillus subtilis* ma ich 70, *Streptococcus pneumoniae* 27, *Helicobacter pylori* 11, *Haemophilus influenzae* 9, ale np. w komórkach *Mycoplasma genitalium* i *Methanococcus jannaschii* w ogóle jest brak kinaz histydynowych [9,10]. W każdym z poznanych układów regulacyjnych, niezależnie od stopnia jego komplikacji, przepływowi fosforanu z KH na RR towarzyszą zmiany w ekspresji genów lub inne swoiste reakcje wewnątrzkomórkowe takie jak np. regulacja ruchu wici, czy demetylacja chemoreceptorów [11]. Wyczerpujące omówienie kilku najlepiej poznanych bakteryjnych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracach przeglądowych [12,13].

Na początku lat 90-tych zidentyfikowano i sklonowano gen kodujący kinazę histydynową w komórkach drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*), przedstawiciela niższych eukariontów [14]. Odkrycie to zainicjowało poszukiwania podobnych systemów regulacyjnych w organizmach wyższych eukariontów i otworzyło atrakcyjne możliwości badania roślinnych elementów dwuskładnikowych systemów regulacyjnych wprowadzanych do odpowiednio zmutowanych komórek drożdży technikami in-

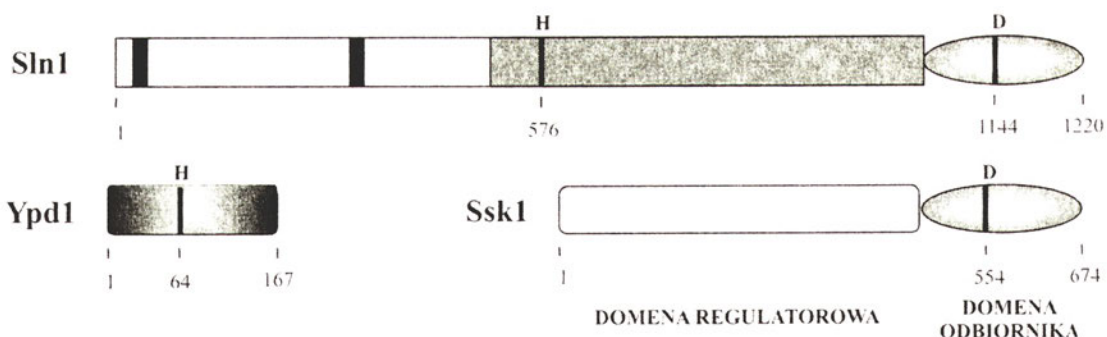
żynierii genetycznej (patrz podrozdziały III-1. i III-2.).

Drożdże pączkujące mają tylko jedną kinazę histydynową Sln1, jedno białko (Ypd1) zawierające domenę Hpt i dwa RR – Ssk1 i Skn7. Kinaza hybrydowa Sln1, pełniąca w drożdżach funkcję osmosensora, posiada w części N-końcowej domenę sensoryową, a w części wewnątrzkomórkowej domeny przekaźnika i odbiornika (Ryc.4A). Aktywna w warunkach małej osmolarności homodimeryczna kina-

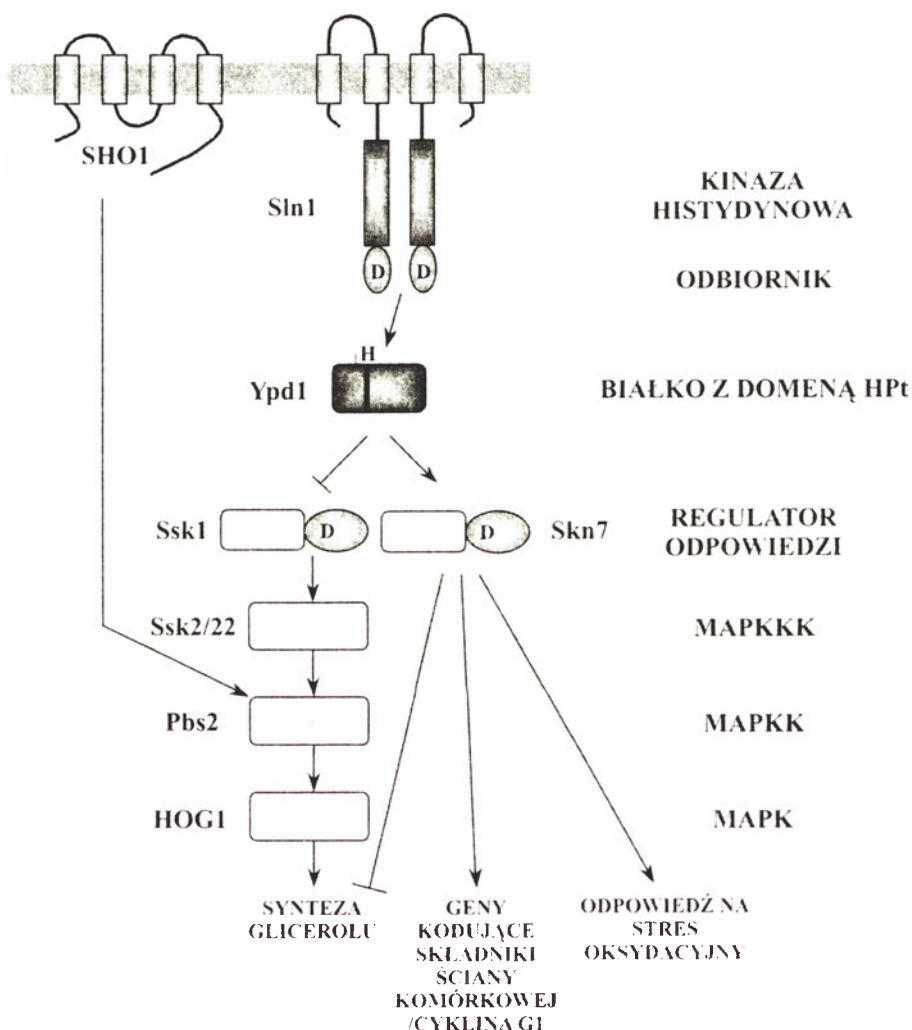
za Sln1 aktywuje łańcuch przepływu grupy fosforanowej z histydyny położonej w przekaźniku na resztę asparaginianu w domenie odbiornika, a stąd ponownie na resztę histydyny w białku Ypd1 [15,16]. Akceptorem fosforanu z Ypd1 może być jeden z regulatorów odpowiedzi – Ssk1 lub Skn7 (Ryc. 4B) [17]. Białko Ssk1 oddziałuje z N-końcową domeną regulatorową kinazy serynowo/treoninowej Ssk2/22 – pierwszym ogniwem w kaskadzie kinaz MAP. Wiązanie Ssk1 do Ssk2/22 może zachodzić jedynie wówczas, gdy reszta asparaginianu w domenie odbiornika Ssk1 jest nieufosforylowana. Efektem takiego oddziaływania są zmiany konformacyjne w Ssk2/22, którym towarzyszy aktywacja domeny kinazowej zlokalizowanej w części C-końcowej polipeptydu i fosforylacja Pbs2 (MAPKK). Tak więc, autofosforylacja Sln1 w warunkach „normalnej” osmolarności i przepływ fosforanu do regulatora odpowiedzi Ssk1 przeciwdziała wiązaniu Ssk1 do Ssk2/22, a tym samym powoduje hamowanie kaskady kinazy HOG1 [17]. Wzrost osmolarności środowiska hamuje aktywność kinazy Sln1, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu poziomu nieufosforylowanego regulatora odpowiedzi Ssk1 i aktywacji kinazy HOG. Zmiany osmolarności środowiska zewnątrzkomórkowego indukują odpowiednie reakcje adaptacyjne komórki, które m. in. polegają na regulacji biosyntezy glicerolu. Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za syntezę glicerolu w drożdżach jest cytozolowa dehydrogenaza 3-fosfoglicerolu kodowana przez gen *GPD1*, którego ekspresja jest aktywowana przez kinazę HOG1 [18]. Kinaza HOG1 może być również



A



B



**Ryc.4.** Drożdżowy dwuskładnikowy system regulacyjny Sln1-Ypd1-Ssk1. A - schemat budowy polipeptydów Sln1, Ypd1 i Ssk1 tworzących dwuskładnikowy system regulacyjny; B - przepływ fosforanu w układzie Sln1>Ypd1>Ssk1 reguluje syntezę glicerolu. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [1,10,14,15,16,17,20]).

aktywowana przez receptor SHO1, który jest sensorem dużej osmolarności (Ryc. 4B) [15].

Akceptorem fosforanu z Ypd1 może być także regulator odpowiedzi Skn7 uczestniczący w aktywacji ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę składników ściany komórkowej oraz genu cykliny G1 [19,20]. Regulator odpowiedzi Skn7 jest także zaangażowany w regulację ekspresji genów aktywowanych przez stres w szlaku niezależnym od kinazy histydynowej [20].

## II-1. Domeny białkowe pośredniczące w przepływie fosforanu

Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej białek tworzących dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnałów pozwoliła wyodrębnić szereg konserwatywnych domen uczestniczących w przepływie fosforanu [8-10,21]. Typowa transbłonowa kinaza histydynowa zawiera w regionie N-końcowym zewnątrzkomórkową domenę sensorową od-

dzieloną od cytoplazmatycznej części fragmentem hydrofobowym. W części wewnątrzkomórkowej, bezpośrednio po fragmencie transbłonowym, położony jest 40 – 180 aminokwasowy „łącznik”, w obrębie którego wiele KH zawiera motyw CC (ang. *coiled coil*) poprzedzający kasetę H [10]. Przekaznik, położony w części cytoplazmatycznej, zawiera domenę odpowiedzialną za dimeryzację oraz domenę katalityczną. Fragment zaangażowany w dimeryzację tworzą dwie przeciwnoległe helisy  $\alpha$ , które w homodimerze wbudowanym w błonę łączą się w „pęczek” czterech helis  $\alpha$ . Domena katalityczna przekaznika obejmuje cztery konserwatywne motywy (N, G1, F i G2) uczestniczące w wiązaniu nukleotydu. Motyw piąty (kasetka H), zawierający resztę histydyny ulegającej autofosforylacji, jest położony zwykle w obrębie domeny odpowiedzialnej za dimeryzację. Domena katalityczna KH wykazuje pewne strukturalne podobieństwo do ATPaz z rodziny GHF, obejmującej gyrazę B, Hsp90 i enzym naprawczy MutL [9]. Niektóre KH oprócz aktywności kinazowej posiadają także aktywność fosfatazową względem fosfoasparaginianu. Tak więc, wiązanie ligandu lub odbiór sygnału przez domenę sensorową poszczególnych kinaz może aktywować bądź hamować autofosforylację reszty histydyny, a także może zmieniać aktywność fosfatazową względem ufosforylowanej domeny odbiornika.

Domena HPT u prokariotów występuje stosunkowo rzadko, zwykle jako dodatkowy moduł w regionie C-końcowym hybrydowej KH np. w kinazie ArcB (Ryc. 3). Genomy organizmów eukariotycznych zawierają zwykle po kilka genów kodujących odrębne białka z domeną HPT utworzoną przez około 120 reszt aminokwasowych [1,3]. Domena HPT nie wykazuje aktywności kinazowej ani fosfatazowej, a jej funkcja polega jedynie na przenoszeniu grupy fosforanowej z asparaginianu położonego w domenie odbiornika hybrydowej kinazy histydynowej na resztę asparaginianu w RR. Struktura domeny HPT jest homologiczna z domeną odpowiedzialną za dimeryzację zlokalizowaną w przekazniku i podobnie jak w homodimerze KH tworzy ją „pęczek” czterech helis [8,10].

Białka RR w większości wypadków zawierają dwie domeny: N-końcową domenę regulatorową (odbiornik) i strukturalnie zróżnicowaną domenę efektorową położoną w części C-końcowej polipeptydu [8,9,22]. Domena regulatorowa, utworzona przez około 125 reszt aminokwasowych, katalizuje transfer fosforanu z histydyny na resztę asparaginianu położoną we własnym odbiorniku. Aktywność autofosforylacyjną RR, niezależną od aktywności KH,

potwierdzono doświadczalnie używając małych cząsteczkowych donorów fosforanu, takich jak acetylofosforan, karbamoilofosforan czy imidazolofosforan [10]. Większość RR katalizuje również autofosforylację reszty fosfoasparaginianu. Z funkcją katalityczną domeny regulatorowej związana jest jej rola regulacyjna w stosunku do domeny efektorowej. Oddziaływanie obu domen odbywa się za pośrednictwem rozległych zmian konformacyjnych towarzyszących powstawaniu wysokoenergetycznego wiązania acylofosforanowego [22,23]. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, iż zmiany aktywności białek towarzyszące powstawaniu wiązań fosfoestrowych pozostają raczej w związku z lokalnymi zmianami efektu elektrostatycznego. Wykrywanie ufosforylowanego RR jest bardzo trudne, ponieważ wiązanie acylofosforanowe jest wyjątkowo labilne i to niezależnie od pH. Dodatkowo, aktywność autofosfatazowa wielu regulatorów odpowiedzi skraca okres życia ufosforylowanych RR, który w większości przypadków trwa od kilku sekund do kilku minut.

Domena efektorowa wielu bakteryjnych RR zawiera sekwencje aminokwasowe tworzące struktury wiążące DNA. Spośród 32 regulatorów odpowiedzi kodowanych przez genom *E. coli* 25 pełni funkcje czynników transkrypcyjnych. W niektórych RR aktywacja domeny efektorowej polega na znoszeniu jej hamowania przez domenę regulatorową, w innych przypadkach fosforylacja domeny regulatorowej indukuje dimeryzację, oligomeryzację lub umożliwia oddziaływanie z innymi białkami lub DNA. W niektórych RR domena efektorowa wykazuje aktywność katalityczną np. aktywność metyloesterazową lub fosfodiesterazową względem cAMP, a pojedyncze RR w ogóle nie zawierają domeny efektorowej [1,10].

### III. Roślinne homologi bakteryjnych kinaz histydynowych

Genom *A. thaliana* zawiera 16 genów kodujących białka posiadające wszystkie bądź tylko niektóre motywy występujące w kinazach histydynowych, a ponadto 5 genów kodujących białka zawierające domenę HPT i 23 geny regulatorów odpowiedzi. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej roślinne homologi bakteryjnych kinaz histydynowych można podzielić na trzy rodziny [3,4,24-28]. Pierwszą rodzinę tworzą białka pełniące funkcję receptorów etylenu. Druga rodzina – AHK (ang. *Arabidopsis histidine kinase*) liczy sześć białek, spośród których trzy są receptorami cytokinin, a jedna jest osmosensorem. Rola pozostałych dwóch KH z tej ro-

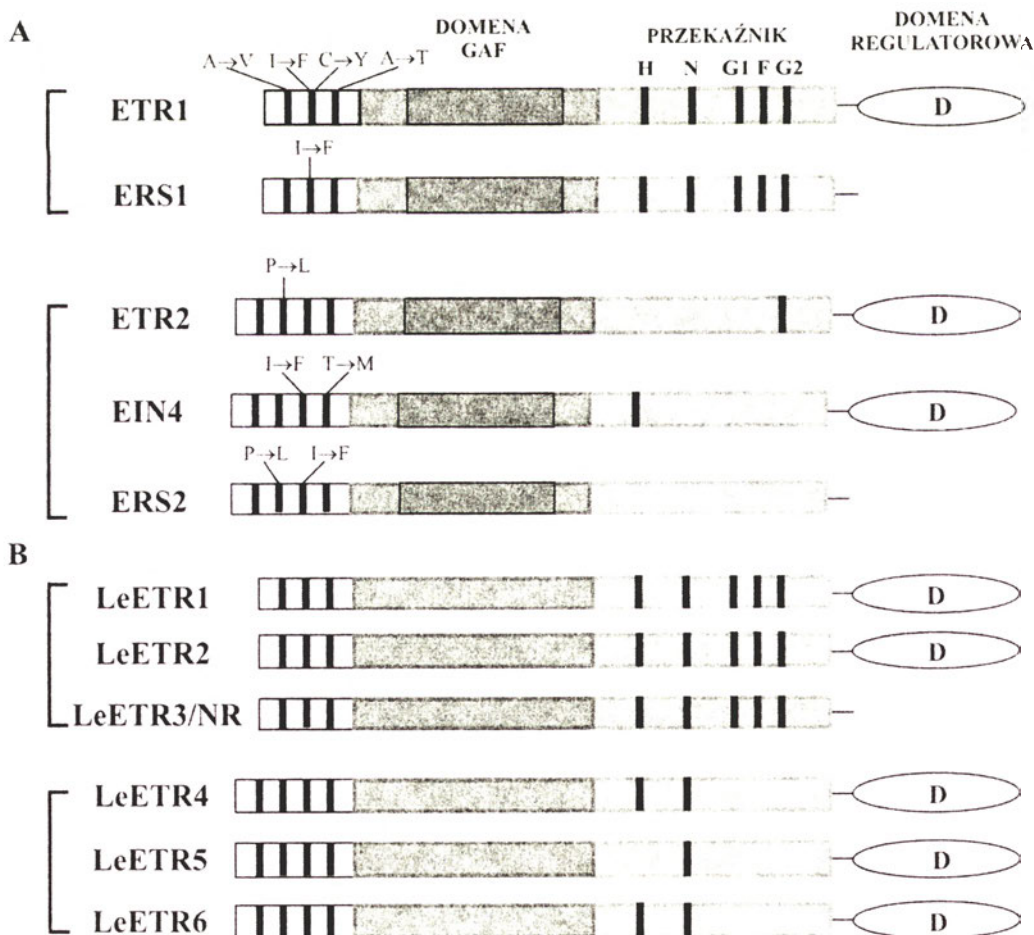
dziny wiązana jest również z percepcją sygnału cytokininowego, chociaż wyniki dotychczasowych badań wydają się tylko częściowo potwierdzać powyższą sugestię. Homologami KH są także białka fitochromowe, kodowane w *A. thaliana* przez 5 genów, które stanowią trzecią rodzinę KH [29].

### III-1. Rodzina receptorów etylenu

Na początku 90-tych lat wyselekcjonowano i scharakteryzowano kilka mutantów etylenowych rzodkiewnika m. in. mutantu niewrażliwego na etylen *etr1* (ang. *ethylene resistant*) [30]. Sklonowanie genu *ETR1* kodującego typową kinazę histydynową [31] zapoczątkowało przełom w poznawaniu receptorów etylenu i przyczyniło się do szybkiego rozwoju badań związanych z poznawaniem dwuskładnikowych systemów regulacyjnych u roślin. Osiągnięcia na tym polu zostały wyczerpująco omówione w licznych pracach przeglądowych opublikowanych w ostatnich kilku latach [30,32-39, 40, 41].

Gen *ETR1* koduje kinazę histydynową typu hybrydowego, która w części sensorowej ma trzy fragmenty hydrofobowe tworzące domenę trans-

blonową. W części wewnątrzkomórkowej *ETR1* posiada wszystkie motywy występujące w przekaźniku, a dodatkowo 125-cio aminokwasowy fragment zawierający motywy charakterystyczne dla domeny regulatorowej (Ryc.5A). W bibliotece genomowej za pomocą sondy cDNA komplementarnej z *ETR1* znaleziono gen *ERS1* (ang. *ethylene response sensor*) kodujący polipeptyd homologiczny z *ETR1* pozbawiony jednak domeny odbiornika [42]. S a k a i i wsp. [43] wyselekcjonowali kolejnego mutantu etylenowego *etr2* (ang. *ethylene response2*), u którego zmutowany gen koduje polipeptyd podobny do *ETR1*. Z kolei sondą hybrydyzacyjną zawierającą fragment *ETR2* zidentyfikowano dodatkowe dwa geny *EIN4* i *ERS2* [44]. Porównując sekwencję nukleotydową genów, liczbę i położenie intronów oraz analizując sekwencję aminokwasową kodowanych przez nie polipeptydów można w obrębie tych pięciu białek wyróżnić dwie podrodziny. *ETR1* i *ERS1* tworzą podrodzinę typowych kinaz histydynowych, podczas gdy *ETR2*, *EIN4* i *ERS2* stanowią odrębną podrodzinę białek, które w części N-końcowej mają dodatkowy czwarty fragment hydrofobowy, a w domenie przekaźnika posiadają sekwencję aminokwa-



Ryc. 5. Schemat budowy KH i polipeptydów homologicznych z KH pełniących funkcję receptorów etylenu. A polipeptydy podrodziny *ETR1* i *ETR2* *A. thaliana*; B polipeptydy homologiczne z *ETR1* i *ETR2* funkcjonujące jako receptory etylenu w pomidorze. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [3,31,38,39,42-44,46]).



sową odbiegającą w mniejszym lub większym stopniu od struktury pierwszorzędowej klasycznych KH (Ryc. 5A). Białko EIN4 ma konserwatywną resztę histydyny w motywie H, lecz nie posiada pozostałych motywów uczestniczących w wiązaniu ATP, ETR2 ma tylko motyw G2, a ERS2 nie zawiera żadnego z pięciu motywów występujących w przekaźniku [39]. W polipeptydach obu podrodziny oraz ich homologach z innych roślin można jeszcze wyodrębnić około 200 aminokwasowy fragment nazywany domeną GAF (Ryc. 5A). Akronim określający domenę pochodzi od nazwy białek (ang. *cGMP binding phosphodiesterases*, *adenylate cyclases*, *transcription factor Fh1A*), w których domena GAF została wcześniej zidentyfikowana [45]. Funkcja domeny GAF w przypadku receptorów etylenu wiązana jest z dimeryzacją i tworzeniem w błonie homo-, a być może również heterodimerskich form receptorów.

Drugą rośliną, obok *A. thaliana*, u której przypuszczalnie poznano już wszystkie geny receptorów etylenu jest pomidor [46]. Genom pomidora zawiera sześć genów kodujących białka homologiczne z ETR1 lub ETR2 (Rys. 5B). Do podrodziny receptorów homologicznych z ETR1 należą kinazy LeETR1, LeETR2 i LeETR3/NR [47-50], podczas gdy białka LeETR4, LeETR5 i LeETR6 są bardziej podobne do ETR2 [46,47,51]. Sklonowano także szereg genów homologicznych z *ETR1* lub *ETR2* z innych roślin kwiatowych m. in. owoców męczennicy jadalnej [52], melona [53,54], fasoli [55], ogórka [56], pelargonii [57], goździka [58], tytoniu [59,60], róży [61], owoców mango [62], brzoskwini [63,64], szczawiu [65].

Badania funkcji receptorowej kinaz ETR1 i ERS1, prowadzone początkowo w drożdżowym układzie ekspresyjnym, polegały na wprowadzaniu do drożdży całych genów *ETR1* i *ERS1* lub różnych fragmentów *ETR1*, a następnie analizowaniu wiązania etylenu przez syntetyzowane polipeptydy [66,67]. W ten sposób wykazano, że w wiązaniu etylenu uczestniczy N-końcowy fragment polipeptydu ETR1 (od pozycji 1 do 165) obejmujący wszystkie trzy fragmenty transbłonowe [66]. Antagonista etylenu 1-MCP (1-metylocyklopropen) w równym stopniu hamuje wiązanie fitohormonu przez ETR1 i ERS1 [67]. W tych, jak i późniejszych badaniach wykazano dodatkowo, że w wiązaniu etylenu uczestniczą reszty cysteiny-65 i histydyny-69 współdziałające w wiązaniu jonu miedzi – kofaktora pośredniczącego w wiązaniu fitohormonu [68]. Znaczenie reszty cysteiny-65 potwierdzono również w badaniach mutantów niewrażliwego na etylen *etr1-1*, jednego z czterech allelicznych mutantów *etr1*, u którego Cys-65 zo-

stała zastąpiona przez tyrozynę [31]. O kluczowej roli jonu miedzi w percepcji sygnału etylenowego świadczą badania mutantów *ran1* (ang. *responsive-to-antagonist1*) *A. thaliana*, którego fenotyp jest podobny do fenotypu roślin traktowanych antagonistą etylenu (*trans*-cyklookten) [69]. Sklonowany gen *RAN1* koduje białko transportujące jony miedzi z cytoplazmy do wnętrza pęcherzyków post-Golgiego, gdzie według autorów, miedź zostaje wbudowana do nowo zsyntetyzowanego polipeptydu (Ryc. 6). Wbudowany do błony aktywny receptor etylenu zostaje następnie włączony do plazmolemy [70]. Białko ETR1 wiąże także jony srebra, chociaż kompleks ETR1-Ag, wiążący nadal etylen, nie jest w stanie przekazać informacji do części cytoplazmatycznej receptora.

Funkcja receptorowa białek z podrodziny ETR2 nie była dotychczas szczegółowo badana, a liczba wyników świadczących pośrednio o funkcjonowaniu tych białek w percepcji etylenu też nie jest wielka. Na szczególną uwagę zasługuje jednak fakt, iż sekwencja aminokwasowa domen transbłonowych tych białek jest identyczna w 44-54% z sekwencją analogicznych fragmentów ETR1 i ERS1 zaangażowanych w wiązanie etylenu. Mutacje w genach *ETR2*, *EIN4* i *ERS2*, prowadzące do obniżonej wrażliwości na etylen, są dominujące i podobnie jak w przypadku *etr1* i *ers1* polegają na zamianie w domenie transbłonowej jednego z aminokwasów uczestniczących bądź to w wiązaniu fitohormonu, bądź w przekazywaniu informacji do domeny transmittera (Ryc.5A) [31,42-44,71,72].

Brak niektórych lub nawet wszystkich konserwatywnych motywów w transmitterze białek z podrodziny ETR2 zmusza do postawienia pytania o to, czy receptory etylenu mają w ogóle aktywność kinaz histydynowych, a także czy transdukcji sygnału towarzyszy transfer grupy fosforanowej na domenę odbiornika i ewentualnie dalej na kolejne moduły przenoszące fosforan. Pozytywną odpowiedź na pierwsze z postawionych pytań uzyskano w doświadczeniach, w których w komórkach drożdży syntetyzowano fragment polipeptydu ETR1 (od 164 do 738 pozycji) obejmujący domenę przekaźnika [73]. Skrócony polipeptyd ETR1 katalizuje reakcję autofosforylacji w obecności jonów manganu, ale tylko wówczas, gdy zawiera konserwatywną histydynę i ma niezmienną kasetę G1. W kontekście wyników tych doświadczeń zasadne staje się więc pytanie o to, czy wiązanie etylenu aktywuje, czy też hamuje kinazę histydynową. H u a i M e y e r o w i t z starając się odpowiedzieć na to pytanie poddali mutanty *etr1*, *etr2*, *ein4* i *ers1* ponownym mutacjom w celu wyse-

lekcjonowania mutantów z wyłączoną funkcją domeny kinazowej lub domeny odbiornika [71]. Okazało się, że wyłączenie funkcji kinazowej w pojedynczym białku, a nawet całkowite wyeliminowanie jednego z białek receptorowych nie zmienia fenotypu siewek rosnących w środowisku nie zawierającym etylenu. Podobne wyniki uzyskano również w badaniach prowadzonych na mutancie *etr1-7*, u którego syntetyzowany jest tylko fragment polipeptydu ETR1 zbudowany z pierwszych 73 aminokwasów [74,75]. Wprowadzenie mutacji eliminującej aktywność pojedynczej kinazy histydynowej prowadzi do nadwrażliwości na etylen w warunkach, gdy rośliny rosną w obecności egzogenego etylenu. Krańcowo odmienne wyniki obserwowano w sytuacji, gdy *A. thaliana* transformowano trzema (*etr1*, *etr2*, *ein4*) lub czterema (*etr1*, *etr2*, *ein4*, *ers2*) podwójnie zmutowanymi genami [71]. Zmiany fenotypowe obserwowane u takich osobników wyraźnie świadczą o konstytutywnej odpowiedzi na etylen w środowisku nie zawierającym etylenu. Wyniki powyższych doświadczeń prowadzą do wniosku, że domena KH jest aktywna wówczas, gdy w ogóle jest brak etylenu, lub wówczas, gdy w wyniku mutacji domena sensorowa nie może wiązać fitohormonu. Do podobnej konkluzji można również dojść analizując wyniki doświadczeń przeprowadzonych na pomidorach [76]. Ograniczenie technikami antysensu ekspresji genu *LeETR4* prowadzi do zmian, które można interpretować jako efekt nadwrażliwości transgenicznego pomidora na etylen [77], podczas gdy nadekspresja genu *LeETR3/NR* obniża wrażliwość rośliny na fitohormon [78]. Na podstawie tych obserwacji można wyciągnąć wniosek, iż zmiana liczby receptorów w roślinie zmienia jej wrażliwość na etylen. Wyłączenie w wyniku podwójnych mutacji trzech lub czterech receptorów sprawia, że znacznie mniej endogenego etylenu jest potrzebne do inaktywacji pozostałych niezmutowanych receptorów. Ponadto wyniki prezentowanych doświadczeń wskazują na wyraźną funkcjonalną redundancję receptorów etylenu, które jak się wydaje, nie różnią się powinowactwem do fitohormonu. Różnice między poszczególnymi receptorami dotyczą w zasadzie miejsca i czasu ekspresji ich genów, która w przypadku *ERS1*, *ERS2* i *ETR2* jest regulowana przez etylen, podczas gdy ekspresja pozostałych genów (*ETR1*, *EIN4*) nie podlega takiej regulacji [43,44,45].

### III-1.1. Szlak transdukcji sygnału etylenowego

Poszukiwania mutantów etylenowych o zmienionej odpowiedzi na fitohormon doprowadziły m. in.

do zidentyfikowania mutantu *ctr1* (ang. *constitutive triple response*), którego fenotyp w warunkach braku etylenu przypomina rośliny linii dzikiej rosnące w obecności etylenu [79]. Konstytutywna „potrójna odpowiedź” na etylen mutantu *ctr1* w sytuacji, gdy rośliny nie są traktowane etylenem sugeruje, że produkt tego genu funkcjonuje jako negatywny regulator szlaku sygnałowego. Potwierdzają to również zmiany fenotypowe obserwowane u osobników, u których w wyniku odpowiedniej mutacji doszło do całkowitego wyeliminowania białka CTR1 [79]. Sklonowany gen *CTR1* koduje polipeptyd zawierający 11 charakterystycznych subdomen występujących w serynowo/treoninowych kinazach białkowych. Sekwencja aminokwasowa subdomen VIB i VIII, a ponadto obecność charakterystycznych regionów bogatych w serynę w części N-końcowej i krótkich sekwencji -GGX- określanych jako powtórzenia PEN wskazują na przynależność CTR1 do rodziny kinaz białkowych Raf. Analiza zmian fenotypowych będących efektem krzyżowań różnych mutantów etylenowych dowodzi, że epistaza między mutacjami *ctr1* a *etr1* i *ein4* jest kompletna, co sugeruje, że kinaza CTR1 położona jest w łańcuchu sygnałowym poniżej receptorów etylenu (Ryc. 6) [80]. Sugestia powyższa okazała się trafna, bowiem potwierdzono doświadczalnie, że CTR1 wiąże się swoim N-końcowym regionem regulatorowym z domeną kinazową i domeną odbiornika ETR1 i ERS1 [81] i nieco słabiej z ETR2 [74]. Wyniki powyższych badań nasuwają przypuszczenie, że receptory etylenu, podobnie jak kinaza Sln1 u drożdży (Ryc. 4B), regulują kaskadę kinaz MAP. Dzisiaj już wiemy, że genom *A. thaliana* zawiera 20 genów kodujących kinazy MAP (MAPK), 10 genów kinazy kinaz MAP (MAPKK) i liczne geny kodujące kinazy kinaz aktywujących kinazy MAP (MAPKKK) [82]. Obecność tak dużej liczby elementów tworzących kaskady kinaz MAP funkcjonujących w różnych szlakach sygnałowych niezwykle utrudnia uzyskanie jednoznacznych wyników potwierdzających udział kinazy MAP w transdukcji sygnału etylenowego [83,84]. Pomijając szereg wątpliwości związanych z tym zagadnieniem, można obecnie wysunąć przypuszczenie, że wiązanie etylenu przez domenę sensorową receptora hamuje aktywność kinazy histydynowej, wpływając w ten sposób hamująco na aktywność kinazy CTR, co w końcowym efekcie prowadzi do pojawienia się określonych odpowiedzi na etylen. Z drugiej jednak strony, porównanie fenotypu osobników zawierających cztery podwójnie zmutowane receptory etylenu [71] z fenotypem mutantu pozbawionego genu *CTR1* [79] sugeruje, że proponowany

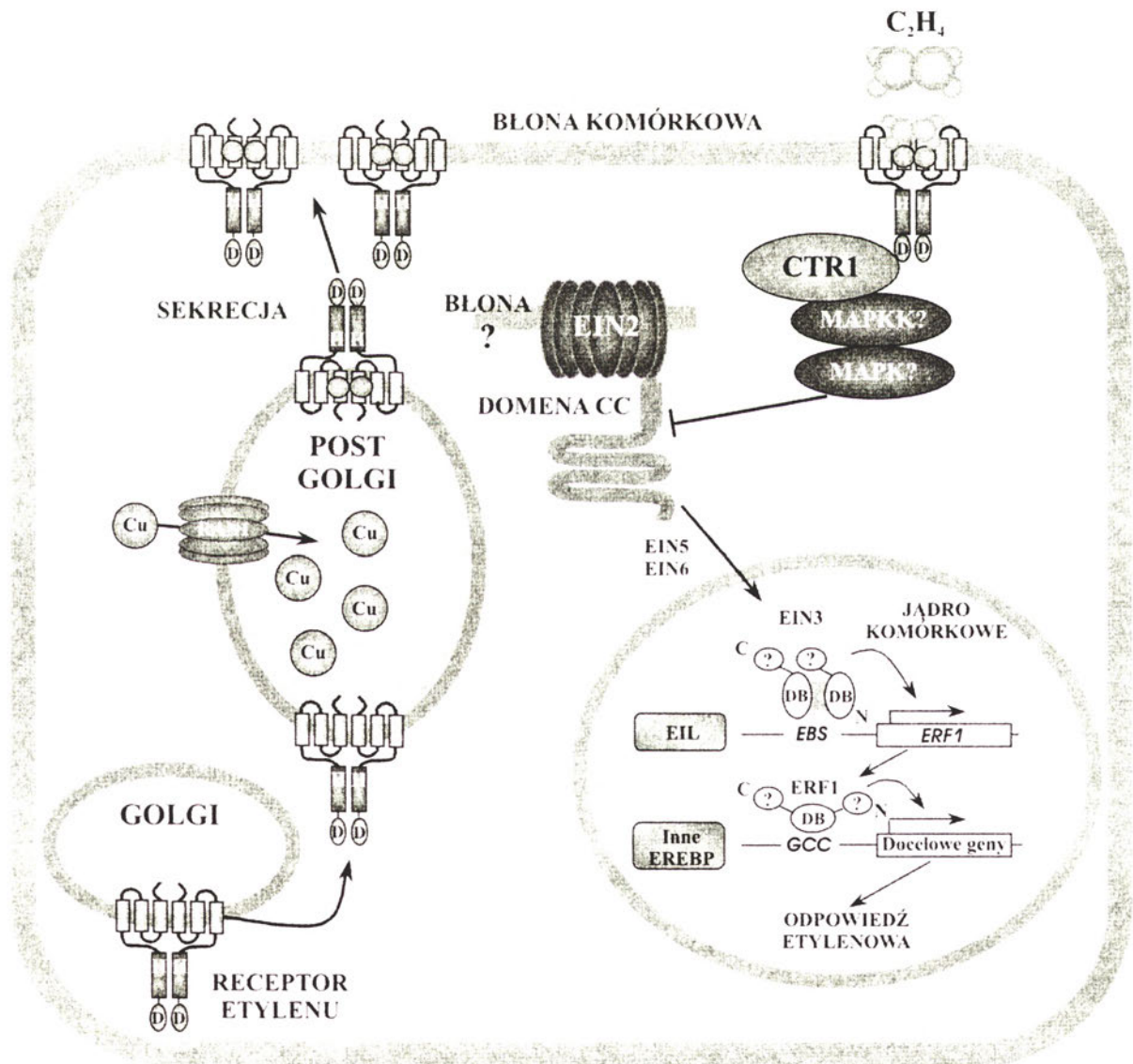


szlak nie jest jedynym możliwym szlakiem transdukcji sygnału etylenowego (patrz podrozdział IV-3.).

Zagadkowym ogniwem łańcucha transdukcji sygnału etylenowego jest białko kodowane przez gen *EIN2* sklonowany u mutantu *A. thaliana* całkowicie niewrażliwego na etylen (*ein2* - ang. *ethylene insensitive*) [80,85,86]. Gen *EIN2* koduje białko utworzone przez 1294 reszty aminokwasowe (141 kDa), które w części N-końcowej (461 aminokwasów) posiada 12 fragmentów transbłonowych, natomiast w części C-końcowej, obejmującej 833 aminokwasy, ma domenę CC (ang. *coiled-coil*) położoną bezpośrednio po 12-tej helisie transbłonowej (Ryc 6). Fragment C-końcowy polipeptydu *EIN2* (od 454 do 1294 aminokwasu) gra istotną rolę w transdukcji sygnału, bowiem nadekspresja kodującego go fragmentu genu *EIN2* w mutancie *ein2-5* prowadzi do wystąpienia niektórych zmian fenotypowych przypominających

konstytutywne odpowiedzi na etylen oraz indukuje transkrypcję genów regulowanych przez ten fitohormon [86]. Mimo że białko *EIN2* jest w części N-końcowej podobne (21% identyczności) do transporterów jonów dwuwartościowych (białka z rodziny Nramp), to wyniki badań prowadzonych na oocytach *Xenopus*, drożdżach i komórkach owadzi dowodzą, że *EIN2* nie transportuje jonów metali [86]. W kontekście wyników tych badań niektórzy autorzy przypuszczają, że domena transbłonowa *EIN2* pełni funkcję sensora dwuwartościowego kationu, który interferuje z nieznanym wtórnym przekazywaniem szlaku transdukcji sygnału etylenowego.

Analiza epistazy między mutantem *ctr1* i pozostałymi mutantami (*ein3*, *ein5*, *ein6*) w różnym stopniu niewrażliwymi na etylen lokuje produkty tych genów w łańcuchu sygnałowym poniżej *CTR1*, chociaż w niektórych przypadkach niekoniecznie poni-



Ryc. 6. Białkowe elementy łańcucha transdukcji sygnału etylenowego. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [33,35,36,39,69,79, 81,86,87]).



żej proponowanej kaskady kinazy MAP [79,80]. Sklonowany gen *EIN3* należy do rodziny określanej akronimem *EIL* (ang. *EIN-like*) obejmującej u *A. thaliana* 6 genów [32]. Białko *EIN3* zbudowane z 628 reszt aminokwasowych (69 kDa) okazało się czynnikiem transkrypcyjnym [87,88]. Geny *EIL1* i *EIL2* komplementują mutację *ein3*, a nadekspresja *EIN3* i *EIL1* u osobników linii dzikiej, a także u mutantu *ein2*, prowadzi do wystąpienia konstytutywnych odpowiedzi na etylen. Homodimery *EIL1*, podobnie jak *EIN3*, wiążą się do sekwencji promotorowej genu *ERF1* i aktywują jego transkrypcję w odpowiedzi na etylen (Ryc. 6) [88]. Gen *ERF1* (ang. *Ethylene Responsive Factor*) należy do licznej rodziny genów kodujących czynniki transkrypcyjne nazywane białkami wiążącymi się do elementów odpowiedzi etylenowych EREBP (ang. *Ethylene Response Element Binding Protein*) [89-92]. Białka ERF wiązane są przez kasetę -GCC-, motyw występujący w promotorach genów indukowanych przez etylen, w tym również genów, których produkty funkcjonują w reakcjach obronnych przeciw patogenom [93,94], a także licznej grupie genów, które nie są regulowane przez etylen [32,95].

### III-2. Kinazy histydynowe z rodziny AHK

#### III-2.1. Rodzina receptorów cytokinin

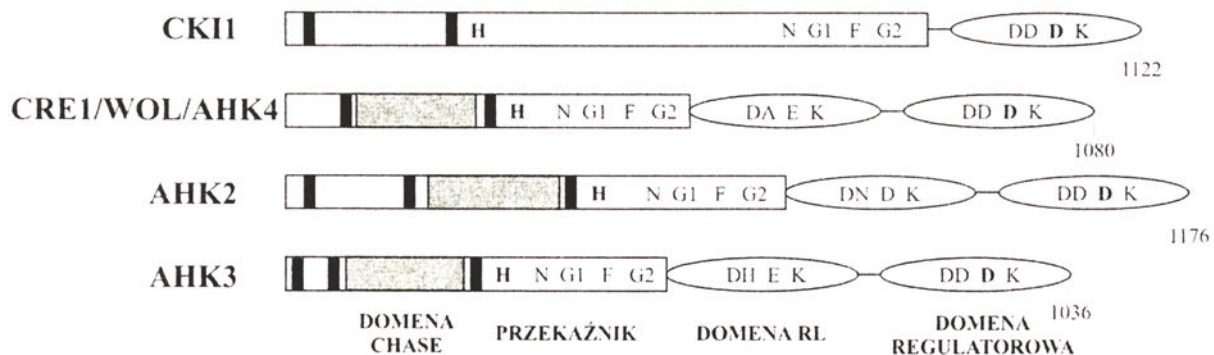
Naturalne cytokiny stanowią zróżnicowaną grupę związków obejmującą izoprenoidowe (*trans*-zeatyna, dihydrozeatyna) oraz aromatyczne (benzyladenina) pochodne adeniny. Cytokiny grają kluczową rolę w regulacji wzrostu i rozwoju roślin, kontrolując podziały komórek, tworzenie merystemu wierzchołkowego pędu, różnicowanie liści i korzeni, rozwój chloroplastów, odporność na stres i starzenie [96,97]. W drugiej połowie 90-tych lat zaznaczył się wyraźny przełom w poznawaniu zarówno receptorów cytokinin, jak też białek tworzących cytokinino- we szlaki sygnałne. Podsumowaniu tych badań poświęcono w ostatnich latach szereg prac przeglądowych [98-103].

W 1996 roku K a k i m o t o wyselekcjonował mutantu cytokininowego *ck1* (ang. *cytokinin independent*) *A. thaliana* o zmienionej odpowiedzi na *trans*-zeatynę [104]. Sklonowany gen *CK1* koduje kinazę histydynową typu hybrydowego, która w części zewnątrzkomórkowej posiada stosunkowo długą pętlę (około 300 reszt aminokwasowych) ograniczoną dwoma fragmentami transbłonowymi (Ryc. 7A) [104]. Nie powiodły się, jak na razie, próby ekspresji całego genu *CK1* w *E. coli*, chociaż otrzyma-

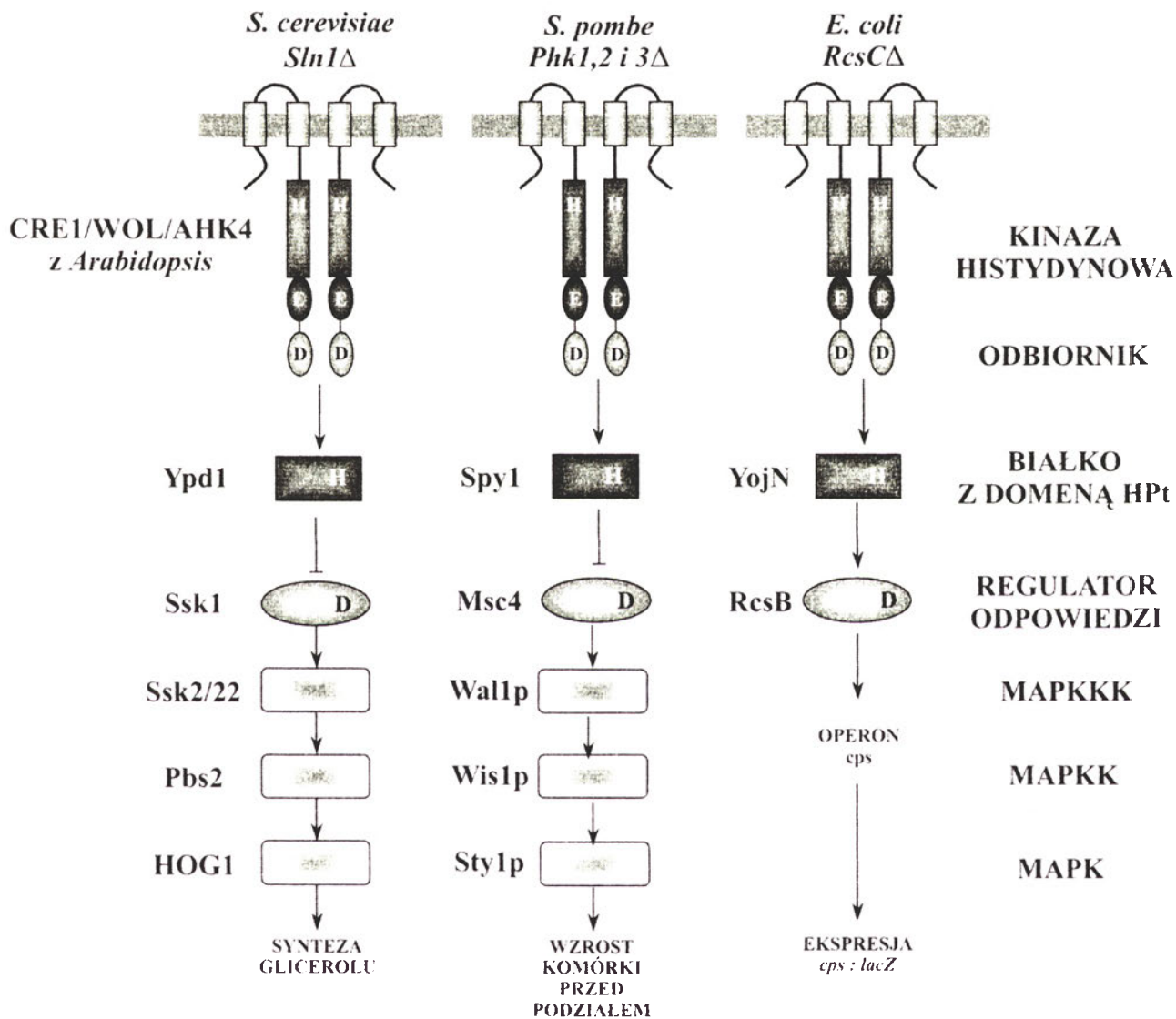
no skrócony polipeptyd odpowiadający domenie regulatorowej. Rekombinowany fragment *CK1* tworzący domenę odbiornika wykazuje aktywność fosfatazową względem fosfohistydyny położonej w motywie H [105]. W protoplastach z komórek mezo-filu *A. thaliana* transformowanych genem *CK1* stwierdzono zwiększoną ekspresję, również w nieobecności cytokiny, *ARR6* – genu swoiście aktywowanego przez cytokinę [106]. Aktywacja promotora genu *ARR6*, kodującego jeden z regulatorów odpowiedzi *A. thaliana*, była zdecydowanie niższa wówczas, gdy protoplasty transformowano odpowiednio zmutowanym genem *CK1*, tak że rekombinowany polipeptyd w miejscu konserwatywnej reszty histydyny lub asparagianinu miał wstawione inne aminokwasy. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że indukcja ekspresji *ARR6* jest uzależniona od reakcji autofosforylacji *CK1* oraz transferu grupy fosforanowej na resztę asparagianinu w domenie regulatorowej. Receptorową rolę *CK1* poddają jednak w wątpliwość wyniki doświadczeń, w których wykazano, że błony izolowane z komórek drożdży dzielących się (*Shizosaccharomyces pombe*) transformowanych genem *CK1* nie wiążą izopenteno- lo-adeniny (IP) [107].

W ostatnich latach wyselekcjonowano innego mutantu cytokininowego *cre1* (ang. *cytokinin response 1*) *A. thaliana* wykazującego szereg zmienionych odpowiedzi na kilka naturalnych i syntetycznych cytokinin [108]. Sklonowany gen *CRE1* okazał się poznanym wcześniej genem *WOL* zidentyfikowanym u mutantu (ang. *woden leg*) *A. thaliana* o zmienionej organizacji tkanki naczyniowej w korzeniu i dolnej części hypokotyła, zahamowanym wzroście korzenia i zredukowanej liczbie komórek [109,110]. U e g u c h i i wsp. [111] sklonowali u *A. thaliana* trzy inne geny *AHK2*, *AHK3* i *AHK4* kodujące kinazy histydynowe, spośród których gen *AHK4* okazał się identyczny z *CRE1/WOL*. Białko kodowane przez gen *CRE1/WOL/AHK4* ma w części sensorowej pętlę utworzoną przez 277 reszt aminokwasowych ograniczoną dwoma fragmentami hydrofobowymi (Ryc. 7A). W części cytoplazmatycznej, obok domeny przekaźnika i typowej domeny odbiornika, występuje dodatkowa domena podobna do odbiornika RI (ang. *receiver-like*), która w miejscu konserwatywnego asparagianinu zawiera resztę kwasu glutaminowego. Pozostałe dwa geny *AHK2* i *AHK3* kodują polipeptydy podobne w części C-końcowej do *CRE1/WOL/AHK4*, ale w części N-końcowej zawierają trzy fragmenty hydrofobowe (Ryc. 7A) [111]. Wszystkie trzy kinazy histydynowe (*AHK2*, *AHK3* i *CRE1/WOL/AHK4*) w domenie zewnątrzkomórko-

A



B



Ryc. 7. Kinazy histydynowe *A. thaliana* pełniące funkcję receptorów cytokinin. A – schemat budowy kinaz histydynowych typu hybrydowego z rodziny receptorów cytokinin; B – schemat drożdżowych i bakteryjnych szlaków sygnałowych aktywowanych przez kinazę histydynową CRE1/WOL/AHK4 z *A. thaliana* w obecności cytokinin. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [100,104,108,113,114], zmodyfikowano).

wej położonej między dwoma fragmentami transbłonowymi mają konserwatywną sekwencję określaną jako domena CHASE (ang. *Cy*clases/*H*istidine kinases *A*ssociated *S*ensory *E*xtracellu-

*lar domain*) [112]. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, iż mutacja *wol* polega na zamianie konserwatywnej reszty treoniny-278 położonej w obrębie domeny CHASE na izoleucynę [110].

Uzyskane w ostatnich latach wyniki wskazują jednoznacznie, iż kinaza CRE1/WOL/AHK4 jest receptorem cytokinin. Inoue i wsp. [108] wprowadzili gen *CRE1/WOL/AHK4* do zmutowanych komórek drożdży *sln1Δ* pozbawionych osmosensora Sln1. Mutant *sln1Δ* jest letalny w warunkach „normalnej” osmolarności, ponieważ regulator odpowiedzi Ssk1, pozostający w formie nieufosforylowanej, aktywuje kaskadę kinazy HOG1 prowadząc w ten sposób do nadmiernej syntezy glicerolu (Ryc. 4B). Komórki z mutacją *sln1Δ* mogą jednak przeżywać wówczas, gdy mają wprowadzony gen *PTP2* (pod promotorem *GALI*) kodujący fosfatyzę hydrolizującą resztę fosfotyrozyny w kinazie HOG. Zmienione w ten sposób komórki drożdży nadal nie przeżywają na pożywce z glukozą, ale mogą żyć w środowisku zawierającym galaktozę, która aktywuje ekspresję genu *PTP2*. Sama ekspresja genu *CRE1/WOL/AHK4* w zmutowanych drożdżach *sln1Δ* nie wpływa na przeżywalność komórek rosnących na pożywce z glukozą, ale chroni je przed śmiercią w obecności *trans*-zeatyny oraz kilku innych aktywnych cytokinin (Ryc. 7B) [108,111,113]. Letalności zmutowanych drożdży nie przeciwdziała ekspresja zmutowanego genu *CRE1/WOL/AHK4* kodującego polipeptyd z resztą glutaminy w miejscu konserwatywnej histydyny lub resztą asparaginy zamiast kwasu asparaginowego w domenie odbiornika. Ekspresja genu *CRE1/WOL/AHK4* nie przeciwdziała również letalności drożdży z mutacją *ypd1Δ* pozbawionych białka przenoszącego grupę fosforanową z KH na RR [108,111]. Wyniki przedstawionych tu doświadczeń dowodzą, że wiązaniu cytokinininy przez CRE1/WOL/AHK4 towarzyszy aktywacja kinazy histydynowej, a nie jej hamowanie, tak jak w przypadku receptorów etyleny.

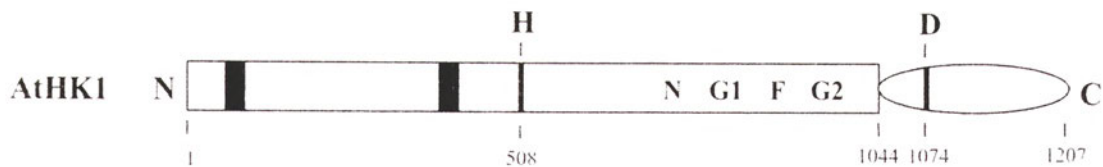
Do takiego samego wniosku prowadzą również wyniki doświadczeń wykonanych na drożdżach *S. pombe* oraz *E. coli* [114]. Komórki *S. pombe* posiadają trzy kinazy histydynowe Phk1/Phk2/Phk3, białko Spyl zawierające domenę HPt i regulator odpowiedzi Mcs4 (Ryc. 7B). Układ regulacyjny aktywowany przez kinazy histydynowe kontroluje przejście z fazy G2 do M, z tego też powodu komórki zmutowanych drożdży *Phk1/Phk2/Phk3Δ*, wchodzące zbyt wcześnie w fazę M, są znacząco mniejsze i bardziej owalne. Ekspresja genu *CRE1/WOL/AHK4* w komórkach z mutacją *Phk1/Phk2/Phk3Δ* znosi defekt wynikający z mutacji, ale tylko w obecności cytokinininy i tylko wówczas, gdy są aktywne również białka Spyl i Mcs4 [114]. Jeszcze w innych badaniach podejmowano próby zastąpienia przez CRE1/WOL/AHK4 nieaktywnej KH funkcjo-

nującej w bakteryjnym systemie regulacyjnym [RcsC (KH) → YojN (HPt) → RcsB (RR)]. System ten w komórkach *E. coli* aktywuje operon *cps* (ang. *capsular polysaccharide synthesis*) kontrolujący syntezę zewnątrzkomórkowego polisacharydu (Ryc. 7B). Synteza polipeptydu CRE1/WOL/AHK4 w bakteriach z mutacją *RcsCΔ* aktywuje szlak sygnałowy prowadzący do operonu *cps* tylko w obecności *t*-zeatyny i benzyloadeniny [107,114]. Defekt związany z mutacją nie jest jednak znoszony wówczas, gdy gen *CRE1/WOL/AHK4* został skrócony w ten sposób, że syntetyzowany w bakteriach polipeptyd nie zawiera domeny odbiornika.

Receptorową rolę kinazy CRE1/WOL/AHK4 potwierdza również fakt, iż białko uzyskane w drożdżowym układzie ekspresyjnym wiąże naturalne i syntetyczne cytokinininy pochodne aminopuryny i difenylomocznika [107]. Komórki drożdży i *E. coli* transformowane genem *CRE1/WOL/AHK4* z mutacją *wol* syntetyzują polipeptyd, który nie wiąże cytokinininy, a w bakteriach nie komplementuje mutacji *RcsCΔ* [107]. Reszta konserwatywnej treoniny w domenie CHASE uczestnicząca w wiązaniu fitohormonu jest obecna również w pozostałych dwóch kinazach AHK2 i AHK3 [107]. Przypuszczenia wynikające m. in. z tego faktu zweryfikowali Hwang i Sheen [106] badając wpływ cytokinin na ekspresję genu *ARR6* w protoplastach mezofilu transformowanych genami *CRE1/WOL/AHK4*, *AHK2* lub *AHK3*. Okazało się, że transkrypcja *ARR6* jest zdecydowanie najintensywniejsza w komórkach transformowanych genem *CRE1/WOL/AHK4*, aczkolwiek wyraźną aktywację ekspresji *ARR6* obserwowano również w przypadku komórek transformowanych genami *AHK2* lub *AHK3* [106]. Yamada i wsp. [107] wykazali, że gen *AHK3* wprowadzony do komórek *E. coli* z mutacją *RcsCΔ* znosi najlepiej defekt wynikający z mutacji w obecności tidiazuronu, cytokinininy syntetycznej pochodnej mocznika, a w drugiej kolejności w obecności *t*-zeatyny i benzyloadeniny. Wyniki tych doświadczeń wskazują więc na to, że wszystkie trzy kinazy AHK są receptorami cytokinin i sugerują, że różnice między nimi dotyczą swoistości i powinowactwa w stosunku do poszczególnych związków oraz miejsca ich ekspresji [111].

W ostatnim czasie w barwinku (*Catharanthus roseus*) sklonowano gen *CrCKR1* kodujący hybrydową kinazę histydynową, której sekwencja aminokwasowa jest w 50-60% identyczna z CRE1/WOL/AHK4 [115].





Ryc. 8. Schemat budowy polipeptydu AtHK1 funkcjonującego w *A. thaliana* jako osmosensor (wg [116]).

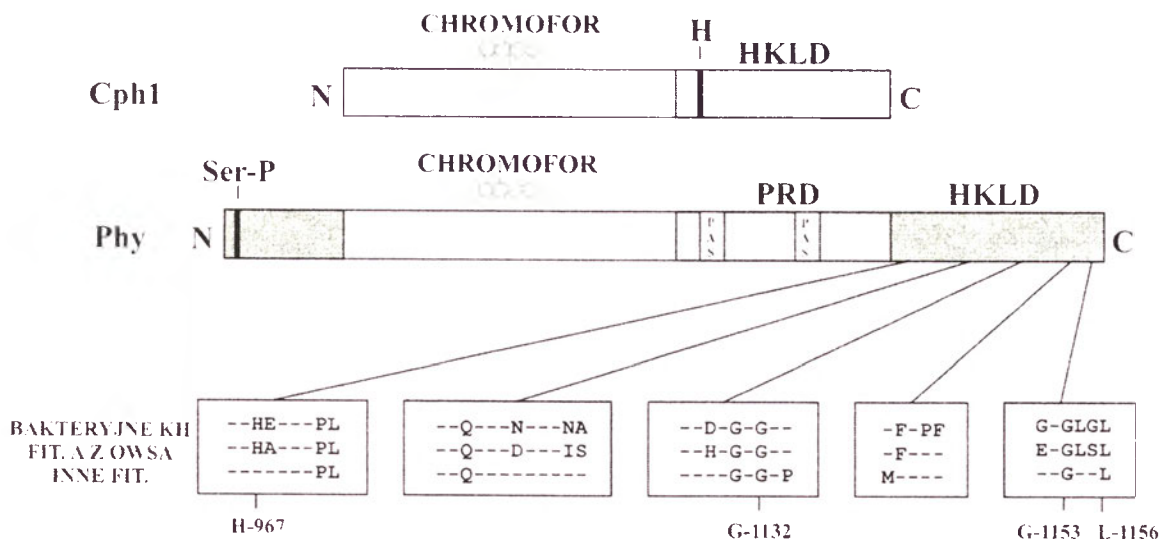
### III-2.2. AtHK1 – roślinnym osmosensorem

Gen *AtHK1* zidentyfikowano i sklonowano z biblioteki cDNA *A. thaliana* uzyskanej na bazie mRNA z roślin poddanych stresowi odwodnienia [116]. Kodowany polipeptyd, utworzony z 1207 reszt aminokwasowych (135 kDa), zawiera wszystkie domeny charakterystyczne dla hybrydowych kinaz histydynowych (Ryc. 8). W regionie N-kończącym AtHK1 posiada pętlę położoną między dwoma fragmentami hydrofobowymi, której sekwencja aminokwasowa jest homologiczna z zewnątrzkomórkową domeną drożdżowego osmosensora Sln1. Gen *AtHK1* wprowadzono do wrażliwych na temperaturę zmutowanych drożdży *sln1-tsΔ*, które w temperaturze 37°C są letalne, gdyż kinaza HOG w tych warunkach pozostaje w stanie ciągłej aktywacji. Ekspresja genu *AtHK1* znosi mutację *sln1-tsΔ*, ale tylko wówczas, gdy syntetyzowany polipeptyd posiada w przekaźniku konserwatywną histydynę, a w domenie odbiornika resztę kwasu asparaginowego i zawiera cały fragment zewnątrzkomórkowy położony w części N-kończącej [116]. Aktywna AtHK1 znosi też mutację *sln1A*, a w drożdżach z podwójną mutacją *sln1-Δsho1Δ* umożliwia przeżywalność zmutowanych komórek w warunkach wysokiej osmolarności. W *A. thaliana* kinaza AtHK1 aktywuje łańcuch sy-

gnalowy, w którym pierwszym ogniwem wydaje się być białko AHP2/AtHPI zawierające domenę HPT [117]. Białko AHP2/AtHPI oddziałuje z kinazą AtHK1 tylko wówczas, gdy osmosensor w domenie odbiornika zawiera resztę kwasu asparaginowego. Ekspresja genu *AtHK1*, wyraźna jedynie w korzeniu *A. thaliana*, jest aktywowana przez duże zasolenie i niską temperaturę, a także przez szereg innych czynników stresowych.

### III-3. Fitochromy – kinazami białkowymi regulowanymi przez światło

Fitochromy są roślinnymi fotoreceptorami absorbującymi światło czerwone (660 nm) i dalekiej czerwieni (730 nm) zaangażowanymi w regulację procesów morfogenezy. Białka fitochromowe *A. thaliana* kodowane przez pięć genów (*PHYA - PHYE*) zawierają w części N-kończącej (74 kDa) domenę strukturalną wiążącą chromofor, a w części C-kończącej (55 kDa) subdomenę PRD (ang. *PAS Repeat Domain*) i subdomenę HKRD (ang. *Histidine Kinase-Related Domain*) (Ryc. 9) [29]. Subdomena PRD gra ważną rolę w oddziaływaniach fitochromu z innymi białkami szlaku sygnałowego m.in. z białkami PIF3 i NDPK2 [118,119]. Funkcja subdomeny HKRD nie



Ryc. 9. Schemat budowy fotoreceptora Cph1 z *Synechocystis sp* i fitochromu roślin wyższych. Na rycinie pokazano położenie subdomen HKRD oraz podobieństwo sekwencji aminokwasowej motywów H, N, G1, F, G2 fitochromu A owsa i innych fitochromów z bakteryjnymi KH (wg [29,119,122,125], zmodyfikowano).

jest jasna i budzi ciągle wiele wątpliwości. Wiadomo, że sekwencja aminokwasowa tej subdomeny jest w 13-17% identyczna z domeną transmitera bakteryjnych kinaz histydynowych (Ryc. 9) [29,120]. Ponadto struktura pierwszorzędowa fitochromu roślin wyższych jest podobna do struktury fotoreceptorów Cph1 i RcaE poznanych u cyjanobakterii (*Synechocystis sp.*, *Fremyella diplosiphon*) [121]. Fotoreceptor Cph1 posiada w części C-końcowej typową domenę transmitera, której aktywność jest regulowana przez światło (Ryc. 9) [122]. Światło dalekiej czerwieni aktywuje autofosforylację reszty histydyny w Cph1 i transfer grupy fosforanowej na resztę kwasu asparaginowego w regulatorze odpowiedzi Rcp1, podczas gdy światło czerwone znosi ten efekt. Struktura pierwszorzędowa regionu C-końcowego białek fitochromowych z roślin wyższych sugeruje, że domena przekaźnika w Cph1 uległa w rozwoju ewolucyjnym duplikacji, dając subdomeny PRD i HKRD. Y e h i L a g a r i a s [123] wykazali, że fitochrom A owsa i zielonego glonu jest rzeczywiście kinazą białkową, która jednak fosforyluje reszty seryny i treoniny w regulatorze odpowiedzi Rcp1 z *Synechocystis sp* i w białku PKS1 (ang. *Phytochrome Kinase Substrate1*) *A. thaliana* [124]. Rośliny transformowane zmutowanym genem *phyA* kodującym polipeptyd pozbawiony konserwatywnych aminokwasów w motywach H,G1,G2 reagują na światło podobnie jak rośliny zawierające aktywny fitochrom A [125]. Obserwacji tych nie potwierdzają jednak wyniki do-

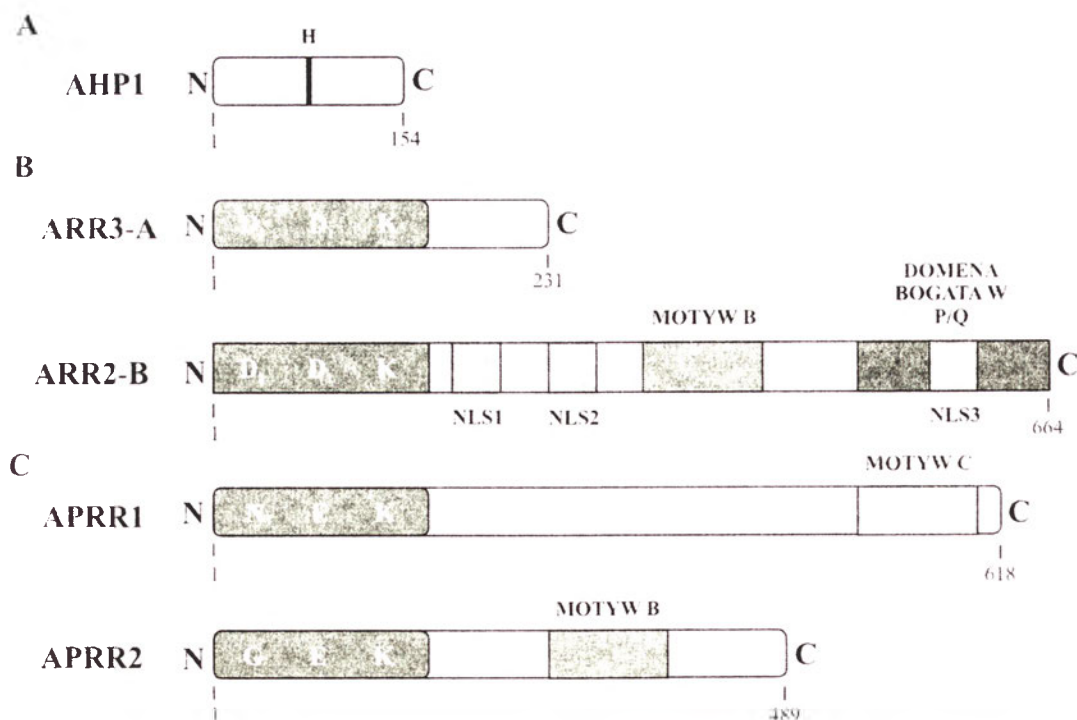
świadczeń, w których rośliny transformowano genami *PHYA* lub *PHYB* skróconymi o całą subdomenę HKRD [126,127]. W sytuacji gdy brakuje jednoznacznych wyników dotyczących funkcji subdomeny HKRD, powszechnie zaczyna się przyjmować pogląd mówiący, iż fitochrom roślin wyższych jest paralogiem kinazy histydynowej, który w toku zmian ewolucyjnych przyjął funkcję kinazy serynowo/treoninowej [121,128-130].

#### IV. Białka tworzące dwuskładnikowe systemy regulacyjne w *Arabidopsis thaliana*

##### IV-1. Białka AHP

Genom *A. thaliana* zawiera pięć genów kodujących białka posiadające domenę HPT i jeden gen (*AHP6/APHP1*), którego produkt w miejscu konserwatywnej histydyny ma resztę asparaginy [3]. Proponowane obecnie nowe akronimy i zmieniona numeracja tych białek stają się przyczyną nieporozumień i wprowadzają zamieszanie w nazewnictwie, dlatego w zamieszczonym niżej wykazie obok nowych nazw tych białek zachowano w nawiasach dotychczas używane skróty: AHP1/(AtHP3), AHP2/(AtHP1), AHP3/(AtHP2), AHP4, AHP5, AHP6/(APHP1).

Klasyczne białka AHP1-5, zbudowane ze 154-157 reszt aminokwasowych, zawierają konserwatywny motyw XHQXKGSSXS z resztą histydyny ulegającą fosforylacji (Ryc.10A) [3,131,132]. Podobieństwo



Ryc. 10. Schemat budowy polipeptydów z domeną HPT, regulatorów odpowiedzi typu A i B oraz białek podobnych do regulatorów odpowiedzi APRR. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [3,24,25,131,136,143,147,154]).

sekwencji aminokwasowej niektórych białek jest bardzo duże np. AHP2 i AHP3 są identyczne w 81%. Homologia między innymi białkami jest jednak mniejsza i poziom identyczności na ogół nie przekracza 45% [3]. Ekspresja poszczególnych genów *AHP* jest zróżnicowana w zależności od tkanki. Obecność transkryptu *AHP1* była stwierdzana jedynie w korzeniu, transkryptów *AHP2* i *AHP3* we wszystkich dojrzałych tkankach, *AHP5* w korzeniu i liściach [131,132], a ekspresji genu *AHP4* nie wykryto w żadnej tkance [133]. Rekombinowane białka AHP1, AHP2 i AHP3 syntetyzowane w drożdżach mogą pośredniczyć w przepływie fosforanu, bowiem w komórkach drożdży z mutacją *ypd1Δ* komplementują białko Ypd1 [131,132]. W protoplastach *A. thaliana* cytokinina wymusza transport białek AHP1 i AHP2 do jądra, chociaż podobnej zmiany lokalizacji subkomórkowej nie obserwowano w przypadku AHP5 [3]. Poszczególne białka AHP mogą oddziaływać z różnymi KH typu hybrydowego (AtHK1,CK11, CRE1/WOL/AHK4 i ETR1) [114,117], a ufosforylowane białka AHP1 i AHP2 są potencjalnymi donorami grupy fosforanowej, która może zostać przeniesiona na regulatory odpowiedzi ARR3 i ARR4 *A. thaliana* [132]. Podobnie białko AHP2 może się wiązać z kilkoma regulatorami odpowiedzi (ARR1, ARR2, ARR10), a w przypadku oddziaływań z białkiem ARR1 obserwowano defosforylację AHP2 [134].

#### IV-2. Regulatory i pseudoregulatory odpowiedzi

Genom *A. thaliana* zawiera 23 geny kodujące regulatory odpowiedzi, w tym 11 RR określanych jako ARR typu A (ang. *Arabidopsis Response Regulator*) i 12 RR typu B (ARR- B). Ponadto zidentyfikowano 9 genów *APRR 1* do *9* (ang. *Arabidopsis Pseudo-Response Regulator*) kodujących białka z nietypową domeną odbiornika.

Regulatory odpowiedzi typu A (ARR3 do ARR9 oraz ARR15, ARR16, ARR17 i ARR22) zawierają jedynie domenę odbiornika i krótkie fragmenty N- i C-końcowe (Ryc. 10B) [135,136]. Sekwencja aminokwasowa domeny odbiornika w obrębie ARR-A jest identyczna w 50-90%. Niektóre z tych białek są zlokalizowane w jądrze (ARR5/6/7-A), inne jak np. ARR4-A występuje w cytoplazmie i jądrze [3,137]. Transkrypcja genów *ARR3-A* do *ARR9-A*, a przypuszczalnie również innych *ARR*-typu A jest aktywowana przez cytokininy [138-144]. Ekspresja *ARR3-A* do *ARR7-A* jest aktywowana przez azotany [139,141], a *ARR4-A* i *ARR5-A* przez czynniki stresowe takie jak zasolenie, niska temperatura i odwod-

nienie [145]. Ekspresję *ARR4-A* aktywuje również światło czerwone, a produkt tego genu wiąże się z fitochromen B wpływając na jego stabilność [137]. Ekspresja genów *ARR-A* nie jest hamowana przez cykloheksimid, co świadczy o tym, że białkowe elementy regulujące ich ekspresję są obecne w komórce.

Regulatory odpowiedzi typu B oprócz domeny odbiornika zlokalizowanej w części N-końcowej polipeptydu zawierają też fragment o różnej długości w części C-końcowej tworzący domenę efektorową (Ryc. 10B). W obrębie tej domeny znajduje się krótki region utworzony przez aminokwasy kwaśne, około 80-cio aminokwasowy motyw B przypominający domenę wiążącą DNA w białkach c-Myb (domena ARRM), końcowy region bogaty w glutaminę i prolinę, a także jeden lub kilka motywów NLS kierujących białko do jądra [136,146,147]. Obecność w ARR-B motywów charakterystycznych dla białek regulujących transkrypcję, jak również swoiste wiązanie syntetycznego oligonukleotydu o określonej sekwencji przez motyw B białek ARR1/2-B sugerują, że białka ARR-B pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych [147]. Sugerowaną rolę potwierdzono doświadczalnie w odniesieniu do ARR1-B i ARR2-B [147,148], a także do zlokalizowanych w jądrze białek ARR10-B i ARR11-B [106,149,150]. L o h r m a n n i wsp. wykazali, że ARR2-B jest pyłkowym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów jądrowych kodujących niektóre polipeptydy I kompleksu łańcucha oddechowego [151].

W ostatnim czasie M a k i n o i wsp. [152] sklonowali z *A. thaliana* dwa geny kodujące białka APRR1 i APRR2 homologiczne z ARR-B. Domena odbiornika w białkach APRR jest w 30-36% identyczna z ARR1-B, chociaż w miejscu konserwatywnych motywów D D K mają motywy N E K w APRR1 lub motywy G E K w APRR2 (Ryc. 10C). Gen *APRR1* okazał się identyczny z genem *TOC1* (ang. *timing of CAB expression*) sklonowanym wcześniej u mutantu *toc1*, u którego defekt w mechanizmie zegara biologicznego powoduje skrócenie okresu niektórych zmian występujących w cyklu okołodobowych [153]. Ekspresja genu *APRR1/TOC1*, którego produkt jest zlokalizowany w jądrze, podlega również zmianom w cyklu okołodobowym [152,154]. Polipeptydy APRR1/TOC, APRR3, APRR5, APRR7 i APRR9 zawierają w części C-końcowej motyw C (lub CCT) zidentyfikowany wcześniej w czynniku transkrypcyjnym CO (ang. *constant*) [152,153], natomiast polipeptydy APRR2 i APRR4 mają motyw B podobny do ARR-B (Ryc.10C). Wyniki najnowszych badań wykazują, że aktywowana przez światło



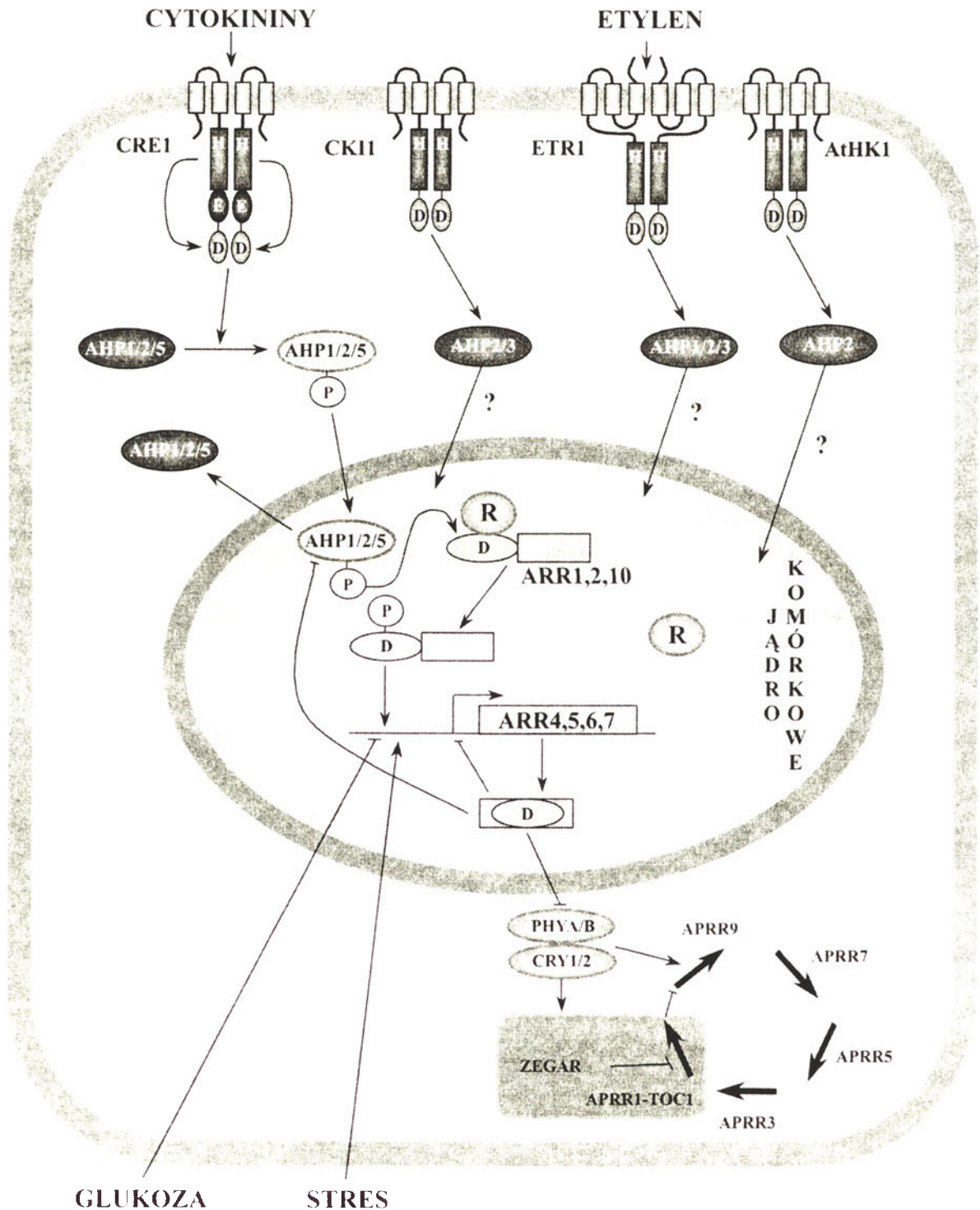
ekspresja genu *APRR9* wymusza transkrypcję innych genów *APRR*, tworząc tzw. fałę *APPR* (*APRR9*→*APRR7*→*APRR5*→*APRR3*→*APRR1/TOC1*) [154-156]. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że białka *APRR* są elementami zegara wewnętrznego lub współdziałają z układem centralnego oscylatora (Ryc. 11) [157-160].

W ostatnich latach sklonowano geny *ZmRR1* i *ZmRR2* kukurydzy i *SAC29* rzepaku kodujące białka homologiczne z *ARR* typu A, a także gen *ZmHP2* ko-

dujący w kukurydzy białko zawierające domenę Hpt [161-163].

#### IV-3. Szlaki sygnałowe aktywowane przez receptory kinazy histydynowe

Nieliczne, jak na razie, doniesienia opublikowane w ostatnim czasie łączą funkcje białek *AHP* i *ARR* z transdukcją sygnału cytokininowego. Receptory cytokinin (*CRE1/WOL/AHK4*, *AHK2*, *AHK3*) są po-



Ryc. 11. Kinazy histydynowe *A. thaliana* i schemat wielostopniowego przepływu fosforanu w systemach regulacyjnych obejmujących białka *AHP* i regulatory odpowiedzi typu B i typu A. Szczegóły opisano w tekście (na podstawie prac [3,4,96,98,99]).

zytywnymi regulatorami szlaku sygnałowego, bowiem, jak to wykazano w komórkach odpowiednich mutantów drożdży i bakterii, wiązaniu fitohormonu przez domenę sensorową tych białek towarzyszy autofosforylacja i transfer grupy fosforanowej na regulator odpowiedzi Ssk1 [107,108,113,114]. Wydaje się, że CRE1/WOL/AHK4 preferencyjnie fosforyluje AHP2 i AHP5, ponieważ tylko te dwa białka konkurują z białkiem YojN, pomostowym elementem pośredniczącym w przepływie fosforanu w komórkach *E. coli* (Ryc. 7B) [114]. W doświadczeniach prowadzonych na protoplastach wykazano, że cytokininy wpływają na zmianę lokalizacji białek AHP1/2, które po ufosforylowaniu przechodzą z cytoplazmy do jądra [106] (Ryc. 11). Ponadto transgeniczne linie *A. thaliana* z nadekspresją genu *AHP2* charakteryzują się fenotypem roślin nadwrażliwych na cytokininy [164]. Analizując powyższe wyniki można zakładać, że w komórkach roślinnych białka AHP pośredniczą w przenoszeniu fosforanu z domeny odbiornika hybrydowych KH na obecne w jądrze regulatory odpowiedzi.

W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, że poszczególne białka AHP oddziałują nie tylko z receptorami cytokinin, ale również z osmosensorem AtHK1, kinazą CKII, a przypuszczalnie również z receptorem etylenu ETR1 (Ryc. 11) [114,117]. Wydaje się więc, że te same białka AHP pośredniczą w przepływie fosforanu w różnych szlakach sygnałowych. Przypuszczenie to wynika również z faktu, że liczba białek AHP w *A. thaliana* jest zdecydowanie mniejsza niż liczba wszystkich hybrydowych KH i RR. Różnice w strukturze pierwszorzędowej białek AHP decydują o tym, że poszczególne białka swoiście oddziałują z różnymi regulatorami odpowiedzi. Białko AHP2 wiąże się z kilkoma białkami RR (ARR1-B, ARR2-B, ARR10-B), a wiązaniu ufosforylowanego AHP2 przez ARR1-B towarzyszy defosforylacja AHP2 [134]. Nadekspresja w protoplastach genów kodujących ARR2-B, ARR10-B i ARR1-B indukuje ekspresję genu reporterowego *ARR6* (od 40 do 400 razy) w warunkach braku egzogennej cytokininy [106,148]. Nadekspresja genów *ARR1/2-B* w kulturze tkankowej i *A. thaliana* intensyfikuje podziały komórkowe i aktywuje rozwój pędu bez udziału egzogennej cytokininy [106]. W kontekście ogólnych założeń dotyczących przekazywania informacji opartego na przepływie fosforanu, nieco zaskakujące wydają się wyniki doświadczeń, które poddają w wątpliwość rolę konserwatywnej reszty kwasu asparaginowego w ARR2-B [106]. Co więcej, w doświadczeniach prowadzonych na ARR1-B pozbawionym całej domeny odbiornika

wykazano, że brak tej domeny w RR wpływa aktywując na wystąpienie konstytutywnych odpowiedzi na cytokininy i wzrost ekspresji genów *ARR-A* w warunkach braku fitohormonu [147,148]. Wyniki tych doświadczeń mogą więc sugerować, że sygnał docierający do ARR1/2-B znosi hamowanie domeny efektorowej przez domenę odbiornika, lub usuwa jakiś nieznany represor (R) związany z domeną odbiornika (Ryc. 11). Odblokowany ARR-B aktywuje ekspresję co najmniej niektórych genów *ARR-A*, która jest uważana za pierwotną odpowiedź na cytokininę. Wyniki doświadczeń prowadzonych na protoplastach sugerują, że pewne białka ARR-A mogą hamować ekspresję innych ARR-A [106], a inne ARR-A mogą funkcjonować jako negatywne regulatory odpowiedzi na fitohormon konkurując z ARR-B o białka AHP [96]. Ponadto wydaje się, że na poziomie ARR4-A następuje integracja informacji przekazywanych przez szlak cytokininowy i szlak aktywowany przez światło [137]. Aktywacja ekspresji *ARR3-A* do *ARR9-A* przez azotany jest niewątpliwie następstwem wzrostu poziomu cytokinin, lecz mechanizm aktywacji ekspresji innych *ARR-A* przez stres i glukozę nie jest znany [3]. Nie jest znana również rola regulatorów odpowiedzi typu A w indukowaniu wtórnych odpowiedzi na cytokininy [165].

## V. Uwagi końcowe

Transdukcja sygnału w dwuskładnikowych systemach regulacyjnych opiera się na przepływie grupy fosforanowej z histydyny zlokalizowanej w przekaźniku kinazy histydynowej na resztę kwasu asparaginowego położoną w regulatorze odpowiedzi. Transfer fosforanu odbywający się zgodnie ze schematem His→Asp lub His→Asp→His→Asp umożliwia liniowy przepływ informacji między kolejnymi modułami szlaku oddziałującymi między sobą w stosunku 1:1. Mechanizm przekazywania informacji różni się tu zasadniczo od typowej kaskady kinaz białkowych, w której jedna kinaza może fosforylować wiele docelowych białek wpływając w ten sposób na wzmocnienie sygnału. Takiej możliwości wzmocnienia sygnału nie ma w dwuskładnikowych systemach regulacyjnych. Wyniki dotychczasowych badań związanych z funkcjonowaniem roślinnych białek homologicznych z KH pozwalają wiązać transdukcję sygnału z aktywnością kinazową tych białek jedynie w przypadku kinaz z rodziny AHK [106,108,113,114,116]. Osiem białek *A. thaliana*, spośród szesnastu homologów bakteryjnych KH, nie posiada jednego, dwu lub wszystkich konserwatywnych motywów położonych w przekaźniku. Rodzące

się w związku z tym wątpliwości nasuwają przypuszczenia, że oprócz fitochromów, również inne białka o nietypowej budowie przekaźnika mogą być kinazami serynowo/treoninowymi. Nie można również wykluczyć innej możliwości, a mianowicie takiej, że podobnie jak w kinazie histydynowej CheA w *E. coli* fosforylacji ulega reszta histydyny położona zupełnie w innej części polipeptydu [12]. Przeważające w roślinach kinazy histydynowe typu hybrydowego wydłużają łańcuch przepływu fosforanu, a tym samym zwiększają liczbę potencjalnych miejsc regulujących przepływ informacji oraz rozszerzają możliwości komunikowania się między poszczególnymi szlakami sygnałowymi. Funkcja większości elementów tworzących dwuskładnikowe systemy regulacyjne w *A. thaliana* jest nieznana, a wyniki dotychczasowych badań zaledwie zakreślają ramy przyszłych poszukiwań. Wyniki niektórych doświadczeń dowodzą, że co najmniej niektóre elementy tych systemów regulacyjnych grają kluczową rolę w sieci sygnałnej łączącej szlaki aktywowane przez etylen, cytokininy, światło i stres.

Artykuł otrzymano 17 lutego 2003

Zaakceptowano do druku 9 października 2003

## Piśmiennictwo:

- Thomason P, Kay R (2000) *J Cell Sci* 113: 3141-3150
- Loomis WF, Shaulsky G, Wang N (1997) *J Cell Sci* 110: 1141-1145
- Hwang I, Chen H-C, Sheen J (2002) *Plant Physiol* 129: 500-515
- Lohrmann J, Harter K (2002) *Plant Physiol* 128: 363-369
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM (1990) *Nature* 344: 395-400
- Mizuno T (1998) *J Biochem* 123: 555-563
- Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy T J (1996) *Mol Microbiol* 20: 911-917
- West AH, Stock AM (2001) *Trends Biochem Sci* 26: 369-376
- Robinson VL, Buckler DR, Stock AM (2000) *Nat Struct Biol* 7: 626-633
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) *Annu Rev Biochem* 69: 183-215
- Grebe TW, Stock J (1998) *Curr Biol* 8: R154-R157
- Parkinson JS (1993) *Cell* 73: 857-871
- Parkinson JS, Kofoid EC (1992) *Annu Rev Genet* 26: 71-112
- Ota IM, Varshavsky A (1993) *Science* 262: 566-569
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996) *Cell* 86: 865-875
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) *Nature* 369: 242-245
- Posas F, Saito H (1998) *EMBO J* 17: 1385-1394
- Thevelein JM (1994) *Yeast* 10: 1753-1790
- Ketela T, Brown JL, Stewart RC, Bussey H (1998) *Mol Gen Genet* 259: 372-378
- Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ, Fassler JS (1998) *EMBO J* 17: 6952-6962
- Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB (1996) *Cell* 86: 845-848
- Cho HS, Pelton JG, Yan D, Kustu S, Wemmer DE (2001) *Curr Opin Struct Biol* 11: 679-684
- Kern D, Volkman BF, Luginbühl P, Nohale MJ, Kustu S, Wemmer DE (1999) *Nature* 402: 894-898
- Schaller GE (2000) *Adv Bot Res* 32: 109-148
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) *Trends Plant Sci* 5: 67-74
- Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2000) *Plant Mol Biol* 42: 273-278
- D'Agostino IB, Kieber JJ (1999) *Trends Biochem Sci* 24: 452-456
- Chang C, Stewart RC (1998) *Plant Physiol* 117: 723-731
- Quail PH (1997) *Plant Cell Environ* 20: 657-665
- Kowalczyk S, Jakubowska A (1999) *Post Biol Kom* 26: 3-32
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Science* 262: 539-544
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR (2002) *Plant Cell Supplement*: S131-S151
- Chang C, Stadler R (2001) *BioEssays* 23: 619-627
- Hall MA, Moshkov IE, Novikova GV, Mur LAJ, Smith AR (2001) *Biol Rev* 76: 103-128
- Hirayama T, Alonso JM (2000) *Plant Cell Physiol* 41: 548-555
- Stepanova AN, Ecker JR (2000) *Curr Opin Plant Biol* 3: 353-360
- Bleecker AB, Kende H (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18
- Bleecker AB (1999) *Trends Plant Sci* 4: 269-274
- Chang C, Hockey J A (1999) *Curr Opin Plant Biol* 2: 352-358
- Barañska J (1998) *Post Biochem* 44: 201-208
- Klimecka M, Trojanek J, Muszyńska G (2002) *Post Biochem* 48: 74-80
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM (1995) *Science* 269: 1712-1714
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5812-5817
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM (1998) *Plant Cell* 10: 1321-1332
- Ho Y-S J, Burden LM, Hurley JH (2000) *EMBO J* 19: 5288-5299
- Klee H, Tieman D (2002) *Physiol Plant* 115: 336-341
- Payton S, Fray RG, Brown S, Grierson D (1996) *Plant Mol Biol* 31: 1227-1231
- Lashbrook CC, Tieman DM, Klee HJ (1998) *Plant J* 15: 243-252
- Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo AK, Tucker ML (1996) *Plant Mol Biol* 30: 1331-1338
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) *Science* 270: 1807-1809
- Tieman DM, Klee HJ (1999) *Plant Physiol* 120: 165-172
- Mita S, Kawamura S, Yamawaki K, Nakamura K, Hyodo H (1998) *Plant Cell Physiol* 39: 1209-1217
- Sato-Nara K, Yuhashi K-I, Higashi K, Hosoya K, Kubota M, Ezura H (1999) *Plant Physiol* 119: 321-329
- Takahashi H, Kobayashi T, Sato-Nara K, Tomita K, Ezura H (2002) *J Exp Bot* 53: 415-422
- Kim JH, Lee JH, Joo S, Kim WT (1999) *Physiol Plant* 106: 90-97
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H (2000) *Plant Cell Physiol* 41: 608-616



57. Dervinis C, Clark DG, Barrett JE, Neill TA (2000) *Plant Mol Biol* 42: 847-856
58. Shibuya K, Nagata M, Tanikawa N, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S (2002) *J Exp Bot* 53: 399-406
59. Terajima Y, Nukui H, Kobayashi A, Fujimoto S, Hase S, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 308-313
60. Xie C, Zhang Z-G, Zhang J-S, He X-J, Cao W-H, He S-J, Chen S-Y (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 810-815
61. Müller R, Stummann BM, Serek M (2000) *Plant Cell Reports* 19: 1232-1239
62. Martinez PG, Gomez RL, Gomez-Lim MA (2001) *J Plant Physiol* 158: 101-108
63. Bassett CL, Artlip TS, Callahan AM (2002) *Planta* 215: 679-688
64. Rasori A, Ruperti B, Bonghi C, Tonutti P, Ramina A (2002) *J Exp Bot* 53: 2333-2339
65. Vriezen WH, van Rijn CPE, Voesenek LA CJ, Mariani C (1997) *Plant J* 11: 1265-1271
66. Schaller GE, Bleecker AB (1995) *Science* 270: 1809-1811
67. Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC, Bleecker AB (2000) *Plant Physiol* 123: 1449-1457
68. Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB (1999) *Science* 283: 996-998
69. Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR (1999) *Cell* 97: 383-393
70. Woeste KE, Kieber JJ (2000) *Plant Cell* 12: 443-455
71. Hua J, Meyerowitz EM (1998) *Cell* 94: 261-271
72. Hall AE, Chen QG, Findell JL, Schaller GE, Bleecker AB (1999) *Plant Physiol* 121: 291-299
73. Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7825-7829
74. Cancel JD, Larsen PB (2002) *Plant Physiol* 129: 1557-1567
75. Gamble RL, Qu X, Schaller GE (2002) *Plant Physiol* 128: 1428-1438
76. Hackett RM, Ho C-W, Lin Z, Foote HCC, Fray RG, Grierson D (2000) *Plant Physiol* 124: 1079-1085
77. Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA, Klee HJ (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5663-5668
78. Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ (2000) *Plant Physiol* 123: 81-92
79. Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) *Cell* 72: 427-441
80. Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR (1995) *Genetics* 139: 1393-1409
81. Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5401-5406
82. Ichimura K (2002) *Trends Plant Sci* 7: 301-308
83. Pan Z, Chang C (1999) *FEBS Lett* 459: 405-410
84. Novikova GV, Moshkov IE, Smith AR, Hall MA (2000) *FEBS Lett* 474: 29-32
85. Chen QG, Bleecker AB (1995) *Plant Physiol* 108: 597-607
86. Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) *Science* 284: 2148-2152
87. Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) *Cell* 89: 1133-1144
88. Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) *Genes Dev* 12: 3703-3714
89. Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) *Plant Cell* 7: 173-182
90. Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A (1998) *J Biol Chem* 273: 26857-26861
91. Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2000) *Plant Cell* 12: 393-404
92. Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H (2000) *Plant J* 22: 29-38
93. Büttner M, Singh KB (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5961-5966
94. Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) *Plant J* 29: 23-32
95. Oñate-Sánchez L, Singh KB (2002) *Plant Physiol* 128: 1313-1322
96. Haberer G, Kieber JJ (2002) *Plant Physiol* 128: 354-362
97. Mok DWS, Mok MC (2001) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118
98. Hutchison CE, Kieber JJ (2002) *Plant Cell Supplement*: S47-S59
99. Sheen J (2002) *Science* 296: 1650-1652
100. Schmölling T (2001) *Trends Plant Sci* 6: 281-284
101. Estelle M (2001) *Curr Biol* 11: R271-R273
102. D'Agostino IB, Kieber JJ (1999) *Curr Opin Plant Biol* 2: 359-364
103. Kakimoto T (1998) *Curr Opin Plant Biol* 1: 399-403
104. Kakimoto T (1996) *Science* 274: 982-985
105. Nakamura A, Kakimoto T, Imamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T (1999) *Biosci Biotech Biochem* 63: 1627-1630
106. Hwang I, Sheen J (2001) *Nature* 413: 383-389
107. Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 1017-1023
108. Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) *Nature* 409: 1060-1063
109. Scheres B, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser M-T, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN (1995) *Development* 121: 53-62
110. Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y (2000) *Gen Dev* 14: 2938-2943
111. Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 231-235
112. Anantharaman V, Aravind L (2001) *Trends Biochem Sci* 26: 579-582
113. Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 751-755
114. Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 107-113
115. Papon N, Clastre M, Andreu F, Gantet P, Rideau M, Crêche J (2002) *J Exp Bot* 53: 1989-1990
116. Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) *Plant Cell* 11: 1743-1754
117. Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) *FEBS Lett* 478: 227-232
118. Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2001) *Post Biochem* 47: 184-191
119. Park C-M, Bhoo S-H, Song P-S (2000) *Cell Dev Biol* 11: 449-456
120. Schneider-Poetsch HA W (1992) *Photochem Photobiol* 56: 839-846
121. Fankhauser C (2000) *Cell Dev Biol* 11: 467-473
122. Yeh K-C, Wu S-H, Murphy JT, Lagarias JC (1997) *Science* 277: 1505-1508
123. Yeh K-C, Lagarias JC (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13976-13981
124. Fankhauser C, Yeh K-C, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J (1999) *Science* 284: 1539-1541
125. Boylan MT, Quail PH (1996) *Protoplasma* 195: 12-17
126. Krall L, Reed JW (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8169-8174

127. Cherry JR, Hondred D, Walker JM, Keller JM, Hershey HP, Vierstra RD (1993) *Plant Cell* 5: 565-575
128. Fankhauser C, Chory J (1999) *Curr Biol* 9: R123-R126
129. Reed JW (1999) *Curr Opin Plant Biol* 2: 393-397
130. Elich TD, Chory J (1997) *Cell* 91: 713-716
131. Miyata S, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) *FEBS Lett* 437: 11-14
132. Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T (1998) *Plant Cell Physiol* 39: 1258-1268
133. Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C, Mizuno T (2000) *Biosci Biotech Biochem* 64: 2486-2489
134. Suzuki T, Sakurai K, Ueguchi C, Mizuno T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 37-45
135. Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2691-2696
136. Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T (1999) *Plant Cell Physiol* 40: 733-742
137. Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E, Harter K (2001) *Science* 294: 1108-1111
138. Brandstätter I, Kieber JJ (1998) *Plant Cell* 10: 1009-1019
139. Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T (1998) *FEBS Lett* 429: 259-262
140. Yamada H, Hanaki N, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T (1998) *FEBS Lett* 436: 76-80
141. Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T (1999) *Plant Cell Physiol* 40: 767-771
142. Kiba T, Yamada H, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 1059-1066
143. D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) *Plant Physiol* 124: 1706-1717
144. Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 85-93
145. Urao T, Yakubov B, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) *FEBS Lett* 427: 175-178
146. Sakai H, Aoyama T, Bono H, Oka A (1998) *Plant Cell Physiol* 39: 1232-1239
147. Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000) *Plant J* 24: 703-711
148. Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A (2001) *Science* 294: 1519-1521
149. Hosoda K, Imamura A, Katoh E, Hatta T, Tachiki M, Yamada H, Mizuno T, Yamazaki T (2002) *Plant Cell* 14: 2015-2029
150. Lohrmann J, Buchholz G, Keitel C, Sweere U, Kircher S, Bäurle I, Kudla J, Schäfer E, Harter K (1999) *Plant Biol* 1: 495-505
151. Lohrmann J, Sweere U, Zabaleta E, Bäurle I, Keitel C, Kozma-Bognar L, Brennicke A, Schäfer E, Kudla J, Harter K (2001) *Mol Genet Genom* 265: 2-13
152. Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T (2000) *Plant Cell Physiol* 41: 791-803
153. Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000) *Science* 289: 768-771
154. Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T (2000) *Plant Cell Physiol* 41: 1002-1012
155. Makino S, Matsushika A, Kojima M, Oda Y, Mizuno T (2001) *Plant Cell Physiol* 42: 334-339
156. Matsushika A, Imamura A, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 833-843
157. Makino S, Matsushika A, Kojima M, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 58-69
158. Matsushika A, Makino S, Kojima M, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 118-122
159. Sato E, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 1374-1385
160. Murakami-Kojima M, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 675-683
161. Sakakibara H, Suzuki M, Takei K, Deji A, Taniguchi M, Sugiyama T (1998) *Plant J* 14: 337-344
162. Sakakibara H, Hayakawa A, Deji A, Gawronski SW, Sugiyama T (1999) *Plant Mol Biol* 41: 563-573
163. Whitelaw CA, Paul W, Jenkins ES, Taylor VM, Roberts JA (1999) *J Exp Bot* 50: 335-341
164. Suzuki T, Ishikawa K, Yamashino T, Mizuno T (2002) *Plant Cell Physiol* 43: 123-129
165. Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH (2002) *Plant Cell* 1: 2771-2785

# Sprawozdanie z XXXIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk, 16 — 20 września 2003 r.

W dniach 16 – 20 września 2003 obradował w Gdańsku XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Patronat honorowy nad Zjazdem objęli: Laureat Pokojowej Nagrody Nobla, były Przewodniczący NSZZ „Solidarność” i Prezydent RP - Lech Wałęsa, Marszałek Sejmiku Województwa Pomorskiego - Jan Kozłowski, Prezydent Miasta Gdańska - Paweł Adamowicz, Prezydent Miasta Sopot - Jacek Karnowski, Przewodniczący Kolegium Rektorów Wybrzeża, Rektor Akademii Medycznej w Gdańsku - prof. Wiesław Makarewicz, Rektor Uniwersytetu Gdańskiego - prof. Andrzej Ceynowa oraz Rektor Politechniki Gdańskiej - prof. Janusz Rachoń.

W Zjeździe uczestniczyło blisko 900 osób z wiodących ośrodków Polski, Niemiec, Wielkiej Brytanii, Włoch, Francji, Hiszpanii, Szwajcarii, Austrii, Holandii, Belgii, Danii, Finlandii, Litwy, Białorusi, Ukrainy, Chorwacji, Japonii i USA.

Uroczysta inauguracja Zjazdu odbyła się w Auditorium Novum Politechniki Gdańskiej. Gości powitał Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego prof. Michał Woźniak. Przewodniczący Kolegium Rektorów Pomorza Gdańskiego Jego Magnificencja Rektor Akademii Medycznej w Gdańsku prof. Wiesław Makarewicz w krótkim wystąpieniu witając zebranych podkreślił znaczenie biochemii w rozwoju nowoczesnej biologii.

Patron Honorowy Zjazdu, były Prezydent RP, Lech Wałęsa w swoim liście dedykowanym uczestnikom z satysfakcją zauważył obecność naukowców z krajów ościennych powstałych po upadku imperium sowieckiego, jak i efektywne zorganizowanie biochemików Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) w strukturę obejmującą kraje od Azerbejdżanu aż po Maroko, a więc znacznie przekraczającą zasięgiem współczesną Unię Europejską.

W kolejnym punkcie inauguracji Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. Jolanta Barańska przedstawiła osiągnięcia Towarzystwa w wpływającym roku oraz wręczyła następujące nagrody:

1. W Konkursie im. Aleksandra Dmochowskiego za pracę „Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej”. Autorzy: Andrzej Kozik, Maria Rapała-Kozik, Ibeth Guevara-Lora; Seria Wydawnicza Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Nagrodę Specjalną przyznano prof. Stefanowi Angielskiemu z zespołem za „Biochemię kliniczną”, wydanie w języku ukraińskim.

2. Im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski – panom Krzysztofowi Sobczakowi i Włodzimierzowi Krzyżosiakowi za „Structural determinants of BRCA1 translation regulation” ogłoszoną w *J Biol Chem* 2002, 277: 17349-17358.

3. Im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszą publikację w 2002 roku w „Postęпах Biochemii” prof. Barbarze Grzelakowskiej-Sztabert za artykuł p.t. „Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego. udział ubikwitynacji” *Post Biochem* 2002, 48: 34-48.

Nagrodę za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych przyznaną przez Sekcję Kwasów Nukleinowych Zarządu Głównego P.T. Bioch. i firmę Sigma Aldrich otrzymali Michał Mińczuk, Aleksandra Dmochowska, Małgorzata Palczewska i Piotr Stępień za „Overpressed yeast mitochondrial putative RNA helicase Mss 116 partially restores proper mtRNA metabolism in strain lacking the Suv3 mt RNA helicase”, *Yeast* 2002, 19(15):1285-1293. Nagrodę wręczył pan dr Maciej Marlewski – przedstawiciel firmy Sigma-Aldrich.

Część naukową Zjazdu zainauguował wykład profesora Masatoshi Hagiwara (Tokyo Japonia) – „Manipulation of alternative splicing by novel protein kinase inhibitors”. Wykład omawiał najnowsze osiągnięcia inżynierii genetycznej w zakresie regulacji „składania” cząsteczek informacyjnego kwasu rybonukleinowego. W ten sposób uczczono 50-lecie ustalenia struktury DNA – najważniejszego odkrycia biologii w XX wieku i nawiązano równocześnie do przełomowego dla nowego już stulecia odkrycia nowych nieoczekiwanych funkcji RNA: odkrycia, któremu redakcja Science przyznała miano Przełomu Naukowego roku 2002.

Koncert muzyki kameralnej w wykonaniu Capelli Gedanensis oraz lampka wina z przekąskami ufundowane przez sponsorów zakończyły inaugurację Zjazdu.



Główną ideą przewodnią tegorocznego Zjazdu była prezentacja najnowszych osiągnięć biologii komórki poczynając od inżynierii genetycznej, chemoprewencji nowotworów, badań nad stresem oksydacyjnym i apoptozą, neurochemią, biomedycznymi aspektami metabolizmu lipidów, puryn i pirymidyn jak i transplantacją narządów. Spore zainteresowanie uczestników wzbudziła sesja poświęcona biologicznej odpowiedzi komórek na stres mechaniczny.

Zjazd wzbudził zainteresowanie poza granicami kraju. Przybyło 94 zagranicznych uczestników. W historii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zdecydowano po raz pierwszy o wprowadzeniu języka angielskiego jako języka znaczącej części obrad i druku streszczeń zjazdowych w formie dodatkowego tomu w fachowym prestiżowym periodyku *Acta Biochimica Polonica*. Sesje poświęcone etycznym aspektom badań w naukach przyrodniczych oraz integracji dydaktyki chemii i biochemii na poziomie uniwersyteckim i licealnym zorganizowano po raz pierwszy na forum Zjazdu PTBioch i obie wzbudziły szereg żywych stymulujących dyskusji. Obrady Zjazdu odbywały się w obiektach Akademii Medycznej. Na program Zjazdu złożyło się 17 sesji naukowych poświęconych następującym zagadnieniom:

1. Biochemia stresu oksydacyjnego
2. Przekazywanie sygnałów komórkowych
3. Od pojedynczego neuronu do mózgu
4. Biochemia cytostatyków i karcinogenów
5. Struktura i funkcja DNA
6. Metabolizm puryn i pirymidyn w zdrowiu i chorobie
7. Kinazy i fosfatazy białkowe
8. Oddychanie komórkowe
9. Białka szoku termicznego
10. RNA - struktura i funkcje
11. Biochemia transplantacji
12. Swoistość metaboliczna tkanek i narządów
13. Metabolizm lipidów
14. Biologiczna odpowiedź komórek na stres mechaniczny
15. Dydaktyka chemii i biochemii
16. Etyczne aspekty badań w naukach przyrodniczych - wyzwania XXI wieku
17. Doniesienia różne

W czasie obrad wygłoszono 119 wykładów, 88 komunikatów ustnych i zaprezentowano 395 plakatów.

Wykład im. J.K. Parnasa wygłoszony przez prof. Włodzimierza Krzyżosiaka oraz wykłady otwierające sesję I „Biochemia stresu oksydacyjnego” zorganizowano w historycznej Sali Białej Ratusza Gdańskiego przepięknie udekorowanej portretami Królów Rzeczypospolitej nawiązujących do bogatej historii związków Gdańska z Polską.

W trakcie obrad odbyły się 4 wykłady sponsorowane firm, a także prezentacje 27 firm z branży biotechnologicznej.

W przerwach obrad była możliwość zwiedzania Trójmiasta. Wszyscy uczestnicy Zjazdu zostali zaproszeni na spotkanie towarzyskie do pałacu w Leźnie, gdzie tańczono przy skocznych dźwiękach muzyki irlandzkiej i podziwiano pokaz ogni sztucznych.

Na spotkaniu kończącym Zjazd ogłoszono wyniki konkursów o nagrody im. Janiny Opieńskiej – Blauth dla studentów za szczególnie wartościowe prace badawcze zgłoszone i przedstawione na dorocznym Zjeździe PT-Bioch. oraz o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików. Komisjom konkursowym przewodniczyli prof. Jerzy Klimek oraz prof. Michał Woźniak.

W pierwszym konkursie nagrodę otrzymała Pani Magdalena Spiechowicz z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego za pracę pt. “Calcium- regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calyculin) and other S100 proteins”.

W Konkursie im. Włodzimierza Mozłowskiego przyznano następujące nagrody i wyróżnienia:

**Nagroda:**

Krzysztof Lemke - Katedra Technologii Leków i Biochemii, Politechnika Gdańska

„DNA topoisomerase I preferentially cleaves DNA at sites covalently modified by 1-nitroacridines”

**Wyróżnienia:**

Natallia Vydra - Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut, Oddział w Gliwicach — „Transcriptional active heat shock factor 1 (HSF1) leads to seminiferous epithelium degeneration in mice testes”

Robert Herok - Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii w Gliwicach — „Ionizing radiation-induced changes of gene expression patterns in human melanoma cells”

Iwona Mruk - Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Gdański — „The EcoVIII endonuclease gene expression is modulated by the low-usage arginine codons”

Katarzyna Gromek - Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Gdański — „Application of DNA sequencing by index walking in analysis of plasmids isolated from enteropathogenic strains of *Escherichia coli*”

Rafał Kozieł - Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego — „Effect of ciprofloxacin on mitochondrial energy metabolism, calcium signaling and viability of Jurkat T-cells”

Według zgodnej opinii uczestników poziom naukowy Zjazdu był wysoki, a obrady przebiegały w miłej atmosferze. Ogromna w tym zasługa Komitetu Naukowego Zjazdu i sympatycznych członków Gdańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Kończąc to sprawozdanie chciałbym przekazać podziękowania Zarządowi Głównemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Redakcji *Acta Biochimica Polonica*, Komitetowi Badań Naukowych oraz Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO –PAN za nieocenioną pomoc, współdziałanie i fundusze przyznane na organizację Zjazdu. Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Medycznej, Katedry Biochemii, Biochemii Klinicznej oraz Biochemii Farmaceutycznej za osobiste zaangażowanie, życzliwość i odpowiedzialność jakie wykazali podczas spotkań polskich biochemików w Gdańsku. Mam świadomość, iż ogromną pomocą w kreowaniu miłej atmosfery Zjazdu była ogromna praca wykonana przez studentów - członków Studenckiego Towarzystwa Naukowego przy Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Uniwersytecie Gdańskim.

Wszystkim pragnę gorąco podziękować

Michał Woźniak

# Sprawozdanie z kursu FEBS "Rekombinacyjna technologia DNA i ekspresja białka"

## Report on the FEBS Course "Recombinant DNA technology and protein expression"

GRZEGORZ B. GMYREK<sup>1</sup>, RAFAŁ ZIELIŃSKI<sup>2</sup>

W dniach 21 – 27 września 2003 roku odbył się w Bukareszcie (Rumunia) kurs szkoleniowo – naukowy „Recombinant DNA technology and protein expression”. Finansowego wsparcia dla kursu udzielił FEBS, natomiast jego lokalna organizacja przypadła Rumuńskiemu Towarzystwu Biochemii i Biologii Molekularnej oraz Instytutowi Biochemii Rumuńskiej Akademii Nauk.

Kurs miał charakter międzynarodowy i mógł w nim uczestniczyć każdy, kto miał status studenta (studia licencjackie, magisterskie, doktoranckie) lub był pracownikiem naukowym o profilu działalności zbliżonym do problematyki prezentowanej podczas kursu. Średni wiek uczestników nie przekraczał 30 lat. Ostatecznie do uczestnictwa w szkoleniu zgłosiły się dwadzieścia dwie osoby z takich krajów jak: Białoruś (1), Grecja (2), Hiszpania (2), Jugosławia (2), Polska (2), Rumunia (6), Słowacja (1), Słowenia (1), Stany Zjednoczone (1), Rosja (1), Turcja (1), Ukraina (1) i Wielka Brytania (1). Podczas niespełna tygodnia trwania kursu, każdy z uczestników mógł udoskonalić i utrwalić wiedzę z zakresu badania DNA, RNA czy ekspresji białek na poziomie molekularnym. Aby to w pełni osiągnąć organizatorzy podzielili szkolenie na dwie części: teoretyczną i praktyczną.

W części teoretycznej miały miejsce wykłady zaprezentowane przez wykładowców rumuńskich i specjalnie zaproszonych na ten cel gości zagranicznych. Mimo, że wiedza zaprezentowana przez pierwszych miała dla większości uczestników charakter przypominający, była świetnym uzupełnieniem do przeprowadzonej później części praktycznej. Prof. Octavian Popescu przedstawił zasady elektroforezy kwasów nukleinowych oraz sekwencjonowania DNA. Dr Stefan Denes szczegółowo wyjaśnił mechanizmy rządzące w reakcji odwróconej transkrypcji (RT) oraz w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Dr Stefan Szedlacsek zaprezentował rodzaje i zastosowanie wektorów do transformacji i transfekcji odpowiednio komórek prokariotycznych i eukariotycznych. Ten sam wykładowca w swoim następnym wykładzie wyjaśnił zastosowanie i działanie prokariotycznych i eukariotycznych systemów ekspresji białek. Dr Ileana Stoica dała wykład o zastosowaniu technik Southern i Northern blot w wykrywaniu docelowych sekwencji zlokalizowanych odpowiednio na DNA czy RNA. Z kolei Dr Gabriela Negroiu wyjaśniła zasady i zastosowanie techniki *Western blot* do wykrywania docelowych sekwencji w białkach. Ostatnim wykładowcą rumuńskim był Dr Andrei Petrescu, który przedstawił podstawowe zasady i wykorzystanie bioinformatyki w analizie sekwencji DNA i białek.

Szczególnie cennym uzupełnieniem do części teoretycznej były wykłady przedstawione przez gości zagranicznych.

Pierwszy z nich, Prof. Hans Lenstra (Uniwersytet w Utrechcie, Holandia) przedstawił wykład, w którym zaprezentował możliwości użycia najnowszych technik biologii molekularnej do badania zróżnicowania genetycznego wśród współcześnie występujących gatunków i ras bydłych. Badania tego typu są bardzo pomocne w poznawaniu filogenezy bydła i mogą mieć także kluczowe znaczenie w planowaniu przyszłych krzyżówek międzygatunkowych. Prof. Lenstra jest głównym wykonawcą w Europejskim Projekcie Badania Zróżnicowania Genetycznego wśród gatunków i ras bydłych. W swoim wykładzie przedstawił on współczesną rekonstrukcję drzewa filogenetycznego bydła na podstawie analizowania występowania pomiędzy nimi hybrydyza-

<sup>1</sup>Mgr. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Laboratorium Immunologii Rozrodu, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: gregoire@hot.pl, <sup>2</sup>mgr. Katolicki Uniwersytet Lubelski, Katedra Biologii Molekularnej, Al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin; e-mail: dziel@kul.lublin.pl



cji międzygatunkowej. Ponieważ specjacja obecnie występujących gatunków bydlęcych jest niekompletna, uważa się, że hybrydyzacja międzygatunkowa może być powszechnie występującym zjawiskiem. Występowanie hybrydyzacji międzygatunkowej można określać na poziomie molekularnym przez analizę mitochondrialnego DNA (mtDNA), polimorfizm markerów autosomalnych (techniki AFLP i SFLP) oraz poprzez analizę markerów zlokalizowanych na chromosomie Y (geny *SRY* i *TSPY*). Znaczna część wykładu Prof. Lenstra zawierała akcent „polski” i była między innymi poświęcona współczesnym poglądom na filogenezę żubra. Wstępne porównanie sekwencji zlokalizowanych na chromosomie Y wskazywało, że żubr (*Bison bonasus*) może być spokrewniony z amerykańskim bizonem (*Bison bison*), na co mogłoby wskazywać podobieństwo fenotypowe, podobny polimorfizm fragmentów jądrowego DNA czy.... wreszcie potoczna nazwa żubra, określanego jako bizon europejski. Niemniej jednak zaobserwowane nieprawidłowości w mitochondrialnym DNA żubra i bizona, wskazują, że mtDNA ma inną filogenezę niż jądrowy DNA i chromosom Y. Uwzględniając najnowsze dane, wydaje się, że żubr jest w większym stopniu spokrewniony z wołem (*Bos taurus*) i zebu (*Bos indicus*), co sugerowałoby także, że matczyzny przodek żubra był bardziej podobny do woła niż do bizona.

Następnym wykładowcą zagranicznym był Dr Michael Zwick (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA), który przedstawił możliwości wykorzystania metod prezentacji fagowej (ang. *phage display*) do pozyskiwania białek o określonych właściwościach. *Phage display* uważa się za jedną z najbardziej obiecujących technik, z rozwojem której wiąże się duże oczekiwanie w opracowywaniu np. nowych metod terapeutycznych. Metoda ta pojawiła się w początkach lat 80-tych, jednak jej gwałtowny rozwój nastąpił 10 lat później. Obecnie wg bazy Medline liczbę publikacji nawiązujących do *phage display* ocenia się na około 200 – 350 rocznie. Metoda prezentacji fagowej wykorzystuje fagi jako nośniki białek fuzyjnych (elementy biblioteki) związane kowalencyjnie z białkami kapsydu. Taki układ, prezentowany na zewnątrz wirionu, umożliwia przeszukiwanie białkowych bibliotek kombinatorycznych. Selekcja biblioteki dokonuje się przez związanie faga z cząsteczką akceptorową. W procesie tym niespecyficznie związane fagi są odplukiwane, z kolei te, które mają białko będące specyficznym ligandem dla akceptora poddaje się dalej namnożeniu w komórkach bakteryjnych (*E. coli*) celem przeprowadzenia kolejnego etapu selekcji. Cykliczne powtórzenie tego procesu powoduje zwiększenie liczby fagów specyficznych w stosunku do reszty. Dr Zwick w swoim wykładzie przedstawił możliwości wykorzystania metody *phage display* do poszukiwania przeciwciał neutralizujących dla epitopów wirusa HIV-1. Dotychczas neutralizujące aktywności w pierwotnych izolatach wirusowych *in vitro* wykazano i najlepiej poznano dla trzech przeciwciał: b12, 2G12 i 2F5. Ostatnio zostały także scharakteryzowane dwa inne przeciwciała: Z13 i 4E10, które rozpoznają C-terminalny region epitopu 2F5. Zastosowanie kombinatorycznej biblioteki przeciwciał wykorzystującej metodę prezentacji fagowej może być pomocne w poszukiwaniach najbardziej skutecznej strategii w konstruowaniu przyszłych szczepionek dla ludzi HIV-1 pozytywnych. Należy przypuszczać, że dalsza molekularna charakteryzacja epitopów dla przeciwciał neutralizujących może być pomocna w rozwinięciu przyszłych, bardziej immunogennych szczepionek przeciwko wirusowi HIV-1.

Kolejnym wykładowcą był Dr Angel Garcia – Alonso (Instytut Glikobiologii, Uniwersytet Oksfordzki, Wielka Brytania), który przedstawił potencjalne zastosowanie proteomiki w badaniach biomedycznych. Termin proteomika określa badania mające na celu identyfikację, powstających w danej komórce lub tkance, białek, poznanie występujących pomiędzy nimi zależności oraz ustalenie ich trójwymiarowych struktur. Szczególnie to ostatnie może mieć duże znaczenie w odkrywaniu miejsc, które mogą mieć znaczenie w regulacji aktywności działania leków. Obecnie do identyfikacji białek w komórkach lub tkankach stosuje się dwie metody: elektroforezę dwukierunkową (zwaną także dwuwymiarową) (2-D) lub spektroskopię masową. Żadna z nich nie jest doskonała, niemniej jednak ta pierwsza stosowana jest częściej. Istotą elektroforezy dwukierunkowej jest rozdział białek w dwóch powiązanych ze sobą etapach: w jednym kierunku następuje rozkład wg wielkości, natomiast w kierunku prostopadłym zgodnie z ładunkiem elektrochemicznym. Dr Garcia – Alonso w swoim wykładzie zaprezentował między innymi zastosowanie proteomiki do identyfikowania białek biorących udział w szlaku sygnałowym w trakcie aktywacji ludzkich płytek krwi. W wyniku tych badań odkryto, że 50% z nowo wyizolowanych białek nie było wcześniej opisanych oraz, że ponad 40% z nich zaangażowanych jest w regulację szlaku sygnałowego bądź w regulację cytoszkieletu w płytkach krwi. W innym przykładzie pokazano zastosowanie proteomiki do identyfikowania białek zaangażowanych w procesie zranienia. Kolejny przykład ukazywał użycie proteomiki do określenia markera(ów) w marskości wątroby (HCV typu C) przez porównanie surowicy osobników zdrowych i chorych. W ostatnim przykładzie Dr Garcia – Alonso pokazał użycie elektroforezy 2-D do identyfikacji białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego w czerniaku złośliwym gałki ocznej.

Ostatnim wykładowcą zagranicznym był Dr George Orphanides (Syngenta Central Toxicology Laboratory, Wielka Brytania), który w swoim wystąpieniu przedstawił mechanizmy regulacji ekspresji genów w procesach transkrypcji zależnej od estrogenu i ich wpływ na wzrost i zróżnicowanie komórek w macicy. Ostatnio ogłoszone wyniki sekwencjonowania genomu ludzkiego określiły liczbę genów w przedziale 26 tys. – 31 tys. Podejrzewa się, że 2000 genów (około 8% z całej puli) może być czynnie zaangażowanych w kodowanie czynników transkrypcyjnych. Wiadomo także, że estrogen może wywierać wpływ na wzrost, rozwój i zróżnicowanie tkanek poprzez zwiążanie się ze specyficznym receptorem w cytozolu. Układ receptor - hormon może wiązać się do odcinka promotorowego genu wrażliwego na estrogen w sposób bezpośredni przez zwiążanie do specyficznego miejsca na DNA (ang. *estrogen response element-ERE*) lub pośrednio przez czynniki transkrypcyjne takie jak AP-1. W swoim wykładzie Dr Orphanides pokazał wyniki niedawno przeprowadzonego eksperymentu, w którym mierzono cykliczne zmiany w ekspresji panelu genów w zależności od zastosowanej dawki estrogenu. Badanie było przeprowadzone na modelu mysim a zmiany w ekspresji genów mierzono przy zastosowaniu techniki mikromacierzy cDNA (ang. *microarrays*). Zastosowanie tej techniki pozwala na równoczesne wychwycenie specyficznego panelu genów, których ekspresja jest najbardziej powiązana, w tym przypadku, ze zmianami w poziomie estrogenu. Pełne zrozumienie wzajemnych powiązań pomiędzy poziomem estrogenu a ekspresją genów może być pomocne w tworzeniu bardziej skutecznych strategii leczenia w chorobach estrogeno-zależnych np: w mięśniaku macicy, endometriozie, chorobach serca czy w schorzeniach endokrynych.

Podczas gdy pierwsza część dnia była poświęcona na wykłady, drugą wypełniały zajęcia praktyczne. Modelowym białkiem ćwiczeniowym była ludzka tyrozynaza ulegająca ekspresji w linii komórkowej czerniaka SK-Mel 1. Celem praktycznej części kursu było sklonowanie rozpuszczalnej części cząsteczki tyrozynazy w wektorze, którym transfekowano następnie komórki linii komórkowej HEK 293T. Ekspresję rozpuszczalnej formy tyrozynazy potwierdzano metodą *Western blot* oraz przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Plan ćwiczeń przebiegał w trzech, ściśle ze sobą powiązanych, blokach i obejmował między innymi:

- izolację totalnego RNA z linii komórkowej ludzkiego czerniaka SK-Mel-1
- odwrotną transkrypcję
- *Southern* i *Nouthern blot*
- RT-PCR
- oczyszczanie produktu reakcji RT-PCR, a następnie trawienie enzymami restrykcyjnymi EcoRI i Xho I
- ekstrakcja fragmentów DNA z żelu
- przygotowanie wektora
- ekstrakcja liniowej formy wektora z żelu
- ligacja fragmentu cDNA z wektorem
- transformacja do komórek *E. coli*
- wyszukiwanie pozytywnie transformowanych klonów przez PCR
- transfekcja do komórek HEK-293T
- identyfikacja docelowego białka przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i techniki *Western blot*

Dodatkowo w tej części kursu miały miejsce także praktyczne zajęcia z zastosowania bioinformatyki.

Cennym punktem szkolenia była prezentacja ustna każdego z uczestników (10 - minutowa prelekcja) związana z aktualnie wykonywanym projektem badawczym w macierzystej jednostce naukowej.

Pomimo dużego obciążenia czasowego związanego z realizacją kursu, organizatorzy zadbali także o ciekawy program kulturalny, który dodatkowo sprzyjał wzajemnej integracji. Kontynuacją tego ostatniego jest istnienie grupy dyskusyjnej na portalu internetowym yahoo.com, która została założona po zakończeniu szkolenia i aktualnie sprzyja podtrzymywaniu kontaktu oraz wymianie doświadczeń.

Dla nas uczestnictwo w kursie było bardzo cennym doświadczeniem z punktu widzenia zaczerpniętej wiedzy teoretycznej oraz praktycznej. Było także doskonałą okazją do uporządkowania tej wiedzy, którą nabyliśmy wcześniej na studiach magisterskich. Chcielibyśmy podkreślić, że nasze uczestnictwo w szkoleniu było możliwe dzięki wsparciu finansowemu, jakiego udzieliła nam organizacja FEBS, oraz pomocy w jego uzyskaniu, które z kolei zawdzięczamy Polskiemu Towarzystwu Biochemicznemu. Jesteśmy bardzo wdzięczni za okazaną nam pomoc. Z całą pewnością uczestnictwo w kursie „Recombinant DNA technology and protein expression” okaże się bardzo pomocne w bieżącej pracy badawczej jak i w przyszłym planowaniu kariery naukowej.

# Roczny spis treści tom 49, nr 1,2,3,4, 2003

## ARTYKUŁY

- Eliza Wyszko, Witold Szaflarski, Jan Barciszewski** - Interferencyjny RNA - molekularny regulator ekspresji genu . . . . . 2
- Piotr Popławski, Rafał A. Derlacz** - Jak działa melatonina? . . . . . 9
- Anna Gajko-Galicka** - Próby zastosowania terapii genowej w dominującej chorobie tkanki łącznej - wrodzonej łamliwości kości . . . . . 18
- Urszula Kralisz** - Glikoproteina VI - receptor kolagenu aktywujący płytki krwi . . . . . 26
- Justyna Wiśniewska, Andrzej Tretyn** - Peptydy natriuretyczne - cząsteczki sygnałowe zwierząt i roślin . . . . . 39
- Barbara Bereza, Agnieszka Kubiak, Jacek Leluk, Waclaw Hendrich** - Fotoenzym oksydoreduktaza: NADPH-protochlorofilid (LPOR) - klucz do biosyntezy chlorofilu . . . . . 46
- Michał Małecki, Piotr P. Stępień** - Mechanizmy degradacji mRNA. . . . . 58
- Anetta Nowosielska, Elżbieta Grzesiuk** - Mutacje adaptacyjne . . . . . 68
- Lidia Włodek, Małgorzata Iciek** - S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny . . . . . 77
- Christos Kargas, Zofia Walter** - Znaczenie polimorfizmu genów transferaz glutationowych człowieka. . . . . 85
- Andrzej Wiśniewski** - Charakterystyka immunoglobulinopodobnych receptorów leukocytów. . . . . 96
- Grażyna Sosińska** - Dolichole, długołańcuchowe lipidy izoprenoidowe biorące udział w modyfikacjach białek . . . . . 107
- Rafał Bartoszewski, Izabela Łączmańska, Jarosław Króliczewski, Andrzej Szczepaniak** - Charakterystyka karboksylazy-oksigenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (rubisko). Kierunki badań . . . . . 116
- Tomasz Popławski, Janusz Błasiak** - Naprawa błędnie sparowanych zasad . . . . . 126
- Daniel Bąk** - RNAi - interferencja RNA - skuteczny sposób na ciszę . . . . . 136
- Agnieszka Dettlaff-Pokora, Beata Schlichtholtz** - Alternatywne wydłużanie telomerów . . . . . 147
- Agnieszka Czechowska, Janusz Błasiak** - Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571 - nadzieja na przełom w leczeniu białaczek . . . . . 157
- Małgorzata Kamocka, Wojciech P. Mielicki** - Prokoagulant nowotworowy: charakterystyka biochemiczna oraz wpływ na rozwój choroby nowotworowej . . . . . 168
- Tomasz Zieliński, Barbara Wachowicz** - Procesy sekrecji w płytkach krwi . . . . . 175
- Beata Olas** - Metabolizm fosfolipidów inozitolowych w płytkach krwi . . . . . 185
- Natalia Rozwadowska, Dorota Fiszer, Maciej Kurpisz** - Układ genów interleukiny-1 w fizjologii gonady męskiej . . . . . 194
- Marzena Wójcik, Barbara Szmalenberg, Maria Koziolkiewicz** - Budowa, mechanizm działania i funkcje biologiczne enzymów z rodziny pirofosfataz/fosfodiesteraz oraz ektonukleotydów (E - NPP). . . . . 202
- Jacek Król, Danuta Kaczyńska, Włodzimierz J. Krzyżosiak** - Mikro RNA - nowi członkowie niekodujących RNA . . . . . 214
- Joanna Łanuszewska, Piotr Widłak** - Białka detektorowe rozpoznające pęknięcia nici DNA i ich udział w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na stres. . . . . 229



**Tomasz Śledziński** - Polimeraza poli(ADP)rybozy i jej udział w naprawie DNA . . . . . 239

**Anna Łukaszewicz-Hussain** - Uszkodzenia komórki - rola mitochondriów . . . . . 250

**Michał Milewski** - Struktura i funkcja białkowych domen PDZ . . . . . 257

**Magdalena Mac** - Transport krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych przez błonę plazmatyczną. . . . . 268

**Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur, Anna Skorupska** - Bakteryjne systemy transportu cukrów. . . . . 278

**Barbara Klajnert, Tomasz Przygodzki** - Dendrymery w zastosowaniach terapeutycznych . . . . . 290

**Stanisław Kowalczyk, Anna Hetman** - Różne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi . . . . . 298

## INNE

Komunikat Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . . 56

Sprawozdanie z XXXIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . . 319

Sprawozdanie z kursu FEBS "Rekombinacyjna technologia DNA i ekspresja białka" 322

# Indeks autorów prac przeglądowych, tom 49, 2003

## B

**Barciszewski J** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Bartoszewski R** - Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Bąk D** - Instytut Matki i Dziecka w Warszawie, Pracownia Genetyki Molekularnej, Zakład Genetyki Medycznej, ul. Kasprzaka 17, 01-211 Warszawa, biolog2@poczta.wp.pl

**Bereza B** - Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biofizyki, Pracownia Fotobiologii, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Błasiak J** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, januszb@biol.uni.lodz.pl

## C

**Czechowska A** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

## D

**Derlacz RA** - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

326

**Dettlaff-Pokora A** - Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, agnieszka\_dettlaff-pokora@wp.pl

## F

**Fiszer D** - Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, fisdor@man.poznan.pl

## G

**Gajko-Galicka A** - Akademia Medyczna w Białymstoku, Zakład Chemii Medycznej, ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok

**Gmyrek GB** - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Laboratorium Immunologii Rozrodu, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, gregoire@hot.pl

**Grzesiuk E** - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, elag@ibb.waw.pl

## H

**Hendrich W** - Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Hetman A** - Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, [aniastef@chem.uni.torun.pl](mailto:aniastef@chem.uni.torun.pl)

## I

**Iciek M** - Instytut Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków, [mbmamica@cyf-kr.edu.pl](mailto:mbmamica@cyf-kr.edu.pl)

## K

**Kaczyńska D** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Kamocka M** - Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, ul. Muszyńskiego 1, 91-403 Łódź

**Kargas C** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Klajnert B** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Biofizyki Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, [aklajn@biol.uni.lodz.pl](mailto:aklajn@biol.uni.lodz.pl)

**Koziołkiewicz M** - Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

**Kowalczyk S** - Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Kralisz U** - Akademia Medyczna w Łodzi, Instytut Fizjologii i Biochemii, Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

**Król J** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Króliczewski J** - Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Krzyżosiak WJ** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, [wlokrzy@ibch.poznan.pl](mailto:wlokrzy@ibch.poznan.pl)

**Kubiak A** - Uniwersytet Wrocławski, Zakład Biotechnologii Białek, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław, Kurpisz M - Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, [kurpimac@man.poznan.pl](mailto:kurpimac@man.poznan.pl)

## L

**Leluk J** - Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego, Uniwersytet Warszawski, 02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5a

## Ł

**Łaczmańska I** - Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

**Łanuszewska J** - Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

**Łukaszewicz-Hussain A** - Akademia Medyczna w Białymstoku, Zakład Toksykologii, ul. Mickiewicza 2C, blok D, 15-222 Białystok, [anhussa@wp.pl](mailto:anhussa@wp.pl)

## M

**Mac M** - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pracownia Procesów Transportu w Błonach Biologicznych, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, [magdab@nencki.gov.pl](mailto:magdab@nencki.gov.pl)

**Małecki M** - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Marczak M** - Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakład Mikrobiologii Ogólnej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Mazur A** - Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakład Mikrobiologii Ogólnej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Mielicki WP** - Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, ul. Muszyńskiego 1, 91-403 Łódź, [mielicki@poczta.onet.pl](mailto:mielicki@poczta.onet.pl)

**Milewski M** - Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki Medycznej, ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa, [milewski@imid.med.pl](mailto:milewski@imid.med.pl)

## N

**Nowosielska A** - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

## O

**Olas B** - Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, [olasb@biol.uni.lodz.pl](mailto:olasb@biol.uni.lodz.pl)

## P

**Popławski P** - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

**Popławski T** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Przygodzki T** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Biofizyki Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, [tomaszp@biol.uni.lodz.pl](mailto:tomaszp@biol.uni.lodz.pl)

## R

Rozwadowska N - Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, [nataliacz@man.poznan.pl](mailto:nataliacz@man.poznan.pl)

## S

**Schlichtholtz B** - Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

**Skorupska A** - Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakład Mikrobiologii Ogólnej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Sosińska G** - Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Laboratorium Glikobiologii Grzybów, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, [grazynas@ibb.waw.pl](mailto:grazynas@ibb.waw.pl)

**Stępień PP** - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Szaflarski W** - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Szczepaniak A** - Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław,

[Andrzej.Szczepaniak@ibmb.uni.wroc.pl](mailto:Andrzej.Szczepaniak@ibmb.uni.wroc.pl)

**Szmalenberg B** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-924 Łódź

## Ś

**Śledziński T** - Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra i Zakład Biochemii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, [tsledz@amg.gda.pl](mailto:tsledz@amg.gda.pl)

## T

**Tretyn A** - Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biotechnologii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, [tran@biol.uni.torun.pl](mailto:tran@biol.uni.torun.pl)

## W

**Wachowicz B** - Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, [wachbar@biol.uni.lodz.pl](mailto:wachbar@biol.uni.lodz.pl)

**Walter Z** - Uniwersytet Łódzki, Katedra Genetyki Molekularnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Widlak P** - Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice, [widlak@io.gliwice.pl](mailto:widlak@io.gliwice.pl)

**Wiśniewska J** - Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biotechnologii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,

**Wiśniewski A** - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, Laboratorium Immunogenetyki, Zakład Immunologii Klinicznej, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, [andrzej@immuno.iitd.pan.wroc.pl](mailto:andrzej@immuno.iitd.pan.wroc.pl)

**Włodek L** - Instytut Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków, [mbwlodek@cyf-kr.edu.pl](mailto:mbwlodek@cyf-kr.edu.pl)

**Wójcik M** - Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, [marzena@bio.cbmm.lodz.pl](mailto:marzena@bio.cbmm.lodz.pl)

Wyszko E - Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

## Z

**Zieliński T** - Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii Ogólnej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź



# Wskazówki dla Autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie, np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako \*.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółwkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

**PIŚMIENNICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnośniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stoltz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 243-272

**ILUSTRACJE:** ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: \*.tif, lub \*.cdr, lub \*.psd, lub \*.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz postugiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołwkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołwkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”  
Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa

## KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

### POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

#### Dotyczący składek członkowskich i prenumeraty „Postępów Biochemii” w roku 2003

Składka członkowska w 2003 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych	80.- zł.
dla Członków studentów	40.- zł
w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.	

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80. + 40. = 120 zł.

**Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2003, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą mogli otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.**

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii”. Koszt w 2003 roku — 80 zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2003 120.- zł.

Prosimy o wnoszenie opłat bez wezwania na nasze konto w BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jolanta Barańska

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

## POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

### ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: [infoptbioch@nencki.gov.pl](mailto:infoptbioch@nencki.gov.pl). W polu „subject „ umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Adam Szewczyk, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zainfekowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www naszego Towarzystwa](http://www.rcin.org.pl)

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego