

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 49, NR 1, 2003

Profesor Władysław Fenrych – wspomnienie	
Interferencyjny RNA	2
Jak działa melatonina?	9
Terapia genowa	18
Glikoproteina VI	26
Peptydy natriuretyczne	39
Biosynteza chlorofilu	46
Komunikaty	56

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 „Postępkach 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 „Postępkach 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.

PIŚMIENICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9-26]. Odnosiniki 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) wskażują 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, str. 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stoiz 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 posługiwać 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 ółwkiem 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” (ólwkiem, 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 przelać na adres:

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



Wspomnienie o Profesorze dr hab. Władysławie Fenrychu

W dniu 25 sierpnia 2002 zmarł w Poznaniu Władysław Fenrych, profesor zwyczajny Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, emerytowany kierownik Katedry Biochemii Farmaceutycznej, członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i współzałożyciel Oddziału Poznańskiego.

Profesor urodził się w 1927 roku w Przybrodzie w województwie poznańskim. W latach 1947-1952 studiował na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii UAM uzyskując dyplom magistra z zakresu chemii. Pracę naukową i dydaktyczną rozpoczął w roku 1957 w III Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Poznaniu. W Klinice zorganizował laboratorium biochemiczne, w którym nadal wykonywane są badania związane z realizacją programów badawczych, a także analizy specjalistyczne z zakresu biochemii i hematologii dla szpitali klinicznych. Badania prowadzone przez Profesora w Klinice Hematologii stały się podstawą do uzyskania stopni naukowych doktora n. przyrodniczych na podstawie pracy: Zagadnienie związków kompleksowych korynoidów z białkami (1965, WSR) oraz doktora habilitowanego na podstawie rozprawy: Białka wiążące witaminę B₁₂ w osoczu. Wpływ czynników fizyko-chemicznych oraz komórkowych na transkobalaminy i ich wzajemną zależność (1978, UAM). W 1984 w wyniku konkursu został kierownikiem Katedry Biochemii i Analityki Medycznej (od 1986 r. Biochemii Farmaceutycznej) AM w Poznaniu. W latach 1967-1968 odbył staż w Oklahoma Research Foundation w Oklahoma City, gdzie pracował nad metylacją t-RNA, a w 1971 w Instytucie Chemii Organicznej i Biochemii w Pradze. Był członkiem licznych Towarzystw Naukowych. Poza PTBioch należał do Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej (tytuł członka zasłużonego), Poznańskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk (tytuł członka honorowego), Polskiego Towarzystwa Teologicznego-Studium Syndologiczne w Krakowie. Był także członkiem korespondentem Towarzystw Syndologicznych w Turynie, Rzymie i USA.

Profesor Fenrych wykazywał szerokie zainteresowania naukowe i umiejętnie łączył badania podstawowe z aplikacyjnymi. Jednym z istotnych nurtów Jego działalności badawczej była analiza białek. Był jednym z pierwszych w kraju, którzy wprowadzili w tym celu metody immunochemiczne, co umożliwiło m.in. ich wykrywanie w płynach ustrojowych oraz ich patologicznych odmian w niektórych schorzeniach rozrostowych.

Bardzo rozległe miejsce w problematyce badawczej, którą zajmował się Profesor zajmuje witamina B₁₂ i białka ją wiążące. We współpracy z Profesorem Pawełkiewiczem m.in. określił mechanizm przekształcania nieaktywnej postaci cyjanokobalaminy w biologicznie czynną, światłoczułą postać 5'-deoksyadenozyno-kobalaminę. Istotną część tych badań stanowiło wczesne rozpoznawanie stanów niedoborowych witaminy B₁₂ oraz patogenezę niedokrwistości megaloblastycznych. Profesor był współautorem tezy o genetycznym uwarunkowaniu choroby Addisona-Biermera. Analiza białek wiążących witaminę B₁₂ w granulocytach doprowadziła nie tylko do określenia roli tego zjawiska w oddziaływaniu niektórych leków, ale skierowała Jego zainteresowania w kierunku metabolizmu tlenowego tych komórek. Temu zagadnieniu poświęcił się całkowicie podejmując funkcję kierownika Katedry Biochemii i Analityki Medycznej. Z jego inicjatywy został skonstruowany chemiluminometr, a On sam stworzył własną szkołę badań luminescencyjnych metabolizmu tlenowego. Warto to podkreślić, bo objął zespół o wykrystalizowanych zainteresowaniach naukowych i osiągnięciach. Profesor Fenrych wykładał biochemię, biochemię kliniczną oraz diagnostykę laboratoryjną dla studentów Farmacji, Oddziału Analityki Medycznej i Wydziału Lekarskiego AM w Poznaniu. Zajęcia z tego zakresu prowadził także przez wiele lat w Pomaturalnym Medycznym Studium Zawodowym. Profesor był ulubieńcem młodzieży akademickiej, szczególnie wtedy gdy pełnił funkcję prodziekana Wydziału Farmaceutycznego. Dowodem tego są wyróżnienia przyznane z inicjatywy studentów : nagroda I stopnia im. Władysława Biegańskiego i Amicus Studentorum. Mimo posiadania rozlicznych odznaczeń (m.in. Złotego Krzyża Zasługi) te cenił sobie szczególnie. Imponował umiejętnym łączeniem zainteresowań humanistycznych z wiedzą ścisłą. Często kończył wykłady fragmentem poezji.

Ilustracją wszechstronnych zainteresowań Profesora była Jego fascynacja Całunem Turyńskim. Był jednym z nielicznych polskich członków Towarzystw Syndologicznych w Turynie, Rzymie oraz USA. Tłumaczył książki i propagował wiedzę na temat Całunu zarówno na Sympozjach naukowych z zakresu Medycyny Sądowej, sesjach PAN , jak i w salkach parafialnych.

Był człowiekiem niezwykle skromnym. Zgodnie z Jego ostatnim życzeniem nie odbyła się uroczysta Rada Wydziału oraz sesja poświęcona Jego pamięci. Zamiast składania kwiatów na grobie wpłacano datki na fundusz „Caritas”, w którym również pracował.

Dla nas pracowników Katedry, był przede wszystkim przyjacielem i partnerem, który zawsze z ogromną życzliwością angażował się w nasze problemy zarówno naukowe i życiowe, inspirując i zachęcając do podejmowania nowych zadań.

Żałujemy, że odszedł tak wcześnie.

Zespół
Katedry Biochemii Farmaceutycznej
Akademii Medycznej
im. K.Marcinkowskiego
w Poznaniu

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 LASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 659-85-71 w. 441
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting & Layout
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
MAGDALENA MARKOWSKA
(Warszawa)
LESZEK PĄCZEK (Warszawa)
ELŻBIETA ROMANOWSKA
(Warszawa)
PIOTR WIECZOREK (Szczecin)
EWA ZDEBSKA (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Profesor Władysław Fenrych — wspomnienie
Professor Władysław Fenrych — obituary

Interferencyjny RNA — molekularny regulator ekspresji genu
Interference RNA — the molecular regulator of gene expression
ELIZA WYSZKO, WITOLD SZAFIARSKI, JAN BARCISZEWSKI

2

Jak działa melatonina?

How does melatonin work?

PIOTR POPLAWSKI, RAFAŁ ANDRZEJ DERLACZ

9

Próby zastosowania terapii genowej w dominującej chorobie
tkanki łącznej — wrodzonej łamliwości kości

Attempts toward gene therapy of the dominant negative disorder of connective tissue — osteogenesis imperfecta

ANNA GAJKO-GALICKA

18

Glikoproteina VI — receptor kolagenu aktywujący płytki krwi

Glycoprotein VI — collagen receptor inducing platelet activation

URSZULA KRALISZ

26

Peptydy natriuretyczne — cząsteczki sygnałowe zwierząt i roślin

Natriuretic peptides — signalling molecules in animals and plants

JUSTYNA WIŚNIEWSKA, ANDRZEJ TRETYN

39

Fotoenzym oksydoreduktaza: NADPH-protochlorofilid (LPOR) — klucz do biosyntezy chlorofilu

Photoenzyme NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) — the key for chlorophyll biosynthesis

BARBARA BEREZA, AGNIESZKA KUBIAK, JACEK IELULK, WACŁAW HENDRICH

46

Komunikat Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

56

Interferencyjny RNA — molekularny regulator ekspresji genu

Interference RNA — molecular regulator of gene expression

ELIZA WYSZKO¹, WITOLD SZAFIARSKI², JAN BARCISZEWSKI³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Molekularny mechanizm wyciszania genu w procesie RNAi
- III. RNAi jako narzędzie do badania funkcji genu
- IV. Biologiczna funkcja RNAi
- V. Perspektywy interferencji RNA

Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular mechanism of gene silencing in RNAi action
- III. RNAi as a tool for gene function research
- IV. Biological function of RNAi
- V. Perspectives of RNA interference

Wykaz stosowanych skrótów: dsRNA — ang. *double stranded RNA*; mRNA — matrycowy RNA; PTGS — ang. *post-transcriptional gene-silencing*; RNAi — ang. *RNA interference*; shRNA — ang. *short hairpin RNA*; siRNA — ang. *small interfering RNA*; ssRNA — ang. *single-stranded RNA*; stRNA — ang. *small temporary RNA*

I. Wprowadzenie

Do niedawna sądzono, że zmiany epigenetyczne są wyłącznie konsekwencją chemicznej modyfikacji DNA lub histonów prowadzącej do przedtranslacyjnej inhibicji ekspresji genu [1]. Jednak w ostatnich kilku latach poznano nowe mechanizmy wyłączania genów na etapie potranskrypcyjnym (np. PTGS ang. *post-transcriptional gene-silencing*), które polegają na zablokowaniu lub ograniczeniu ekspresji genu w wyniku degradacji produktu jego transkrypcji (mRNA) [2-5].

Jedne z pierwszych badań dotyczyły genetycznej modyfikacji petunii (*Petunia hybrida*) i miały na celu uzyskanie kwiatów o bardziej intensywnej barwie [6]. Do rośliny wprowadzono dodatkowe kopie genu syntazy chalconowej w celu zwiększenia ilości pigmentu. Wbrew oczekiwaniom u kilku wyselekcjonowanych transgenicznych roślin kwiaty były częściowo lub całkowicie pozbawione zabarwienia. Obserwacja ta wskazywała na ograniczenie lub zatrzymanie syntezy pigmentu. W istocie nie nastąpiła ekspresja dodatkowo wprowadzonego genu, a supresja endogennego genu wytwarzającego pigment roślinny. Proces ten nazwano współblokowaniem (ang. *co-suppression*) genów (Tabela 1) [3, 4, 7].

Podobne zjawisko zaobserwowano podczas transformacji tytoniu mającej na celu otrzymanie odmian odpornych na wirusy. Do rośliny wprowadzano cDNA replikazy niezbędnej do amplifikacji wirusa ziemniaczanego typu X. Przypuszczano, że nadprodukcja tego enzymu pozwoli zatrzymać ekspresję infekcyjnego wirusowego DNA w roślinie poprzez zablokowanie kluczowego etapu cyklu życiowego. Okazało się jednak, że rośliny transgeniczne syntetyzują znikome ilości replikazy co sugerowało, że cykl życiowy wirusa został zablokowany nie z powodu

¹Dr, ²mgr, ³prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, tel.: (61) 852-8503 wew. 132, e-mail: wyszkoe@ibch.poznan.pl, jbarcisz@ibch.poznan.pl

nadmiaru enzymu, ale w wyniku degradacji mRNA replikazy. Efekt ten nazwano potranskrypcyjnym blokowaniem ekspresji genu, PTGS [8, 9].

W innych eksperymentach pokazano, że wprowadzenie cDNA kodującego karoten do *Neurospora crassa* powodowało redukcję ekspresji endogennego genu u 30% komórek, a zjawisko to określono po-

Tabela 1

Mechanizmy regulacji ekspresji genów u różnych organizmów.

Przynależność taksonomiczna	Organizm	Rodzaj mechanizmu	Czynnik powodujący inhibicję	Geny ulegające represji	Literatura
Grzyby	<i>N. crassa</i>	tłumienie genu	transgeny	<i>gde-1, qde-2, gde-3</i>	[77,78]
Rośliny	<i>Arabidopsis sp. Nicotiana sp.</i>	PTGS, kosupresja genów	transgeny, wirusy	<i>sgs, egs</i>	[79,80]
	<i>Petunia sp.</i>	transkrypcyjne blokowanie genu	transgeny	<i>ddm, som, hog, sil</i>	[81]
Bezkęgowce	<i>Hydra sp.</i>	RNAi	dsRNA	?	[82]
	<i>T. brucei</i>	RNAi	dsRNA	?	[83]
	<i>Planaria sp.</i>	RNAi	dsRNA	?	[84]
	<i>D. melanogaster</i>	RNAi	dsRNA	?	[85,86]
		kosupresja genów	transgeny	?	[87,88]
<i>C. elegans</i>	RNAi, PTGS	dsRNA, transgeny	<i>mut-2, mut-7, rde-1, rde-2, rde-3, rde-4.</i>	[89,90]	
Kęgowce	<i>Mus musculus</i>	RNAi	dsRNA	?	[64]

transkrypcyjnym tłumieniem genu (ang. *post-transcriptional gene quelling*, *PTGQ*) [10-12].

Przełomem w badaniach regulacji ekspresji genów okazało się zastosowanie tzw. antysensowych oligonukleotydów (DNA i RNA) w celu zablokowania ekspresji genu lub jego produktu [13, 14]. Zakładano, że antysensowe oligonukleotydy hybridyzują do kodującej nici DNA lub mRNA uniemożliwiając w ten sposób przyłączenie polimerazy do DNA lub blokując wiązanie mRNA do rybosomu, co prowadzi do inhibicji ekspresji swobodnego genu. Do *Caenorhabditis elegans* wprowadzono jedno- lub dwuniciowe cząsteczki RNA (ang. *double-stranded RNA*, dsRNA) o sekwencji komplementarnej do sekwencji wybranego genu. W porównaniu z jednoniciowym, dsRNA powodował bardziej efektywną inhibicję genu [15], która nie ograniczała się tylko do komórek, w których proces został zapoczątkowany wprowadzeniem dsRNA ale rozprzestrzeniła się po całym organizmie [4, 12, 16, 17]. Wprowadzony do jelita *C. elegans* dsRNA nie tylko natychmiast indukował blokowanie ekspresji genu w całym organizmie, ale gen ten pozostał również nieaktywny w kolejnych pokoleniach.

Zjawisko interferencji ekspresji genu w wyniku wprowadzenia dsRNA występuje w komórkach bezkręgowców, kręgowców, w tym również u ssaków (Tabela 1). Porównanie mechanizmów: degradacji mRNA indukowanego dsRNA, potranskrypcyjnego blokowania ekspresji genu (PTGS), tłumienia i kosupresji genów oraz badania genetyczne sugerują, że

przebiegają one według podobnego mechanizmu omówionego niżej [16, 18, 19].

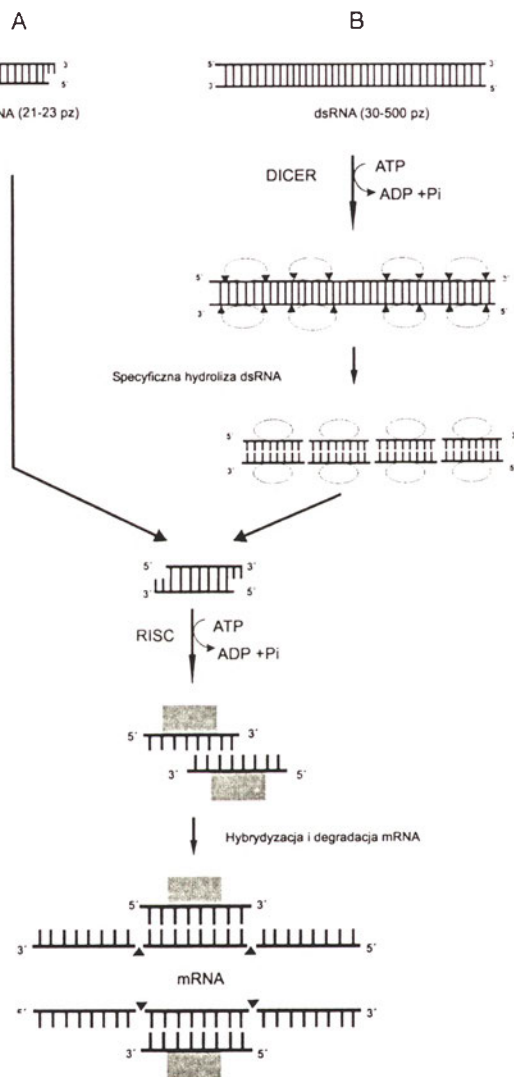
II. Molekularny mechanizm wyciszania genu w procesie RNAi

Interferencja RNA (RNAi) polega na degradacji mRNA indukowanej wprowadzeniem lub syntezą dsRNA o homologicznej sekwencji. Powoduje ona ograniczenie lub całkowite zahamowanie ekspresji odpowiedniego genu [20, 21]. Obecność tego procesu wykazano u wielu organizmów eukariotycznych, w tym u roślin, pierwotniaków, grzybów, zwierząt bezkręgowych i kręgowców [22, 23]. Okazało się również, że RNAi wydajnie blokuje ekspresję genów w ludzkich hodowlach komórkowych [24].

Pierwszym etapem procesu interferencji RNA jest hydroliza dsRNA do siRNA (ang. *small interfering RNA*) [24-28] (Ryc. 1). Są to dwuniciowe RNA o długości 21-23 nukleotydów o sekwencji homologicznej do docelowego mRNA mające dwa niesparowane nukleotydy przy końcu 3' każdej z nici [29]. siRNA powstaje w wyniku hydrolizy kompleksem enzymatycznym (dimer) określanym jako DICER.

W skład każdego monomeru wchodzi: helikaza RNA zależna od ATP, dwie podjednostki RNazy III i domena białkowa wiążąca dsRNA [28]. DICER scharakteryzowano u *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces pombe* i *Homo sapiens*. W reakcji katalizowanej przez ten kompleks dsRNA jest rozpoznawany przez domenę wiążącą RNA, a helikaza RNA rozplata obie nici i każda z podjednostek RNazy III hydrolyzuje wiązanie fosfodiesterowe w RNA, prowadząc do powstania siRNA. Podobnie jak produkty działania

zawierające „tępe końce” lub pozbawione grupy fosforanowej przy końcu 5’ słabo aktywują proces RNAi [30-34]. Długość siRNA wydaje się być cechą gatunkowo specyficzną i może odzwierciedlać zmiany w strukturze obu domen RNazy III. Wśród rybonukleaz typu RNazy III, DICER jest unikalny, ponieważ do hydrolyzy dsRNA wykorzystuje energię pochodzącą z ATP [27]. Helikaza RNA tworząca domenę w DICER przy końcu aminowym wykorzystuje ATP do translokacji wzdłuż dsRNA [28, 34]. Generalnie dsRNA może mieć wielkość od 30 do ponad 500 par zasad. Do badań związanych z RNAi wykorzystuje się także krótkie syntetyczne siRNA, otrzymywane metodą chemiczną bądź w wyniku transkrypcji *in vitro* krótkich RNA za pomocą polimerazy T7 [35]. Pozwala to na ominięcie etapu hydrolyzy przez DICER (Ryc. 1).



Ryc. 1. Mechanizm interferencji RNA. Pierwszy etap obejmuje degradację dwuniciowych RNA (dsRNA) do siRNA (21-23 pz) przez kompleks enzymatyczny DICER (○). W drugim etapie uczestniczy kompleks białkowy RISC, (□) który ze związaną cząsteczką siRNA przyłącza się do homologicznego mRNA i katalizuje jego degradację. Drogi powstawania siRNA: A — syntetyczna, B — enzymatyczna.

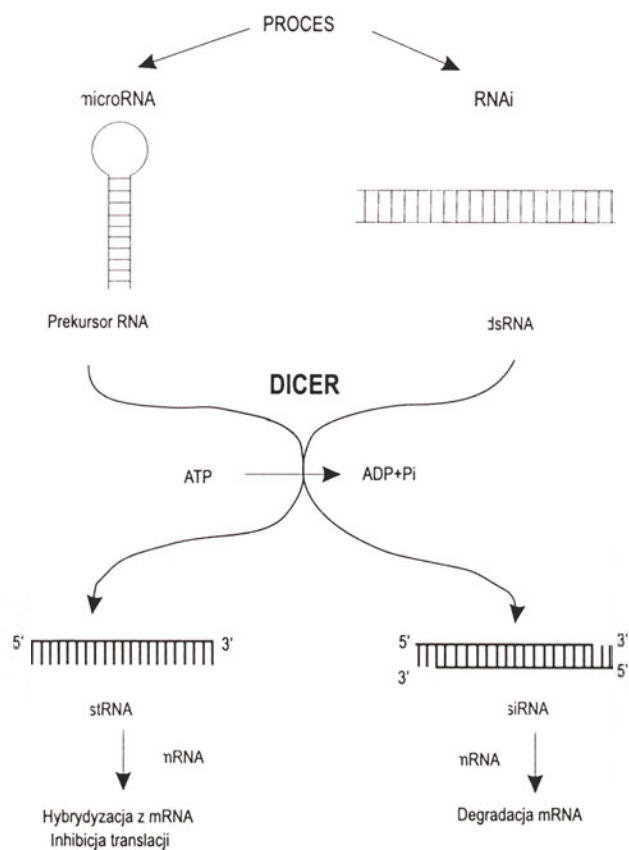
W drugim etapie interferencji RNA dwuniciowe cząsteczki siRNA wiążą się do kompleksu białkowego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) [34]. Kompleks ten wyizolowano z komórek S2 *D. melanogaster*. Posiada on aktywność endonukleazową, a niektóre jego domeny wykazują duże podobieństwo do białek z rodziny *Argonaute* [36]. Nukleolityczne właściwości kompleksu RISC są istotą procesu RNAi. Przyłączenie siRNA aktywuje RISC [26,34], który następnie rozpoznaje i degraduje komplementarny mRNA, blokując w ten sposób ekspresję genu [34,36]. Właściwości endonukleolityczne RISC nie są dotychczas znane, niektóre obserwacje wskazują jej odrębność od RNazy III związanej z DICER [27, 29, 34]. Wydaje się, że ATP jest niezbędny tylko do aktywacji RISC i nie jest związany z jego aktywnością rybonukleazową, podobnie jak inne kofaktory nukleotydowe [34, 36].

W kompleksie białkowym DICER wyizolowanym z *Drosophila* występuje domena PAZ, która jest homologiczna do rodziny białek *Argonaute*. W kompleksie RISC występuje domena Arg2, która należy także do białek *Argonaute*. Obie domeny przypuszczalnie oddziałują ze sobą ułatwiając w ten sposób włączenie siRNA do RISC [36, 26].

DICER uczestniczy także w tworzeniu małych (19-25 nukleotydów), jednoniciowych niekodujących RNA zwanych microRNA, które znaleziono u roślin i zwierząt. Ich regulatorowe działanie polega na specyficznym rozpoznawaniu docelowej cząsteczki mRNA na zasadzie komplementarności, co prowadzi do zablokowania jej translacji [37, 38]. Należą do nich między innymi stRNA (ang. *small temporary RNA*) będące produktami genów *lin-4* i *let-7* u *C. elegans* (Ryc. 2) [39, 40]. Wydaje się, że są one zaangażowane w proces kontroli rozwoju *C. ele-*

innych RNaz III, również siRNA posiadają przy końcu 3’ grupę hydroksylową, a przy końcu 5’ grupę fosforanową oraz niesparowane dwa nukleotydy przy końcu 3’ [29]. Jest to istotne, ponieważ siRNA

gans. Dojrzały stRNA dla *lin-4* hamuje potranskrypcyjnie ekspresję genu *lin-14* oraz *lin-28* poprzez oddziaływania w rejonie niekodującym 3'UTR mRNA. W podobny sposób *let-7* blokuje ekspresję genu *lin-41*. Obecność stRNA stwierdzono również w tkankach ludzkich [41].



Ryc. 2. Rola DICER w powstaniu siRNA i stRNA. Substratami są cząsteczki prekursorowe microRNA (struktura typu spinki) np. *let7*, *lin 4* lub dsRNA (helisa). Produktami reakcji katalizowanej przez DICER są jednoniciowe 19-25 nukleotydowe stRNA oraz siRNA.

Proces RNAi może być aktywowany zarówno przez siRNA będące produktem działania DICER jak i syntetyczne RNA [29, 34], które wydajnie aktywują RISC u *D. melanogaster* i komórkach ssaków, ale są mniej efektywne u *C. elegans* [24, 30, 42].

Wysoką wydajność procesu RNAi można tłumaczyć udziałem polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP) w amplifikacji dsRNA i rozprzestrzenianiu efektu RNAi na inne komórki bądź tkanki [43-46]. Podobne zjawisko obserwowano u roślin, grzybów i nicieni [43, 45, 46]. Stwierdzono, że aby doprowadzić do degradacji docelowego mRNA, którego obecność szacowano na około 1000 kopii, wystarczy ok. 35 cząsteczek dsRNA [47].

Mutacje w genach kodujących białka homologiczne do RdRP redukują wydajność procesu RNAi u *N.*

crassa (*QDE-1*), *C. elegans* (*EGO-1*) i roślin (*SGS2*) [44, 48].

Poznanie mechanizmu inhibicji ekspresji genu w organizmach tak odległych ewolucyjnie od siebie jak pierwotniaki, rośliny i kręgowce sugerują uniwersalność mechanizmu interferencji RNA (Tabela 2).

Tabela 2

Elementy mechanizmu potranskrypcyjnego wyciszania genu (PTGS) i RNAi u zwierząt, grzybów i roślin [91].

	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Czynnik inicjujący	nić sensowa RNA	+	+
	nić antysensowa RNA	+	?
	dsRNA	+	?
	geny wirusa	?	+
Elementy procesu	siRNA	+	+
	RdRP	<i>EGO1, PRF1</i>	<i>QDE1</i>
	helikaza RNA	<i>SMG2</i>	?
	RNaza III	<i>DCR</i>	?
	Białka Argonaute	<i>RDE1</i>	<i>QDE2</i>

III. RNAi jako narzędzie do badania funkcji genu

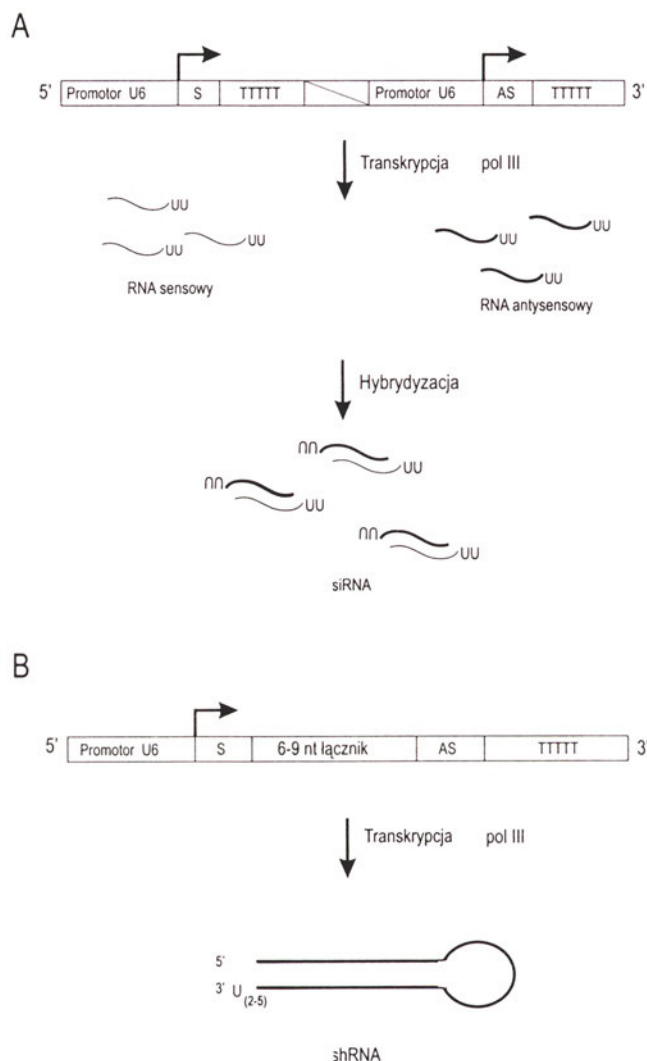
Badania mechanizmu interferencji RNA doprowadziły do wyodrębnienia kilku rodzajów RNA biorących udział w tym procesie jak dsRNA, siRNA i shRNA.

dsRNA powoduje wydajną inhibicję ekspresji określonych genów m.in. u *A. thaliana*, *C. elegans* i *D. melanogaster*. Okazało się, że w komórkach ssaków nie można stosować długich (>30 pz) dsRNA z powodu wewnątrzkomórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Inną metodą otrzymywania prekursorów RNAi jest zastosowanie wektorów zawierających sekwencje siRNA i shRNA (*ang. short hairpin RNA*) pod kontrolą promotorów polimerazy III RNA, U6 lub H1, które katalizują syntezę krótkich RNA, pozbawionych poliA [49]. Sygnałem terminacji transkrypcji w tym przypadku jest sekwencja składająca się z 5 tymidyn. W rejonie tym następuje hydroliza transkryptu zapewniając powstanie RNA zakończonego przy końcu 3' kilkoma urydynami (Ryc. 3) [50-52].

W przypadku klonowania siRNA, wektor zawiera sekwencje dwóch promotorów U6 kierujących transkrypcją dwóch 19 nukleotydowych fragmentów

DNA odpowiadających nici sensowej i antysensowej siRNA (Ryc. 3A) [50]. Powstanie shRNA zapewnia jeden promotor kontrolujący syntezę RNA na matrycy składającej się z dwóch 21 nukleotydowych fragmentów o komplementarnej sekwencji, tworzących trzon struktury spinki, rozdzielonych 6-9 nukleoty-



Ryc. 3. Strategia klonowania siRNA i shRNA do wektora. A. Transkrypcja fragmentów DNA o długości 19 pz odpowiadających nici sensowej (S) i antysensowej (AS) siRNA zachodzi pod kontrolą dwóch promotorów U6 za pomocą polimerazy III (pol III). B. Syntezę shRNA prekursora RNA dla DICER kontroluje jeden promotor U6. Powstałe produkty RNA mają przy końcu 3' niesparowane urydyny.

dową sekwencją odpowiadającą pętli (Ryc. 3B) [51]. shRNA jest substratem dla DICER i uczestniczy w procesie RNAi [53]. Zauważono, że wprowadzenie tak skonstruowanego plazmidu do komórki nie zaburza jej homeostazy, a efekt działania siRNA ulega wydłużeniu z kilku godzin do tygodni w przypadku linii komórkowych [52].

IV. Biologiczna funkcja RNAi

O znaczeniu procesu RNAi świadczą najlepiej zmiany w organizmie gdy dochodzi do zaburzeń na poszczególnych etapach tego procesu.

Mutacje w genach rodziny *Argonaute* u *Arabidopsis thaliana* powodują zaburzenia funkcji komórek, np. defekty w rozwoju liści czy nieprawidłową proliferację merystemów kwiatowych, natomiast u *Drosophila* negatywnie wpływają na rozwój neuronów [54].

Indukowany w komórce RNAi stanowi obronę przed wirusami, ochronę genomu przed transpozonomami oraz współuczestniczy w regulacji ontogenezy [3, 55-57]. Mutanty *Arabidopsis thaliana*, które utraciły zdolność aktywacji PTGS stały się wrażliwe na infekcje wirusowe [55]. Wirusy w odpowiedzi na PTGS wytworzyły mechanizmy blokowania procesu RNAi/PTGS syntezując dsRNA przeciwko genom białek biorących udział w PTGS [58-60].

RNAi wpływa na stabilność genomu poprzez ograniczanie integracji transpozonów, które wbudowując się mogą przerwać ciągłość genu [61]. Stwierdzono, że w wyniku mutacji genów *Mut-7* (homolog RNazy D), *Rde-1* i *Rde-4* należących do rodziny *Argonaute* nastąpiło zaburzenie procesu RNAi u *C. elegans* prowadząc do nadmiernej aktywności transpozonów, podobnie jak u *Chlamydomonas reinhardtii* po zmutowaniu genu *Mut-6* homologicznego do helikazy RNA [62, 63].

Proces interferencji ma znaczenie także dla rozwoju ontogenetycznego, świadczą o tym badania wczesnych stadiów embrionalnych myszy ze zmutowanym genem *Ego1* [64].

Inhibicja ekspresji genów poprzez RNAi może przebiegać na różnych poziomach. dsRNA u roślin indukuje metylację fragmentów genomu, a w przypadku modyfikacji sekwencji promotora następuje zablokowanie transkrypcji genu [65]. RNAi może także modulować strukturę chromatyny u *Drosophila*, *C. elegans* i grzybów [66-68]. Innym przykładem jest ekspresja genów *lin-4* i *let-7* prekursorów RNAi działających na etapie translacji.

Opisano pierwsze udane eksperymenty wykorzystujące siRNA skierowane przeciw genom białek *rev* i *tat* w liniach komórkowych transfekowanych wirusem HIV-1 jak również genom receptora komórkowego *cd4*, białka strukturalnego *gag* czy białka regulatorowego *nef* [69, 70, 71].

Działania anty-HIV mają także na celu hamowanie replikacji wirusa w komórkach gospodarza. Po zastosowaniu siRNA w limfocytach zaobserwowano

obniżenie poziomu HIV w komórkach do 30-50 razy [72].

Inhibicja infekcji wirusowej przez RNAi dotyczy także innych wirusów jak: RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*), który wywołuje szereg chorób układu oddechowego, zastosowanie RNAi doprowadziło do znaczącego obniżenia poziomu RNA wirusa w komórkach. Podobny efekt zaobserwowano po wykorzystaniu siRNA przeciw wirusowi polio [73].

Pokazano także udaną iniekcję siRNA do komórek myszy i wyciszenie genów reporterowych w różnych narządach np. 5-10 razy w komórkach wątroby, śledziony, trzustki oraz w nerkach [74].

RNAi wykorzystuje się również jako narzędzie do badania własności genów u różnych organizmów poprzez „knock-out” mRNA i obserwacje funkcjonalnego efektu inhibicji ekspresji całych grup genów na poziomie komórki czy całego organizmu. Ten sposób postępowania przyjęto analizując np. funkcję genów chromosomów I i III u *C. elegans*. W przypadku chromosomu I rozszerzono znajomość fenotypu genów z 70 do 378, natomiast dla chromosomu III wykazano, że większość genów tam zlokalizowanych pełni funkcję w regulacji i różnicowaniu komórkowym [75, 76].

V. Perspektywy inferencji RNA

W ciągu ostatnich kilku lat interferencja RNA stała się potężnym narzędziem badania struktury i funkcji genów. Ostatnio pojawiło się wiele doniesień o wykorzystaniu RNAi dla inaktywacji infekcji wirusowych i replikacji w kulturach tkankowych. Wykazano również, że RNAi powoduje supresję ekspresji genów u zwierząt. Wszystkie te badania sugerują jednoznacznie, że RNAi może stać się ważnym narzędziem terapeutycznym, chociaż w dalszym ciągu brakuje wiedzy jak wykorzystać RNAi do zwalczania chorób.

Artykuł otrzymano 5 listopada 2001
Zaakceptowano do druku 20 lutego 2003

Piśmiennictwo

1. Lewin B (1998) *Cell* **93**: 301-303
2. Bass BL (2000) *Cell* **101**: 235-238
3. Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13959-13964
4. Kennerdell JR, Carthew RW (2001) *Nat Biotech* **17**: 896-898
5. Koter M, Henning J (2002) *Postępy Biochemii* **48**: 182-188
6. Van der Krol AR, Mur LA, Beld A, Mol JNM, Stuitje AR (1990) *Plant Cell* **2**: 291-299
7. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) *Plant Cell* **2**: 279-289
8. Baulcombe D (1994) *Trends Microbiol* **2**: 60-63
9. Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S, Baulcombe D (1993) *EMBO J* **12**: 379-386
10. Cogoni C, Romano N, Macino G (1994) *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 205-209
11. Romano N, Macino G (1992) *Mol Microbiol* **6**: 3343-3353
12. Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G (1996) *EMBO J* **15**: 3153-3163
13. Guo S, Kemphues K (1995) *Cell* **81**: 611-620
14. Krol AR, Mol JN, Stuitje AR (1988) *Gene* **10**: 45-50
15. Rocheleau CE, Downs WD, Lin R, Wittmann C, Bei Y, Cha YH, Ali M, Priess JR, Mello CC (1997) *Cell* **90**: 707-716
16. Palauqui JC, Elmayer T, Pollien JM, Vaucheret H (1997) *EMBO J* **16**: 4738-4745
17. Voignet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998) *Cell* **95**: 177-187
18. Ketting RF, Plasterk RH (2000) *Nature* **404**: 296-268
19. Montgomery MK, Fire A (1998) *Trends Genet* **14**: 255-258
20. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) *Nature* **391**: 806-811
21. Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15502-15507
22. Akashi H, Miyagishi M, Taira K (2001) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **11**: 359-367
23. Vaucheret H, Beclin C, Fagard M (2001) *J Cell Sci* **114**: 3083-3091
24. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) *Nature* **411**: 494-498
25. Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) *Science* **286**: 950-952
26. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) *Nature* **404**: 293-296
27. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) *Cell* **101**: 25-33
28. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) *Nature* **409**: 363-366
29. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) *Genes Dev* **15**: 188-200
30. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9742-9747
31. Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, Tsagris M, Tabler M (2001) *Curr Biol* **11**: 1776-1780
32. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001) *EMBO J* **20**: 6877-6888
33. Parrish S, Fire A (2001) *RNA* **7**: 1397-1402
34. Nykanen A, Haley B, Zamore PD (2001) *Cell* **107**: 309-321
35. Yu J-Y, DeRuijter SL, Turner DL (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6047-6052
36. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) *Science* **293**: 1146-1150
37. Rhodes MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge ChB, Bartel B, Bartel DP (2002) *Cell* **110**: 513-520
38. McManus MT, Sharp PA (2002) *Nature* **3**: 737-747
39. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) *Genes Dev* **15**: 2654-2659
40. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) *Cell* **106**: 23-34
41. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) *Science* **293**: 834-838
42. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A (2000) *Mol Cell* **6**: 1077-1087
43. Cogoni C, Macino G (1999) *Nature* **399**: 166-169
44. Mourrain P, Beclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) *Cell* **101**: 533-542
45. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000) *Cell* **101**: 543-553
46. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001) *Cell* **107**: 465-76
47. Kennerdell JR, Carthew RW (1998) *Cell* **95**: 1017-1026

48. Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11650-11654
49. Rynes J-P, Drocourt D, Tiraby M, Tiraby G (2003) InvivoGen, www.invivogen.com
50. Miyagishi M, Taira K (2002) *Nat Biotech* **19**:497-508
51. Sui G, Soohoo Ch, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5515-5520
52. Brummelkamp T, Bernards R, Agami R (2002) *Science* **296**: 550-553
53. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) *Genes Dev* **16**: 948-958
54. Hannon GJ (2002) *Nature* **418**: 244-251
55. Mourrain P, Beclin Ch, Elmayer T, Feuerbach F, Godon Ch, Morel J-B, Jouette D, Lacombe A-M, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo T-A, Vaucheret H (2000) *Cell* **101**: 533-542
56. Vaucheret H, Fagard M (2001) *Trends Genet* **17**: 29-35
57. Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) *Nature* **411**: 834-842
58. Matzke MA, Matzke AJ, Pruss GJ, Vance VB (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**: 221-227
59. Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6516-6521
60. Baulcombe D (2001) *Nature* **409**: 295-296
61. Voelker LL, Dybvig K (1998) *Methods Mol Biol* **104**: 235-238
62. Ding SW (2000) *Curr Opin Biotechnol* **11**: 152-156
63. Wu Scharf D, Jeong B, Zhang Ch, Cerutti H (2000) *Science* **290**: 1159-1162
64. Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 70-75
65. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) *Cell* **76**: 567-576
66. Pal—Bhadra M, Bhadra U, Bichler JA (2002) *Mol Cell* **9**: 315-327
67. Tabara H (1999) *Cell* **99**: 123-132
68. Dudley NR, Labbe JC, Goldstein B (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4191-4196
69. Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li M-J, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J (2002) *Nat Biotech* **19**: 500-505
70. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Berford P J, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA (2002) *Nat Med* **8**: 681-686
71. Coburn GA, Cullen BR (2002) *J Virol* **76**: 9225-9231
72. Jacque J-M, Triques K, Stevenson M (2002) *Nature* **418**:435-438
- 73 Gitlin L, Karelsky S, Andino R (2002) *Nature* **418**: 430-434
74. McManus MT, Sharp PA (2002) *Nat Rev Genet* **3**:737- 747
75. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000) *Nature* **408**: 325-330
76. Goncey P, Echeverri Ch, Oegema K, Coulson A, Jones SJM, Copley RR, Duperon J, Oegema J, Brchm M, Cassin E, Hannak E, Kirkham M, Pichler S, Flohrs K, Goessen A, Leidel S, Alleaume AM, Martin C, Ozlu N, Bork P, Hyman AA (2000) *Nature* **408**:331-33676
77. Cogoni C, Maciano G (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10233-10238
78. Cogoni C, Macino G (1999) *Nature* **399**: 166-169
79. Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM (2000) *Curr Biol* **10**:169-178
80. Dehio C, Schell J (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5538-5542
81. Furner IJ, Sheikh MA, Collett CE (1998) *Genetics* **149**: 651-662
82. Lohmann JU, Endl I, Bosch TC (1999) *Dev Biol* **214**: 211-214
83. Ngo H, Tschudi C, Guil K, Ullu E (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14687-14692
84. Sanchez AA, Newmark PA (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5049-5054
85. Kennerdell JR, Carthew RW (1998) *Cell* **95**: 1017-1026
86. Misquitta L, Paterson BM (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1451-1456
87. Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchel JA (1997) *Cell* **90**: 479-490
88. Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchel JA (1999) *Cell* **99**: 35-46
89. Tobara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999) *Cell* **99**: 123-132
90. Ketting RF, Haverkamp THA, van Luenen HGAM, Plasterk RHA (1999) *Cell* **99**: 133-141
91. Escobar MA, Dandekar AMW: *Noncoding RNAs: Molecular biology and Molecular Medicin*, Eds Barciszewski J, Erdmann VA, Landes Bioscience USA (2002) w druku

Jak działa melatonina?

How does melatonin work?

PIOTR TADEUSZ POPŁAWSKI¹, RAFAŁ ANDRZEJ DERLACZ²

Spis treści:

- II. Receptory błonowe wiążące melatoninę
 - II-1. Klasyfikacja
 - II-2. Receptory typu ML1
 - II-2-a. Budowa
 - II-2-b. Działanie receptorów mt1
 - II-2-c. Działanie receptorów MT2 i Mel_{1c}
 - II-3. Receptory typu ML2 (MT3)
- III. Receptory jądrowe wiążące melatoninę
- IV. Działanie melatoniny na poziomie komórkowym
 - IV-1. Wiązanie hormonu do kalmoduliny i modyfikacja struktury cytoszkieletu
 - IV-2. Zmiany w lokalizacji komórkowej kalmoduliny
 - IV-3. Oddziaływanie melatoniny z PKC
 - IV-4. Melatonina jako przeciwutleniacz
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Membrane receptors
 - II-1. Classification
 - II-2. ML1 type of receptors
 - II-2-a. Structure
 - II-2-b. Function of mt1 receptors
 - II-2-c. Function of MT2 i Mel_{1c} receptors
 - II-3. ML2 (MT3) type of receptors
- III. Nuclear receptors
- IV. Cellular mechanism of melatonin action
 - IV-1. Binding to calmodulin and modification of the cytoskeletal structure
 - IV-2. Changes in calmodulin localisation
 - IV-3. Interaction with the PKC
 - IV-4. Melatonin as an antioxidant
- V. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: AF — funkcja transaktywacyjna; AFMK — N¹-metylo-N²-formylo-5-metoksykynuramina; CaM — kalmodulina; cAMP — cykliczny adenozyńmonofosforan; CAT — katalaza; cGMP — cykliczny guanozyńmonofosforan; DAG — diacyloglicerol; GPx — peroksydaza glutationowa; GRd — reduktaza glutationowa; GSH — zredukowany glutation; GSSG — utleniony glutation; IP₃ — trifosfoinozytol; MAPs — białka wiążące mikrotubule; NOS — syntaza tlenku azotu; PGF₂ — prostaglandyna F₂; PKC — kinaza białkowa C; QR2 — reduktaza chinonowa 2; ROREs — elementy odpowiedzi hormonalnej; ROR/RZR — grupa receptorów jądrowych związków będących pochodnymi retinolu; SCN — jądra nadskrzyżowaniowe; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; TM — domena transbłonowa

I. Wstęp

Melatonina (*N*-acetylo-5-metoksytryptamina), zwana tak ze względu na efekt jaki wywołuje na znajdujący się w skórze płazów i gadów pigment melaninowy, została wykryta około 50 lat temu. Początkowo uważano, że występuje jedynie u kręgowców, niemniej ostatnie badania pokazały jej obecność

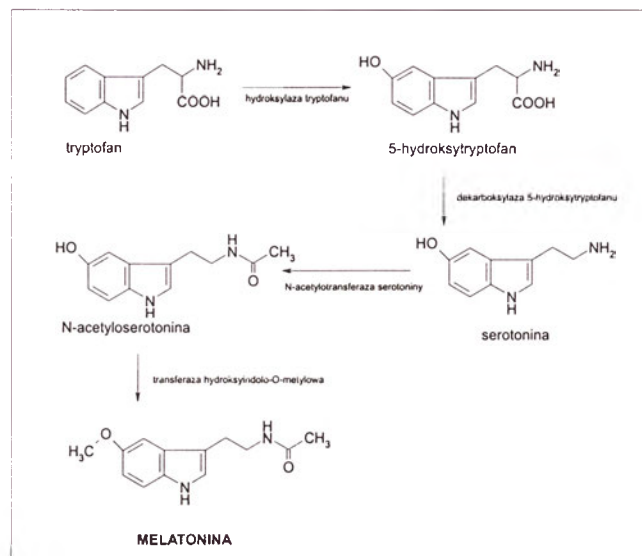
także u bakterii, drożdży, pierwotniaków, owadów, a nawet u roślin [1-2]. Postrzegana dotychczas jedynie jako hormon regulujący cykl dobowy czy sezonowy organizmu, okazała się być doskonałym przeciwutleniaczem, który nie tylko neutralizuje aktywne formy tlenu, ale także reguluje aktywność wielu enzymów odpowiedzialnych za ich usuwanie (m.in. reduktazy glutationowej i peroksydazy glutationowej) [3].

Wiele kontrowersji wzbudzają pojawiające się ostatnio w prasie i telewizji informacje przedstawiające melatoninę jako cudowny środek, którego stosowanie jest zbawienne w wielu przypadkach i nie niesie przy tym absolutnie żadnych skutków ubocznych, nawet w przypadku stosowania dawek kilkaset razy przewyższających jego dzienną produkcję u dorosłego człowieka (około 30 µg) [4]. Sugeruje się, że melatonina może być lekiem zwalczającym zaburzenia snu, choroby nowotworowe, chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona, a nawet infekcję wąglikiem [2, 5, 6]. Niestety, większość tych informacji nie ma dostatecznego potwierdzenia w wynikach badań klinicznych.

Melatonina jako mała, doskonale rozpuszczalna tak w wodzie jak i w tłuszczach cząsteczka, nie jest w organizmie magazynowana, a szybkość jej uwalniania do krwiobiegu odpowiada szybkości syntezy. U zwierząt synteza melatoniny, której prekursorem jest

¹Student V roku, ²dr, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: kogut@biol.uw.edu.pl, rderlacz@biol.uw.edu.pl

pobierany z krwi tryptofan, zachodzi przede wszystkim w szyszynce [2, 4], choć niewielkie ilości hormonu mogą być także wytwarzane przez siatkówkę i soczewkę oka [6, 8, 9], nabłonek przewodu pokarmowego [10], czy komórki krwi [5, 11]. Proces syntezy melatoniny przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Synteza melatoniny w komórkach szyszynki.

Stężenie melatoniny we krwi człowieka waha się zależnie od pory dnia i roku od 0,14 do 2,3 nM. Zmiany jej poziomu w krwiobiegu są skorelowane z długością dnia i nocy. I tak w ciągu dnia stężenie melatoniny jest małe, a wartość maksymalną osiąga między godziną 24. a 03. nad ranem [12]. Podobny profil wydzielania hormonu został opisany nawet dla jednokomórkowych glonów [2]. Co więcej, jest on taki sam dla zwierząt prowadzących zarówno dzienny, jak i nocny tryb życia [2]. Wykazano też, że u człowieka melatonina nagromadza się w szpiku kostnym [13, 14], płynie mózgowo-rdzeniowym [15] i żółci [16].

Jesteśmy zgodni co do jednego — hormon ten działa w komórce na co najmniej trzy sposoby: (a) w wyniku wiązania melatoniny przez receptory błonowe, (b) na skutek oddziaływania z receptorami jądrowymi i wreszcie (c) poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami cytoplazmatycznymi.

II. Receptory błonowe wiążące melatoninę

II-1. Klasyfikacja

Ze względu na powinowactwo do hormonu, błonowe receptory wiążące melatoninę można podzielić na dwie grupy: ML1 wiążące melatoninę

przy stężeniu pikomolarnym hormonu oraz ML2 (zwane też MT3) wiążące melatoninę przy stężeniu nanomolarnym hormonu [17]. Wśród receptorów z grupy ML1 wyróżniono dodatkowo trzy podtypy: mt1 (Mel_{1a}), MT2 (Mel_{1b}) i Mel_{1c} [18]. Wyszczególniono je na podstawie podobieństwa genetycznego oraz strukturalnego: i tak receptory mt1 wykazują 60% podobieństwa sekwencji aminokwasowej do MT2, a mt1 i MT2 60% podobieństwa sekwencji aminokwasowej do Mel_{1c} [18]. Podział receptorów melatoninowych przedstawiono w Tabeli 1.

II-2. Receptory typu ML1

II-2-a. Budowa

Receptory należące do tej grupy współdziałają z różnymi białkami G: Gi₂, Gi₃, Gq/11 [18, 19]. Posiadają one 7 hydrofobowych domen transbłonowych, N-koniec białka znajduje się po stronie zewnątrzkomórkowej, a C-koniec w cytoplazmie. Poniżej trzeciej domeny transbłonowej (TM3) występują charakterystyczne motywy NRY oraz C(C/Y)ICHS. Z kolei siódma domena transbłonowa (TM7) charakteryzuje się obecnością motywu NAXXY [18]. Za wiązanie melatoniny odpowiedzialna jest znajdująca się w piątej domenie transbłonowej (TM5) konserwowana reszta histydyny, która oddziałuje z grupą 5-metoksy hormonu [20-22], oraz znajdujące się w domenie siódmej seryna i alanina [20, 23].

II-2-b. Działanie receptorów mt1

Receptory mt1 współdziałają z wrażliwymi na toksynę krztuśca białkami Gi (Gi₂, Gi₃) [17-19, 24]. Białka te hamują aktywność cykazy adenylanowej, powodując obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP. Wykazano m.in., że w komórkach skóry ludzi melatonina hamuje spowodowane podaniem forskoliny nagromadzenie się tego cyklicznego nukleotydu [24]. Co więcej, melatonina za pośrednictwem receptorów z grupy mt1 może wspomagać wywołaną przez prostaglandynę F_{2α} (PGF_{2α}) stymulację fosfolipazy C (PLC) (Ryc. 2). Za hamowanie cykazy adenylanowej odpowiedzialna jest podjednostka α białka Gi, podczas gdy podjednostki βγ powodują wzrost aktywności PLC, co prowadzi w efekcie do wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, następstwem czego jest aktywacja kinazy białkowej C (PKC) [19]. Receptory mt1 mogą także współdziałać z białkami G niewrażliwymi na toksynę krztuśca — Gq/11. Podjednostki α tych białek podobnie do dimeru βγ białek Gi aktywują fosfolipazę C, zwiększając dodatkowo poziom wewnątrzkomór-

kowego wapnia i aktywność PKC [19]. Wiadomo również, że białka Gq/11 są odpowiedzialne za aktywację kinaz MAP oraz niezależną od fosfolipazy C stymulację fosfolipazy D (PLD) [19, 25-27], a także regulację działania zależnych od napięcia kanałów wapniowych w neuronach [19, 28]. Co więcej, za pośrednictwem receptorów mt1 melatonina może aktywować potasowe kanały jonowe Kir3, 1/2, 2 i stymulować produkcję IP₃ [19, 29-33].

Tabela 1

Klasyfikacja i charakterystyka błonowych receptorów melatoniny

Typ receptora	Podtyp receptora	Charakterystyka	Efekty
ML1 (wiążące melatoninę przy pikomolarnym stężeniu hormonu)	mt1(Mel1 _a)	Współdziałają z białkami Gi ₂ , Gi ₃ , Gq/11	↓cAMP; ↑Ca ²⁺ ; ↑IP ₃ ; wzrost aktywności PLC, PKC, PLD oraz kinaz MAP; regulacja działania bramkowanych elektrycznie kanałów wapniowych i kanałów jonowych KIR 3, 1/2, 2
	MT2 (Mel1 _b)	Współdziałają z białkami Gi ₂ , Gi ₃ , Gq/11	Efekty takie same jak dla receptora mt1 oraz ↓cGMP
	Mel1 _c	Współdziałają z białkami Gi ₂ , Gi ₃ , Gq/11	
ML2 (MT3) (wiążące melatoninę przy nanomolarnym stężeniu hormonu)		Homolog ludzkiej reduktazy chinonowej 2	Detoksykacja komórki

II-2-c. Działanie receptorów MT2 i Mel1_c

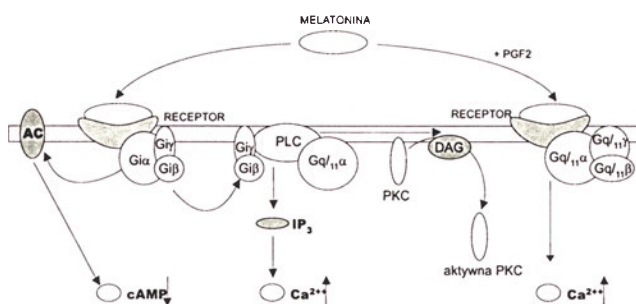
Wszystkie receptory należące do typu ML₁ hamują aktywowaną cyklazę adenylanową zmniejszając tym samym syntezę cAMP, ale tylko MT2 i Mel1_c mają wpływ na poziom wewnątrzkomórkowego cGMP. Wykazano, że w komórkach linii HEK293 ze sklonowanymi receptorami MT2 i Mel1_c melatonina obniża podwyższony uprzednio poziom cGMP [34]. Nie ma ona jednak wpływu na podstawową zawartość tego cyklicznego nukleotydu w cytoplazmie. Omawiane receptory pośredniczą ponadto w hamowaniu aktywności rozpuszczalnej formy (nie związanej z błonami) cyklazy guanylowej [34]. Stwierdzono, że w korze mózgu kurczą poziom cGMP zmienia się wraz z dobowymi zmianami poziomu melatoniny, a receptory MT2 występują w dwóch ważnych dla działania melatoniny miejscach: w jądrach nadskrzyżowaniowych (SCN) i w siatkówce [34-36]. W siatkówce kręgowców cGMP bierze udział w wywoływaniu przez światło szlaku sygnałowym rodopsyny [37, 38], a w SCN w regulacji rytmu dobowego [37, 39-41]. Wydaje się, że rolą melatoniny w tych, a może także w innych tkankach jest

hamowanie wzrostu poziomu cGMP wywoływanego przez inne czynniki.

II-3. Receptory typu ML2 (MT3)

Receptor MT3 nie współdziała z białkami G. Jest to białko o masie 26 kDa, będące homologiem ludzkiej reduktazy chinonowej 2 (QR2) [42]. Badania receptorów pochodzących z nerki chomika syryjskiego

wykazały 95% homologii pod względem sekwencji aminokwasowej między MT3 a QR2, niemniej okazało się, że MT3 ma o kilka rzędów wielkości wyższe powinowactwo do substratów [42]. Wykazano obecność MT3 skorelowaną z aktywnością QR2 w wątro-

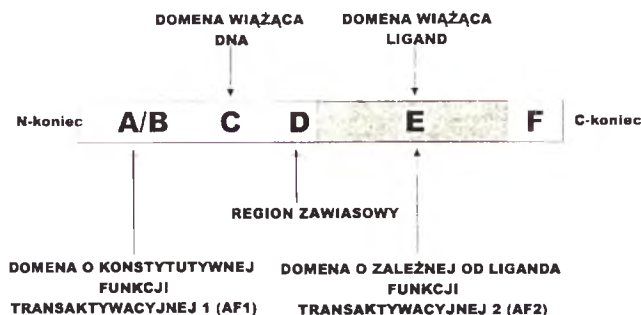


Ryc. 2. Współdziałanie melatoniny z różnymi typami białek G (Gi oraz Gq) prowadzące do spadku wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i do wzrostu stężenia Ca²⁺. Aktywacja PLC prowadzi do powstania IP₃ stymulującego uwolnienie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego oraz nagromadzenie się DAG wspomagającego aktywację PKC. α, β, γ — podjednostki białka G; PLC — fosfolipaza C; PGF₂ — prostaglandyna F₂; PKC — kinaza białkowa C; DAG — diacylglicerol; IP₃ — trifosfoinozytol.

bie, nerce, mózgu, sercu, tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych i płucach u chomika, myszy i psa. Nie zauważono natomiast korelacji między występowaniem MT3 i aktywnością QR2 u małpy *Macaaca fascicularicus*, co wynika najprawdopodobniej z tego, że małpy w odróżnieniu od chomików, myszy i psów nie wykazują wyraźnego cyklu reprodukcyjnego [43].

III. Receptory jądrowe

Drugim rodzajem receptorów wiążących melatoninę są receptory jądrowe, należące do podrodziny ROR/RZR (ang.: *retinoid orphan receptors/retinoid Z receptors*) [44]. Podrodzina ta obejmuje produkty trzech genów: (i) różne warianty ROR powstające w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA (ROR1 α , ROR α 2, ROR α 3 i RZR α), warunkujące różnorodność domeny N-końcowej, (ii) RZR β oraz (iii) ROR γ [44-47]. Typowy receptor ROR/RZR posiada N-końcową, zmienną domenę A/B o konstytutywnej funkcji transaktywacyjnej (AF1), konserwowaną, wiążącą DNA domenę C, zmienną domenę D (tzw. region zawiasowy), oraz domenę E wiążącą ligand i zawierającą konstytutywną zależną od liganda funkcję transaktywacyjną 2 (AF2), a także opcjonalnie występującą domenę F (Ryc. 3) [44, 49, 50]. Kon-



Ryc. 3. Budowa receptora jądrowego z rodziny ROR/RZR. A/B — zmienna domena charakteryzująca się konstytutywną funkcją transaktywacyjną 1 (AF1), C — konserwowana domena wiążąca DNA, D — region zawiasowy, E — domena wiążąca ligand, wykazująca funkcję transaktywacyjną 2 (AF2); F — dodatkowa domena występująca opcjonalnie.

stytutywne aktywności transkrypcyjne (pozytywne lub negatywne zależnie od typu promotora) mogą być wzmacniane przez ligand, w tym przypadku przez melatoninę. Receptory ROR/RZR wiążą się do DNA jako monomery i rozpoznają tzw. elementy odpowiedzi hormonalnej (ROREs) reprezentowane przez sekwencję A/GGGTCA [44, 45, 47, 51-56].

Podobnie jak w receptorach jądrowych innego typu C-końcowa sekwencja posiadająca AF2 odpowiada za interakcję receptora z różnymi koaktywatorami [44, 57]. Zostało dowiedzione wiązanie p300, MyoD, bHLH i innych czynników transkrypcyjnych do receptorów ROR/RZR [44, 58]. Oddziaływania receptorów z koaktywatorami mogą się również pojawiać pod nieobecność liganda, co doskonale tłumaczyłoby konstytutywną aktywność ROR/RZR [44, 59].

Odkrycie ROREs w promotorach genów kodujących białka o wielu różnych funkcjach (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, apolipoproteina, oksytocyna, laminina B1, N-myc, fosfolipaza A, 5-lipooksygenaza), sugeruje bardzo szeroki zakres działania ROR/RZR. Receptory te są zaangażowane w regulację procesów immunologicznych, różnicowanie centralnego układu nerwowego oraz dojrzewanie limfocytów T [44].

IV. Działanie melatoniny na poziomie komórkowym

IV-1. Wiązanie się do kalmoduliny i modyfikacja struktury cytoszkieletu

Melatonina jako związek lipofilny może swobodnie przenikać przez błony komórkowe i oddziaływać w cytoplazmie z różnymi związkami docelowymi. Niektórzy autorzy sugerują, że za cytoplazmatyczny receptor melatoninowy należy uznać kalmodulinę (CaM).

Melatonina wiąże się do kalmoduliny z dużym powinowactwem, a wiązanie to jest odwracalne i zależne od jonów wapnia [60-62]. Co więcej, hormon ten hamuje zależną od CaM kinazę II (Ki = 16 nM), przy czym dotyczy to także procesu autofosforylacji samej kinazy [60, 62]. Obok zależnej od CaM kinazy II melatonina hamuje aktywność wielu innych enzymów, których aktywność zależy od kalmoduliny, takich jak: syntaza tlenu azotu (NOS) [60, 63], fosfodiesteraza cAMP [60, 64] oraz zależna od Ca²⁺/Mg²⁺ ATPaza [60, 65]. Wiązanie kompleksu Ca²⁺/kalmodulina do białek towarzyszących mikrotubulom (MAPs — ang.: *microtubule associated proteins*) i tubulinie hamuje polimeryzację tej ostatniej [60, 66]. Wykazano, że wiązanie melatoniny do kompleksu Ca²⁺/kalmodulina znosi jego hamujący wpływ na polimeryzację mikrotubul [60, 67]. Efekt wywołany przez melatoninę jest zbliżony do obserwowanego po podaniu antagonisty CaM: trifluoperazyny w stężeniu 10 μ M, ale jest bardziej wydajny, gdyż zachodzi już przy stężeniu 1 nM hormonu. Także w badaniach

in situ wykazano, że podanie melatoniny powoduje przerost mikrotubul [60, 67]. Obok znoszenia działania kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina, melatonina w stężeniu mikromolowym łącząc się z tubuliną hamuje jej polimeryzację [60]. Można więc wskazać dwa różne sposoby działania melatoniny na strukturę cytoszkieletu: po pierwsze — przerost mikrotubul wywołany antagonistycznym działaniem melatoniny względem kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina (stężenie nanomolowe hormonu), po drugie — rozproszenie mikrotubul wywołane przez wiązanie melatoniny do tubuliny (stężenie mikromolowe melatoniny).

IV-2. Zmiany w lokalizacji komórkowej kalmoduliny

Melatonina zmienia rozmieszczenie CaM w komórce poprzez jej translokację z cytosolu do frakcji błonowej. Sugeruje to, że melatonina może wywoływać długoterminowe efekty wynikające ze zmiany stężenia kalmoduliny w różnych przedziałach subkomórkowych [68]. Stwierdzono, że podanie 1 nM melatoniny komórkom linii MDCK powoduje wzrost syntezy kalmoduliny. Co więcej, po czterodniowym podawaniu hormonu zaobserwowano 78% wzrost ilości kalmoduliny we frakcji błonowej i 60% spadek jej zawartości w cytosolu. Nie zaobserwowano natomiast zmian ilości kalmoduliny w jądrze komórkowym [68-70].

Wydaje się, że redystrybucja kalmoduliny jest spowodowana aktywacją kinazy białkowej C. Działanie melatoniny polega na stymulacji aktywności tej kinazy, co w efekcie prowadzi do fosforylacji białek zależnych od kalmoduliny. Ufosforylowane białka nie łączą się z kalmoduliną, a nawet odłączają od niej, a wolna kalmodulina jest transportowana do frakcji błonowej. Przemieszczająca się kalmodulina wiąże różne białka błonowe (także o aktywności enzymatycznej), co może tłumaczyć, dlaczego melatonina wywołuje tak wiele efektów [68].

IV-3. Oddziaływanie z PKC

Mikrotubule są zakotwiczone w filamentach pośrednich rozrzuconych równomiernie po całej cytoplazmie, a także w strefie okołojądrowej [60, 71]. Podanie 1 nM melatoniny zmienia rozmieszczenie i kształt tych filamentów. Stają się one krótkie, cienkie i znikają ze strefy okołojądrowej [60]. Wpływ melatoniny na filamenty pośrednie może być skutkiem jej oddziaływania z PKC, gdyż rozmieszczenie filamentów pośrednich zależy od fosforylacji przez PKC jednego z białek tworzących filamenty — wimenty-

ny [60, 72]. Kinaza białkowa C jest aktywowana przez jony wapnia i diacylglicerol (DAG), a aktywacja jest poprzedzona translokacją kinazy z cytosolu do frakcji błonowej. Aktywna PKC przemieszcza się w rejon cytoszkieletu, gdzie fosforyluje wimentynę, powodując zniszczenie struktury filamentów [60, 73, 74]. Zarówno melatonina jak i estry forbolu, będące aktywatorem PKC — powodują jej translokację do frakcji okołobłonowej, a fosforylacja wimentyny jest stymulowana przez oba związki już po 5 minutach inkubacji. Melatonina może wobec tego powodować rozproszenie filamentów pośrednich dzięki oddziaływaniu z PKC.

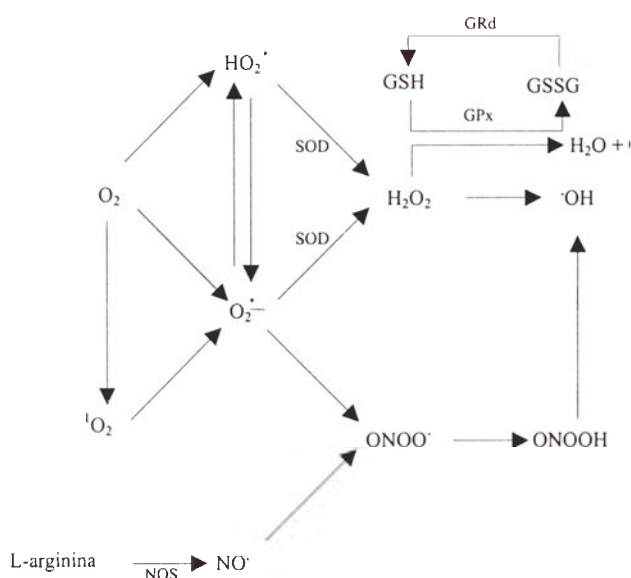
IV-4. Melatonina jako przeciwutleniacz

Oprócz detoksykacji komórki przez melatoninę w wyniku regulacji ekspresji niektórych genów (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, reduktaza glutationowa, peroksydaza glutationowa) oraz na skutek hamowania aktywności enzymów powodujących powstawanie wolnych rodników (syntaza tlenu azotu) — może ona działać jako przeciwutleniacz i wymiatacz wolnych rodników. Melatonina usuwa m.in. tlen singletowy — $^1\text{O}_2$, nadtlenek wodoru — H_2O_2 , tlenek azotu — NO^* , jon peroksynitrowy — ONOO^* , kwas peroksynitrowy — ONOOH oraz rodniki peroksydowe [75].

Właściwości redukujące indoli i ich pochodnych są znane od dawna. Około 10 lat temu odkryto, że melatonina neutralizuje wysoko reaktywny rodnik wodorotlenowy [75, 76]. Od tamtego czasu pojawiło się wiele prac, które dowodzą, że hormon ten i jego metabolity są wyjątkowo efektywnymi wymiataczami wolnych rodników i działającymi na terenie całego organizmu przeciwutleniaczami. Warte podkreślenia jest to, że melatonina usuwa wolne rodniki tak w środowisku hydrofilowym, jak i hydrofobowym, jest przy tym znacznie skuteczniejsza od witaminy C, witaminy E oraz glutationu [75].

Tlen cząsteczkowy przechodzi w stan wzbudzenia tworząc tlen singletowy (Ryc. 4). Melatonina usuwa powstały w wyniku działania UV tlen singletowy ze stałą szybkością $2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [75, 77]. Dodanie jednego elektronu do tlenu prowadzi następnie do powstania anionorodnika ponadtlenkowego (Ryc. 4), którego każda komórka może w ciągu 24 godzin wyprodukować 2×10^{10} cząsteczek [75, 78]. Anionorodnik ten pojawia się w komórkach fagocytujących oraz w intensywnie wytwarzających ATP mitochondriach. Powstaje też podczas autooksydacji katecholamin, soli kwasu foliowego oraz niektórych toksyn i leków. Jest on wysoce toksyczny, a jego obecność

dodatkowo ułatwia powstawanie znacznie bardziej reaktywnych rodników. Nie wykazano zdolności melatoniny do usuwania anionorodnika ponadtlenkowego [75], niemniej Hardal and i wsp. [79] wysunęli hipotezę, że może on być przez melatoninę usuwany. W ich teorii melatonina łącząc się z rodnikiem wodorotlenowym daje związek, który następnie łączy się z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworząc *N*¹-metylo-*N*²-formylo-5-metoksykynuraminę (AFMK). Szlak taki nie został jednak jeszcze jednoznacznie opisany.

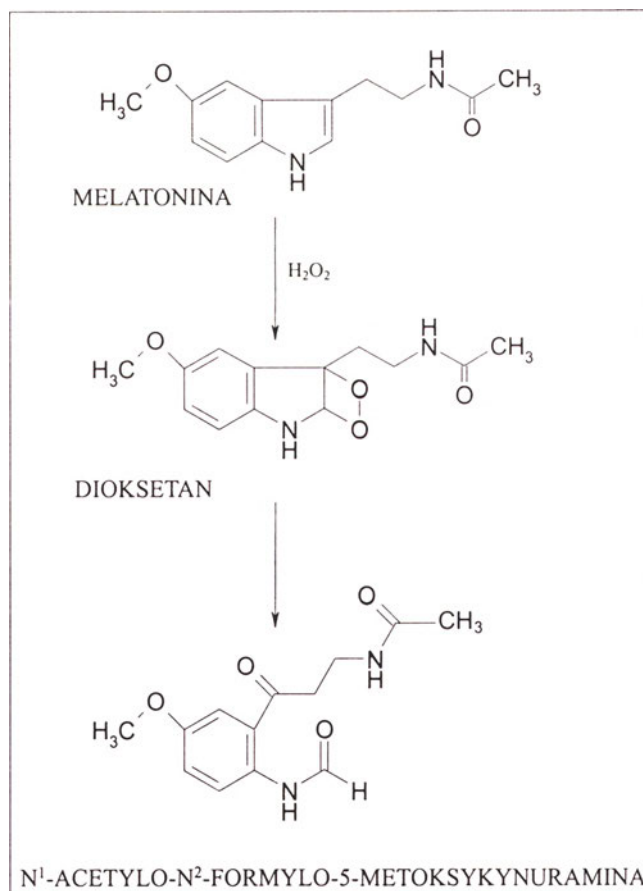


Ryc. 4. Powstawanie wolnych rodników w organizmach żywych. ¹O₂ — tlen singletowy, O₂⁻ — anionorodnik ponadtlenkowy, HO₂[·] — rodnik wodoronadtlenkowy, H₂O₂ — nadtlenek wodoru, OH[·] — rodnik wodorotlenowy, ONOO⁻ — jon peroksynitrowy, ONOOH — kwas peroksynitrowy, NO — tlenek azotu, GRd — reduktaza glutationowa, GPx — peroksydaza glutationowa, GSH — zredukowany glutation, GSSG — utleniony glutation, SOD — dysmutaza ponadtlenkowa, NOS — syntaza tlenu azotu.

Kolejny toksyczny związek to nadtlenek wodoru (H₂O₂) powstający podczas dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego przez dysmutazę ponadtlenkową, jak również w wyniku innych reakcji. Wewnątrzkomórkowe stężenia nadtlenu wodoru są kontrolowane działaniem katalazy i peroksydazy glutationowej (Ryc. 4). Usuwanie H₂O₂ przez melatoninę jest zależne od stężenia hormonu i następuje w dwóch etapach. Pierwszy etap zachodzi ze stałą szybkością $2, 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Drugi jest znacznie wolniejszy, a prędkość usuwania H₂O₂ stopniowo maleje. Podczas neutralizacji H₂O₂ melatonina jest przekształcana w AFMK (Ryc. 5). Doświadczenia, które doprowadziły do powyższych wniosków, były przeprowadzane *in vitro*. Jeżeli proces usuwania H₂O₂ przez melatoninę zachodzi także w komórkach,

to melatonina odgrywa obok katalazy i GPx kluczową rolę w usuwaniu tego związku [75].

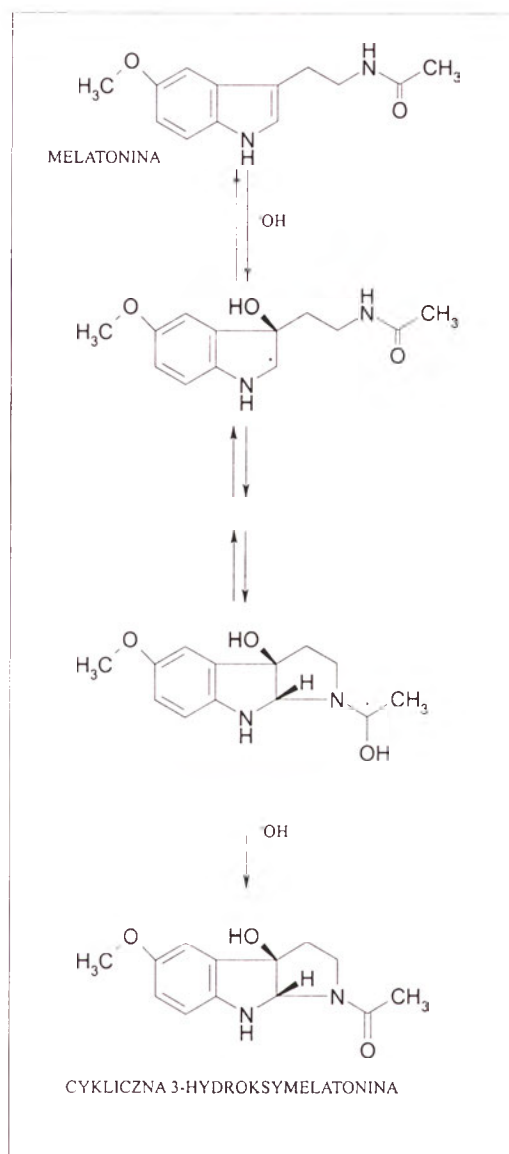
Rodnik wodorotlenowy powstaje na dwa sposoby: po pierwsze — w wyniku rozszczepienia wody pod wpływem promieniowania jonizującego i po drugie — podczas oddziaływania H₂O₂ z metalami przejściowymi w reakcji Fentona (Ryc. 4). Jest on najbardziej reaktywnym rodnikiem. Powoduje znaczące uszkodzenia sąsiadujących z nim cząsteczek takich jak: RNA, DNA, lipidy, białka czy węglowodany. Jednak z powodu wysokiej reaktywności działa on tylko w niewielkiej odległości od miejsca powstania. Ochronę przed tym rodnikiem stanowi wiele mechanizmów obronnych takich jak usuwanie H₂O₂ w reakcjach katalizowanych przez katalazę i peroksydazę glutationową, chelatowanie jonów dwuwartościowych biorących udział w reakcji Fentona, działanie przeciwutleniaczy, reperowanie i eliminowanie uszkodzonych przez rodnik wodorotlenowy związków. Melatonina jest znacznie bardziej efektywnym wymiataczem OH niż glutation i mannitol.



Ryc. 5. Usuwanie nadtlenu wodoru przez melatoninę.

Szybkość reakcji usuwania rodnika wodorotlenowego w jej obecności wynosi około $1, 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [75, 80, 81]. Każda cząsteczka melatoniny potrafi usunąć dwa rodniki wodorotlenowe, w reakcji która prowadzi do powstania cyklicznej 3-hydroksymela-

toniny (3-OHM) [75] (Ryc. 6). 3-OHM została wykryta w moczu ludzi i szczurów. Związek ten jest markerem ilości rodnika wodorotlenowego usuniętego przez melatoninę.



Ryc. 6. Usuwanie rodnika wodorotlenowego przez melatoninę.

Ze względu na swoją strukturę elektronową azot może tworzyć wiele reaktywnych związków. Badano interakcje melatoniny z następującymi wysokoreaktywnymi związkami zawierającymi azot — tlenkiem azotu (NO^\bullet), jonem peroksynitrowym (ONOO^-) i kwasem peroksynitrowym (ONOOH) (Ryc. 4).

Tlenek azotu jest produkowany przez syntazę tlenu azotu w obecności L-argininy jako substratu. Ma krótki okres półtrwania (we krwi poniżej 1 s, a w tkankach 6-10 s). Pełni wiele ważnych funkcji zarówno w organizmach zwierzęcych jak i roślinnych. Jednak oprócz pozytywnych efektów działania tlenu azotu są i negatywne. Związek ten może być toksyczny, gdyż bierze udział w wielu procesach neuro-

degeneracyjnych [75, 82]. Wykazano, że melatonina usuwa tlenek azotu, a szybkość tej reakcji wynosi $3,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [75, 81, 83].

Tlenek azotu reaguje z rodnikiem ponadtlenkowym tworząc ONOO^- . Reakcja ta jest 3 razy szybsza niż usuwanie rodnika ponadtlenkowego przez SOD. Jon peroksynitrowy ma właściwości nitrujące i jest silnym utleniaczem. W fizjologicznym pH jon peroksynitrowy szybko przyłącza proton i powstaje kwas peroksynitrowy, związek powodujący powstawanie wielu silnych utleniaczy. Zarówno ONOO^- jak i ONOOH reagują z melatoniną. Jednym z produktów tej reakcji jest hydroksymelatonina, która jest także produktem degradacji melatoniny. Co więcej, melatonina zapobiega nitrozowaniu tyrozyny [75, 84].

Melatonina bierze także udział w usuwaniu rodników peroksydowych (ROO^\bullet). Hormon ten jest dwa razy bardziej efektywnym przeciwutleniaczem niż witamina E [75, 85]. Jednak badania nad rodnikiem lipoperoksydowym [75, 86-88] wykazały, że melatonina jest gorszym wymiataczem tego rodnika od α -tokoferolu. Usuwa także rodnik aloksylowy [75, 89] i kwas nadchlorowy [9, 75, 86, 90].

Melatonina lokalizuje się na powierzchni błon komórkowych w pobliżu polarnych głów fosfolipidów, co umożliwia ochronę błon komórkowych przed utlenianiem [9, 91]. Dodatkowo zmieniając płynność błon bardzo skutecznie usuwa rodniki zanim uszkodzą lipidy i białka błony komórkowej [9, 92, 93].

V. Podsumowanie

Melatonina jest hormonem, który działa w komórce za pośrednictwem zarówno receptorów błonowych, jak i jądrowych oraz bezpośrednio oddziałuje ze związkami znajdującymi się w cytoplazmie. Wpływa ona na poziom wielu wtórnych przekaźników informacji, takich jak cAMP, cGMP, Ca^{2+} i IP_3 , zmienia strukturę cytoszkieletu, modyfikuje aktywność enzymów, wpływa na ekspresję genów oraz jest bardzo efektywnym przeciwutleniaczem i wymiataczem wolnych rodników. Jej przewaga nad innymi związkami o podobnym działaniu przeciwutleniającym wynika m.in. z tego, że melatonina przenika swobodnie przez wszystkie bariery w organizmie: błony komórkowe, bariera krew-mózg itp. [4]. Tak szeroki zakres działania tego hormonu stwarza możliwość wykorzystania go w terapii wielu chorób. Trwają badania nad zastosowaniem melatoniny w leczeniu nowotworów, choroby Alzheimerera, Parkinsona, czy cukrzycy. Wydaje się niemożliwe, aby poda-

nie hormonu o tak szerokim spektrum działania nie powodowało skutków ubocznych — chociaż jak dotąd nie wykazano jednak szkodliwego działania melatoniny. Dalsze badania prowadzone na poziomie komórkowym wydają się niezbędne dla zrozumienia roli, jaką melatonina pełni w organizmach żywych.

Artykuł otrzymano 9 września 2002

Zaakceptowano do druku 16 grudnia 2002

Piśmiennictwo:

- Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S, Manchester LC (2001) *Nutrition Reviews* 9: 286-290
- Vijayalaxami CRT Jr, Reiter JR, Herman TS (2002) *J Clin Oncol* 20: 2575-2601
- Reiter JR, Tan DX, Manchester LC, Calvo JR (2002) *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, str 565-613
- Karasek M (1997) *Szyszyńska i melatonina*, PWN, Łódź, str 51-54
- Cardinali DP, Brusco LI, Libereczuk C, Furio AM (2002) *Neuroendocrinol Lett* 23: 20-23
- Maestroni GJM (2001) *Exp Opin Invest Drugs* 10: 467-476
- Pang SF, Allen AE (1986) *Pineal Res Rev* 4: 55-96
- Cahill GM, Grace MS, Besharse JC (1991) *Cell Mol Neurobiol* 11: 529-535
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) *J Biomed Sci* 7: 444-458
- Bubenik GA, Ball RO, Pang SF (1992) *J Pineal Res* 12: 7-12
- Reiter RJ (1991) *Endocrin Rev* 12: 151-180
- McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) *Endocrinology* 2: 627-634
- Conti A, Coconi S, Herens, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJM (2000) *J Pineal Res* 28: 193-202
- Tan DX, Manchester RJ, Reiter RJ, Qi W, Zhang M, Weintraub S T, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC (1999) *Free Radical Biol Med* 27: 838-847
- Skinner DC, Malpoux B (1999) *Endocrinology* 140: 4399-4405
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ (1999) *Life Sci* 65: 2523-1529
- Dubcovich ML (1995) *TiPS* 16: 50-56
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C (1996) *TiPS* 17: 100-102
- Grydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R (1999) *Mol Endo* 12: 2025-2038
- Conway S, Drew JE, Mowat ES, Barrett P, Delagrangé P, Morgan PJ (2000) *The Journal of Biological Chemistry* 27: 20602-20609
- Conway S, Canning SJ, Barrett P, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Morgan PJ (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 239: 418-423
- Kokkola T, Watson MA, White J, Dowell S, Ford SM, Laitinen JT (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 249: 531-536
- Navajas C, Kokkola T, Poso A, Honka N, Gynter J, Laitinen JT (1996) *Eur J Pharmacol* 304: 173-183
- Vanecek J (1998) *Physiol Rev* 78: 687-721
- Fields TA, Casey PJ (1997) *Biochem J* 321: 561-571
- Exton JH (1997) *Eur J Biochem* 243: 10-20
- Bence K, Ma W, Kozasa T, Huang XY (1997) *Nature* 389: 296-299
- Willars GB, Challiss RA, Stuart JA, Nahorski SR (1996) *Biochem J* 316: 905-913
- Garcia-Parganeda A, Pozo D, Guerrero JM, Calvo JR (1997) *J Immunol* 159: 3774-3781
- Jockers R, Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Barret F, Morgan PJ, Guardiola B, Delagrangé P, Marullo S, Strosberg AD (1997) *Mol Endocrinol* 11: 1070-1081
- Nelson CS, Marino JL, Allen CN (1996) *Neuroreport* 7: 717-720
- McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) *Endocrinology* 138: 397-404
- Godson C, Reppert SM (1997) *Endocrinology* 138: 397-404
- Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg DA, Jockers R (1999) *Biochemical Pharmacology* 58: 633-639
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8734-8738
- Dubcovich M, Yun K, Al-Ghoul W, Benloucif S, Masana M (1998) *FASEB J* 12: 1211-1220
- Martin M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D (2000) *FASEB J* 12: 1677-1690
- Barlow-Walden L, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menéndez-Peláez A, Chen LD, Poeggeler B (1995) *Neurochem Int* 26: 497-502
- Liu C, Gillette MU (1996) *J Neurosci* 16: 744-757
- Liu C, Ding JM, Faiman LE, Gillette MU (1997) *J Neurosci* 17: 659-666
- Starkey SJ (1996) *Neurosci Lett* 11: 199-202
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchère JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA (2000) *J Biol Chem* 40: 31311-31317
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsh F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA (2001) *Biochemical Pharmacology* 61: 1369-1379
- Smirnov AN (2001) *Biochemistry (Mosc)* 1: 19-26
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G (1994) *Genes Dev* 8: 538-553
- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM (1994) *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1976-1983
- Medvedev A, Yan ZH, Hirose T, Giguere V, Jetten AM (1996) *Gene* 181: 199-206
- Girguere V, Beatty B, Squire J, Copeland NG, Jenkins NA (1995) *Genomics* 28: 596-598
- Medvedev A, Chistokhina A, Hirose T, Jetten AM (1997) *Genomics* 46: 93-102
- Freedman LP (red) (1998) *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors* Birkhäuser Boston
- Schradeer M, Danielsson C, Wiesenberger I, Carlberg C (1996) *J Biol Chem* 271: 19732-19736
- Greiner EF, Kirfel J, Greschik H, Dorflinger U, Becker P, Mercep A, Schule R (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10105-10110
- Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, deLamarter JF, Becker-Andre M (1994) *Mol Endocrinol* 8: 757-770
- Giguere V, McBroom LDB, Flock G (1995) *Mol Cell Bio* 15: 2517-2526
- Winrow CJ, Capone JP, Rachubinski RA (1998) *J Biol Chem* 273: 31442-31448
- McBroom LDB, Flock G, Girguere V (1995) *Mol Cell Bio* 15: 796-808
- Bagchi MK (1998) W: Freedman LP (red) *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors* Birkhauser Boston, str 159-189
- Ortiz MA, Piedrafita FJ, Pfahl M, Maki R (1995) 9: 1679-1691
- Atkins GB, Hu X, Guenther MG, Rachez C, Freedman LP, Lazar MA (1999) *Mol Endocrinol* 13: 1550-1557
- Benítez-King G, Antón-Tay F (1996) W: Tang PI, Pang SF (red) *Frontiers of Hormone Research* Hongkong Tom 21, str.154-159

61. Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F (1993) *Life Sci* **53**: 201-207
62. Benitez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F (1996) *Biochem Biophys Acta* **1290**: 191-196
63. Pozo D, Reiter RJ, Calvo Jr, Guerrero JM (1994) *Life Sci* **55**: 455-460
64. Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F (1991) *Brain Res* **557**: 289-292
65. Antón-Tay F, Huerto-Delgadillo L, Ortega-Corona BG, Benitez-King G (1993) W: Toitou Y, Arendt K, Pavet P (red) *Melatonin in the Pineal Gland from Basic Science to Clinical Application*, Elsevier, Amsterdam, str 41-46
66. Kumagai HE, Nishida E, Kotani S, Sakai H (1986) *J Biochem* **99**: 521-525
67. Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benitez-King G (1994) *J Pineal Res* **17**: 55-62
68. Antón-Tay F, Martínez I, Tovar R, Benitez-King G (1998) *J Pineal Res* **24**: 35-42
69. Benitez-King G, Huerto-Delgadillo F, Antón-Tay F (1994) *Adv Pineal Res* **7**: 57-61
70. Benitez-King G, Antón-Tay F (1993) *Experimentia* **49**: 635-641
71. Dráberová E, Dráber P (1993) *J CellSci* **106**: 1263-1273
72. Ando S, Tanabek, Gonda Y, Sato C, Inagaki M (1989) *Biochemistry* **28**: 2974-2979
73. Hannun YA, Bell RM (1986) *J Biol Chem* **261**: 9341-9347
74. Zalewski PD, Forbes IJ, Giannakis C, Cowled PA, Betts WH (1990) *FEBS Lett* **273**: 131-134
75. Reiter RJ, Tan DX, Acuña-Castroviejo D, Burkhardt, Karbownik M (2000) *Current Topics in Biophysics* **2**: 171-183
76. Jovanovic SV, Simic MG (1985) *Life Chem Rep* **3**: 124-130
77. Roberts JE, Hu DN, Martnez L, Chignell CF (2000) *J Pineal Res* **19**: 159-189
78. Chance B, Sies H, Boveris A (1979) *Physiol Rev* **59**: 527-605
79. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX (1993) *Neurosci Biobehav Dev* **17**: 347-357
80. Stasica P, Ulanski P, Rosiak JM (1998) *J Radioanal Nucl Chem* **232**: 107-113
81. Mahal HS, Sharma HS, Mukherjee T (1999) *Free Rad Biol Med* **26**: 557-565
82. Beckman JS (1991) *J Dev Physiol* **15**: 53-59
83. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L (1999) *J Pineal Res* **27**: 159-163
84. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP (1999) *J Pineal Res* **25**: 24-33
85. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F (1994) *Life Sci* **55**: 271-276
86. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B (1996) *Free Radic Biol Med* **21**: 307-315
87. Livrea M, Tesoriere L, D'Arpab D, Morrcalle M (1997) *Free Radic Biol Med* **23**: 706-711
88. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL (1998) *Life Sci* **62**: 853-859
89. Scaino JC (1995) *J Pineal Res* **19**: 159-189
90. Dellegar SM, Murphy S.A., Boune AE, DiCesare J, C, Purser GH (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 431-439
91. Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto S, Livera MA, Liveri TV (1999) *J Pineal Res* **26**: 108-112
92. Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Muñoz-Hoyos A (1997) *FEBS Lett* **408**: 297-308
93. Garcia JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang K, Yu BP, Escames G (1998) *J Membr Biol* **162**: 59-65

Próby zastosowania terapii genowej w dominującej chorobie tkanki łącznej — wrodzonej łamliwości kości

Attempts toward gene therapy of the dominant negative disorder of connective tissue — osteogenesis imperfecta

ANNA GAJKO-GALICKA

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Podłoże molekularne choroby
 - II-1. Mutacje hamujące ekspresję genu *COL1A1*
 - II-2. Zmutowane geny *COL1A1* lub *COL1A2* ulegające ekspresji
- III. Konsekwencje mutacji: od mutacji do złamania kości
 - III-1. Wpływ mutacji na ekspresję kolagenu
 - III-2. Specyficzność tkankowa ekspresji zmutowanego kolagenu
- IV. Myszy transgeniczne jako modele wrodzonej łamliwości kości u ludzi
- V. Terapia komórkowa
- VI. Terapia genowa
 - VI-1. Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów
 - VI-2. Zastosowanie rybozymów „hammerhead”
 - VI-2.1. Strategia wprowadzenia rybozymów do komórek docelowych
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. The molecular base of disease
 - II-1. Excluded mutations in the *COL1A1* gene
 - II-2. Included mutations in either *COL1A1* or *COL1A2* gene
- III. The consequences of mutation: from mutation to bone fragility
 - III-1. The effect of mutation on the collagen expression
 - III-2. Tissue-specific expression of mutated collagen
- IV. Transgenic mice as OI models in humans
- V. Cell therapy
- VI. Gene therapy
 - VI-1. The application of the antisense oligonucleotides
 - VI-2. The application of ribozymes “hammerhead”
 - VI-2.1. Delivery of ribozymes to the target cells
- VII. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: *COL1A1* — gen kodujący łańcuch 1 kolagenu typu I (ang. *gen for Collagen type I alpha 1 chain*); *COL1A2* — gen kodujący łańcuch 2 kolagenu typu I (ang. *gen for Collagen type I alpha 2 chain*); ELISA — (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*); HDV — wirus zapalenia wątroby typu D (ang. *Human Hepatitis Delta Virus*); hGH — ludzki hormon wzrostu (ang. *human growth hormone*); mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. *messenger ribonucleic acid*); OI — wrodzona łamliwość kości u ludzi (ang. *Osteogenesis Imperfecta*); oim — wrodzona łamliwość kości u myszy (ang. *osteogenesis imperfecta mouse*); Rnaza H — rybonukleaza H; rRNA — rybosomalny kwas rybonukleinowy (ang. *ribosomal ribonucleic acid*); sTRSV — satelitarny RNA nici (+) wirusa plamistości tytoniu (ang. *satellite RNAs of Tobacco Ringspot Virus*).

I. Wprowadzenie

Osteogenesis imperfecta (OI) jest autosomalną genetyczną grupą schorzeń tkanki łącznej, której głównym objawem klinicznym jest kruchość i łamliwość kości [1-3]. W 1979 r. Silenc i wsp. [4] na podstawie klinicznych, genetycznych i radiograficznych cech wyodrębnili 4 typy choroby (Tabela 1). Typ I charakteryzuje się najłagodniejszymi objawami takimi jak: niebieska twardówka, nieliczne złamania lub ich brak, podczas gdy typ II choroby jest śmiertelny. Noworodki rodzą się z licznymi złamaniami żeber i kości długich, niezmineralizowaną czaszką, a bezpośrednią przyczyną śmierci jest ich niewydolność oddechowa. Typ III charakteryzuje się wielokrotnymi złamaniami, postępującą deformacją sylwetki, niskim wzrostem, trójkątną twarzą; łagodniejsza w przebiegu jest choroba typu IV.

W ponad 90% przypadków OI stwierdzono mutację w genach kodujących kolagen typu I [5-7]. Poza nielicznymi przypadkami choroby typu III o charak-

Dr nauk medycznych; Zakład Chemii Medycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok 8; e-mail: angajko@amb.ac.bialystok.pl

terze recesywnym, wrodzona łamliwość kości jest dominującą chorobą genetyczną. Choroba jest określana mianem dominującej wówczas, jeżeli ujawnia się u osobnika heterozygotycznego, w przeciwieństwie do choroby recesywnej ujawniającej się jedynie u homozygoty. OI typu II (letalnego) występująca w potomstwie zdrowych fenotypowo rodziców jest najczęściej wynikiem nosicielstwa mutacji przez któregoś z rodziców [8] lub powstania mutacji *de novo*. Ryzyko odziedziczenia mutacji od rodzica obciążonego nosicielstwem wynosi 6-7% [8]. OI należy do chorób rzadkich, gdyż częstość występowania szacuje się na 1 do 10 000 urodzeń.

do syntezy kolagenu o nieprawidłowej strukturze i funkcji [11].

II-1. Mutacje hamujące ekspresję genu *COL1A1*

Mutacje występujące w regionie promotora lub mutacje wprowadzające przedwczesne kodony terminacyjne w jednym z alleli genu *COL1A1* kodujących łańcuch $\alpha 1$ prokolagenu typu I mogą spowodować zahamowanie jego ekspresji (ang. *null allele*) [12-14]. Również mutacje zmieniające ramkę odczytu kodonów mogą obniżyć stabilność zarówno zmutowanego mRNA jak i białka. W konsekwencji

Tabela 1

Charakterystyka wrodzonej łamliwości kości

Typ choroby	Objawy kliniczne	Dziedziczenie	Typ mutacji
I (łagodny)	Niebieska twardówka, utrata słuchu, łagodne złamania kości	Dominujące	<i>COL1A1</i> „null allele”
II (letalny)	Bardzo liczne złamania kości długich i żeber, niezmineralizowana czaszka	Dominujące, nowe mutacje	<i>COL1A1</i> i <i>COL1A2</i> : substytucje glicyny, delecje egzonów
III (postępująco-deformujący)	Łamliwość kości, deformacja szkieletu, niski wzrost, skolioza, osteoporoza	Dominujące, nowe mutacje, recesywne	<i>COL1A1</i> i <i>COL1A2</i> : substytucje glicyny, delecje egzonów
IV (umiarkowanie deformujący)	Łamliwość i łukowatość kości długich, zwyrodnienie zębiny, niski wzrost	Dominujące	<i>COL1A1</i> i <i>COL1A2</i> : substytucje glicyny, delecje egzonów

Aby przejść do omówienia strategii terapii genowej, niezbędne jest poznanie podłoża molekularnego i biochemicznego choroby. Różna ekspresja mutacji i związane z tym różne postacie choroby stanowią podstawę w planowaniu terapii antysensowej. Duże nadzieje wiązane są z użyciem rybozymów jako czynników terapeutycznych w leczeniu niektórych chorób wirusowych i nowotworowych. Zastosowanie ich w przyszłej terapii genowej dominujących chorób genetycznych, takich jak osteogenesis imperfecta, wydaje się również być obiecujące.

II. Podłoże molekularne choroby

Biochemiczne i molekularne badania wykazały, iż przyczyną choroby jest mutacja w genie *COL1A1* lub *COL1A2* kodujących kolejno łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ kolagenu typu I, stanowiącego główne strukturalne białko skóry, kości i ścięgien [9, 10]. Zmutowane geny, w zależności od rodzaju mutacji, albo nie ulegają ekspresji, czego następstwem jest brak zmutowanego kolagenu, albo ulegają ekspresji prowadząc

syntetyzowany jest tylko kolagen o prawidłowej strukturze, jednak w zredukowanej o połowę ilości. Tego rodzaju mutacje wykryto w najłagodniejszej chorobie typu I. Fakt, iż brak ekspresji zmutowanego allelu związany jest z najłagodniejszymi objawami choroby, sugeruje możliwość leczenia cięższych przypadków OI poprzez supresję zmutowanego allelu.

II-2. Zmutowane geny *COL1A1* lub *COL1A2* ulegające ekspresji

Zmutowane geny *COL1A1* lub *COL1A2* stwierdzone w chorobie o ciężkim jej przebiegu (typ III i IV), oraz w przypadkach letalnych ulegają ekspresji prowadząc do syntezy kolagenu o nieprawidłowej strukturze i funkcji [5-7, 9, 10]. Ponieważ w cząsteczce kolagenu występują dwa łańcuchy $\alpha 1$ i jeden $\alpha 2$, w przypadku obecności mutacji w genie kodującym łańcuch $\alpha 2$, połowa cząsteczek kolagenu będzie zawierała zmutowany łańcuch. Natomiast wystąpienie mutacji w genie *COL1A1* spowoduje wzrost ilości cząsteczek zmutowanego kolagenu do

75%. Większość mutacji występuje w domenie potrójnej helisy kolagenu o regularnej strukturze [9, 10]. Każdy łańcuch kolagenowy zawiera 338 nieprzerwanych tripletów nukleotydów GXY, gdzie G oznacza glicynę, w miejscu X występuje często prolina, a w Y hydroksyprolina. Obecność glicyny jako co trzeciego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym jest niezwykle istotna w tworzeniu i funkcjonowaniu potrójnej helisy kolagenu, ponieważ jedynie ten aminokwas może zmieścić się w centralnym rdzeniu helisy. Większość mutacji (85%) stwierdzonych w genach kolagenowych prowadzi do substytucji glicyny przez inny aminokwas: cysteinę, argininę, serynę, walinę, alaninę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy czy tryptofan. Do innych częściej spotykanych należą mutacje zaburzające składanie RNA (ang. *exon splicing*), czego wynikiem są delecje egzonów lub insercje [5-7].

III. Konsekwencje mutacji: od mutacji do złamania kości

III-1. Wpływ mutacji na ekspresję kolagenu

Tworzenie potrójnej helisy kolagenu rozpoczyna się od asocjacji łańcuchów w C-końcowym propeptydzie i przebiega w kierunku N-końca [9, 10]. Przed utworzeniem helisy wolne łańcuchy polipeptydowe ulegają modyfikacjom: prolina i lizyna hydroksylacji, a hydroksylizyna glikozylacji. Podstawienie glicyny przez inny aminokwas spowalnia i zaburza tworzenie helisy [15], a niezwiązane części łańcuchów ulegają niekontrolowanej modyfikacji od miejsca mutacji do N-końca (ang. *overmodification*) [16]. Dochodzi do zaburzeń sekrecji kolagenu zawierającego zmutowane łańcuchy. Wewnątrzkomórkowa akumulacja zmutowanego kolagenu z obniżoną najczęściej stabilnością termiczną prowadzi do jego zwiększonej degradacji [17, 18]. Mutacje wpływają na tkankę łączną w sposób dominująco-negatywny (ang. *dominant negative mutations*), a to oznacza, że produkt genu zmutowanego może doprowadzić do zniszczenia produktu genu prawidłowego. W przypadku kolagenu typu I, obecność jednego zmutowanego łańcucha np. $\alpha 1$, jako produktu zmutowanego allelu genu *COL1A1*, może spowodować degradację całej cząsteczki kolagenu wraz z dwoma pozostałymi łańcuchami o prawidłowej strukturze tj. $\alpha 1$ jako produktu normalnego allelu genu *COL1A1* i $\alpha 2$ jako produktu normalnego genu *COL1A2* [9]. Sekrecja zmutowanych cząsteczek kolagenu i tworzenie z ich udziałem włókien kolagenowych może doprowadzić do zmiany struktury, zaburzeń interakcji z innymi

mi białkami kolagenowymi i niekolagenowymi, oraz ich nieprawidłowej mineralizacji [19-21].

III-2. Specyficzność tkankowa ekspresji zmutowanego kolagenu

Większość badań nad wpływem mutacji na ekspresję i metabolizm kolagenu przeprowadzono w kulturach fibroblastów pochodzących od chorych. Ponieważ jednak głównym objawem choroby jest łamliwość kości, w poznaniu patofizjologii choroby bardziej istotnym, chociaż trudniej dostępnym materiałem są osteoblasty. Nieliczne wyniki uzyskane m.in. w naszym laboratorium, jak: szybsza sekrecja zmutowanego kolagenu przez osteoblasty niż fibroblasty, wyższa jego stabilność termiczna, a zatem niższa degradacja w osteoblastach niż w fibroblastach, wskazują na specyficzność tkankową ekspresji zmutowanego kolagenu [22, 23]. Stwierdzono również wyższą zawartość zmutowanego kolagenu, w stosunku do prawidłowego, w osteoblastach niż w fibroblastach [23], a nawet obecność zmutowanych molekuł kolagenu tylko w kościach przy ich braku w skórze [24].

IV. Myszy transgeniczne jako modele wrodzonej łamliwości kości u ludzi

Obecne badania mają na celu sprawdzenie efektów terapii genowej u myszy transgenicznych z objawami OI występującymi u ludzi, a spowodowanymi wprowadzonymi zmutowanymi genami kolagenowymi. W pierwszych doświadczeniach z transgenicznymi myszami uzyskano wprawdzie ekspresję zmutowanego genu *COL1A1*, lecz były to przypadki letalne [25-27]. Chociaż ze względu na letalny fenotyp nie można ich było użyć do badań, jednakże były one dowodem potwierdzającym, iż bezpośrednią przyczyną choroby są mutacje w genach kodujących kolagen typu I. W laboratorium J a c k s o n stworzono transgeniczną mysz nazwaną oim, z typowymi objawami ludzkiego typu III OI, lecz z recesywnym sposobem dziedziczenia defektu kolagenowego [28]. Z powodu delecji nukleotydu 3983 w genie *COL1A2* nie zachodziła synteza łańcuchów $\text{pro}\alpha 2$ kolagenu typu I, tworzył się zatem homotrimer składający się z trzech łańcuchów $\alpha 1$ [21]. Optymistyczne dla przyszłej terapii genowej było uzyskanie kilku linii transgenicznych myszy z różnym poziomem ekspresji tej samej mutacji [29]. U myszy z dużą liczbą kopii zmutowanego genu i wysokim poziomem ekspresji mutacji stwierdzono bardzo dużo złamań charakterystycznych dla letalnego typu II choroby. Jedna-

kże u myszy z nieco niższą liczbą kopii zmutowanego genu i niższym poziomem jego ekspresji, stwierdzono łagodne objawy choroby, lub nawet ich brak. Powyższe obserwacje były podstawą do przypuszczeń, iż stosunkowo niewielkie obniżenie poziomu ekspresji zmutowanego kolagenu, po zastosowaniu terapii genowej, mogłoby złagodzić objawy chorobowe. Ciągłe jednak brakowało odpowiedniego modelu myszy łączącego wszystkie cechy charakterystyczne dla ludzkiej łamliwości kości. Dopiero w laboratorium *M a r i n i* [30] udało się po raz pierwszy stworzyć mysz z nieletalnymi objawami choroby, której genom zawiera w komórce pojedynczą kopię mutacji powodującej typową substytucję glicyny przez cysteinę w łańcuchu $\alpha 1$ w pozycji 349 [22] pod kontrolą endogennego promotora. Uzyskano specyficzną tkankowo ekspresję allelu normalnego i zmutowanego, dominujący sposób dziedziczenia mutacji i charakterystyczną dla OI różnorodność objawów klinicznych. Model ten jest nie tylko idealny do przetestowania terapii genowej [31], ale również w poszukiwaniach innych czynników wpływających na fenotyp [32], zważywszy fakt występowania różnorodnej ekspresji tej samej mutacji w kilku przypadkach u ludzi [3, 33].

V. Terapia komórkowa

W planowaniu terapii komórkowej różnych chorób, w tym również OI wykorzystuje się fakt, iż komórki zrębu szpiku kostnego różnicują się w różne typy komórek, włączając komórki osteoblastów [34-36]. Mogą one być izolowane ze szpiku kostnego, gdyż przytwierdzają się do podłoża hodowlanego, a po ich wprowadzeniu do organizmu (dożylnym lub bezpośrednim do jamy szpikowej kości długich) z niewielką wydajnością mogą inkorporować do kości [37-40]. W laboratorium *P r o c k o p a* [37] z organizmu myszy transgenicznej wyizolowano komórki zrębu szpiku kostnego i dokonano ich wlewu do zdrowej myszy, wcześniej naświetlonej w celu umożliwienia implantacji nowego szpiku. W ciągu 1-5 miesięcy po wlewie, komórki potomne zrębu szpiku kostnego stanowiły 2-12% komórek wykrytych w kościach, ale również w szpiku, śledzionie, płucach i chrząstce biorcy. Ekspresja zmutowanego genu zachodziła jednak jak oczekiwano tylko w kościach, brak jej natomiast było w innych tkankach, w których nie zachodzi synteza kolagenu. W innym doświadczeniu wprowadzono mysie samcze komórki zrębu szpiku kostnego do samicy i w 4-19% komórek kultur pochodzących ze skóry czy chrząstki biorcy wykryto chromosom Y [38]. Ważne było, iż komórek

dawcy nie wykrywano w pierwszym dniu czy tygodniu po wlewie. To oznacza, iż komórki donorowe wszczepiają się najpierw w szpik kostny, a następnie komórki potomne wędrują do tkanek niekrwiotwórczych i nabywają ich fenotyp [34]. Na bazie tych odkryć [34-40] podjęto się próby terapii komórkowej u trojga dzieci z ciężkimi objawami występującymi w III typie OI [41]. Po 3 miesiącach od przeprowadzonej allogenicznej transplantacji szpiku kostnego, 1.5-2% komórek kości beleczkowatej biorcy pochodziło od donora. Histologiczne badanie kości wykazały wzrost gęstości i mineralizacji kości, a co za tym idzie zmniejszenie ilości złamań.

VI. Terapia genowa

W terapii genowej chorób dominujących, takich jak wrodzona łamliwość kości, wymagany jest zupełnie inny kierunek działania niż w przypadku chorób genetycznych recesywnych. W przypadku chorób recesywnych objawy kliniczne wynikają z obecności nieaktywnego produktu genu lub jego braku, stąd też celem terapii genowej jest wprowadzenie egzogenego genu brakującego lub nieaktywnego białka, a w efekcie przywrócenie jego funkcji i ustąpienie objawów klinicznych. Inaczej jest w przypadku OI, gdzie objawy choroby są konsekwencją nie braku, a obecności produktu zmutowanego genu, białka o nieprawidłowej strukturze. Skutki mutacji w genach kolagenowych amplifikują się, ponieważ zmutowane cząsteczki kolagenu wywierają destrukcyjny wpływ na funkcje kolagenu prawidłowego i metabolizm innych białek tkanki łącznej. Ta sytuacja nie może być odwrócona poprzez wprowadzenie prawidłowego genu kolagenowego do defektywnej tkanki. Konieczne jest w tym przypadku zablokowanie ekspresji zmutowanego allelu genu kolagenowego [40, 42-47].

VI.1. Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów

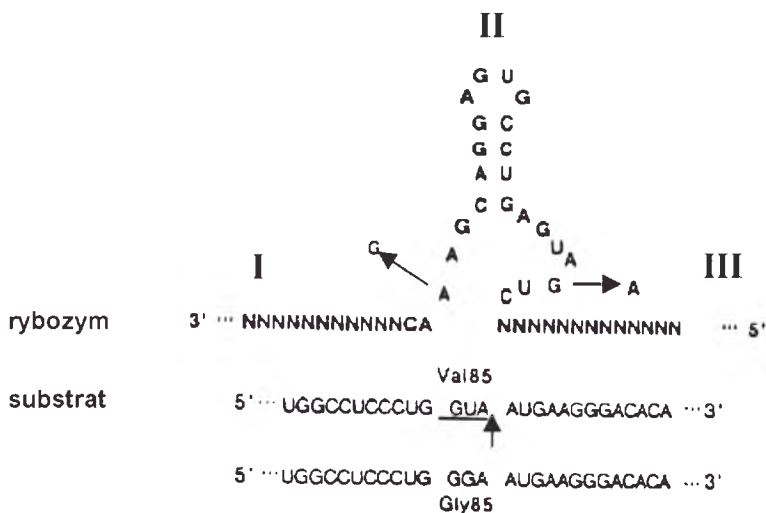
W celu selektywnego zahamowania lub zredukowania ekspresji zmutowanego allelu podjęto próby zastosowania antysensowych oligonukleotydów. Są to krótkie odcinki DNA lub RNA ściśle wiążące się z docelowym mRNA i zapobiegające jego translacji. Wewnątrzkomórkowe enzymy rozpoznają i trawią mRNA sparowany z DNA. Transfekując kultury fibroblastów pochodzących od chorych antysensowymi oligonukleotydami, uzyskano częściową redukcję ekspresji genów kolagenowych [48]. 50%-ową supresję syntezy zmutowanego kolagenu

osiągnęli Wang i Marini [49], jednak kosztem eliminowania produktu genu zmutowanego następowała również redukcja kolagenu prawidłowego do 20%. Związane jest to z wysoką powtarzalnością sekwencji regionów kodujących genów kolagenu typu I i wynikającą z tego powodu niespecyficnością wiązania antysensowych oligonukleotydów do mRNA. Tym niemniej zastosowanie antysensowych oligonukleotydów w terapii genowej myszy transgenicznej z letalnym fenotypem pozwoliło na uzyskanie redukcji ekspresji zmutowanego genu kolagenowego, jak również znaczną redukcję złamań kości [50].

VI-2. Zastosowanie rybozymów „hammerhead”

W celu zwiększenia specyficzności wiązania się z mRNA, zamiast antysensowych nukleotydów zastosowano rybozymy, krótkie cząsteczki RNA posiadające zdolność do przeprowadzania autokatalitycznej reakcji bez udziału białek i tworzenia wiązań kowalencyjnych w cząsteczce kwasu nukleinowego. Do znanych klas rybozymów należą: introny grupy I, rybonukleaza P, rybozymy o strukturze drugorzędowej w kształcie młotka (ang. *hammerhead*) lub spiniki do włosów (ang. *hairpin*), oraz wirus zapalenia wątroby typu D (HDV). Introny grupy I, zdolne do

zahamowanie ekspresji mutacji odpowiedzialnych za wrodzoną łamliwość kości zastosowano rybozymy „hammerhead”, które szerzej omawiane były w *Postęпах biochemii* [57]. W naturalnym środowisku, gdzie występują rybozymy „hammerhead”, podczas replikacji RNA działają one w układzie *cis*, stanowiąc wraz z substratem jedną całość. Okazało się jednak, iż rybozymy reprezentatywne dla satelitarnego RNA nici (+) wirusa pierścieniowatej plamistości tytoniu (sTRSV) mogą również przeprowadzać reakcję katalityczną w układzie *trans*, gdzie substrat i enzym są oddzielnymi cząsteczkami [58]. Centrum aktywne rybozymów samotnących „hammerhead” przypomina „głowę młotka” i jest utworzone przez trzy helikalne ramiona (Ryc. 1). Dwa z nich, I i III, są odpowiedzialne za komplementarne wiązanie się rybozymu z substratem, którym w terapii genowej OI jest fragment zmutowanego mRNA. W przeprowadzenie reakcji katalitycznej jest bezpośrednio zaangażowane ramię II, które składa się z konserwatywnych nukleotydów niezbędnych dla zachowania aktywności rybonukleolitycznej. Cięcie zachodzi za specyficzną rozpoznawaną sekwencją trójnukleotydową substratu, którą w przypadku substytucji glicyny przez walinę w pozycji 85 łańcucha $\alpha 1$ [59] jest GUA (Ryc. 1). Podczas katalitycznego cięcia tylko substrat ulega przekształceniom, zaś sam



Ryc. 1. Struktura rybozymu „hammerhead” ze wskazaniem w substracie miejsca cięcia za sekwencją GUA, utworzonego na skutek substytucji glicyny 85 przez walinę w łańcuchu $\alpha 1$ kolagenu typu I. Zmiana konserwatywnych nukleotydów (zaznaczona strzałkami) w centrum aktywnym rybozymu prowadzi do jego inaktywacji.

samodzielnego wycinania się, stwierdzono najpierw w jądrowym pre-rRNA *Tetrahymena thermophila* [51], a następnie w *Eubacteriae*, bakteriofagach, mitochondriach grzybów, chloroplastach roślin i genach rRNA niższych eukariontów [52]. Rybonukleaza P jest enzymem występującym u bakterii, m.in. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Salmonella typhimurium* [53]. Pozostałe z wymienionych rybozymów występują naturalnie w RNA wirusów i wiroidów [54-56]. W eksperymentach mających na celu

rybozym uwalniany po przeprowadzonej reakcji jest stale aktywny. Ze względu na wyższą specyficzność wiązania rybozymów do mRNA, są one bardziej obiecującym narzędziem w przyszłej terapii genowej OI niż wspomniane wyżej oligonukleotydy. RNA rybozymu może być syntetyzowane chemicznie lub enzymatycznie przy pomocy polimeraz RNA (SP6 czy T7) transkrybujących matrycowe DNA w układzie pozakomórkowym [60]. Skład nukleotydowy wiążących ramion I i III nie jest ściśle konserwa-

tywny, zatem ich sekwencja może być zmieniona prowadząc do syntezy rybozymów specyficznych dla określonych substratów. Duże znaczenie w aktywności rybozomu i specyficzności substratowej odgrywa długość ramion wiążących. Zbyt krótkie ramiona I i III mogą być przyczyną utraty swoistości enzymu, zaś zbyt długie mogą zmniejszyć szybkość oddysocjowania produktów, co w konsekwencji może doprowadzić do zablokowania katalitycznych właściwości cząsteczek RNA. Rybozomy stosowane w próbach redukcji ekspresji mutacji w genach kolagenowych zawierały w helisach I i III po 9 lub 13 nukleotydów [61, 62]. G r a s s i i wsp. [61] uzyskali *in vitro* (w układzie pozakomórkowym) wysoką specyficzność działania pięciu różnych rodzajów rybozomu w stosunku do zmutowanych alleli genów kolagenu typu I. Lokalizacja miejsca mutacji i specyficznego cięcia zmutowanych alleli zachodziła specyficznie również w obecności różnych ilości normalnych cząsteczek mRNA, oraz całkowitego RNA [61]. W tym samym laboratorium po raz pierwszy uzyskano selektywne obniżenie o około 50% poziomu mRNA kodującego zmutowany łańcuch $\alpha 1$ w hodowli fibroblastów transfekowanych aktywnymi rybozymami [62]. W wyniku hydrolizy zmutowanego mRNA, ilość zmutowanego białka kolagenu uległa znaczącej redukcji. Należy dodać, iż stabilna ekspresja rybozymów nie wpływała na żywotność fibroblastów, tak więc odkrycia te są obiecujące w zastosowaniu ich jako czynników w przyszłej terapii genowej.

Znaczna część mutacji zidentyfikowanych w OI (ponad 25% substytucji glicyny), jak również niektóre polimorfizmy stanowią miejsca rozpoznawania i cięcia przez rybozomy. W co piątym przypadku OI można zastosować strategię niezależną od charakteru mutacji, opierając się na selektywnym wiązaniu się rybozomu z transkryptem zmutowanego allelu, gdzie występuje polimorfizm [63]. Tak więc około 35-40% przypadków OI, poprzez zastosowanie supresji mutacji i związanych z nią polimorfizmów, mogłoby być leczonych z wykorzystaniem specyficznych właściwości rybozomu [62].

VI-2.1. Strategia wprowadzenia rybozymów do komórek docelowych

Zastosowanie rybozomu w terapii genowej OI wymagać będzie skierowania go do tkanki docelowej. Komórki zrębu szpiku kostnego wydają się być atrakcyjnym narzędziem w leczeniu różnych chorób poprzez bezpośrednie ich użycie do terapii lub jako wektorów do terapii genowej. Zalety którymi się one charakteryzują to: 1) stosunkowa łatwość izolacji ze

szpiku kostnego, hodowli *in vitro* i transfekcji genami terapeutycznymi, 2) potencjalnie mogą być izolowane od tego samego pacjenta, który będzie leczony, przez co prawdopodobnie uniknie się odpowiedzi immunologicznej i innych reakcji ubocznych, 3) potencjalnie mogą być użyte do leczenia chorób różnych tkanek poprzez transfekcję komórek genami terapeutycznymi kierowanymi przez promotory specyficzne tkankowo [43]. Komórki zrębu szpiku kostnego, pochodzące od myszy transgeniczných, po wielokrotnych pasażach ulegały łatwo transdukcji wektorem retro- i adenowirusowym [40, 64]. Po 30-40 dniach od wprowadzenia do organizmu myszy komórek z retrowirusowym genem zawierającym marker, można je było zlokalizować wzdłuż powierzchni beleczkowatej kości, co sugeruje, iż komórki z wprowadzonym egzogennym genem zachowały zdolność tworzenia kości *in vivo* [40]. Komórki mysie zrębu szpiku kostnego ulegały łatwo transdukcji różnymi innymi genami np. retrowirusowym wektorem produkującym hormon wzrostu (hGh) [65]. Po wewnątrzrdzeniowej iniekcji myszy, ekspresja hGh zachodziła w kościach i produkt genu wykrywano w surowicy metodą ELISA.

Badano również możliwość transdukcji komórek zrębu szpiku kostnego myszy transgenicznej oim (syntetyzującej homotrimer złożony z trzech łańcuchów $\alpha 1$, bez łańcucha $\alpha 2$) genami kolagenowymi. W tym celu jako wektora użyto niereplikującego się adenowirusa typu 5 z usuniętymi regionami E1 i E3. Region E1 koduje wczesne białko E1 regulujące transkrypcję, bez którego niemożliwa jest wydajna ekspresja tzw. genów późnych i replikacja wirusa. Region E3, którego usunięcie zwiększa pojemność wektora adenowirusowego, koduje co najmniej siedem białek, z których jedno — gp19k jest zdolne do zmniejszania siły reakcji limfocytów T cytotoksycznych. Mysi gen kodujący brakujący łańcuch pro $\alpha 2(I)$ wprowadzono w region E1 z ekspresją kierowaną przez wczesny promotor ludzkiego cytomegalowirusa [66]. Komórki zrębu szpiku kostnego myszy oim transdukowane adenowirusem zawierającym gen *COL1A2* syntetyzowały kolagen typu I o prawidłowej strukturze, a więc zawierający łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ w stosunku 2:1 i to zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Wektory retrowirusów stabilnie integrują do genomu docelowych komórek, jednakże nie uzyskano długoterminowej regulacji ekspresji z wewnętrznych promotorów komórkowych. W niektórych przypadkach jest to spowodowane specyficznym dla komórek macierzystych mechanizmem represji transkrypcji retrowirusów. S t o v e r i i wsp. [67] zbadali eks-

presję samoinaktywującego się wektora retrowirusowego ze szczyrim promotorem *COL1A1* w kulturach komórek zrębu szpiku kostnego różnicujących się w osteoblasty, oraz u myszy chimerycznej powstałej z transdukowanych embrionalnych komórek macierzystych. Uzyskane wyniki wskazywały, iż samoinaktywujące się wektory retrowirusa nie były stale inaktywowane w embrionalnych komórkach macierzystych i ulegały specyficznej ekspresji w osteoblastach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Tak więc wektory te powinny być użyteczne w terapii genowej OI skierowanej do kości jako tkanki docelowej.

VII. Uwagi końcowe

Osteogenesis imperfecta jest heterogenną grupą genetycznych chorób wpływających na integralność tkanki łącznej, których głównym objawem jest łamliwość kości. Większość przypadków OI jest wynikiem mutacji występujących w genach kodujących łańcuchy polipeptydowe *pro α 1* i *pro α 2* prokolagenu typu I. Ponieważ OI należy do chorób genetycznych nieuleczalnych, terapia komórkowa i genowa, testowana na myszach transgenicznym wydaje się być obiecująca w przyszłym zastosowaniu jej do leczenia ludzi. Mutacje w genach kolagenowych wpływają na tkankę łączną w sposób dominująco-negatywny, ponieważ doprowadzają one do niszczenia również prawidłowych produktów alleli genu, co oznacza degradację cząsteczek kolagenu zawierających tylko jeden zmutowany łańcuch, a dwa pozostałe normalne (ang. *procollagen suicide*) [9]. Z tego powodu uzupełnienie genów normalnych bez eliminacji lub wyciszenia genów zmutowanych nie przyniesie korzyści, jak to dzieje się w przypadku chorób recesywnych. Celem terapii jest więc wyeliminowanie lub zredukowanie genu niosącego mutację i/lub równoległe uzupełnienie genu prawidłowego. W ciężkich przypadkach choroby poprzez zredukowanie ekspresji zmutowanego allelu, terapia antysensowa mogłaby zredukować ilość zmutowanego kolagenu i złagodzić objawy do występujących w typie I choroby. W przypadku najłagodniejszego typu I choroby, gdzie skutkiem mutacji jest nieaktywny allel, korzystne mogłoby być jego uzupełnienie, jak w przypadku chorób recesywnych [68]. Co więcej, taki kierunek działania mógłby być zastosowany również w ciężkich przypadkach choroby jako uzupełnienie terapii antysensowej, gdzie po wyeliminowaniu lub wyciszeniu genu zmutowanego mógłby być wprowadzony gen normalny. Chociaż takich badań jeszcze nie przeprowadzono, potencjalnie uzupełnienie normalnych ge-

nów kolagenowych mogłoby doprowadzić do wzrostu ilości prawidłowo funkcjonujących molekuł kolagenu i do złagodzenia objawów choroby, a nawet ich ustąpienia [45]. Teoretycznie, w celu złagodzenia objawów OI, nie jest konieczna 100%-owa supresja zmutowanego genu, wystarczyłoby uzyskać poziom ekspresji zmutowanego kolagenu jaki istnieje w tkance kostnej u ludzi obciążonych nosicielstwem mutacji, a będących najczęściej bezobjawowymi lub z łagodnymi objawami choroby [8].

Obiecujące wydają się być wyniki uzyskane na mysich modelach z zastosowaniem komórek zrębu szpiku kostnego jako wektorów dostarczających „narzędzi” do supresji ekspresji zmutowanego genu i/lub dostarczających normalnych genów kolagenowych, do tkanki docelowej — kości. Narzędziem takim mogą być antysensowe oligonukleotydy wiążące się ze zmutowanym mRNA, lub jeszcze bardziej specyficznie wiążące się z docelowym mRNA rybozymy. Zastosowanie rybozymu wydaje się być korzystniejsze z kilku względów [69]. Po pierwsze, mogą inaktywować mRNA bez udziału enzymów gospodarza, podczas gdy antysensowe oligonukleotydy tworzą stabilne dupлекsy degradowane przy udziale Rnazy H. Po drugie, mogą ciąć więcej niż jedną kopię mRNA poprzez oddysocjowanie od produktu cięcia i wiązanie się z innym mRNA. Po trzecie, wykazują dużo wyższą specyficzność działania niż antysensowe oligonukleotydy, ponieważ ich działanie jest uzależnione zarówno od specyficznego wiązania się do mRNA, jak i specyficznego miejsca katalitycznego działania.

W celu osiągnięcia złagodzenia objawów choroby, może być wymagana długotrwała supresja zmutowanego allelu. Można to osiągnąć poprzez izolację preosteoblastów szpiku kostnego i ich modyfikację przez użycie retrowirusów niosących specyficzne rybozymy. Po wprowadzeniu zmodyfikowanych komórek do organizmu, utworzyłyby one dojrzałe osteoblasty ze stałą ekspresją rybozymu skierowanego przeciwko specyficznej mutacji. Teoretycznie, nawet przejściowa ekspresja rybozymu (6-12 miesięcy) mogłaby pozytywnie wpłynąć na mechaniczne właściwości macierzy kości, aczkolwiek nieznane są objawy uboczne jakie mogą towarzyszyć ekspresji rybozymu w osteoblastach [62].

*Artykuł otrzymano 15 kwietnia 2002
Zaakceptowano do druku 20 stycznia 2003*

Piśmiennictwo

1. Cole WG (1997) *Clin Orthop Rel Res* 343: 235-248

2. Tosi LL (1997) *Curr Opin Pediatr* **9**: 94-99
3. De Paepe A, Nuytinck L (2001) *Acta Clin Belg* **56**: 10-16
4. Sillence DO, Senn A, Danks DM (1979) *J Med Genet* **16**: 101-116
5. Cole WG (1994) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **47**: 29-80
6. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ (1997) *Hum Mutat* **9**: 300-315
7. Dalglish R (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 253-255
8. Zlotogora J (1998) *Hum Genet* **102**: 381-386
9. Prockop DJ (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 403-434
10. Myllyharju J, Kivirikko KI (2001) *Ann Med* **33**: 7-21
11. Sykes B (1985) *BioEssays* **3**: 112-117
12. Barsh GS, David KE, Byers PH (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3838-3842
13. Johnson C, Primorac D, McKinstry M, McNeil J, Rowe D, Lawrence JB (2000) *J Cell Biol* **150**: 417-432
14. Slayton RL, Deschenes SP, Willing MC (2000) *Matrix Biol* **19**: 1-9
15. Baum J, Brodsky B (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 122-128
16. Lehmann HW, Rimek D, Bodo M, Brenner RE, Vetter U, Worsdorfer O, Karbowski A, Muller PK (1995) *Eur J Clin Invest* **25**: 306-310
17. Bateman JF, Chan D, Mascara T, Rogers JG, Cole WG (1986) *Biochem J* **240**: 699-708
18. Persikov AV, Ramshaw JA, Brodsky B (2000) *Biopolymers* **55**: 436-450
19. Cohen-Solal L, Zylberberg L, Sangalli A, Gomez Lira M, Mottes M (1994) *J Biol Chem* **269**: 14751-14758
20. Tenni R, Cetta G, Dyne K, Rossi A, Quacci D, Lenzi L, Castel-lani AA (1988) *Hum Genet* **79**: 245-250
21. Kuznetsova N, McBride DJ Jr, Leikin S (2001) *J Mol Biol* **309**: 807-815
22. Sarafova AP, Choi H, Forlino A, Gajko A, Cabral W A, Tosi L, Reing CM, Marini JC (1998) *Hum Mut* **11**: 395-403
23. Galicka A, Wolczynski S, Gindzienski A (2002) *J Pathol* **196**: 235-237
24. Mundlos S, Chan D, Weng YM, Sillence DO, Cole WG, Bateman JF (1996) *J Biol Chem* **271**: 21068-21074
25. Schnieke A, Harbers K, Jaenisch R (1983) *Nature* **304**: 315-320
26. Stacey A, Bateman J, Choi T, Mascara T, Cole W, Jaenisch R (1988) *Nature* **332**: 131-136
27. Killian JS, Olsen AS, Kontusaari S, Sokolov B, Prockop DJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 23373-23379
28. Chipman SD, Sweet HO, McBride DJ Jr, Davisson MT, Marks SC Jr, Shuldiner AR, Wenstrup RJ, Rowe DW, Shapiro JR (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1701-1705
29. Sokolov BP, Ala-Kokko L, Dhulipala R, Arita M, Killian JS, Prockop DJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 9622-9629
30. Forlino A, Porter FD, Lee EJ, Westphal H, Marini JC (1999) *J Biol Chem* **274**: 37923-37931
31. Forlino A, Marini JC (2000) *Mol Genet Metab* **71**: 225-232
32. Galicka A, Wolczynski S, Anchim T, Surazynski A, Lesniewicz R, Palka J (2001) *Eur J Biochem* **268**: 2172-2178
33. Forlino A, D'Amato E, Valli M, Camera G, Hopkins E, Marini JC, Cetta G, Coviello DA (1997) *Biochem Mol Med* **62**: 26-35
34. Prockop DJ (1998) *Matrix Biol* **16**: 519-528
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti D W, Craig S, Marshak DR (1999) *Science* **284**: 143-147
36. Bianco P, Gehron Robey P (2000) *J Clin Invest* **195**: 1663-1668
37. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4857-4861
38. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1142-1147
39. Nilsson SK, Dooner MS, Weier HU, Frenkel B, Lian JB, Stein GS, Quesenberry PJ (1999) *J Exp Med* **189**: 729-734
40. Oyama M, Tatlock A, Fukuta S, Kavalkovich K, Nishimura K, Johnstone B, Robbins PD, Evans CH, Niyibizi C (1999) *Gene Ther* **6**: 321-329
41. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo W W, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Bre-nner MK (1999) *Nat Med* **5**: 309-313
42. Moriwake T, Seino Y (1997) *Acta Pediatr Jpn* **39**: 521-527
43. Prockop DJ (1999) *Biochem Soc Trans* **27**: 15-31
44. Lian JB, Niyibizi C (2000) *Clin Orthop* **379S**: 159-163
45. Niyibizi C, Smith P, Mi Z, Robbins P, Evans C (2000) *Clin Orthop* **379S**: 126-133
46. Kang R, Ghivizzani SC, Muzzonigro TS, Herndon J H, Robbins PD, Evans CH (2000) *Clin Orthop* **375**: 324-337
47. Byers PH (2000) *Curr Opin Pediatr* **12**: 603-609
48. Laptev AV, Lu Z, Colige A, Prockop DJ (1994) *Biochemistry* **33**: 11033-11039
49. Wang Q, Marini JC (1996) *J Clin Invest* **97**: 448-454
50. Killian JS, Li SW, Prockop DJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6298-7302
51. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sand J, Gotteschling DE, Cech TR (1982) *Cell* **31**: 147-157
52. Michel F, Westhof E (1990) *J Mol Biol* **216**: 585-610
53. McCorkle GM, Altman S (1987) *J Chem Ed* **64**: 221-226
54. Forster AC, Symons RH (1987) *Cell* **49**: 211-220
55. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G (1987) *Science* **231**: 1577-1580
56. Sharmeen L, Kuo MYP, Dinter-Gottlieb G, Taylor J (1988) *J Virol* **62**: 2674-2679
57. Rola M, Kuźmak J (2001) *Postępy Biochemii* **47**: 282-291
58. Uhlenbeck OC (1987) *Nature* **328**: 596-600
59. Valli M, Zolezzi F, Mottes M, Antoniazzi F, Stanzial F, Tenni R, Pignatti P, Cetta G (1993) *Eur J Biochem* **217**: 77-82
60. Szczakiel G, Nedbal W (1995) *Trends Microbiol* **3**: 213-217
61. Grassi G, Forlino A, Marini JC (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 3451-3458
62. Dawson PA, Marini JC (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 4013-4020
63. Millington-Ward S, O'Neill B, Kiang AS, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ (1999) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 537-542
64. Balk ML, Bray J, Day C, Epperly M, Greenberger J, Evans CH, Niyibizi C (1997) *Bone* **21**: 7-15
65. Suzuki K, Oyama M, Faulcon L, Robbins PD, Niyibizi C (2000) *Cell Transplant* **9**: 319-327
66. Niyibizi C, Smith P, Mi Z, Phillips CL, Robbins P (2000) *Cell Biochem* **25**: 84-91
67. Stover ML, Wang CK, McKinstry MB, Kalajzic I, Gronowicz G, Clark SH, Rowe DW, Lichtler AC (2001) *Mol Ther* **3**: 543-550
68. Kocher MS, Shapiro F (1998) *J Am Acad Orthop Surg* **6**: 225-236
69. Grassi G, Marini JC (1996) *Trends Mol Med* **28**: 499-510

Glikoproteina VI — receptor kolagenu aktywujący płytki krwi

Glycoprotein VI — collagen receptor inducing platelet activation

URSZULA KRALISZ

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa glikoproteiny VI
- III. Występowanie GPVI
- IV. Budowa genu GPVI
- V. Przesyłanie sygnału za pośrednictwem GPVI
- VI. Fosforylacja łańcucha γ receptora Fc
- VII. Motyw aktywujący ITAM łańcucha γ receptora Fc
- VIII. Motyw hamujący ITIM białka PECAM-1
- IX. Podobieństwo GPVI do receptorów immunologicznych
- X. Peptydy podobne do kolagenu
- XI. Konwulsyna
- XII. Udział receptorów kolagenu w adhezji, aktywacji i agregacji płytek krwi
- XIII. Domeny błony wzbogacone w glikolipidy
- XIV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: BCR — receptory antygenowe limfocytów B (ang: *B-cell antigen receptor*); Btk — kinaza tyrozynowa Bruton (ang: *Bruton tyrosine kinase*); CD — antygeny różnicowania leukocytów (ang: *cluster of differentiation*); Csk-kinaza fosforylująca C-terminalną resztę tyrozynową kinaz rodziny *src* (ang: *carboxy-terminal src kinase*); Cvx-konwulsyna (ang: *convulxin*); CRP — peptydy podobne do kolagenu (ang: *collagen related peptides*); DG — diacyloglicerol; domena SH-domena homologiczna do obecnej w białku *src* (ang: *src homology domain*); Gads — białko adaptorowe podobne do Grb2 uczestniczące poniżej Shc (ang: *Grb2-related adapter downstream of Shc*); GP — glikoproteina; Fak — kinaza ognisk adhezyjnych (ang: *focal adhesion kinase*); łańcuch γ FcR-łańcuch γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE (ang: *γ chain of the high-affinity receptor of IgE*); GEMs-domeny błony plazmatycznej wzbogacone w glikolipidy (ang: *glycolipid-enriched membrane domains*); HEL — komórki lini erytroleukemicznej (ang: *human erythroleukemic cell lines*); ICAM-2 — międzykomórkowe białko adhezyjne-2 (ang: *intracellular adhesion molecule-2*); IP3- 1, 4, 5-trisfosforan inozytolu; ITAM — motyw aktywujący receptorów immunologicznych zawierający reszty ty-

Contents:

- I. Introduction
- II. The structure of glycoprotein VI
- III. GPVI localization
- IV. The structure of GPVI gene
- V. Signal transduction via GPVI
- VI. Fosforylation of Fc receptor γ chain
- VII. Activation motif ITAM of Fc receptor γ chain
- VIII. Inhibitory motif ITIM of PECAM-1 protein
- IX. Similarity of GPVI to immune receptors
- X. Collagen related peptides
- XI. Convulxin
- XII. Participation of collagen receptors in adhesion, activation, and aggregation of blood platelets
- XIII. Glycolipid-enriched membrane domains
- XIV. Concluding remarks

rozynowe (ang: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); ITIM — motyw hamujący receptorów immunologicznych zawierający reszty tyrozynowe (ang: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*); LAT-łącznik aktywacji limfocytów T (ang: *linker for activation of T cells*); myszy *mev* — myszy ze zmutowanym genem *shp-1* (ang: *moth-eaten viable*); PAG — fosfoproteina związana z GEMs (ang: *phosphoprotein associated with GEMs*); PECAM-1 — białko adhezyjne płytek krwi i komórek śródbłonna (ang: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*); PH — domena homologiczna do domeny plekstrynowej (ang: *plextrin homology domain*); PI-3 — kinaza 3-fosfatydylinozytolowa (ang: *phosphatidylinositol 3-kinase*); PIP3 — 3, 4, 5-trisfosforan fosfatydylinozytolu; PIR — receptor podobny do Ig (ang: *Paired Ig-Like Receptor*); PF4 — płytkowy czynnik 4 (ang: *platelet factor 4*); PKC — kinaza białkowa C (ang: *protein kinase C*); PLC2 — fosfolipaza C2 (ang: *phospholipase C γ 2*); SH2 i SH3 — domeny homologiczne do domeny 2 i domeny 3 kinaz rodziny *src* (ang: *src homology 2 and 3 domain*); SHIP — fosfataza 5'-fosfoinozytolowa zawierająca domenę SH2 (ang: *SH2 containing inositol 5'-phosphatase*); SHP-1 i SHP-2 — fosfatazy tyrozynowe-1 i -2 zawierające domeny SH2 (ang: *src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1 and -2*); SKAP 55 — fosfoproteina o m.c. 55 kDa asocjująca z kinazą Src (ang: *Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*); SKAP-HOM — białko adaptorowe homologiczne do SKAP (ang: *SKAP 55 homologue*); SLP-76 — białko leukocytów zawierające domenę homologiczną do domeny SH2 kinaz rodziny *src* (ang: *src homology 2 domain-containing leuko-*

Dr nauk przyrodniczych, Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

cyte protein); src — mięsak (ang: *sarcoma*); TCR — receptor antygenowy limfocytów T (ang: *T-cell antigen receptor*); TxA_2 — tromboksan A_2 ; WASP — białko syndromu Wiscott-Aldrich (ang: *Wiskott-Aldrich syndrom protein*); WGA — aglutynina otrzymywana z kielków pszenicy (ang: *wheat germ agglutinin*)

I. Wstęp

Glikoproteina VI (GPVI) przyciągnęła uwagę badaczy od roku 1987, w którym Sugiyama i wsp. [1] opisali defekty funkcji płytek krwi z deficytem GPVI. Defekty te występowały tylko podczas stymulacji płytek kolagenem i polegały na nie tworzeniu się agregatów płytkowych, braku uwalniania ATP z ziarnistości płytkowych i nie wytwarzaniu tromboksanu A_2 . Ponadto, płytki z deficytem GPVI wykazywały obniżoną adhezję do kolagenu. Specyficzne defekty płytek krwi tej pacjentki wskazywały, że GPVI pełni funkcję receptora kolagenu niezbędnego do prawidłowej aktywacji płytek krwi.

Opisano kilka przypadków chorych z deficytem GPVI w płytkach krwi, charakteryzujących się łagodnymi tendencjami krwawiennymi. Płytki krwi chorych wykazują normalną odpowiedź funkcjonalną pod wpływem wielu czynników fizjologicznych aktywujących płytki, w tym trombiny, ADP, tromboksanu A_2 i arachidonianu. Obniżoną odpowiedź obserwuje się tylko w przypadku aktywacji płytek kolagenem [2-3].

Porównanie aktywacji płytek krwi osób zdrowych z aktywacją płytek z niedoborem GPVI zachodzącą pod wpływem specyficznych ligandów wiążących GPVI, którymi są kolagen, peptydy o strukturze podobnej do kolagenu (ang: *collagen related peptides*, CRP) oraz konwulksyna (ang: *convulxin*, Cvx), pozwoliło na poznanie mechanizmu działania GPVI.

Cechą charakterystyczną aktywacji płytek kolagenem przebiegającej z udziałem GPVI, w porównaniu z aktywacją płytek innymi aktywatorami w tym m.in. trombiny i ADP, jest udział wielu białkowych kinaz tyrozynowych fosforylujących reszty tyrozynowe swoich białkowych substratów w sposób niezależny od cykazy adenylanowej i białkowej kinazy C (ang: *protein kinase C*, PKC). Mechanizm przesyłania sygnału od kolagenu do białkowych kinaz tyrozynowych z udziałem GPVI jest bardzo podobny do tego, który wykorzystują receptory antygenowe limfocytów (ang: *B- and T-cell antigen receptor*, BCR, TCR). Udział innych receptorów kolagenu płytek krwi, w tym m.in. GPIa/IIa, kompleksu GPIb/GPV/GPIX, GPIV, białek o m.cz. 85/90 kDa oraz 65 kDa w aktywacji płytek krwi jest dużo mniejszy lub jest bardzo słabo poznany [4-9].

II. Budowa glikoproteiny VI

Ogromnym postępem ostatnich dwóch lat badań nad GPVI było jej wyizolowanie z płytek krwi, poznanie pełnej sekwencji aminokwasowej, sklonowanie oraz poznanie lokalizacji i struktury genu GPVI [10-13]. GPVI została sklonowana przez cztery niezależne grupy badawcze [1-4]. Clementson i wsp. [10] sklonowali GPVI z biblioteki szpiku kostnego, Miura i wsp. [11] izolowali RNA z komórek UT-7/TPO, a Ezumi i wsp. [12] sklonowali cDNA GPVI w komórkach CMK. Jandrot-Perrus i wsp. [13] w celu otrzymania sekwencji GPVI badali ludzkie i mysie biblioteki megakariocytów szukając obecności białek połączonych z receptorem Fc i posiadających resztę argininową w części transbłonowej. Sekwencja GPVI otrzymana przez tych wszystkich badaczy jest prawie identyczna. Ludzka i mysia cała cząsteczka GPVI wykazuje ok. 64% homologii sekwencji aminokwasowej, a homologia odcinków podobnych do immunoglobulin (Ig-C2) osiąga 78%. Podobieństwo na poziomie nukleotydów dla całej cząsteczki GPVI wynosi 67% [4]. Zarówno ludzka jak i mysia GPVI zawiera motywy sekwencyjne WSXWS w pozycjach pomiędzy 97-101 i 192-196, które są charakterystyczne dla receptorów hematopoetycznych klasy I i biorą udział w pofaludowaniu cząsteczki. GPVI jest trzecim płytkowym receptorem, razem z białkiem adhezyjnym płytek i komórek śródbłonka (ang: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1) (CD31) i międzykomórkowym białkiem adhezyjnym-2 (ang: *intracellular adhesion molecule-2*, ICAM-2) (CD102), nie wykazującym funkcji immunologicznych, ale należącym do rodziny receptorów immunoglobulinowych. Sekwencja aminokwasowa części cytoplazmatycznej GPVI wykazuje podobieństwo do receptorów Fc α (CD89), receptorów inhibitorowych komórek NK oraz polimorficznych receptorów mysich zwanych PIR (ang: *paired Ig-like receptor*, PIR) [14-17].

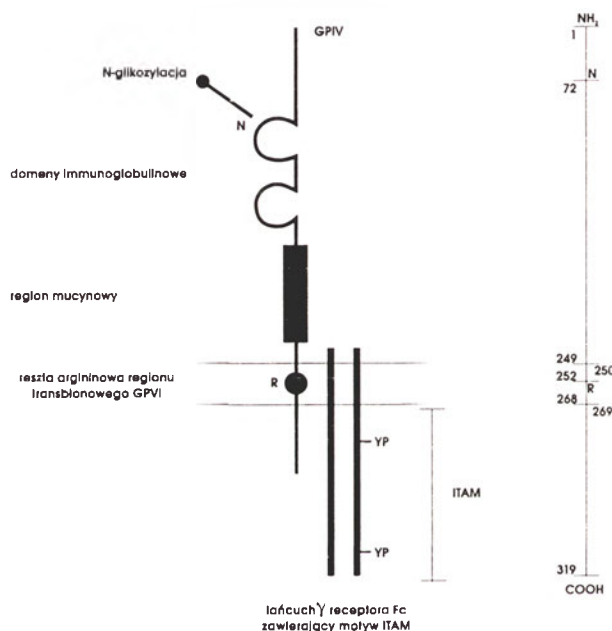
Dojrzałe białko składa się z jednego łańcucha zbudowanego z 319 reszt aminokwasowych. Odcinek wewnątrzkomórkowy, stanowiący C-koniec cząsteczki jest stosunkowo długi i składa się z 51 reszt aminokwasowych. Wykazuje on niewielką homologię z innymi białkami tej rodziny. W odcinku wewnątrzkomórkowym nie występują reszty tyrozynowe, a obecne reszty serynowe i treoninowe nie znajdują się w znanych motywach sekwencyjnych rozpoznawanych przez kinazy białkowe, co sugeruje brak możliwości przekazywania sygnałów przez GPVI za pomocą reakcji fosforylacji-defosforylacji

odcinka wewnątrzkomórkowego. Odcinek wewnątrzkomórkowy zawiera region bogaty w proliny, zdolny do wiązania białek posiadających domenę SH3 (ang: *src homology 3 domain*, SH3), w tym m.in. wielu kinaz tyrozynowych i białek adaptorowych. Stwarza to możliwość asocjacji GPVI z białkami biorącymi udział w przekazywaniu sygnału [11, 18-19]. Odcinek transbłonowy jest zbudowany z 19 aminokwasów i znajduje się pomiędzy resztami aminokwasowymi 250-268. W pozycji 3 domeny transbłonowej znajduje się reszta argininowa, która jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za tworzenie mostka solnego z resztą kwasu asparaginowego łańcucha γ receptora Fc (łańcuch γ FcR) [10]. Występowanie podobnych mostków solnych obserwowano pomiędzy receptorami Fc α i receptorami komórek NK a łańcuchem γ FcR. Tak więc zdolność GPVI do przekazywania sygnału wynika z asocjacji z łańcuchem γ FcR na podobieństwo z receptorami BCR i TCR. Zewnątrzkomórkowa N-terminalna część GPVI zawiera dwie domeny podobne do domen Ig-C2, które są utrzymywane przez dwa mostki dwusiarczkowe. GPVI ma tylko jedno miejsce N-glikozylacji występujące w Asn w pozycji 72. Liczne reszty treoninowe i serynowe, będące potencjalnymi miejscami O-glikozylacji, znajdują się w regionie podobnym do mucyn, zlokalizowanym blisko błony komórkowej odcinka zewnątrzkomórkowego. Masa cząsteczkowa GPVI, wyliczona na podstawie zawartości aminokwasów wynosi 37 kDa. Ponieważ GPVI płytek krwi rozdzielana w żelach poliakrylamidowych ma masę cząsteczkową 65 kDa, więc różnica wynosząca 28 kDa wynika najprawdopodobniej z obecności cukrowców, które stanowią 1/3 masy cząsteczki [10-11]. Schemat budowy GPVI przedstawia rycina 1.

Badania prowadzone z zastosowaniem izolowanej GPVI potwierdziły jej znaczenie jako receptora kolagenu płytek krwi [10]. Izolowana GPVI wiązała się do kolagenu i blokowała agregację płytek indukowaną kolagenem. Poliklonalne IgG skierowane przeciwko GPVI i ich fragmenty F(ab)₂ wywoływały silną aktywację płytek krwi, a fragmenty Fab wywoływały hamowanie agregacji płytek krwi, tak jak uprzednio opisano dla ludzkich alloprzeciwciał dla GPVI [2, 10].

Badania sklonowanej GPVI również potwierdziły jej udział w przewodzeniu sygnału. Ekspresja GPVI w komórkach UT-7/TPO (komórki linii leukemii megakarioblastycznej) nadała tym komórkom zdolność wiązania Cvx, a ekspresja w komórkach COS-7 spowodowała, że komórki te wiązały CRP [11-12]. Ekspresja GPVI w komórkach DAMI (komórki linii me-

gakariocytycznej) wywoływała ich aktywację, mierzoną jako zwiększenie poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego pod wpływem kolagenu i Cvx. Zwiększenie poziomu wapnia było zupełnie hamowane przez przeciwciała dla GPVI [10]. Ekspresja rekombinantowej GPVI w transfekowanych komórkach U937 i FDC-P1 nadawała im zdolność adhezji do kolagenu i Cvx [13]. Rekombinantowa GPVI hamowała agregację i uwalnianie serotoniny z płytek krwi pod wpływem kolagenu i Cvx. Na podkreślenie zasługuje fakt, że rekombinantowa GPVI była zaszczepiona z łańcuchem γ FcR [13].

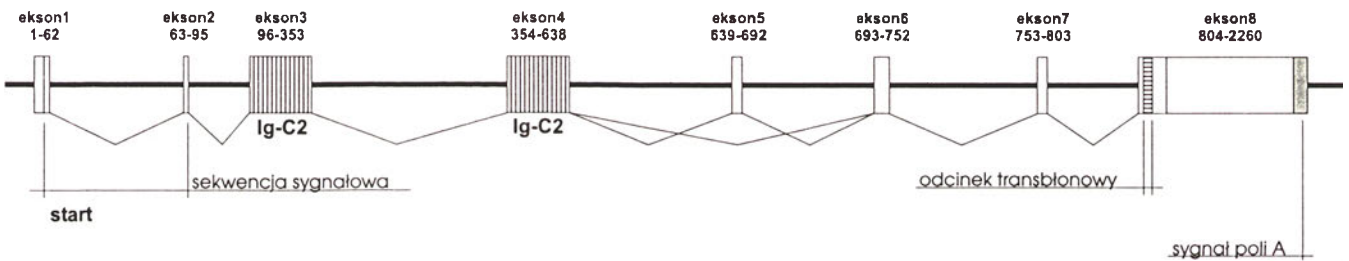


Ryc. 1. Schemat budowy glikoproteiny VI. Na schemacie zaznaczony jest odcinek zewnątrzkomórkowy z miejscem N-glikozylacji, dwiema domenami immunoglobulinowymi i regionem mucynowym bogatym w reszty serynowe i treoninowe. Domena transbłonowa GPVI zawiera resztę argininową, która jest odpowiedzialna za asocjację z łańcuchem γ receptora Fc, zawierającego sygnalizujący motyw ITAM (wg [20], zmodyfikowano).

III. Występowanie GPVI

Obecności GPVI szukano prawie we wszystkich tkankach ludzi i myszy oraz wielu liniach komórkowych. Występowanie RNA dla GPVI wykryto tylko w liniach megakariocytycznych, megakariocytach i płytkach krwi [11, 13, 20, 21]. Tak więc wydaje się, że GPVI należy do nielicznych białek, razem z GPV i PF4, które mogą być uważane za specyficzne marke-

ry megakariocytów i płytek krwi. Berlanga i wsp. [21], stosując megakarioblastyczne komórki HEL i CMK różnicowane estrem forbolu wykazali, że ekspresja GPVI zwiększa się wraz ze wzrostem różnicowania się tych komórek. Zwiększeniu ekspresji GPVI towarzyszył wzrost ekspresji łańcucha γ FcR, wzrost fosforylacji reszt tyrozynowych wielu białek, w tym kinazy Syk, fosfolipazy PLC γ 2 (ang: *phospholipase C γ 2*, PLC γ 2), białka adaptorowego LAT (ang: *linker for activated T cells*, LAT) oraz wzrost uwalniania wapnia wewnątrz komórek w odpowiedzi na Cvx. Doświadczenia, w których stosowano ludzkie megakariocyty różnicowane *in vitro* trombo-poetyną, potwierdziły badania Berlanga i wsp. i wykazały, że podczas dojrzewania megakariocytów następuje wzrost ekspresji GPVI. Wzrostowi ekspresji GPVI towarzyszył wzrost ekspresji łańcucha γ FcR i wzrost odpowiedzi funkcjonalnej megakariocytów pod wpływem kolagenu, Cvx i CRP [22-23]. Megakariocyty myszy różnicowane *in vitro* wraz ze wzrostem dojrzałości wykazywały również zwiększenie ekspresji GPVI [21].



Ryc. 2. Budowa genu GPVI. Na rycinie pokazane są eksony w postaci prostokątów. Liczby powyżej prostokątów wskazują na zawartość nukleotydów występujących w każdym eksonie. Eksony kodujące domeny Ig-C2 są zakreślone liniami pionowymi. Część eksonu 8 kodująca domenę transbłonową jest zakreślona liniami poziomymi. Regiony eksonów nie ulegające translacji są zaciemnione. Na rycinie pokazane jest miejsce startu transkrypcji, sekwencja sygnałowa, miejsce zatrzymania transkrypcji i sekwencja sygnałowa poli A (wg [12], zmodyfikowano).

IV. Budowa genu GPVI

Gen GPVI zlokalizowano na chromosomie 19q13.4. W jego pobliżu występują inne geny receptorów immunoglobulinowych w tym m.in. KIRs (ang: *killer cell inhibitory receptors*, KIRs), rodzina gp49b i FcaR. Gen GPVI zbudowany jest z ośmiu eksonów o łącznej długości 23 000 par zasad. Eksony 1 i 2 kodują dwudziestoaminokwasową sekwencję sygnałową, a eksony 3 i 4 kodują dwie domeny podobne do Ig-C2. Eksony 5-7 kodują region podobny do mucyn, a ekson 8 koduje region transbłonowy i cytoplazmatyczny. Główne miejsce startu transkrypcji znajduje się w pozycji +1, a inne miejsca startu transkrypcji znajdują się pomiędzy pozycjami -13 a -94. Promotor genu GPVI nie posiada sekwencji TATA i CAAT i posiada wiele miejsc startu transkrypcji podobnie do innych genów megakariocy-

tycznych, w tym genów integryn α_{11b} i α_2 oraz genów GPIX, PF4 i GPV [10-13]. Budowa genu GPVI pokazana jest na rycinie 2.

V. Przesyłanie sygnału za pośrednictwem GPVI

Kolagen oraz przeciwciała p62 skierowane przeciwko GPVI, wyizolowane z osocza pacjentki z niedoborem GPVI (GPVI-) w płytkach krwi, oraz fragmenty F(ab) $_2$ tych przeciwciał aktywują płytki krwi osób z normalną zawartością GPVI (GPVI+). Aktywacji płytek towarzyszy fosforylacja wielu białek, w tym kinaz Src i Syk oraz fosfolipazy PLC γ 2, która przebiega nawet w obecności czynników zwiększających zawartość cyklicznego AMP (cAMP). Kinaza Fak nie jest fosforylowana w płytkach aktywowanych p62 przy zwiększonym poziomie cAMP. Niezależnej od cAMP fosforylacji białek nie obserwowano w płytkach stymulowanych trombiną, co wskazywało na występowanie zależnego i niezależnego od cAMP mechanizmu aktywacji kinaz i na to, że GPVI aktywuje niektóre kinazy niezależnie od

cAMP [24]. Niezależna od cAMP fosforylacja PLC γ 2 jest przyczyną, już wcześniej charakteryzowanych jako niezależnych od cAMP procesów uwalniania jonów wapnia i tworzenia kwasu fosfatydowego w płytkach stymulowanych kolagenem [25-26].

Aktywacja płytek kolagenem oraz przeciwciałami sieciującymi krzyżowo receptor Fc γ RIIA (CD32), o niskim powinowactwie dla IgG, wywołuje fosforylację wielu białek podobnych do tych, które są fosforylowane w limfocytach po aktywacji receptorów TCR i BCR [27-29]. Motyw aktywujący zawierający reszty tyrozynowe (ang: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) receptora Fc γ RIIA ulega fosforylacji i asocjuje z domeną SH2 kinazy Syk w płytkach i limfocytach stymulowanych sieciowaniem receptora Fc γ RIIA [27, 30-33]. Nie obserwowano fosforylacji tego receptora i jego asocjacji z kinazą Syk w płytkach stymulowanych kolagenem

[27]. Badania te sugerowały, że kolagen aktywuje płytki w sposób podobny do aktywacji receptorów BCR i TCR, w których asocjacja ufosforylowanego receptora z kinazą Syk jest niezbędna dla zapoczątkowania aktywacji. Badania Gibbins i wsp. oraz Tsuji i wsp. [34-36] wykazały, że aktywacja płytek kolagenem wywołuje fosforylację innego białka zawierającego motyw ITAM, którym okazał się łańcuch γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE (łańcuch γ FcR), tworzący stabilny kompleks z GPVI (GPVI/Fc γ R). W kompleksie tym GPVI jest receptorem kolagenu, a łańcuch γ , homodimer o m.c.z. 14-20 kDa, spełnia funkcję przekaźnika informacji do wnętrza komórki. W płytkach GPVI- obserwowano niedobór łańcucha γ FcR proporcjonalny do niedoboru GPVI. Świadczy to o niezbędności występowania kompleksu GPVI/Fc γ R dla prawidłowej aktywacji płytek kolagenem [34].

Stymulacja płytek czynnikami aktywującymi kompleks GPVI/Fc γ R, którymi są kolagen, przeciwciała sieciujące krzyżowo GPVI, CRP i Cvx, wywołuje fosforylację motywu ITAM łańcucha γ FcR, powodując jego asocjację z tandemowymi domenami SH2 kinazy Syk, a w konsekwencji autofosforylację kinazy Syk i wzrost jej aktywności kinazowej. Syk inicjuje kaskadę przenoszenia sygnału, która kończy się aktywacją enzymów takich jak fosfolipaza PLC γ 2 i kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa (ang: *phosphatidylinositol 3-kinase*, kinaza PI-3), dostarczających drugorzędowych przekaźników informacji w tym m.in. 1, 4, 5-trisfosforanu inozytolu (IP3) i 1, 2-diacylglicerolu (DG), odpowiedzialnych za aktywację PKC oraz uwalnianie jonów wapnia [35-36, 37, 38]. W procesie aktywacji tych enzymów pośredniczy wiele białek adaptorowych takich jak LAT, SKAP-HOM, Crkl, Grb2, SLP-76, SLAP-130 i Gads [6, 39-41]. Udział kinazy Syk, adaptoru transbłonowego LAT oraz adaptoru cytozolowego SLP-76 badano w płytkach krwi genetycznie zmodyfikowanych myszy. Niedobór Syk prowadził do całkowitego braku fosforylacji LAT, SLP-76 i PLC γ 2. Brak SLP-76 powodował nie występowanie fosforylacji tylko PLC γ 2. W płytkach z deficytem LAT (LAT-) obserwowano jedynie słabe obniżenie fosforylacji SLP-76 i PLC2. Wyniki te wskazują na to, że LAT, SLP-76 i PLC γ 2 są substratami kinazy Syk. Wyniki te ponadto wskazują, że SLP-76 reguluje fosforylację PLC γ 2, która również częściowo zależy od LAT. Białko Gads jest konstytutywnie połączone z SLP-76, a cały kompleks SLP-76/Gads łączy się z LAT. LAT asocjuje z fosfolipazą PLC γ 2 i również z kinazą PI-3, co prowadzi do aktywacji tych enzymów [41-47]. Badania Gibbins i wsp. [48] wyka-

zały, że aktywacja kinazy PI-3 może przebiegać dwoma szlakami, z których jeden polega na asocjacji ufosforylowanego białka LAT z domeną SH2 podjednostki regulatorowej o m.c.z 85 kDa kinazy PI-3 (p85 PI-3), a drugi na asocjacji domeny SH2 p85 PI-3 z ufosforylowanym łańcuchem γ FcR. 3, 4, 5-trisfosforany fosfatydyloinozytolu (PIP3), wytworzone po aktywacji kinazy PI-3, biorą udział w przyłączaniu kinazy Btk (ang: *Bruton tyrosine kinase*) do błony plazmatycznej. PIP3 biorą też udział włączeniu PLC γ 2 do błony, dzięki asocjacji z jej domeną homologiczną do domeny plekstrynowej (ang: *plestrin homology domain*, PH). Sekwencja zdarzeń fosforylacyjnych inicjowanych połączeniem się liganda z kompleksem GPVI/Fc γ R prowadząca do aktywacji kinazy PI-3, fosfolipazy PLC γ 2 i w konsekwencji do aktywacji płytek krwi przedstawia rycina 3. Funkcja wielu białek, w tym m.in. Vav, Btk, Tec, Slap-130, WASP, które występują w kompleksach z innymi białkami biorącymi udział w przesyłaniu sygnału od kompleksu GPVI/Fc γ R nie jest dokładnie poznana.

VI. Fosforylacja łańcucha γ receptora Fc

Kolagen jest jedynym fizjologicznym aktywatorem płytek krwi, który wywołuje fosforylację łańcucha γ FcR. Badania prowadzone na genetycznie zmodyfikowanych myszach wykazały, że obecność łańcucha γ FcR oraz kinazy Syk jest niezbędna dla aktywacji płytek kolagenem [6, 48-49]. Aktywacji płytek kolagenem oraz CRP przy braku jonów magnezu oraz w obecności przeciwciał 6F1 skierowanych przeciwko GPIa/IIa, a więc w warunkach wykluczających działanie tego receptora kolagenu, towarzyszy fosforylacja łańcucha γ FcR, co świadczy o tym, że jest ona niezależna od tego receptora [35]. Stymulacja płytek trombiną oraz przeciwciałami sieciującymi receptor Fc γ RIIA nie powoduje fosforylacji łańcucha γ FcR [35]. Aglutynina otrzymana z kielków pszenicy (ang: *wheat germ agglutinin*, WGA), która jest silnym aktywatorem płytek krwi, wywołuje również fosforylację Syk i PLC γ 2. WGA powoduje fosforylację motywu ITAM łańcucha γ FcR i receptora Fc γ RIIA, czyli wykorzystuje szlak przewodzenia informacji zależny od kompleksu GPVI/Fc γ R i od receptora Fc γ RIIA. Z kolei trombina, fizjologiczny aktywator płytek, nie wywołuje fosforylacji receptorów Fc, ale wywołuje fosforylację Syk i PLC γ 2, co wskazuje na obecność innych szlaków przekazywania informacji prowadzących do aktywacji tych białek [35].

Niezbędność fosforylacji łańcucha γ FcR i jego asocjacji z GPVI dla prawidłowej aktywacji krwi za pomocą ligandów łączących się do GPVI wykazały badania Niesswand i wsp. [50], którzy zastosowali przeciwciała monoklonalne JAQ1, skierowane przeciwko GPVI. JAQ1 hamują aktywację płytek kolagenem, a w połączeniu z przeciwciałami poliklonalnymi, wywołującymi ich sieciowanie, powodują aktywację płytek oraz megakariocytów zawierających łańcuch γ , natomiast nie aktywują płytek z jego niedoborem. Ponadto, JAQ1 łączą się z megakariocytami i płytkami posiadającymi łańcuch γ FcR, natomiast nie łączą się z megakariocytami i płytkami z jego niedoborem, co świadczy o tym, że ekspresja GPVI jest *in vivo* skorelowana z ekspresją łańcucha γ FcR. Przeciwciała JAQ1 hamowały fosforylację łańcucha γ FcR, Syk, PLC γ 2, LAT i SLP76 w płytkach stymulowanych kolagenem i CRP. JAQ1 nie hamowały fosforylacji LAT w płytkach stymulowanych wysokimi stężeniami kolagenu, natomiast hamowały fosforylację LAT podczas aktywacji płytek wysokimi stężeniami CRP, co świadczy o tym, że w błonie plazmatycznej płytek występuje jeszcze jedno białko, rozpoznające kolagen i przekazujące sygnał niezbędny do fosforylacji LAT. Białko to jest najprawdopodobniej również sprzężone z łańcuchem γ FcR i w odróżnieniu od GPVI nie rozpoznaje sekwencji GPO (glicyna-prolina-hydroksypolina) występujących w kolagenie i CRP [51].

VII. Motyw aktywujący ITAM łańcucha γ receptora Fc

Motyw ITAM zawiera sekwencje YXXL/I-X₆₋₈-YXXL/I, w których konserwatywne reszty tyrozynowe są fosforylowane podczas aktywacji płytek z udziałem kompleksu GPVI/Fc γ R. Doświadczenia, w których obserwowano hamowanie fosforylacji motywu ITAM przez inhibitory kinaz oraz koprecypitację kinaz Lyn i Fyn z łańcuchem γ FcR dostarczyły pośrednich dowodów udziału kinaz rodziny *src*, Lyn i Fyn, w fosforylacji motywu ITAM. Jednocześnie nie obserwowano koprecypitacji innych kinaz, w tym Src, Yes, Fgr, Lck i Hck z tym łańcuchem [18-19]. Bezpośrednich dowodów udziału Lyn i Fyn w fosforylacji ITAM dostarczyli Quek i wsp [52], którzy zastosowali do badań płytki krwi myszy pozbawione genów kodujących Lyn i Fyn. Płytki Fyn- wykazywały obniżoną fosforylację łańcucha γ FcR, a ponadto LAT, SLP-76 i PLC γ 2, co było połączone z obniżoną odpowiedzią funkcjonalną płytek aktywowanych CRP. Płytki Lyn- wykazywały początkowe ob-

niżenie fosforylacji łańcucha γ FcR, po którym nastąpiło zwiększenie fosforylacji tego łańcucha i PLC γ 2, czemu towarzyszyło potęgowanie aktywacji płytek. Wyniki te świadczą o udziale Fyn i Lyn w fosforylacji motywu ITAM łańcucha γ FcR oraz o udziale Lyn w szlaku hamującym przesyłanie sygnału, najprawdopodobniej poprzez hamowanie aktywności fosfolipazy PLC γ 2 [52].

VIII. Motyw hamujący ITIM białka PECAM-1

Aktywacja płytek krwi z udziałem kompleksu GPVI/Fc γ R, w której kluczową rolę odgrywa fosforylacja motywu ITAM łańcucha γ FcR, jest hamowana przez fosforylację motywu hamującego (ang: *immune receptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) białka PECAM-1. Płytki krwi genetycznie zmodyfikowanych myszy z deficytem PECAM-1 wykazywały zwiększoną odpowiedź funkcjonalną pod wpływem kolagenu i CRP, w tym zwiększoną adhezję, agregację i reakcję uwalniania [53]. Zwiększonej odpowiedzi funkcjonalnej nie obserwowano podczas aktywacji płytek trombiną i ADP, co świadczy o tym, że motyw ITIM białka PECAM-1 wykazuje działanie supresyjne wyłącznie dla agonistów płytkowych specyficznych dla kompleksu GPVI/Fc γ R. Fosforylacja dwóch reszt tyrozynowych w pozycjach 663 i 686 występujących w konsensusowej sekwencji (L/I/V/S)XYXX(L/V) domeny cytoplazmatycznej PECAM-1 jest miejscem wiązania białek posiadających domeny SH2 [53]. Sugerowano, że białkami tymi mogą być fosfatazy tyrozynowe-1 i -2 zawierające domeny SH2 (ang: *src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1 and -2*, SHP-1 i SHP-2), przeprowadzające defosforylację kinaz tyrozynowych, najprawdopodobniej Syk i Lyn. Kinazy te mogą wiązać się bezpośrednio do domeny SH2, do domeny katalitycznej fosfataz lub wiążą się z fosfatazami za pośrednictwem innych białek np. SLP-76. Płytki krwi myszy *mev/mev* (ang: *moth-eaten viable*, *mev*) z mutacją genu *shp-1*, powodującą prawie całkowitą utratę katalitycznej aktywności SHP-1, wykazywały zamiast zwiększonej, obniżoną odpowiedź funkcjonalną na czynniki aktywujące GPVI. Ponieważ fosforylacja wszystkich białek charakterystycznych dla przewodzenia sygnału przez GPVI była obniżona, natomiast fosforylacja jednego białka o m.c. 26 kDa była znacznie podwyższona, wydaje się, że SHP-1 może również obniżać funkcję płytek poprzez fosforylację tego białka [54].

IX. Podobieństwo GPVI do receptorów immunologicznych

Podobieństwo GPVI do receptorów BCR i TCR polega na podobieństwie struktury pierwszorzędowej, obecności dwóch domen homologicznych z domenami Ig-C2 tych receptorów oraz na podobieństwie mechanizmu działania aktywującego i hamującego pobudzanie limfocytów i płytek krwi. Działanie aktywujące wywierane jest przez motyw ITAM, a hamujące przez motyw ITIM podobnych białek [10-17].

W części transbłonowej GPVI oraz receptorów BCR i TCR występuje dodatkowo naładowana reszta argininowa, tworząca mostek solny z ujemnie naładowaną resztą kwasu asparaginowego łańcucha γ receptora Fc. Mostek ten umożliwia połączenie się tych receptorów z sygnalizującym łańcuchem FcR. Brak motywu aktywującego oraz występowanie dodatnio naładowanego aminokwasu w transbłonowym odcinku jest cechą charakterystyczną wielu receptorów, w tym GPVI, receptorów Fc o wysokim i niskim powinowactwie dla IgG (Fc γ RI i Fc γ RIII), wysokim dla IgE (Fc ϵ RI), dla IgA (Fc α R) oraz PIR-A i receptora PI (CD161) komórek NK [17, 55-58]. Wszystkie te receptory asocjują z łańcuchem γ FcR, co umożliwia aktywację komórki w odpowiedzi na agregację receptora. Fosforylacja reszt tyrozynowych motywu ITAM łańcucha γ FcR umożliwia tworzenie kompleksów sygnalizujących, w których aktywacja kinaz Syk, PI-3 oraz fosfolipazy PLC γ 2 odgrywa kluczową rolę. W fosforylacji motywu ITAM biorą udział kinazy Fyn i Lyn. Wiele podobnych białek adaptorowych np. SLP-76, LAT, Gads i WASP pośredniczy w przekazywaniu sygnału od GPVI i receptorów TCR i BCR, a przesyłanie sygnału odbywa się w obszarach GEMs błony [6, 59-60].

Należy podkreślić, że udział niektórych kinaz i białek adaptorowych jest różny w aktywacji płytek i limfocytów, i tak np. kinaza Btk i białko WASP odgrywają dużo większą rolę w aktywacji limfocytów niż płytek krwi, o czym świadczy fakt, że limfocyty z deficytem tych białek wykazują defekty funkcjonalne w odróżnieniu od płytek krwi, które ich nie wykazują [47]. Ponadto białko adaptorowe SKAP-130 nie występuje w płytkach. Białko to jest obecne w limfocytach i zawiera konstytutywnie ufosforylowane reszty tyrozynowe. Płytki krwi zawierają białko SKAP-HOM, które ma konstytutywnie fosforylowane reszty tyrozynowe i którego fosforylacja nie ulega zwiększeniu po aktywacji kompleksu GPVI/FcR. W odróżnieniu od płytek krwi, białko SKAP-HOM limfocytów nie jest konstytutywnie fosforylowane, lecz

ulega fosforylacji po aktywacji receptorów TCR i BCR [41, 61].

W płytkach krwi fosforylacja motywu ITIM białka PECAM-1 i jego asocjacja z fosfatazami tyrozynowymi odgrywa funkcję hamującą podczas aktywacji płytek z udziałem kompleksu GPVI/Fc γ R [53-54, 62]. W limfocytach B i T stymulowanych antygenem hamujące działanie wywierane jest przez fosforylację motywu ITIM receptora Fc γ RIIB oraz PECAM-1, co wywołuje jego asocjację z fosfatazami SHP-1 i SHP-2 oraz z fosfatazą 5'-fosfoinozytolołą zawierającą domenę SH2 (ang: *SH2 containing inositol 5'-phosphatase*, SHIP) przeprowadzającymi defosforylację wielu białek [63-65]. Deficyt kinazy Lyn w płytkach i limfocytach wywołuje obniżone hamowanie, co wskazuje na udział Lyn w fosforylacji motywu ITIM, aczkolwiek udział innych kinaz rodziny *src* był również proponowany [52, 62-64, 66].

X. Peptydy podobne do kolagenu

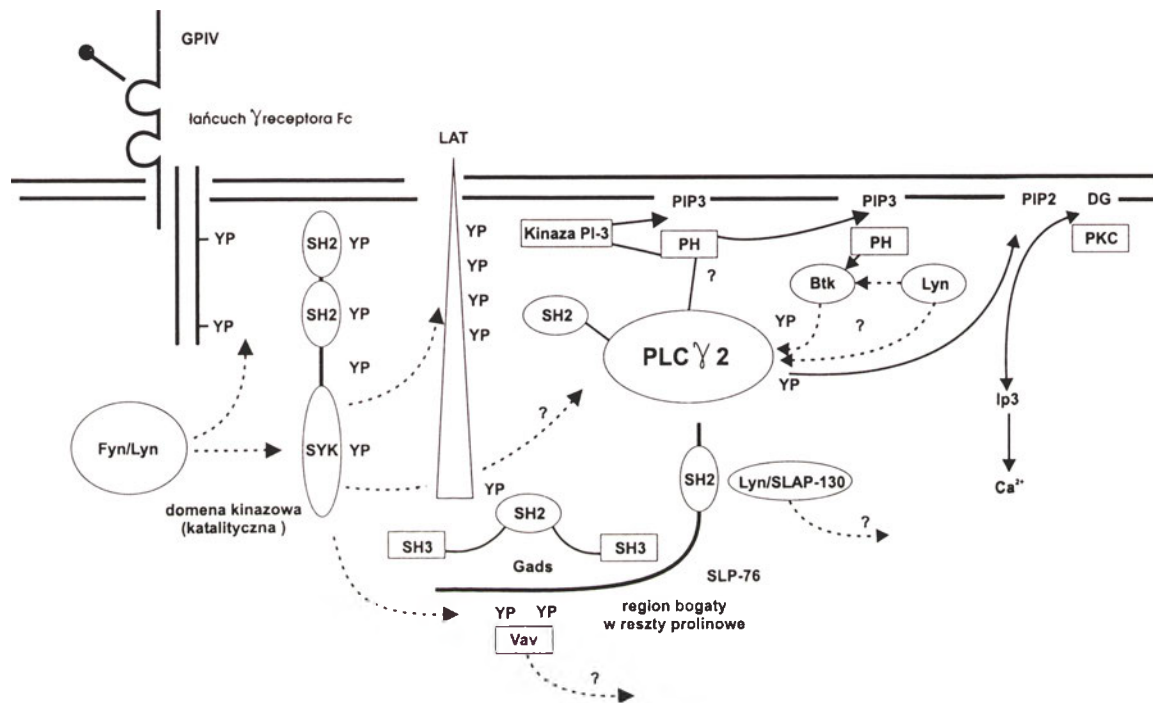
Peptydy podobne do kolagenu są otrzymywane drogą syntezy chemicznej. CRP są zbudowane z powtarzających się motywów sekwencyjnych, w skład których wchodzi reszty glicynowe, prolinowe i hydroksyprolinowe (GPO). Powtarzające się motywy GPO odzwierciedlają trzeciorzędową strukturę potrójnej helisy kolagenu. Usieciowanie krzyżowe tych peptydów, za pomocą reszt lizynowych lub cysteinowych, powoduje, że przybierają one spontanicznie strukturę czwartorzędową (polimeryczną) kolagenu [67]. CRP łączą się wyłącznie z GPVI i nie oddziałują z innymi receptorami kolagenu płytek i dlatego badanie oddziaływania CRP z płytkami krwi umożliwiło poznanie mechanizmu przekazywania sygnału za pośrednictwem kompleksu GPVI/Fc γ R [37, 67-69]. CRP są silniejszymi od kolagenu aktywatorami płytek, najprawdopodobniej dlatego, że motywy GPO powtarzają się w nich dużo częściej niż w kolagenie, dzięki czemu sieciują krzyżowo większą ilość cząsteczek GPVI [6]. Motywy GPO kolagenu stanowią ok. 10 % cząsteczki kolagenu i rzadko są zgrupowane blisko siebie, co powoduje, że sieciowanie GPVI przez kolagen jest słabsze. Ponadto, kolagen łącząc się z innymi receptorami może sieciować je z GPVI [6]. Oddziaływanie pomiędzy motywami GPO i płytkami krwi jest wysoce specyficzne, ponieważ motywy te są charakterystyczne dla kolagenu i rzadko występują w innych białkach, a GPVI występuje tylko w megakariocytach i płytkach [6, 69]. Na uwagę zasługuje fakt, że płytki krwi nie przylegają do CRP podczas przepływu, co świadczy o niskiej sile oddziaływań pomiędzy nimi, która nie jest

w stanie przeciwstawić się siłom ścinania (ang: *shear forces*) działającym na płytki w czasie przepływu [7]. Fakt ten wskazuje również na to, że trzeciorzędowa i czwartorzędowa struktura kolagenu, reprezentowana przez CRP, nie jest wystarczająca do inicjowania adhezji *in vivo*. Hamowanie adhezji dynamicznej płytek do kolagenu przez CRP obecne w osoczu wskazuje na udział sekwencji GPO połączonych z GPVI w adhezji *in vivo* [7].

Aktywacji płytek krwi towarzyszy pojawianie się aktywności prokoagulacyjnej, polegającej na ekspozycji kwaśnych fosfolipidów, głównie fosfatydyloseryny, na powierzchni błony. Umożliwia to aktywa-

kinaz pozwoliło na wyjaśnienie dwóch mechanizmów przyczyniających się do wzrostu stężenia tych jonów pod wpływem kolagenu. Jeden mechanizm, polegający na uwalnianiu jonów wapnia z ziarnistości wewnątrzpłytkowych, jest aktywowany przez CRP i jest zależny od GPVI i kinazy Syk. Drugi mechanizm, powodowany napływem jonów wapniowych do wnętrza komórki ze środowiska zewnątrzkomórkowego, jest niezależny od GPVI i kinazy Syk [70].

Zastosowanie CRP umożliwiło poznanie kolejności zdarzeń fosforylacyjnych po asocjacji liganda z kompleksem GPVI/FcγR i wskazało na ważną funk-



Ryc. 3. Schemat przekazywania sygnału przez kompleks GPVI/FcγR. Połączenie się specyficznego liganda do kompleksu GPVI/FcγR powoduje fosforylację motywu ITAM FcγR przez kinazy Fyn i Lyn, co wywołuje przyłączenie się kinazy Syk do błony. Kinaza Syk ulega autofosforylacji i jest fosforylowana przez kinazy rodziny src, co powoduje jej aktywację. Aktywna kinaza Syk fosforyluje Lat i SLP-76. Fosforylowane białko LAT łączy się z PLCγ2 i kompleksem białek SLP-76/Gads. Fosforylowane LAT łączy się również z kinazą PI-3, co umożliwia połączenie się tej kinazy z błoną i jej aktywację. Aktywna PI-3 dostarcza 3,4,5-trisfosforanów fosfatydyloinozytolowych, które łączą się z domenami plekstrynowymi fosfolipazy PLCγ2 i kinazy Btk, co ułatwia ich asocjację z błoną i aktywację. PLCγ2 może być fosforylowana przez kinazy Lyn i Btk. PLCγ2 hydrolizuje PIP2 dostarczając diacyloglicerol i 1,4,5-trisfosfoinozytol; diacyloglicerol aktywuje białkową kinazę C, a 1,4,5-trisfosfoinozytol powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w płytkach krwi. Kolejność zdarzeń fosforylacyjnych pokazują strzałki. YP — reszty fosfotyrozynowe, SH2 i SH3 — domeny homologiczne do domen SH2 i SH3 kinaz tyrozynowych, PH — domena plekstrynowa, DG — diacyloglicerol, IP3 — 1,4,5-trisfosforan inozytolu, PIP3 — 3,4,5-trisfosforan fosfatydyloinozytolu, PIP2 — 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu, PKC — kinaza białkowa C (wg [6], zmodyfikowano).

cję czynników krzepnięcia osoczowego, w tym trombiny i czynnika Xa. Porównanie aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi, przylegających do kolagenu z aktywnością płytek przylegających do CRP w obecności przeciwciał 6F1 oraz p62, oraz innych czynników blokujących GPVI lub GPIIb/IIIa, wykazało, że GPVI jest receptorem odpowiedzialnym za wytwarzanie tej aktywności [5]. Porównanie zmian stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w megakariocytach Syk- i Syk+ z zastosowaniem inhibitorów

cję SLP-76 w tworzeniu kompleksów sygnalizujących [37]. Ponadto, umożliwiło poznanie czynników regulujących funkcje kinaz PI-3, Btk, Tec i fosfolipazy PLCγ2 oraz regulujących translokację PLCγ2 i Btk do białek cytoszkieletu [47].

XI. Konwulksyna

Konwulksyna jest lektyną typu C izolowaną z jadu węża *Crotalus durissus terrificus*. Cvx jest zbu-

dowana z dwóch podjednostek α i β połączonych mostkami disiarczkowymi tworząc kompleks $\alpha_3\beta_3$ o m.c. 72 kDa [18, 38]. Cvx wiąże specyficznie GPVI, co jest przyczyną zmiany kształtu płytek, uwalniania szeregu substancji z ziarnistości płytkowych i agregacji płytek krwi. Cvx wywołuje również adhezję płytek krwi w sposób niezależny od jonów magnezu, co świadczy o tym, że przebiega ona z udziałem tylko GPVI [18, 38, 71-73]. Cvx jest silniejszym i szybszym czynnikiem aktywującym płytki niż kolagen i CRP, najprawdopodobniej dlatego, że każda cząsteczka konwulksyny może łączyć się z trzema cząsteczkami GPVI, powodując bardzo silną trimeryzację tego receptora [6, 18, 38, 72-73]. Cvx wywołuje około trzykrotnie silniejszą od kolagenu i CRP fosforylację wielu białek, w tym łańcucha γ FcR oraz innych białek leżących poniżej w kaskadzie fosforylacyjnej tj. Syk, PLC γ 2, SLP-76 i LAT. Pod wpływem Cvx interakcje pomiędzy wieloma białkami biorącymi udział w przesyłaniu informacji od kompleksu GPVI/Fc γ R są silniejsze, co pozwoliło na wykrycie asocjacji kinaz Fyn i Lyn z tym kompleksem, asocjacji białka LAT z SLP-76, PLC γ 2 i asocjacji podjednostki p85 kinazy PI-3 z LAT i z Fc γ R oraz w szczególności umożliwiło wykrycie kompleksów białek o niskiej sile wzajemnego oddziaływania, w tym m.in. kompleksów białek adaptorowych Cbl, Grb2, Gads i SKAP-HOM z łańcuchem γ FcR, LAT, SLP-76 i PLC γ 2 [6, 18, 41, 48].

XII. Udział innych receptorów kolagenu w adhezji, aktywacji i agregacji płytek krwi

Płytki krwi GPVI- wykazywały obniżoną drugą fazę adhezji, zależną od aktywacji płytek, w warunkach symulujących fizjologiczny przepływ krwi. Faza pierwsza adhezji, zwana chwilowym zatrzymaniem przepływu płytek lub inicjowaniem kontaktu płytki z kolagenem, była porównywalna w płytkach GPVI- i w płytkach GPVI+ [74]. Wyniki te świadczą o tym, że GPVI nie bierze udziału w inicjowaniu adhezji do kolagenu (faza pierwsza), która zależy m.in. od interakcji unieruchomionego czynnika vWF na kolagenie z kompleksem glikoprotein GPIb/V/IX błony płytkowej. Oddziaływanie niebezpośrednie GPIb z kolagenem, poprzez czynnik von Willebranda związany do specyficznych miejsc kolagenu, jest niezbędne dla prawidłowej adhezji płytek *in vivo*, szczególnie przy wysokich siłach ścinania [7]. Należy podkreślić, że wiązanie się vWF z GPIb i GPIIb/IIIa powodowane wysokimi siłami ścinania (ang. *shear stress*) wywołuje aktywację płytek krwi, której towarzyszy zwiększona fosforylacja wielu

białek w tym m.in. Fc γ RIIA, kinazy Syk, fosfolipazy PLC γ 2, translokacja kinazy Src i Lyn do frakcji cytoszkieletu płytek, asocjacja kinazy Syk z kinazą Src oraz asocjacja GPIb z kinazami tyrozynowymi i białkami adaptorowymi [77-78], wzrost stężenia jonów wapnia i powstawanie agregatów płytkowych [75-78].

Udział GPIa/IIa, GPIb/V/IX i GPIIb/IIIa w aktywacji płytek kolagenem badano stosując szereg lektyn specyficznie wiążących się z tymi glikoproteinami, w tym m.in. agretynę, znaną też jako rodocytna, alboagreginę i echicetynę. Wyniki badań z zastosowaniem niektórych lektyn, w tym rodocytny, wiążącej się do GPIa/IIa i Ib i wywołującej fosforylację podobnych białek jak w przypadku aktywacji płytek kolagenem, należy potraktować z dużą ostrożnością, ponieważ jej mechanizm działania nie zależy wyłącznie od połączenia z receptorami kolagenu [79-80]. Echicetyna i alboagregina, które łączą się z GPIb wywołują fosforylację reszt tyrozynowych wielu białek, w tym również tych, które biorą udział w przekazywaniu informacji od GPVI, a więc łańcucha γ receptora Fc, kinaz Fyn, Lyn i Syk, fosfolipazy PLC γ 2 oraz asocjacje GPIb z tymi kinazami i łańcuchem γ FcR. Działanie tych lektyn nie jest jednak dokładnym odzwierciedleniem wiązania się vWF do GPIb, ponieważ wywołują dużo silniejszą aktywację płytek niż czynnik vWF [81-83]. Słaba aktywacja płytek wywołana wiązaniem się vWF do cząsteczek GPIb, występujących w błonie płytki w ilości ok. 25 000, w porównaniu z aktywacją wywołaną przez wiązanie się specyficznych ligandów z GPVI, występującej w płytce w ilości ok. 2000 cząsteczek, może być spowodowana wg. Marshall i wsp. [83] słabą asocjacją GPIb ze szlakiem przekazującym informację lub udziałem tylko nielicznej subpopulacji cząsteczek GPIb w przekazywaniu sygnału. Jak wykazały ostatnie badania Asazuma i wsp. [84] alboagretyna wiąże się również do GPVI, co dodatkowo tłumaczy powstawanie pod jej wpływem silnego sygnału aktywującego. W chwili obecnej nie ulega wątpliwości jedynie fakt, że wiązanie vWF do GPIb i GPIIb/IIIa indukuje przekazywanie sygnału za pośrednictwem kinaz tyrozynowych, ale dokładny mechanizm udziału tych glikoprotein w aktywacji płytek kolagenem nie jest poznany.

GPV, jak wykazały badania Mogg i wsp. [85], wiąże się bezpośrednio z kolagenem. Płytki genetycznie zmodyfikowane z deficytem GPV wykazują obniżoną tendencję do tworzenia zakrzepów w badaniach modelowych *in vivo*. Deficyt GPV powodował *in vitro* występowanie obniżonej adhezji i agregacji płytek przez kolagen, co świadczy o udziale GPV w

tych procesach. Rola GPV w fosforylacji reszt tyrozynowych białek nie jest poznana.

Płytki krwi nie przylegają do CRP podczas przepływu, co dowodzi, że oddziaływanie GPVI z sekwencjami GPO nie jest wystarczające dla inicjowania adhezji. Bezpośrednie oddziaływanie GPIa/IIa ze specyficznymi sekwencjami kolagenu jest niezbędne dla inicjowania adhezji płytek *in vivo* [7, 86]. Płytki krwi przylegają do unieruchomionego peptydu zawierającego sekwencję kolagenu wiążącą domenę A GPIa, odpowiedzialną za połączenie GPIa/IIa z kolagenem. Adhezji płytek nie towarzyszy fosforylacja reszt tyrozynowych białek płytek, co świadczy o tym, że rozpoznawanie kolagenu wyłącznie przez GPIa/IIa nie jest wystarczające do inicjowania aktywacji płytek [69].

Model oddziaływania płytek krwi z kolagenem, wysunięty na podstawie porównania adhezji i aktywacji płytek GPVI+ i GPVI- kolagenem, CRP i Cvx zakłada, że początkowy kontakt płytek z kolagenem inicjowany jest głównie przez GPIa/IIa i GPIb, co pozwala na chwilowe zatrzymanie przepływających płytek na włóknach kolagenu. Bezpośredni udział GPIV w oddziaływaniu z kolagenem jest też możliwy, ponieważ płytki z deficytem tej glikoproteiny wykazują m.in. obniżoną wczesną adhezję do kolagenu [87-89]. Bezpośredni kontakt GPIa/IIa i GPIV z kolagenem nie jest jednak wystarczający do aktywacji płytek i dlatego proponowany jest również jedynie pasywny udział tych glikoprotein w aktywacji płytek, polegający na zwiększaniu powinowactwa kolagenu dla GPVI [6, 9].

Zatrzymanie płytek podczas pierwszej fazy adhezji umożliwia rozpoznanie GPVI przez kolagen powodując aktywację płytek doprowadzającą do powstania nieodwracalnych agregatów płytkowych [37, 68-69]. GPVI jest więc niezbędna dla przebiegu drugiej fazy adhezji, w której następuje aktywacja GPIIb/IIIa, umożliwiająca agregację płytek. Większy udział GPVI, w porównaniu z udziałem GPIa/IIa, w aktywacji GPIIb/IIIa, wytwarzaniu endogennego aktywatora płytkowego, tromboksanu A₂ (TxA₂), badany z zastosowaniem blokerów GPIa/IIa i GPVI oraz w warunkach umożliwiających adhezję przebiegającą wyłącznie za pośrednictwem jednego z tych receptorów, oraz tworzeniu aktywności prokoagulacyjnej, potwierdzają funkcję GPVI jako najważniejszego receptora aktywującego płytki podczas ich adhezji do kolagenu [5, 90-91].

Istnieją również dane doświadczalne, które wskazują na bezpośredni udział GPIa/IIa w aktywacji płytek krwi. Analiza fosforylowanych białek w płytkach krwi GPVI- aktywowanych kolagenem wyka-

zała obniżenie fosforylacji wielu białek z wyjątkiem kinazy Src i białka kortaktyny, które jest jednym z substratów tej kinazy. Fosforylacja Src obniżała się po inkubacji płytek GPVI- z przeciwciałami skierowanymi przeciwko GPIa/IIa, wskazując na udział tej glikoproteiny w fosforylacji Src. Ponieważ aktywacja kinazy Src przebiega również w płytkach GPVI+ stymulowanych p62 i jest niezależna od cAMP, wydaje się, że jej aktywacja zależy zarówno od GPVI i GPIa/IIa [24, 92]. Przeciwciała sieciujące GPIa/IIa powodowały wzrost stężenia jonów wapnia, który był powodowany napływem tych jonów ze środowiska zewnątrzkomórkowego, co świadczy o udziale GPIa/IIa w aktywacji płytek [70]. Ponadto, przeciwciała monoklonalne 6F1, skierowane przeciwko GPIa/IIa, hamowały uwalnianie serotoniny i agregację płytek oraz wzrost stężenia jonów wapniowych w płytkach krwi stymulowanych Cvx, ale nie hamowały adhezji płytek do Cvx, co wskazuje na udział GPIa/IIa w późniejszych etapach płytkowej aktywacji tj. egzocytozy i agregacji [73].

Na udział GPIV w aktywacji płytek wskazują niebezpośrednio następujące dane: (1) przeciwciała skierowane przeciwko GPIV aktywują płytki krwi, w sposób zależny od usieciowania GPIV z receptorem FcγRIIA (2) GPIV jest zasocjowana z kinazami Fyn i Lyn, których aktywacja inicjuje kaskadę przenoszenia sygnału od kompleksu GPVI/FcγR, (3) GPIV jest zlokalizowana w domenach GEMs, w których odbywa się przesyłanie sygnału, (4) przeciwciała sieciujące GPIV zwiększają aktywację płytek konwulksyną [4, 6, 93].

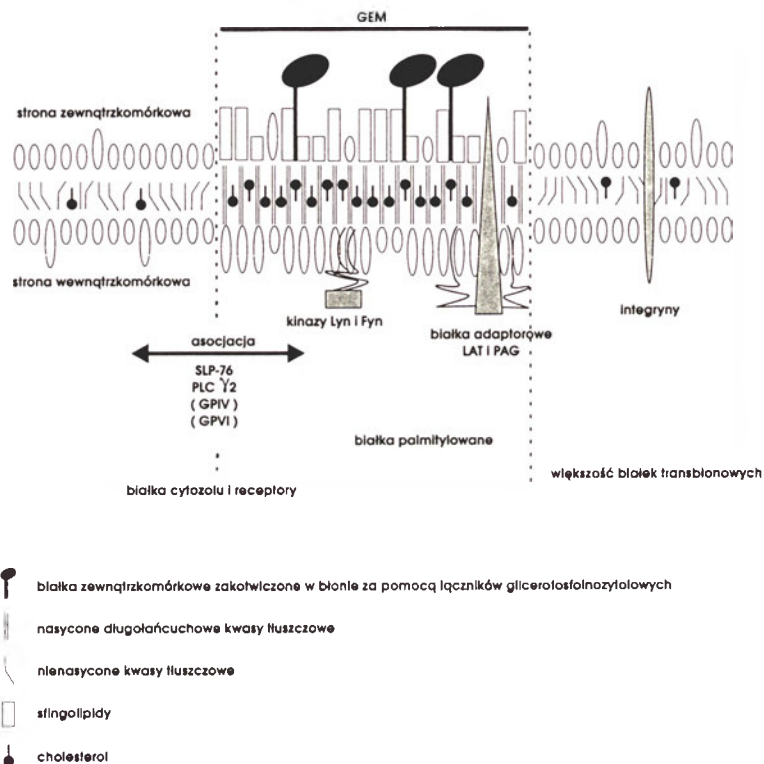
XIII. Domeny błonowe wzbogacone w glikolipidy

Domeny błony plazmatycznej wzbogacone w glikolipidy (ang: *glycolipid-enriched membrane domains*, GEMs) są miejscem powstawania sygnałów informujących komórkę o działającym ligandzie. Sygnał ten jest przesyłany do wnętrza komórki, za pomocą oddziaływań pomiędzy wieloma białkami przekąźnikowymi grupującymi się w pobliżu GEMs, co umożliwia komórce odpowiedź funkcjonalną na działający ligand [6, 41]. Domeny GEMs przedstawione są schematycznie na rycinie 4.

Domeny GEMs są bogate w cholesterol, sfingolipidy, długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe oraz białka biorące udział w przewodzeniu sygnału za pośrednictwem motywu ITAM. Białka strony zewnątrzkomórkowej są zakotwiczone w GEMs dzięki resztom glicerofosfoinozytolowym. Palmitylacja reszt cysteinowych ułatwia białkom trans-

blonowym i białkom strony cytoplazmatycznej połączenie się z GEMs. Kinazy Fyn i Lyn są palmitylowane. Zdolność kinaz Fyn i Lyn do fosforylacji łańcucha γ FcR wynika również z ich obecności w domenach GEMs [6]. Na uwagę zasługuje fakt, że kinaza Src, której w płytkach krwi jest najwięcej ze wszystkich kinaz tyrozynowych, nie jest palmitylowana i nie występuje w GEMs [94]. Wiele białek cytozolu, w tym PLC γ 2, SLP-76 czy Gads są transportowane w pobliże GEMs po aktywacji receptorów.

kazywania informacji. Poznanie procesu aktywacji płytek kolagenem stwarza możliwość zastosowania selektywnego pobudzenia lub blokady tego procesu z zachowaniem nienaruszalności odpowiedzi funkcjonalnej płytek na działanie innych aktywatorów. Przykładu selektywnej blokady aktywacji płytek kolagenem dostarczyli N i e s w a n d t i wsp [95], którzy podali myszom dootrzewnowo przeciwciała monoklonalne JAQ1, skierowane przeciwko glikoproteinie VI. Podanie tych przeciwciał wywołało usunię-



Ryc. 4. Budowa domen błony plazmatycznej wzbogaconych w glikolipidy (GEMs), w których odbywa się przekazywanie sygnału. Domeny GEMs bogate są w cholesterol, długłańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe, sfingolipidy. Białka strony zewnątrzkomórkowej są zakotwiczone w domenach GEMs za pomocą łączników glicerofosfoinozytolowych, a palmitylacja ułatwia białkom strony cytoplazmatycznej połączenie się z GEMs. Wiele białek cytozolu np. PLC γ 2 i SLP-76 łączy się z obszarami GEMs po przyłączeniu liganda do kompleksu GPVI/Fc γ R (wg [6], zmodyfikowano).

XIV. Podsumowanie

Wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania płytek krwi z kolagenem jest niezmiernie istotne dla poznania procesu krzepnięcia krwi oraz dla wyjaśnienia wielu zjawisk patologicznych, związanych z zaburzeniami tego procesu, prowadzących do krwawień lub zakrzepic. Badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych w ciągu kilku ostatnich lat udowodniły, że glikoproteina VI jest receptorem kolagenu płytek krwi odpowiedzialnym za ich aktywację. Badania te wyjaśniły w dużym stopniu mechanizm przesyłania informacji od kompleksu GPVI/Fc γ R, wyłoniły wiele elementów składowych biorących w nim udział, pokazały kolejność ich działania i wskazały na występowanie różnorodności szlaków prze-

bie GPVI z płytek *in vivo* przez okres dwóch tygodni, co najprawdopodobniej wywołane było internalizacją tej glikoproteiny i jej degradacją w cytozolu. Myszy, którym podano przeciwciała JAQ1, były przez okres dwóch tygodni całkowicie chronione przed letalnymi zakrzepicami, wywołanymi przez podanie *in vivo* kolagenu. Ponadto, płytki tych myszy wykazywały całkowity brak aktywacji w odpowiedzi na kolagen i CRP, podczas gdy ich odpowiedź aktywacyjna na ADP i trombinę była niezmienną. Czas krwawienia myszy z podanymi przeciwciałami JAQ1 był podwyższony w porównaniu z myszami kontrolnymi, ale był on znacznie niższy w porównaniu z myszami, którym podawano przeciwciała przeciwko GPIIb/IIIa, wskazując, że terapia antyzakrzepowa z zastosowaniem specyficznych czynników skierowa-

nych przeciwko GPVI jest związana z mniejszym ryzykiem powstawania krwotoków.

Pomimo ogromnego postępu badań nadal istnieje wiele zagadnień, które nie zostały wyjaśnione np. skład cukrowców GPVI, czy molekularne podstawy prowadzące do niedoboru GPVI. Ponadto, funkcja wielu kinaz i białek adaptorowych w tym m.in. Btk, Tec, SOS, WASP, Cas, Cbl, Crkl, Shc, PAG, SLAP-130 biorących udział w przekazywaniu informacji od GPVI jest bardzo słabo poznana.

Podziękowania

Artykuł ten dedykuję mojemu synowi Piotrowi
Praca dotowana z grantu KBN 6 P05A 133 20

Artykuł otrzymano 11 marca 2002
Zaakceptowano do druku 17 lutego 2003

Piśmiennictwo

1. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi S, Sensaki S, Kenaji K, Uchino H (1987) *Blood* **69**: 1712-1720
2. Moroi M, Jung S M, Okuma M, Shinmyozu K (1989) *J Clin Invest* **84**: 1440-1445
3. Arai M, Yamamoto N, Moroi N, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K (1995) *Br J Haematol* **89**: 124-130
4. Huang M-M, Bolen J B, Barnwell J W, Shattil S, Brugge J S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7844-7849
5. Heemskerk J W M, Siljander P, Vuist W M J, Breikers G, Reutelingsperger C P M, Barnes M J, Knight C G, Lassila R, Farndale R W (1999) *Thromb Haemost* **81**: 782-792
6. Watson S P, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis S, Marshall S, Snell D, Stafford M, Tulasne D, Wilde J, Wonerow P, Frampton J (2001) *Thromb Haemostas* **86**: 276-288
7. Verkleij M W, Morton L F, Knight G, de Groot P G, Barnes M J, Sixma J J (1998) *Blood* **91**: 3808-3816
8. Francischetti I M B, Chiang T M, Guimaracas J A, Bon C (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **270**: 932-935
9. Hers I, Berlanga O, Tiekstra M J, Kamiguti A S, Theakston R D G, Watson S P (2000) *Eur J Biochem* **267**: 2088-2097
10. Clemetson J M, Polgar J, Magnenat E, Wells T N C, Clemetson K J (1999) *J Biol Chem* **274**: 29019-29024
11. Miura Y, Ohnuma M, Jung S M, Moroi M (2000) *Thromb Res* **98**: 301-309
12. Ezumi Y, Uchiyama T, Takayama H (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **77**: 27-36
13. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A-H, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Coudic J-P, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W, Villeval J-L (2000) *Blood* **96**: 1798-1807
14. van Zanten G H, de Graaf S, Slootweg P J, Heijnen H F, Connoli T M, de Groot P G, Sixma J J (1994) *J Clin Invest* **93**: 615-632
15. Chiang T M, Rinaldy A, Kang A H (1997) *J Clin Invest* **100**: 514-521
16. Clemetson J M, Polgar J, Magnenat E, Wells T N, Clemetson K J (1999) *J Biol Chem* **274**: 29019-29024
17. Ono M, Yuasa T, Ra C, Takai T (1999) *J Biol Chem* **274**: 30288-30296
18. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H (1998) *J Exp Med* **188**: 267-276
19. Briddon S J, Watson S P (1999) *Biochem J* **338**: 203-209
20. Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J (2000) *Platelets* **11**: 252-258
21. Berlanga O, Bobe R, Becker M, Murphy G, Leduc M, Bon C, Barry F A, Gibbins J M, Garcia P, Frampton J, Watson S P (2000) *Blood* **96**: 2740-2745
22. Lagrue-Lak-Hal A-H, Debili N, Kingbury G, Leduc C, Le Couedic J-P, Villeval J-P, Jandrot-Perrus M, Vainchenker W (2001) *J Biol Chem* **276**: 15316-15325
23. Mountford J C, Melford S K, Bunce C M, Gibbins J, Watson S P (1999) *Thromb Haemost* **82**: 1153-1159
24. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Yanagi S, Yamamura H, Okuma M (1995) *J Biol Chem* **270**: 28029-28036
25. Smith J B, Dangelmaier C, Selak M A, Ashby B, Daniel J (1992) *Biochem J* **283**: 889-892
26. Smith J B, Dangelmaier C, Daniel J L (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 695-700
27. Yanaga F, Poole A, Asselin J, Blake R, Schieven G L, Clark E A, Law C-L, Watson S P (1995) *Biochem J* **11**: 471-478
28. Haimovich B, Regan C, DiFazio L, Ginalis E J, Purohit U, Rowley R B, Bolen J, Greco R (1996) *J Biol Chem* **271**: 16332-16337
29. Huang M-M, Indik Z, Brass L F, Hoxie J A, Schreiber A D, Brugge J S (1992) *J Biol Chem* **267**: 5467-5473
30. Chacko G W, Duchemin A-M, Coggeshall K M, Osborne J M, Brandt J T, Anderson C L (1994) *J Biol Chem* **269**: 32435-32440
31. Kolanus W, Romeo C, Seed B (1993) *Cell* **74**: 171-183
32. Sidorenko S P, Law C L, Chandran K A, Clark E A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 359-363
33. Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, Inazu T, Taniguchi T, Yamamoto T, Yamamura H (1994) *J Exp Med* **179**: 1725-1729
34. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H (1997) *J Biol Chem* **272**: 23528-23531
35. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law C-L, Watson S P (1996) *J Biol Chem* **271**: 18095-18099
36. Gibbins J M, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson S P (1997) *FEBS Letters* **413**: 255-259
37. Gross B S, Lee J R, Clements J L, Turner M, Tybulewicz V L J, Findell P R, Koretzky G A, Watson S P (1999) *J Biol Chem* **274**: 5963-5971
38. Polgar J, Clemetson J M, Kehrel B E, Wiedemann M, Magnenat E M, Wells T N C, Clemetson K J (1997) *J Biol Chem* **272**: 13576-13583
39. Gross B S, Melford S K, Watson S P (1999) *Eur J Biochem* **263**: 612-623
40. Pasquet J M, Gross B, Queck L, Asazuma N, Zhang W, Sommers C L, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee J R, Koretzky G, Love P E, Samelson L E, Watson S P (1999) *Blood* **89**: 1235-1242
41. Asazuma N, Wilde J J, Berlanga O, Leduc M, Leo A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Bon C, Liu S K, McGlade J, Schraven B, Watson S P (2000) *J Biol Chem* **275**: 33427-33434
42. Watson S P (1999) *Thromb Haemost* **82**: 365-376
43. Watson S P, Gibbins J (1998) *Immunol Today* **19**: 260-264
44. Barnes M J, Knight C G, Farndale R D (1998) *Curr Opin Hematol* **5**: 314-320
45. Alberio L, Dale G L (1999) *Eur J Clin Invest* **29**: 1066-1076
46. Clements J L, Lee J R, Gross B, Yang B, Olson J D, Sandra A, Watson S P, Lentz S R, Koretzky G A (1999) *J Clin Invest* **103**: 19-25
47. Bobe R, Wilde J I W, Maschberger P, Vanketswarlu K, Cullen P J, Siess W, Watson S P (2001) *Blood* **97**: 678-684
48. Gibbins J M, Briddon S, Shutes A, van Vugt M J, van de Winkel J G J, Saito T, Watson S P (1998) *J Biol Chem* **273**: 34437-34443

49. Poole A, Gibbins J M, Turner M, van Vogt M J, van de Winkel J G J, Saito T, Tybulewicz V L J, Watson S P (1997) *EMBO J* **16**: 2333-2341
50. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner J E, Zirngibl H (2000) *J Biol Chem* **275**: 23998-24002
51. Schulte V, Snell D, Bergmeier W, Zirngibl H, Watson S P, Nieswandt B (2001) *J Biol Chem* **276**: 364-368
52. Quek L S, Pasquet J-M, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs M L, Dunn A R, Lowell C A, Watson S P (2000) *Blood* **96**: 4246-4253
53. Patil S, Newman D K, Newman P J (2001) *Blood* **97**: 1727-1732
54. Pasquet J-M, Quek L, Pasquet S, Poole A, Matthews J R, Lowell C, Watson S P (2000) *J Biol Chem* **275**: 28526-28531
55. Kubagawa H, Chen C C, Ho L H, Shimada T S, Gartland L, Mashburn C, Uehara T, Ravetch J V, Cooper M D (1999) *J Exp Med* **189**: 309-318
56. Ravetch J V, Kinetic J P (1991) *Annu Rev Immunol* **9**: 457-462
57. Morton H C, van den Herik-Oudijk I E, Vosseveld P, Snijders A, Verhoeven A J, Capel P J, van de Winkel J G (1995) *J Biol Chem* **270**: 29781-29787
58. Arase N, Arase H, Park S Y, Ohno H, Ra C, Saito T (1997) *J Exp Med* **186**: 1957-1963
59. Myung P S, Boerth N J, Koretzky G A (2000) *Curr Opin Immunol* **12**: 256-266
60. Tomlinson M G, Lin J, Weiss A (2000) *Immunol Today* **21**: 584-591
61. Marie-Cardine A, Hendricks-Taylor R, Boerth N H Z, Schraven B, Koretzky G A (1998) *J Biol Chem* **273**: 25789-25795
62. Ciemil M, Thomas J M, Sage T, Barry F A, Leduc M, Bon C, Gibbins J G (2000) *J Biol Chem* **275**: 27339-27347
63. Smith K G C, Tarlinton D M, Doody G M, Hibbs M L, Fearon D T (1998) *J Exp Med* **187**: 807-811
64. Doody G M, Justeman L B, Delibrias C C, Matthews R J, Lin J, Thomas M L, Fearon D T (1995) *Science* **269**: 242-244
65. Zhang J, Somani A K, Siminovitch K A (2000) *Semin Immunol* **12**: 361-378
66. Chan V W F, Meng F, Soriano P, DeFranco A L, Lowell C A (1997) *Immunity* **7**: 69-81
67. Morton L F, Hargreaves P G, Farndale R W, Young R D, Barnes M J (1995) *Biochem J* **306**: 337-344
68. Knight C G, Morton L F, Onley D J, Peachey A R, Ichinohe T, Okuma M, Farndale R W, Barnes M (1999) *Cardiovasc Res* **41**: 450-457
69. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson K J, Anders O, Steiner M, Knight C G, Farndale R W, Okuma M, Barnes M J (1998) *Blood* **91**: 491-499
70. Briddon S J, Melford S K, Turner M, Tybulewicz V, Watson S P (1999) *Blood* **93**: 3847-3855
71. Francischetti I M B, Saliou B, Leduc M, Carlini C R, Hatmi M, Randon J, Faili A, Bon C (1997) *Toxicol* **35**: 1217-1228
72. Jandrot-Perrus M, Lagrue A-H, Okuma M, Bon C (1997) *J Biol Chem* **272**: 27035-27041
73. Niedergang F, Alcover A, Knight C G, Farndale R W, Barnes M J, Francischetti I M B, Bon C, Leduc M (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 246-250
74. Moroi M, Jung S M, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M (1996) *Blood* **86**: 2081-2092
75. Razdan K, Hellums J D, Kroll M H (1994) *Biochem J* **302**: 681-686
76. Oda A, Yokoyama K Y, Murata T, Takuhira M, Nakamura K, Handa M, Watanabe K, Ikeda Y (1995) *Thromb Haemost* **74**: 736-742
77. Asazuma A, Ozaki Y O, Yatomi Y, Handa M, Fujimura Y, Miura S, Kume S (1997) *Blood* **90**: 4789-4798
78. Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Miura S, Fujimura Y, Kume S (1995) *Biochim Biophys Acta* **1243**: 482-488
79. Bergmeier W, Bouvard D, Eble J A, Mokhtari-Nejad R, Schulte V, Zirngibl H, Brakebusch C, Fassler R, Nieswandt (2001) *J Biol Chem* **276**: 25121-25126
80. Navdaev A, Clemetson J M, Polgar J, Kehrel B E, Glauner M, Magnenat E, Wells T N C, Clemetson K J (2001) *Thromb Haemost* Abstract: P1160
81. Falati S, Edmead C E, Poole A (1999) *Blood* **94**: 1648-1656
82. Navdaev A, Dormann D, Clemetson J M, Clemetson K J (2001) *Thromb Haemost* Abstract: P1169
83. Marshall S J, Asazuma N, Wonerow P, Andrews R, Watson S P (2001) *Thromb Haemost* Abstract: P 1562
84. Asazuma N, Marshall S J, Berlanga O, Snell D, Poole A W, Berndt M, Andrews R K, Watson S P (2001) *Blood* **97**: 3989-3991
85. Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravannat C, Schuhler S, Freund M, Santer M, Kahn M, Nieswandt B, Gachet C, Cazenave J-P, Lanza F (2001) *Blood* **98**: 1038-1046
86. Emsley J, Knight C G, Farndale R W, Barnes M J, Liddington R C (2000) *Cell* **100**: 47-56
87. Tandon N N, Kralisz U, Jamieson G A (1989) *J Biol Chem* **264**: 7576-7583
88. Diaz-Ricart M, Tandon N N, Carretero M, Ordinas T, Bastida E, Jamieson G A (1993) *Blood* **82**: 491-496
89. Kralisz U (1995) *Post Bioch* **41**: 188-195
90. Nakamura T, Jamieson G A, Okuma M, Kambayashi J-i, Tandon N N (1998) *J Biol Chem* **273**: 4338-4344
91. Nakamura T, Kambayashi J-i, Okuma M, Tandon N N (1999) *J Biol Chem* **274**: 11897-11903
92. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Arai M, Yamamoto N, Takahashi H, Okuma M (1997) *J Biol Chem* **272**: 63-68
93. Dorahy D J, Burns G F (1998) *Biochem J* **333**: 373-379
94. Honda Z I, Suzuki T, Kono H, Okada M, Yamamoto T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 1759-1771
95. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave J-P, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl (2001) *J Exp Med* **193**: 459-469

Peptydy natriuretyczne — cząsteczki sygnałowe zwierząt i roślin

Natriuretic peptides — signalling molecules in animals and plants

JUSTYNA WIŚNIEWSKA¹, ANDRZEJ TRETYN²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Peptydy natriuretyczne zwierząt
 - II-1. Struktura genu ANP oraz dojrzewanie ANP kręgowców
 - II-2. Receptory NPs kręgowców
 - II-3. Biologiczna funkcja NPs
- III. Peptydy natriuretyczne roślin
 - III-1. Wpływ zwierzęcego ANP oraz irPnP na rośliny
- IV. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Natriuretic peptides in animals
 - II-1. Structure of ANP genes and maturation of ANP in vertebrates
 - II-2. Receptors of NPs in vertebrates
 - II-3. Biological function of NPs
- III. Plants' natriuretic peptides
 - III-1. The effect of animal ANP and irPnP on plants
- IV. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: ANP — przedsionkowy peptyd natriuretyczny; BNP — mózgowy peptyd natriuretyczny; cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan; CNP — peptyd natriuretyczny typu C; ENOD40 — białkowy product genu *enod40*; irP-NP — roślinny peptyd natriuretyczny wyizolowany z bluszczu (*Hedera helix*); NPs — peptydy natriuretyczne; PNPs — roślinne peptydy natriuretyczne; rANP — przedsionkowy peptyd natriuretyczny szczura; RNP — nerkowy peptyd natriuretyczny; SCR/SP11 — białka uczestniczące w interakcji pyłek-słupek; VNP — komorowy peptyd natriuretyczny

I. Wstęp

W ostatnich kilkunastu latach ukazało się wiele prac, w których starano się wykazać podobieństwa lub/i różnice w naturze chemicznej związków pełniących funkcje sygnałowe w tkankach roślin i zwierząt. W tkankach i organach roślin zidentyfikowano takie (fito)hormony jak: auksynę, gibereliny, cytokiny, kwas absycynowy, etylen, brassinosteroidy oraz jasmoniany. Wszystkie te związki to sub-

stancje organiczne o stosunkowo małej masie cząsteczkowej (poniżej 400 Da).

W przypadku niektórych hormonów roślinnych można dostrzec pewne podobieństwa w ich budowie chemicznej do hormonów zwierzęcych — brasinosteroidy podobne są do progesteronu i testosteronu (steroidów), a kwas jasmonowy do prostaglandyn. W tkankach roślin stwierdzono także występowanie zwierzęcego neuroprzekaźnika — acetylocholino [1-2] oraz substancji insulinopodobnych [3-7]. Na tej podstawie przypuszcza się, że w trakcie ewolucji pierwotne zwierzęta i rośliny wykorzystywały te same związki, które jako nośniki informacji służyły im do utrzymywania komunikacji między komórkami oraz odbioru bodźców zewnętrznych. Największą grupę takich substancji w tkankach zwierzęcych stanowią oligo- i polipeptydy, które pełnią kluczową rolę w regulacji metabolizmu, cyklu komórkowego oraz różnicowania się komórek i tkanek. Jeszcze do niedawna sądzono, że tego typu procesy w organizmach roślinnych regulowane są przez „klasyczne” fitohormony. Odkrycia dokonane w ostatnim dziesięcioleciu wskazują na istnienie u roślin peptydowych cząsteczek sygnałowych. Pierwszą tego typu cząsteczkę — systeminę — odkryto w roku 1991 [8]. W kolejnych latach schyłku ubiegłego wieku wykryto szereg in-

¹Dr, ²prof. dr hab., Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, e-mail: jwisniew@biol.uni.torun.pl; tran@biol.uni.torun.pl

nych białkowych cząsteczek sygnałowych m. in.: fitosulfokiny (PSK) [9], ENOD40 [10], SCR/SP11 [11]. Pojawiły się również prace wskazujące na obecność w tkankach roślinnych białek homologicznych z przedsionkowym peptydem natriuretycznym zwierząt i człowieka [12, 13].

II. Peptydy natriuretyczne zwierząt

Peptydy natriuretyczne (NPs — ang. *Natriuretic Peptides* lub NFs ang. *Natriuretic Factors*), to białka hormonalne powszechnie występujące w organizmach kręgowców, które utrzymują homeostazę jonową (bilans sodu i potasu) oraz wodną w organizmie [13, 14, 15].

W zależności od miejsca syntezy i pełnionej funkcji w tkankach ssaków można wyróżnić następujące peptydy natriuretyczne NPs [16, 17]:

- przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP — ang. *Atrial Natriuretic Peptide*),
- komorowy peptyd natriuretyczny (VNP — ang. *Ventricular Natriuretic Peptide*),
- mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP — ang. *Brain Natriuretic Peptide*),
- peptyd natriuretyczny typu C (CNP — ang. *type C Natriuretic Peptide*),
- nerkowy peptyd natriuretyczny (RNP — ang. *Renal Natriuretic Peptide, urodilatin*).

Peptydy natriuretyczne zostały zidentyfikowane w organizmach kręgowców — od ryb chrzęstnoszkieletowych, płazów, gadów, po ptaki i ssaki włącznie [za 17]. Przedsionkowy, komorowy oraz mózgowy peptyd natriuretyczny (ANP, VNP i BNP) są białkami hormonalnymi wydzielanymi przez serce do krwi, zaś peptyd natriuretyczny typu C (CNP) jest białkiem produkowanym w mózgu i obwodowym układzie nerwowym [17]. U ryb chrzęstnoszkieletowych występuje tylko CNP, który wytwarzany jest zarówno przez serce jak i mózg [18].

Poza przedsionkiem serca ssaków [19] obecność ANP lub jego mRNA stwierdzono także w sercach i zwojach nerwowych bezkręgowców; takich jak: ślimak [20], krab [21] oraz ostryga [15]. ANP wykryto również w cytoplazmie komórek pantofelka (*Paramecium*) [22] oraz w tkankach kilku gatunków roślin [12, 13, 23, 24].

Fakt występowania peptydów natriuretycznych w organizmach stojących na różnych szczeblach ewolucji sugeruje, iż białka te powstały we wczesnym etapie tego procesu, a następnie cały układ doskonalił się indywidualnie w różnych grupach systematycznych zwierząt i roślin [25].

II-1. Struktura genu ANP oraz dojrzewanie ANP kręgowców

Obecnie dobrze jest znana struktura genów kodujących przedsionkowe peptydy natriuretyczne kręgowców. Wchodzące w ich skład 3 eksony kodują pre-pro-ANP. Proces powstawania dojrzałego ANP ma charakter wieloetapowy (Ryc. 1). W pierwszym etapie tego procesu z pre-pro-ANP zostaje usunięta N-końcowa sekwencja sygnałowa. Następnie z końca C tego polipeptydu usuwane są 2 reszty arginino-we. U szczura, królika i wołu w skład powstałego tą drogą pro-ANP wchodzi 126 reszt aminokwasowych. W wyniku dalszego dojrzewania pro-ANP, dochodzi do jego proteolitycznego rozpadu, prowadzącego do powstania 98-aminokwasowego odcinka N-końcowego oraz 28-aminokwasowego fragmentu C-końcowego. Aktywną część C-końcowego odcinka ANP stanowi 17-aminokwasowy fragment, zawarty pomiędzy 7-mą (licząc od C-końca) a 23-cią cysteiną, które połączone są mostkiem dwusiarczkowym. Prawdopodobnie odcinek ten jest odpowiedzialny za specyficzne wiązanie się z receptorem [26].

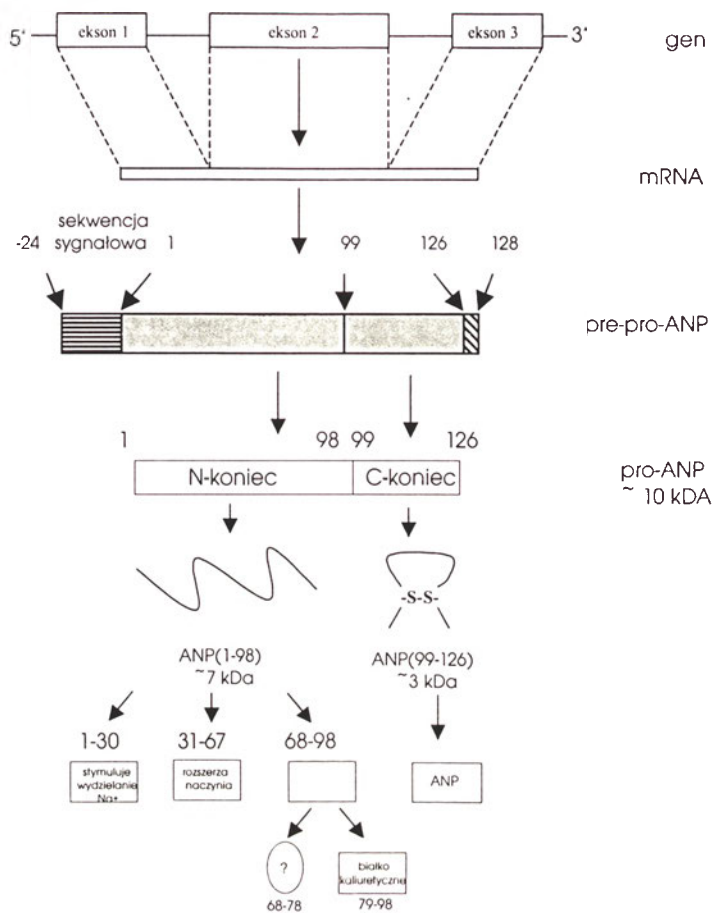
Biologiczna rola N-końca proANP(1-98) jest mniej poznana i uważa się, iż ulega on dalszej proteolitycznej degradacji na kilka mniejszych odcinków, z których każdy może pełnić odmienną funkcję biologiczną. I tak: ANP(1-30) bierze udział w długotrwałej stymulacji wydalania sodu z organizmu, ANP(31-67) wpływa na rozszerzanie naczyń krwionośnych, natomiast ANP(79-98) to białko kaliuretyczne, regulujące bilans potasu w organizmie [27].

Najbardziej konserwatywnie zachowanymi białkami, należącymi do NPs, są peptydy natriuretyczne typu C (CNP), natomiast budowa mózgowych peptydów natriuretycznych (BNP) jest wysoce zmienna. Ustalono, że CNP i BNP kodowane są przez różne geny, ale ich fragmenty C-końcowe wykazują taką samą cykliczną budowę jaka występuje w ANP. W przypadku wszystkich NPs omawiany C-koniec charakteryzuje się konserwatywnie zachowywanymi trzema motywami o następującym składzie aminokwasów: C F G x x x D R I x x x S G L G C (gdzie „x” oznacza dowolną resztę aminokwasową) [26].

Podobnie jak w CNP budowa pro-ANP jest wysoce konserwatywna u wszystkich do tej pory badanych gatunków ssaków i wynosi odpowiednio: u szczura i myszy — 93,8%, człowieka i psa — 89%, a u człowieka i szczura — 85% [za 25]. Homologiczność sekwencji pro-ANP pomiędzy różnymi gromadami kręgowców (np. ssakami i płazami) jest niska i

wynosi około 50% [28]. Niewiele jest danych porównujących sekwencję ANP kręgowców i bezkręgowców. Wykazano jedynie, że mRNA ostrygi i kraba są identyczne z mRNA ANP szczura [29].

wiera krótką (37 aminokwasową) domenę cytoplazmatyczną. Najwyższe powinowactwo względem NPR-A i NPR-C wykazuje ANP, podczas gdy CNP najsilniej wiąże się z NPR-B [26]. W wyniku akty-



Ryc. 1. Struktura genu przedstonkowego peptydu natriuretycznego (ANP) oraz poszczególne etapy jego powstawania w organizmie kręgowców (na podstawie [16, 25] — zmodyfikowane).

II-2. Receptory NPs kręgowców

Obecnie znana jest budowa trzech typów receptorów NPs: NPR-A, NPR-B oraz NPR-C [26, 30]. Wspomniane receptory zbudowane są z pojedynczego polipeptydu, w skład którego wchodzi domeny: zewnątrzkomórkowa, transbłonowa i cytoplazmatyczna (Ryc. 2). N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa (występująca u wszystkich typów receptorów) zbudowana jest z 440 reszt aminokwasowych. W zależności od rodzaju receptora w skład domeny cytoplazmatycznej może wchodzić 530 (NPR-A i NPR-B) lub 37 (NPR-C) aminokwasów. W pierwszym przypadku, w części cytoplazmatycznej receptora NPs, występują sekwencje homologiczne do kinazy białkowej i cyklicznej guanylanowej, zbudowane odpowiednio z około 280 i 250 reszt aminokwasowych. Receptor NPR-C w miejsce tych sekwencji za-

wacji NPR-A i NPR-B dochodzi do przejściowego wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego cGMP [31]. Natomiast receptor NPR-C (nie posiadający domeny cyklicznej guanylanowej) prawdopodobnie oddziałuje z cykliczną adenylanową, odpowiedzialną za syntezę cAMP. Oba wymienione cykliczne nukleotydy poprzez wpływ na aktywność kanałów jonowych i wodnych (akwaporyn) regulują homeostazę jonową i wodną organizmów [26, 32], a poprzez modulację stężenia elektrolitów kontrolują objętość i ciśnienie krwi [33].

II-3. Biologiczna funkcja NPs

Mechanizm regulacji homeostazy wodno-elektrolitowej ssaków jest złożony. Uważa się, że ANP może działać wielostronnie na ten proces. Pośrednio wpływa hamująco na ośrodek pragnienia, a także ob-

niża sekrecję wazopresyny z podwzgórza oraz aldosteronu z nadnerczy. W wyniku tych procesów dochodzi do zmniejszenia absorpcji wody i sodu w jelicie oraz stymulacji ich wydalania przez nerki. Poza tym ANP pośrednio wpływa na utrzymanie równowagi i bilansu sodowego w organizmie przez nerki poprzez hamowanie sekrecji reniny oraz zmniejszenie powinowactwa angiotensyny do jej receptorów. Przyczynia się także do rozszerzania średnicy żył, przez co maleje zarówno ciśnienie w przedsionkach jak i ich rozciągnięcie. Pod wpływem ANP dochodzi do znacznego wzrostu wydzielania sodu, chloru, potasu, wapnia, magnezu, fosforanów i

sionków w wyniku zwiększonej objętości krwi, a co z tym się wiąże zwiększonej ilości płynów i sodu w organizmie.

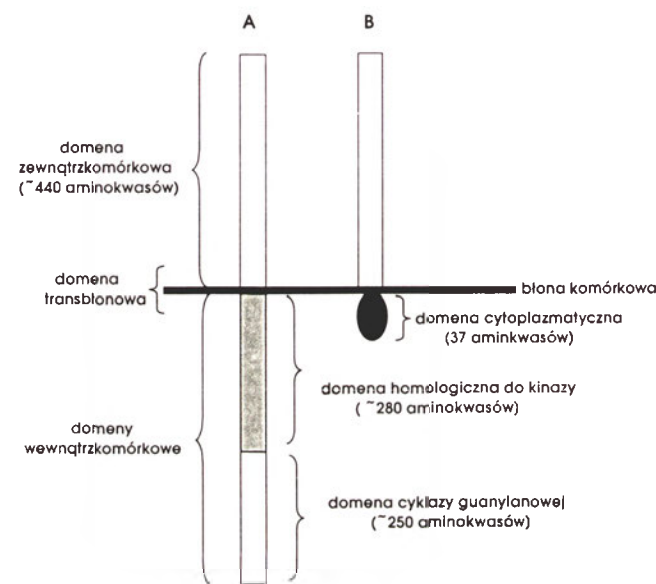
W przypadku ssaków ANP jest głównym hormonem, który poprzez stymulację wydzielania wody i sodu reguluje ciśnienie ich krwi. ANP odgrywa również fundamentalną rolę w procesie osmoregulacji u ryb słodkowodnych i morskich [36, 37]. Stwierdzono między innymi, że peptyd ten hamuje proces picia wody przez węgorza żyjącego w wodzie słodkiej i absorpcję sodu przez jego jelito, zaś w nerkach węgorza żyjącego w wodzie słonej ANP wpływa na zmniejszenie stężenia moczu [37]. ANP wyizolowane z tkanek ssaków i podane do organizmu pstrąga tęczowego wykazuje zarówno działanie diuretyczne i natriuretyczne, wpływając na aktywność $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATP-azy}$ [38, 39].

III. Peptydy natriuretyczne roślin

W ekstraktach z liści i łodyg draceny (*Dracena goldseffiana*) stwierdzono obecność białek homologicznych z proANP(1-98), proANP(31-67) oraz ANP(99-126) szczura (rANP). Zawartość homologów proANP(1-98) i proANP(99-126) w tkankach liści i łodyg wahała się w granicach 109-129 20 ng/g tkanki. Mniejszą ilość proANP(31-67) stwierdzono w łodydze (96 20 ng/g tkanki) w porównaniu do liści (123 ± 21 ng/g tkanki). Przypuszcza się, iż ma to związek z większą ilością naczyń ksylemu w liściach niż w łodydze. W tkankach przedsionka serca szczura poziom tych białek był wyższy (196 ± 40 ng/g tkanki), zaś w tkankach komory serca o ponad 25 razy mniejszy ($4,3 \pm 1,4$ ng/g tkanki) w porównaniu do tkanek bluszczu. Masa cząsteczkowa roślinnych homologów — proANP(1-98), proANP(31-67), ANP(99-126) była podobna do masy ANP wyizolowanego z tkanek szczura i wynosiła odpowiednio: 10 kDa, 3,9 kDa, 3 kDa [12].

Stwierdzono, że przeciwciała rozpoznające różne odcinki zwierzęcych proANP reagują z białkami występującymi w tkankach roślinnych. Za pomocą króliczych przeciwciał (anty- α -ANP) wyizolowano i oczyszczono z ekstraktów liści bluszczu (*Hedera helix*) odpowiednik ANP(1-28) człowieka i nazwano go irPNP (od ang. *Plant Natriuretic Peptide*). Jego ciężar cząsteczkowy był zbliżony do homologicznego odcinka rANP i wynosił około 3063 Da [23].

Poza dracena i bluszczem występowanie homologów proANP kręgowców (proANP(1-30, 31-67)) oraz C-końcowego fragmentu ANP wykryto także w tkankach korzeni, łodyg i liści wielu gatunków roślin naczyniowych, takich jak: paprotniki (*Nephrolepis*



Ryc. 2. Schemat budowy receptorów peptydów natriuretycznych typu NPR-A i NPR-B (A) i typu NPC-C (B) (na podstawie [16] — zmodyfikowane).

wody, spowodowanego podwyższeniem filtracji kłębuszkowej i przepływu krwi przez nerki oraz hamowaniem błonowego transportu wymienionych jonów. W efekcie końcowym dochodzi do zmniejszenia objętości krwi i utrzymywania jej prawidłowego ciśnienia [33]. Kluczową rolę w regulacji opisanych procesów odgrywa ANP, który produkowany jest w formie prohormonu (pro-ANP) w prawym przedsionku serca i uwalniany do krwioobiegu. Synteza proANP(1-98) ma charakter konstytutywny, a jego stężenie w osoczu człowieka jest znacznie wyższe niż pro-ANP(99-126) [34]. Prawdopodobnie jest to wynikiem znacznie wolniejszej degradacji pro-ANP(1-98) w porównaniu do pro-ANP(99-126), który po przyłączeniu się do receptorów ulega selektywnej degradacji prowadzonej przez endopeptydazę [35]. W warunkach naturalnych stężenie ANP zmienia się w zależności od rozciągania ścian przed-

exaltata, *Selaginella lepidophylla*), rośliny nagozależkowe (*Zamia pumila*, *Podocarpus macrophytes*), rośliny okrytozależkowe jedno- (*Dracena godseffiana* i *Reo spathacea*) i dwuliścienne (*Pelargonium hortorum*, *Rosa damascena*) [13]. Poza nielicznymi wyjątkami (*Podocarpus macrophytes* i *Dracena godseffiana*) liście zawierały większą ilość homologów ANP w porównaniu do łodyg. Spośród wszystkich przeanalizowanych gatunków najwyższy poziom badanych białek stwierdzono w liściach i łodygach draceny (12-12,9 ng/g tkanki) [13]. Oprócz łodyg i liści obecność homologów zwierzęcego ANP stwierdzono również w korzeniach wszystkich przebadanych roślin. Na tej podstawie przypuszcza się, że ANP może stymulować wzrost absorpcji wody przez korzenie oraz podwyższać tempo transportu wody i zawartych w niej soli z korzeni do nadziemnych części roślin.

Obecność homologu rANP wykryto w tkankach liści i łodyg metasekwji chińskiej (*Metasequoia glyptostroboides*), żywej skamieniałości z ery mezozoicznej. Masa cząsteczkowa białka wyizolowanego z łodyg tej rośliny była nieco większa w porównaniu z rANP. Fakt ten sugeruje, że podobnie jak u zwierząt również u roślin ANP może występować w formie prohormonu. Za dojrzewanie tego białka może odpowiadać papaina 3E, endopeptydaza tnąca białka w miejscu występowania reszt kwasu asparaginowego [40].

Na podstawie wyników badań uzyskanych dla metasekwji przypuszcza się, że białka natriuretyczne funkcjonowały u pierwszych roślin lądowych. Ułatwiający transport wody i soli mineralnych z korzeni do liści umożliwiły osiągnięcie przez rośliny znacznych rozmiarów (ponad 9 metrów wysokości). Dodatkowym czynnikiem pozwalającym na wzrost nadziemnych części roślin było uruchomienie procesu transpiracji. Stymulujące ten proces białka natriuretyczne umożliwiły lepsze zaopatrzenie liści w wodę i sole mineralne [24].

Jak dotąd mało wiadomo na temat genów kodujących u roślin homologi zwierzęcych peptydów natriuretycznych. Stosując metodę hybrydyzacji typu *Southern* wykazano obecność sekwencji homologicznej do genu ANP owcy (2070 pz) w tkankach korzeni, łodyg i liści bluszczu (*Hedera helix*) [25]. Analiza całkowitego RNA wyizolowanego z tej rośliny doprowadziła do wykrycia cząsteczek mRNA, które swą wielkością (850 pz) zbliżone są do mRNA prohormonu rANP [28, 41]. Obecność tego mRNA stwierdzono jedynie w tkankach łodygi. Wyniki te sugerują, że gen kodujący cząsteczki ANP podlega ekspresji tylko w komórkach tego organu [25]. Po-

wstający w łodydze białkowy prekursor podlega dojrzewaniu (proteolitycznej obróbce), a powstałe tą drogą cząsteczki aktywnego ANP transportowane są do miejsc ich docelowego działania, między innymi do aparatów szparkowych. Sugestię tę potwierdza fakt zidentyfikowania w tkankach liści bluszczu czterech fragmentów proANP, powstałych przypuszczalnie w wyniku proteolitycznego cięcia pre-proANP, w miejscach połączeń pomiędzy resztami kwasu asparaginowego. Sugeruje się, że transportowane do liści cząsteczki ANP wiążąc się z występującymi w błonach komórek przysparkowych receptorami stymulują otwieranie się aparatów szparkowych. Podwyższeniu tempa transpiracji towarzyszy zwiększenie szybkości pobierania wody i soli mineralnych przez korzenie i ich transportu do liści [13, 25].

III-1. Wpływ zwierzęcego ANP oraz irPNP na rośliny

W ciągu ostatnich kilku lat stwierdzono, że zwierzęce NPs mogą wpływać na przebieg różnych procesów zachodzących u roślin.

Wykazano, że poszczególne, zwierzęce fragmenty proANP(1-30, 30-67, 79-98) znacząco przyspieszają szybkość transportu wody wzdłuż łodyg chryzantem o około 15-35 min (tj. około 30-70%) w porównaniu do kontroli. ProANP(1-30, 30-67, 79-98) podnosiły także szybkość transpiracji (odpowiednio 5-, 4-, 3-razy przeliczając na powierzchnię liścia) oraz absorpcję roztworu glebowego przez korzenie. Peptydy te stymulowały transport wody i soli mineralnych nawet po usunięciu liści z pędu. Tylko C końcowy fragment ANP nie wykazywał żadnego wpływu na badane procesy [13]. Uzyskane wyniki potwierdzają pogląd, iż transpiracja nie musi być jedynym procesem odpowiedzialnym za transport roztworu z korzeni do nadziemnych części rośliny. ANP mogą wpływać na transport wody i zawartych w niej soli mineralnych poprzez: wzrost absorpcji roztworu glebowego, wzrost szybkości przepływu wody z zawartymi w niej solami mineralnymi wzdłuż łodygi oraz podniesienie tempa transpiracji [13]. U zwierząt ANP stymulują rozszerzanie naczyń krwionośnych. W związku z tym zaproponowano, iż u roślin jednym z możliwych mechanizmów działania ANP może być wzrost średnicy naczyń ksylemu [13]. Wydaje się to mało prawdopodobne ze względu na fakt, iż są to komórki martwe. Uważa się jednak, iż omawiane peptydy mogą zwiększać przepuszczalność elementów floemu tj. rurek sitowych oraz komórek towarzyszących dla wody i soli mineralnych [13]. Roz-

twór floemu jest bardziej stężony w porównaniu do roztworu wypełniającego elementy ksylemu, gdyż zawiera osmotycznie czynne produkty fotosyntezy. Jeśli niektóre składniki soku floemowego (np. sole mineralne) uległyby przemieszczeniu z floemu do ksylemu, doszłoby do wzrostu potencjału osmotycznego roztworu wypełniającego elementy ksylemu, a co za tym idzie do wzrostu tempa pobierania wody przez korzenie i jej transportu do nadziemnych części rośliny [13].

Stosując metodę magnetycznego rezonansu jądrowego ($^2\text{H-NMR}$) wykazano, że rANP oraz irPNP stymulują poprzeczny przepływ wody z elementów ksylemu do kory pierwotnej pędów trzykrotki (*Tradescantia multiflora*). Podobny mechanizm działania wykazywał 8-Br-cGMP (przepuszczalny przez błony komórkowe analog cGMP), podczas gdy inhibitor cyklicznej guanylanowej (LY 83583) oraz bloker kanałów wodnych (HgCl_2) hamowały ten proces. Na tej podstawie przypuszcza się, że roślinne NPs mogą kontrolować międzytkankowy transport wody poprzez regulację wewnątrzkomórkowego poziomu cGMP i aktywności kanałów wodnych [42].

Z tkanek liści bluszcza wyizolowano i oczyszczono dwie frakcje irPNP homologiczne z pro-ANP(1-28) człowieka [43]. Tylko jedna frakcja irPNP wykazywała aktywność biologiczną w tkankach walca osiowego korzeni kukurydzy, w których podnosiła o około 3 razy poziom endogenego cGMP. Podwyższone stężenie tego nukleotydu utrzymywało się przez okres około 10 minut od podania irPNP, a następnie w ciągu kolejnych 20-tu minutach wracało ono do poziomu wyjściowego. Zaobserwowano, iż w tkankach przewodzących korzenia kukurydzy irPNP powoduje bezpośredni napływ jonów H^+ oraz opóźnia wpływ do tych tkanek jonów K^+ i Na^+ [44]. Po potraktowaniu tkanek walca osiowego wyizolowanych z korzeni kukurydzy rANP, kinetyną i LY 83583 nie zaobserwowano żadnego fizjologicznego efektu. Na podstawie wyników opisanych badań przypuszcza się, że w błonach komórkowych walca osiowego występują receptory irPNP. Podobnie jak u zwierząt receptory te mogą posiadać cytoplazmatyczną domenę posiadającą aktywność cyklicznej guanylanowej.

Wyizolowany i oczyszczony z bluszcza irPNP stymulował otwieranie się aparatów szparkowych trzykrotki. Efekt ten obserwowano przy 100-krotnie niższym stężeniu irPNP, w porównaniu do rANP [23]. Wykazano również, że poza trzykrotką syntetyczny rANP(1-28) stymuluje otwieranie się aparatów szparkowych kalanchoe i wyki [45]. Polipeptyd ten tracił swoją biologiczną aktywność po zerwaniu

mostka dwusiarczkowego, występującego pomiędzy 7-mą a 23-cią resztą aminokwasową. Sugeruje to, iż specyficzna struktura II-rzędowa białka decyduje o jego wiązaniu się z receptorem [46]. Stymulujący wpływ rANP oraz kinetyny na otwieranie się aparatów szparkowych odwracalnie hamowany był w wyniku wcześniejszego potraktowania komórek przy- szparkowych inhibitorem cyklicznej guanylanowej (LY 8353), podczas gdy 8-Br-cGMP działał w podobny sposób jak rANP [46].

Zarówno rANP(1-28), jak i irPNP stymulowały otwieranie się szparek liści ziemniaka podnosząc poziom cytoplazmatycznego cGMP komórek szparkowych [47]. Wzrost stężenia tego cyklicznego nukleotydu w badanych komórkach związany był z błonowym transportem Ca^{2+} . Wykazano, że w obecności EGTA (chelatora jonów wapnia) następuje zablokowanie indukowanego przez IrPNP podwyższenia cytoplazmatycznego poziomu cGMP [47].

Wykazano, że poza komórkami walca osiowego i szparek peptydy natriuretyczne wpływają na właściwości osmotyczne komórek miększu asymilacyjnego. Syntetyczny rANP (99–126), w zależności od stężenia i czasu podania, zmieniał potencjał osmotyczny (turgor) w protoplastach uzyskanych z mezofilu liści. Turgor tych protoplastów wzrastał również po dodaniu irPNP do roztworu inkubacyjnego [48].

IV. Podsumowanie

W ostatnich latach uzyskano wiele danych przemawiających za występowaniem u roślin odpowiedników zwierzęcych peptydów natriuretycznych. Mechanizm działania tych roślinnych i zwierzęcych cząsteczek sygnałowych związany jest z regulacją homeostazy wodnej i jonowej. Roślinne NPs mogą kontrolować transport wody i soli mineralnych w komórkach walca osiowego korzeni, w tkankach przewodzących (floemie i ksylemie) oraz w komórkach liści (miększu asymilacyjnym i komórkach przy- szparkowych). Przypuszcza się, że w plazmolemie komórek roślinnych mogą występować receptory wiążące peptydy natriuretyczne. Obecność specyficznych miejsc wiążących (receptorów) ^{125}I -rANP w błonach komórkowych, pochodzących z liści i łodyg trzykrotki wykazano *in vivo* i *in vitro* [45, 49]. Podobnie jak u zwierząt receptory te mogą posiadać cytoplazmatyczną domenę wykazującą aktywność cyklicznej guanylanowej (patrz ryc. 2) [46]. Indukowanemu przez wiązanie NP wzrostowi poziomu cGMP może towarzyszyć aktywacja kanałów jonowych [47] i wodnych [50], mających bezpośredni wpływ na homeostazę jonową i wodną roślin.

By dokładniej poznać biologiczną rolę roślinnych peptydów natriuretycznych niezbędne są dalsze badania. Winny one wykazać w jakich komórkach i tkankach roślinnych syntetyzowane są ich formy prekursorowe oraz gdzie i jak przebiega ich dojrzewanie. Należy również wyjaśnić budowę molekularną i mechanizm działania receptorów roślinnych peptydów natriuretycznych.

Podziękowanie

Autorzy dziękują Komitetowi Badań Naukowych za możliwość realizacji badań, które finansowane były w ramach grantu nr 5PO6A 03016.

Artykuł otrzymano 6 maja 2002
Zaakceptowano do druku 12 grudnia 2002

Piśmiennictwo

1. Tretyn A, Kendrick RE (1991) *Bot Rev* **57**: 33-73
2. Wiśniewska J, Tretyn A (1999) *Acta Physiol Plantarum* **21**: 221-230
3. Gray AM, Flatt PR (1998) *British J Nutrit* **128**: 2319-2323
4. Gray AM, Flatt PR (1998) *British J Nutrit* **80**: 109-114
5. Gray AM, Flatt PR (1999) *British J Nutrit* **81**: 203-209
6. Gray AM, Flatt PR (1999) *J Endocrinol* **160**: 409-414
7. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sultupinar N (2001) *Phytotherapy Res* **15**: 157-61
8. Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) *Science* **253**: 895-898
9. Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, Sakagami Y (2000) *Plant Cell Physiol* **41**: 825-830
10. Kouchi H, Takane K, So RB, Ladha JK, Reddy PM (1999) *Plant J* **18**: 121-129
11. Brugiere N, Cui Y, Rothstein SJ (2000) *Trends Plant Sci* **5**: 432-438
12. Vesely DL, Giordano AT (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 695-700
13. Vesely DL, Gower Jr, Giordano AT (1993) *Am J Physiol* **265**: E465-E477
14. Martin DR, Pevahouse JB, Trigg DJ, Vesely DL, Buerkert JE (1990) *Am J Physiol* **258**: F1401-F1408
15. Vesely DL, Gower Jr, Giordano AT, Friedl FE (1993) *Comp Biochem Physiol* **106B**: 535-546
16. Gering CA (1999) *Ann Bot* **83**: 329-334
17. Takei Y (2001) *Biochem Biol* **129**: 559-573
18. Suzuki R, Togashi K, Ando K, Takei Y (1994) *Gen Comp Endocrinol* **96**: 378-384
19. de Bold AJ, Borenstein BH, Veress AT, Sonnenberg H (1981) *Life Sci* **28**: 89-94
20. Reinecke M, Nehls M, Forssmann WG (1985) *Peptides* **6**: 321-331
21. Turrin MQA, Sawaya, MI, Santos, MCF, Veiga LV, Mantero F (1992) *Comp Biochem Physiol* **101A**: 803-806
22. Vesely DL, Giordano AT (1992) *Peptides* **13**: 177-182
23. Billington T, Pharmawati M, Gehring CA (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 722-725
24. Yang Q, Gower WR Jr, Li C, Chen P, Vesely DL (1999) *Exp Biol Med* **221**: 188-192
25. Vesely MD, Gower Jr, Perez-Lamboy G, Overton RM, Graddy L, Vesely DL (2001) *Exp Biol and Med* **226**: 61-65
26. Koller KJ, Goeddel DV (1992) *Circulation* **86**: 1081-1088
27. Vesely DL, Douglas MA, Dietz JR, Gower WR, McCormick MT, Rodriguez-Paz G, Schocken DD (1994) *Circulation* **90**: 1129-1140
28. Takei Y (2001) *Int Rev Cytol* **194**: 1-66
29. Poulos JE, Gower Jr, Friedl FE, Vesely DL (1995) *Gen Comp Endocrin* **100**: 61-68
30. Chinkers M, Gabers DL, Chang MS, Love DG, Chin H, Goddel DV, Schulc S (1989) *Nature* **338**: 78-83
31. Garbers DL, Lowc DG (1994) *J Biol Chem* **269**: 30741-30744
32. Anand-Srivastava MB, Trachte GJ (1993) *Pharmacol Rev* **45**: 455-497
33. Ganong WF (1994) W: Traczyk WZ (red.) *Podstawy fizjologii lekarskiej*, Wydawnic-two Lekarskie PZWL, W-wa, str. 557-559
34. Itoh H, Nakao K, Sugawara A (1988) *J Clin Endocrinol Metab* **67**: 429-437
35. Kenny AJ, Stephenson SL (1988) *FEBS Lett* **232**: 1-8
36. Evans DH (1990) *Annu Rev Physiol* **52**: 43-60
37. Takei Y, Kaiya H (1998) *Anguilla Jap Zool Sci* **15**: 399-404
38. Duff DW, Olson KR (1986) *Am J Physiol* **251**: R639-R642
39. Takei Y, Flik G, Hirose S (1999) W: Roubos EW, Wendelaar Bonga S, Vaudry H, de Loof A (red.), *Recent Developments in Comparative Endocrinology and Neurology*. Shaker publishing BV, Maastricht, str. 144-148
40. Glazer AN, Smith EL (1971) W: Boyer PD (red) *The enzymes, Hydrolysis: Peptide Bonds.*, Academic Press, New York, str. 501-502
41. Poulos JE, Gower Jr, Sullebarger JT, Fontanet HL, Vesely DL (1996) *Cardiovasc Res* **32**, 909-919
42. Suwastika IN, Gehring CA (1998). *Cell Mol Life Sci* **54**: 1161-1167
43. Pharmawati M, Gehring CA, Irving HR (1998) *Plant Science* **137**: 107-115
44. Pharmawati M, Shabala SN, Newman IA, Gehring CA (1999) *Mol Cell Biol Res Commun* **2**: 53-57
45. Gering CA, Khalid KMD, Toop T, Donald JA (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 739-744
46. Pharmawati M, Billington T, Gehring CA (1998) *Cell Mol Life Sci* **54**: 272-276
47. Pharmawati M, Maryani MM, Nikolakopolus T, Gehring CA, Irving HR (2001) *Plant Physiol Biochem* **39**: 385-394
48. Maryani MM, Bradley G, Cahih DM, Gehring CA (2001) *Plant Sci* **161**: 443-452
49. Suwastika IN, Toop T, Irving HR, Gehring CA (2000) *Plant Biol* **2**: 1-3
50. Patil RV, Han Z, Wax MB (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 392-396

Fotoenzym oksydoreduktaza: NADPH-protochlorofilid (LPOR) — klucz do biosyntezy chlorofilu

Photoenzyme NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) — the key for chlorophyll biosynthesis

BARBARA BEREZA¹, AGNIESZKA KUBIAK², JACEK LELUK³,
WACŁAW HENDRICH⁴

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Protochlorofilid
 - II-1. Protochlorofilid *in vitro*: własności fizykochemiczne i badania modelowe
 - II-2. Protochlorofilid *in vivo*: w roślinach oraz w izolowanych plastydach i ich fragmentach
- III. Oksydoreduktaza: NADPH-protochlorofilid
 - III-1. POR *in vivo*: biosynteza, transport i lokalizacja
 - III-2. POR *in vitro*: otrzymywanie i własności katalityczne
 - III-3. Struktura
- IV. Kompleksy protochlorofilidu i ich fotoreaktywność
 - IV-1. Formy spektralne protochlorofilidu a jego stan fizyczny
 - IV-2. Mechanizm fotoredukcji protochlorofilidu
- V. Rola światła, protochlorofilidu, LPOR i NADPH w regulacji syntezy chlorofilu
- VI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Protochlorophyllide
 - II-1. Protochlorophyllide *in vitro*: physicochemical properties and model studies
 - II-2. Protochlorophyllide *in vitro*: in plants, isolated plastids and its fragments
- III. NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase
 - III-1. POR *in vivo*: biosynthesis, transport and localisation
 - III-2. POR *in vitro*: isolation, purification and catalytic properties
 - III-3. Structure
- IV. Protochlorophyllide complexes and its fotoreactivity
 - IV-1. Spectral forms of protochlorophyllide and its physical state
 - IV-2. Photoreduction of protochlorophyllide and its mechanism
- V. Effect of light, Pchl, LPOR and NADPH in regulation of chlorophyll biosynthesis
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ALA — kwas δ -aminolewulinowy; CD — dichroizm kołowy; Chl — chlorofil; Chlid — chlorofilid; D — ciemny; DPOR — oksydoreduktaza niezależna od światła; DV — reszta diwinylowa; Ex — pasmo wzbudzenia fluorescencji; Em — pasmo emisji fluorescencji; Emv — pasmo oscylacyjne emisji fluorescencji; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny; FLN — fluorescencja wąskopasmowa (ang. *fluorescence line narrowing*); HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa; LPOR — oksydoreduktaza zależna od światła; L — jasny; MBP — białko wiążące maltozę; MV — reszta monowinylowa; NADPH — fosforan dinukleotydu niko-

tynamido-adeninowego (forma zredukowana); NADP⁺ — fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (forma utleniona); NMR — jądrowy rezonans magnetyczny; P_y:P — barwnik, y — maksimum emisji; Pchl — protochlorofil; Pchlid — protochlorofilid; P_{fr} — fitochrom (forma dalekiej czerwieni — ang. *far red*); PLB — ciało prolamelarne; PT — protylakoidy; TX100 — detergent Triton X100.

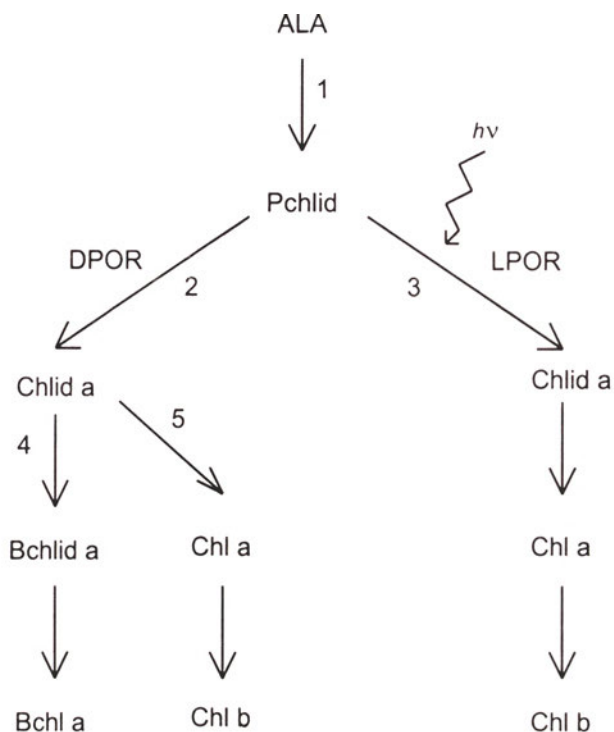
I. Wstęp

Protochlorofilid (Pchlid) jest związkiem pośrednim na szlaku syntezy ważnych barwników fotosyntetycznych i fotoreceptorów roślinnych: chlorofili i bakteriochlorofili [1-3]. Występuje on powszechnie we wszystkich organizmach fotosyntezujących. Barwnik ten jest zlokalizowany w błonach tylakoidowych na terenie cytoplazmy w komórkach prymitywnych organizmów prokariotycznych oraz w plastydach organizmów eukariotycznych. Znajduje się

¹Dr, Zakład Biofizyki, Pracownia Fotobiologii, barbara@bf.uni.wroc.pl, tel. (71) 375 6247, ²mgr, Zakład Biotechnologii Białek, agnes@bf.uni.wroc.pl, tel. (71) 375 2936, ³dr hab. Zakład Biotechnologii Białek, lulu@bf.uni.wroc.pl, tel. (71) 376 2611, ⁴prof. dr hab. (emeryt), Zakład Biofizyki, hendrich@bf.uni.wroc.pl, tel. (71) 360 8743, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej U. Wr., ^{1, 4}ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław; ^{2, 3}ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

tam w formie wolnej lub w kompleksach z białkami. Jego synteza nie wymaga światła.

Enzymatyczna redukcja protochlorofilidu do chlorofilidu może przebiegać dwiema różnymi drogami: zależną i niezależną od światła (Ryc. 1). Każda



Rys.1. Drogi syntezy barwników chlorofilowych: ALA — kwas δ -aminolewulinowy, DPOR — niezależna od światła reduktaza Pchlidu, LPOR — zależna od światła reduktaza Pchlidu: bakterie fotosyntezujące: 1,2,4; sinice, glony, mszaki, paprotniki, rośliny nagozależkowe: 1,2,5 oraz rośliny okrytozależkowe: 1,3.

z tych dróg wymaga aktywności odrębnych oksydo-reduktaz protochlorofilidu oraz puli NADPH. Niezależna od światła redukcja protochlorofilidu jest jedyną drogą prowadzącą do syntezy bakteriochlorofilu u beztlenowych bakterii fotosyntezujących. Sinice, glony, rośliny nagozależkowe i inne rośliny niższe mają możliwość zarówno niezależnej („ciemnej”), jak i zależnej od światła („jasnej”) redukcji protochlorofilidu do chlorofilidu. Rośliny kwiatowe mogą przekształcać protochlorofilid i kończyć syntezę chlorofilu tylko na świetle. Na tym szlaku biosyntezy chlorofilu protochlorofilid pełni szczególną rolę, ponieważ jego redukcja jest pierwszą reakcją zależną od światła i regulowaną przez światło. Fotoredukcja protochlorofilidu umożliwia uruchomienie ostatnich etapów syntezy chlorofilu a i b. Równoległe z syntezą barwników następuje indukowana światłem synteza białek niezbędnych do tworzenia fotosystemów I i II, anten oraz przemiany proplastydów w dojrzałe, w pełni funkcjonalne chloroplasty [4].

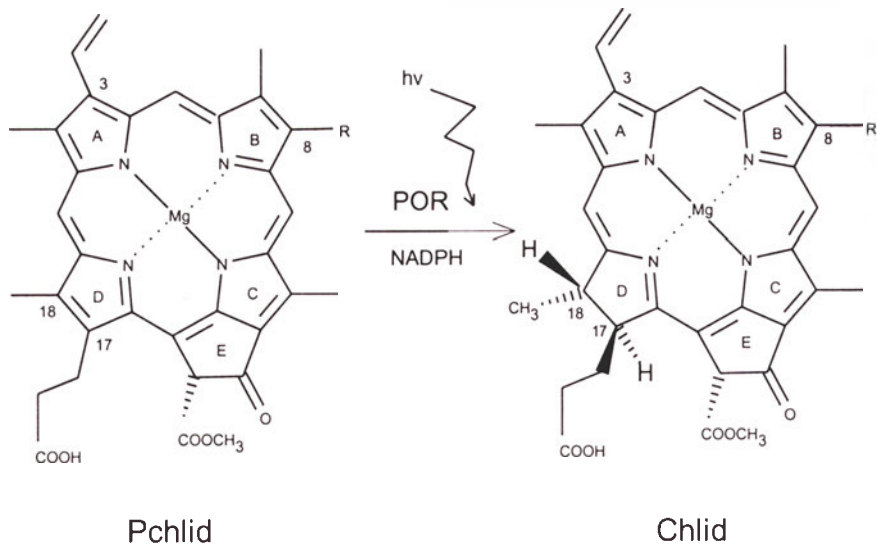
Pomimo wieloletnich badań molekularne podstawy syntezy chlorofilu nie są jeszcze w pełni poznane. Postępy badań prezentowano w kolejnych pracach przeglądowych [1-3, 5]. Szczególne zainteresowanie budzi jeden z ostatnich etapów: fotoredukcja protochlorofilidu do chlorofilidu jako kluczowe miejsce fotorregulacji aparatu fotosyntetycznego, a także bezpośredniej zamiany energii kwantu na energię aktywacji fotoenzymu [4, 6-11]. Badania nad niezależną od światła redukcją kompleksów protochlorofilid-białko i syntezą chlorofilu u roślin niższych są znacznie mniej zaawansowane [12, 13].

II. Protochlorofilid

II-1. Protochlorofilid *in vitro*: własności fizykochemiczne i badania modelowe

Protochlorofilid jest związkiem hydrofobowym. Różni się on od chlorofilu obecnością podwójnego wiązania pomiędzy węglami C_{17} i C_{18} pirolowego pierścienia D (IV) oraz brakiem łańcucha fitolowego (Ryc. 2). Roztwory monomerów protochlorofilidu w eterze dietylowym wykazują maksima absorpcji w regionie niebieskim przy $\sim 430\text{nm}$ i w regionie czerwonym przy $\sim 622\text{nm}$ oraz emisji w regionie czerwonym przy $\sim 630\text{nm}$. Położenie oraz intensywność pasm zmienia się w zależności od rodzaju rozpuszczalnika i stopnia agregacji chromoforu. Prowadzono badania modelowe nad własnościami spektroskopowymi protochlorofilidu i protochlorofilu: w roztworach rozpuszczalników nieorganicznych, immobilizowanego w postaci warstwy na powierzchni szkła oraz w roztworach wodnych w micelach z detergentami [14, 15]. Przykładowo pomiary widm absorpcyjnych warstw protochlorofilidu na szkle wykazały obecność pasm 628-630, 635, 644, 665 i 676 nm [16]. Odpowiada to położeniu pasm obserwowanych w widmach etiolowanych liści oraz w widmach izolowanych etiolastów i ich fragmentów.

Puła protochlorofilidu jest heterogenna. Z materiału roślinnego wyodrębniono pochodne monowinylowe i diwinylowe protochlorofilidu i protochlorofilu. MV-Pchlid i DV-Pchlid różnią się grupą boczną przy węglu 8 porfiryny pirolu B (Ryc. 2). Ta zmiana struktury chemicznej, podobnie jak fitylizacja pierścienia porfirynowego, nie powoduje różnic spektralnych pomiędzy pochodnymi MV- i DV- w regionie czerwonym widm emisyjnych. Natomiast stwierdzono różnice w położeniu pasm w regionie Soreta widm absorpcyjnych. W eterze etylowym znajdują się one odpowiednio przy 438 nm dla DV-protochlorofilidu i 432nm dla MV-protochloro-



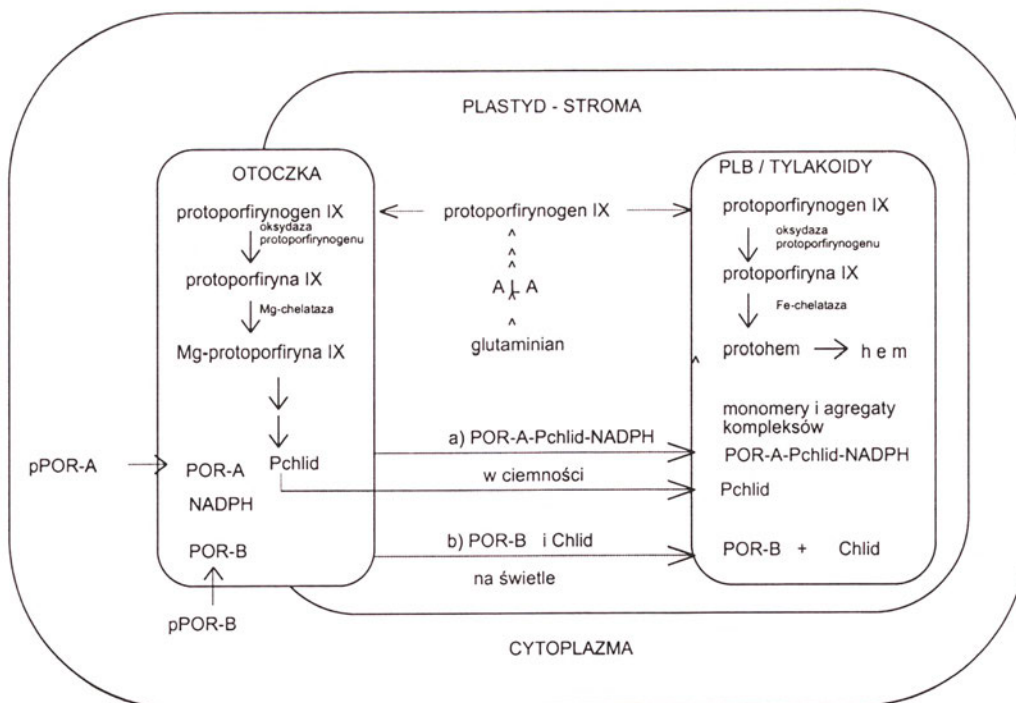
Rys. 2. Redukcja protochlorofilidu do chlorofilidu, katalizowana przez POR

filidu. Agregacja barwników powoduje przesunięcie pasm absorpcji i emisji w kierunku długofalowym w regionie czerwonym oraz rozdzielenie pasm Soreta [17]. Pochodne MV- i DV-porfiryn można rozdzielić przy pomocy HPLC [18]. *In vitro* otrzymano także pochodne protochlorofilidu, w których zamiast magnezu podstawiono inne metale, np miedź i cynk [19, 20.]. Barwniki porfiryne są związkami labilnymi: w obecności tlenu i silnego światła łatwo ulegają fotooksydacji. W środowisku kwaśnym tracą magnez, natomiast w środowisku silnie zasadowym następuje

zniszczenie V-tego izocyklicznego pierścienia (E) [21].

II-2. Protochlorofilid *in vivo*: w roślinach, izolowanych plastydach i ich fragmentach

W tlenowych organizmach fotosyntezujących protochlorofilid powstaje z glutaminianu w wyniku wieloetapowego procesu enzymatycznego, który może przebiegać zarówno na świetle, jak i w ciemności. Pierwszych osiem reakcji ma miejsce w cytopla-



Rys. 3. Lokalizacja etapów syntezy i prawdopodobne drogi transportu Pchlidu, Chlidu oraz (p)POR-A i (p)POR-B i ich kompleksów: a) w etioplastach — w ciemności b) w chloroplastach — na świetle, [wg 98, zmienione]

zmie i prowadzi do syntezy protoporfirynogenu IX, który jest następnie transportowany do plastydów (Ryc. 3) i tam jest utleniany do protoporfiryny IX. Etapy te są wspólne dla syntezy barwników chlorofilowych i hemu. Następnie ich drogi rozdzielają się. Kolejnych sześć etapów tzw. odgałęzienia -Mg prowadzi do powstania chlorofili [1, 5]. W roślinach okrytozalążkowych przebiegają one w otoczce plastydowej, niezależnie od światła — do momentu utworzenia protochlorofilidu [22, 23]. W ciemności synteza chlorofilu zostaje zatrzymana na tym etapie. W roślinach etiolowanych z proplastydów rozwijają się etioplasty, których głównymi elementami strukturalnymi są: parakrystaliczne ciało prolamelarne (PLB) i odchodzące od niego nieliczne błony zwane protylakoidami (PT) (Ryc. 4). W etioplastach stwier-



Rys. 4. Struktura etioplastu z pierwszego liścia 15-dniowej etiolowanej siewki fasoli: PLB — ciało prolamellarne, PT — protylakoidy, O — dwuwarstwowa otoczka etioplastu (dzięki uprzejmości dr F.Francka z Laboratorium Fotobiologii Uniwersytetu w Liege, Belgia), powiększenie 60 000 x.

dzono obecność protochlorofilidu zarówno w PLB, jak i w PT. W warunkach fizjologicznych, na świetle, protochlorofilid nie nagromadza się w większych ilościach, ponieważ natychmiast ulega redukcji do chlorofilidu.

Na szlaku syntezy chlorofili w roślinach tworzą się pochodne mono- i diwinyłowe poszczególnych związków pośrednich. Na podstawie pomiarów równowagowego nagromadzenia się MV-protochlorofilidu i DV-protochlorofilidu w roślinach, R e b e i z i

wsp. zaproponowali ujednoczony, rozgałęziony schemat możliwych szlaków biosyntezy chlorofili a i b [24-26].

III. Oksydoreduktaza NADPH-protochlorofilid

III-1. LPOR *in vivo*: biosynteza, transport i lokalizacja

Fotoredukcja protochlorofilidu jest katalizowana przez stereospecyficzną oksydoreduktazę: NADPH-Pchlid (EC 1.3.1.33) [27, 28]. LPOR jest kodowana przez geny jądrowe i syntezowana w cytoplazmie w postaci proenzymu pLPOR (41-44 kD, w zależności od gatunku rośliny). Jego łańcuch jest dłuższy od 44 do 66 aminokwasów od formy dojrzalej. Następnie pLPOR jest transportowana do otoczki plastydów. Dojrzała LPOR stanowi około 50% białek PLB etioplastów [29]. We wczesnych etapach zielenienia obecność białka POR wykazywano głównie w tylakoidach gran. W miarę zielenienia jego względna ilość w granach obniżała się, natomiast zwiększała się w otoczce plastydów. W dojrzałych chloroplastach stwierdzono obecność LPOR w zewnętrznej błonie otoczki plastydowej. Jedynie nieznaczne ilości fotoenzymu obserwowano w tylakoidach gran [30, 31].

Pula światłozależnej oksydoreduktazy nie jest jednorodna. Przez wiele lat uważano, że istnieje tylko jeden fotoenzym POR (obecnie LPOR-A). Następnie wykryto drugą izoformę fotoenzymu — LPOR-B. Białka LPOR-A i LPOR-B, kodowane są przez dwa różne geny jądrowe [32, 33]. LPOR-A nagromadza się w dużych ilościach w PLB etioplastów. W czasie naświetlania roślin etiolowanych jej aktywność i stężenie drastycznie maleje. W roślinach zielonych, hodowanych w cyklu światło-ciemność, można wykryć śladowe ilości LPOR-A pod koniec okresu ciemnego [34]. Izoforma LPOR-B jest obecna zarówno w roślinach etiolowanych, jak i zielonych. Dokładna lokalizacja LPOR-B w etioplastach nie jest znana. Podobnie jak LPOR-A, LPOR-B jest enzymem stereospecyficznym względem β -NADPH, protochlorofilidu i wymaga wzbudzenia światłem. Natomiast jego stężenie utrzymuje się na stałym poziomie w czasie zielenienia roślin.

Istotne różnice między pLPOR-A i pLPOR-B występują w sekwencji peptydu sygnałnego. Znajduje to odbicie w drogach transportu obu białek do wnętrza plastydów. Wykazano, że import pLPOR-A do plastydów jęczmienia odbywa się tylko w obecności protochlorofilidu [35]. Światło obniża poziom tego

związku w otoczce plastydów drogą natychmiastowej fotoredukcji do chlorofilidu lub w wyniku procesów fotooksydacji i degradacji. W rezultacie zanika zdolność plastydów do importu pLPOR-A. Peptyd sygnałny pPOR-A w kompleksie z chlorofilidem jest prawdopodobnie maskowany, a więc niezdolny do fizycznej interakcji z receptorem znajdującym się na zewnętrznej powierzchni otoczki plastydu [36]

Zależności takiej nie wykazano w przypadku pLPOR-B. Ta izoforma fotoenzymu jest importowana do plastydów w sposób ciągły, niezależnie od obecności lub braku protochlorofilidu [37]. Autorzy postulują, że oprócz ogólnie akceptowanego sposobu importu białek do plastydów, istnieje drugie, specyficzne miejsce translokacji POR-A, zależne od obecności protochlorofilidu [38]. Niemniej jednak rola protochlorofilidu w transporcie POR do plastydów nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Wyniki Dahl i wsp. [39] nie potwierdzają roli protochlorofilidu i różnic w imporcie POR-A i POR-B jęczmienia do chloroplastów. Autorzy nie stwierdzili także proteolitycznej degradacji POR-A. Badania importu LPOR grochu (który ma tylko jeden gen i jedną formę fotoenzymu) wykazały, że nie zależy on od substratu [40].

Ostatnio odkryto w rzodkiewniku, obok genów *por-A* i *por-B*, obecność genu trzeciej izoformy: *por-C*, którego ekspresja jest indukowana światłem. Stężenie i aktywność LPOR-C wzrasta w czasie rozwoju i osiąga maksimum w dojrzałych chloroplastach [41]. Natomiast w siewkach ogórka zidentyfikowano pojedynczy gen *por*, którego ekspresja także jest indukowana przez światło [42, 43].

III-2. LPOR *in vitro*: otrzymywanie i własności katalityczne

LPOR otrzymywano z etiolowanych siewek jęczmienia, pszenicy, liści grochu, fasoli, rzodkiewnika i wielu innych roślin [8]. Podejmowano szereg prób izolowania LPOR w postaci oczyszczonego białka lub w formie aktywnego kompleksu z NADPH i Pchlidem metodami klasycznej biochemii [44-49] oraz biologii molekularnej. Między innymi opracowano metody otrzymywania POR drogą syntezy *in vitro*: w układzie z ekstraktem z zarodków pszenicy [35] oraz drogą ekspresji w *E. coli* genu kodującego LPOR: grochu [50], *Synechocystis* [51, 52].

LPOR jest stereospecyficzna względem β -NADPH i niezestyfikowanych protochlorofilidów o naturalnej konfiguracji $13^2(R)$ [53]. *In vitro* jest także aktywna w obecności pochodnych Zn, Co i Cu protochlorofilidu [54] oraz cynkowej pochodnej pro-

tofeoforbidu b [20]. Aktywność LPOR zależy także od potencjału oksydacyjno-redukcyjnego mikrośrodowiska reakcji, osiągając maksimum przy -400 mV [55, 56]. W plastydach zależy on przede wszystkim od proporcji stężeń NADPH i $NADP^+$. Niski potencjał oksydacyjno-redukcyjny, który panuje w etiolatach w warunkach znacznego nadmiaru NADPH w stosunku do $NADP^+$, stabilizuje aktywność oksydo-reduktazy protochlorofilidu oraz jej kompleksy [57].

III-3. Struktura LPOR

Cząsteczki LPOR są zbudowane z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych o masach od 33 do 38 kDa [8]. Na przykład w skład łańcucha LPOR owsa wchodzi 346 aminokwasów, w tym około 30% reszt hydrofobowych i 16% zasadowych (głównie Arg i Lys, co tłumaczy jego amfifilowe własności oraz wysoką wartość $pI \approx 8.5$) [46].

Drogą dedukcji na podstawie sekwencji cDNA ustalono struktury I-rzędowe LPOR z szeregu gatunków roślin jedno- i dwuliściennych [58]. Białko pLPOR z jęczmienia obejmuje 388 reszt, w tym 74 aminokwasy peptydu sygnałnego przy N-końcu [59]. Podobne dane otrzymano w wyniku klonowania i sekwencjonowania LPOR z owsa [60], rzodkiewnika [61] i pszenicy [62]. Wykazano bardzo duże podobieństwo pomiędzy pLPOR roślin jednoliściennych. Wynosi ono 92% na poziomie składu nukleotydów oraz 98% na poziomie składu aminokwasowego. Wśród zbadanych klonów dla roślin okrytozalążkowych: rzodkiewnika [61], grochu [63], jęczmienia [33], a także roślin nagozalążkowych: sosny *Pinus strobus* i *Pinus taeda* [64] — wysoka homologia dotyczy głównie białek dojrzałych. Istotne różnice występują w sekwencji peptydu sygnałnego pLPOR [62]. Homologia pomiędzy LPOR-A i LPOR-B z siewek jęczmienia, wynosi ok. 75% w obrębie całego polipeptydu (>80% w rejonie białka dojrzałego oraz ok. 50% w części sygnałnej) [33]. Zgodność pomiędzy izoformami z rzodkiewnika sięga 88% [32].

Wstępne obliczenia metodami Garniera, Chou i Fasmana wskazują na obecność w LPOR conajmniej 6 β struktur na przemian z 4 α -helisami (dane nie publikowane I. M r ó z , cytowane w [7]). Na podstawie analizy widm CD LPOR-A ustalono, że α -helisy stanowią 33%, struktury β 19%, zgięcia 20% oraz struktury nieuporządkowane 28%. Potwierdzają to symulacje komputerowe B i r v e i wsp. [65]. Komputerowa analiza porównawcza sekwencji LPOR-A i LPOR-B z jęczmienia [J. L e l u k , dane nie publikowane], programem SEMIHOM [66] oraz metodą GOR [67] z programem PREDICT7 [68] wskazuje

także na bardzo wysoki stopień homologii między izoformami A i B (73% homologii absolutnej). Świadczy także o tym, że zarówno charakter hydropatyczny poszczególnych fragmentów, jak i struktura trzeciorzędowa, są dla obu białek bardzo zbliżone. Znaczna ilość klasterów hydrofobowych sugeruje wysoki udział fragmentów helikalnych w strukturze drugorzędowej. Dla przykładu według algorytmu GOR udział poszczególnych struktur w LPOR A wynosi: α -helisy — 47.8%, β -struktury — 23.7%, zgięcia — 10.5%. W LPOR B: α -helisy stanowią 48.3%, β -struktury — 24.3%, zgięcia — 10.8%. Mniej niż 1/4 łańcucha białkowego posiada konformację nieregularną (20-22%). Dotąd niewiele wiadomo na temat LPOR-C. Dedukowana sekwencja aminokwasowa LPOR-C wykazuje 75% homologię z wcześniej znanymi izoformami LPOR-A i LPOR-B z rzodkiewnika [41].

Porównanie sekwencji aminokwasowych LPOR-A i LPOR-B jęczmienia ze znanymi sekwencjami innych białek (z zastosowaniem programów MAXHOM [69] oraz DSC [70, 71]) wykazały dużą homologię także z innymi oksydoreduktazami roślinnymi, oraz z reduktazą białka przenoszącego grupy acylowe [L e l u k, dane nie publikowane]. Izoforny LPOR posiadają również duże podobieństwo składu aminokwasowego do wielu krótkołańcuchowych dehydrogenaz [72]. Szczególnie wysoki stopień homologii dotyczy N-końca polipeptydów. Stwierdzono także duży stopień podobieństwa cDNA LPOR w tym rejonie do cDNA roślinnej noduliny [73]. W pobliżu N-końca cząsteczki LPOR znajduje się sekwencja 33 aminokwasów, charakterystyczna dla tzw. motywu Rossmanna, który występuje w wielu dehydrogenazach. W żadnej z cytowanych prac nie stwierdzono w LPOR obecności α -helisy wystarczająco długiej do przejścia w poprzek błony. Należy przypuszczać, że LPOR jest raczej białkiem peryferycznym [74, 75].

IV. Kompleksy protochlorofilidu i ich fotoreaktywność

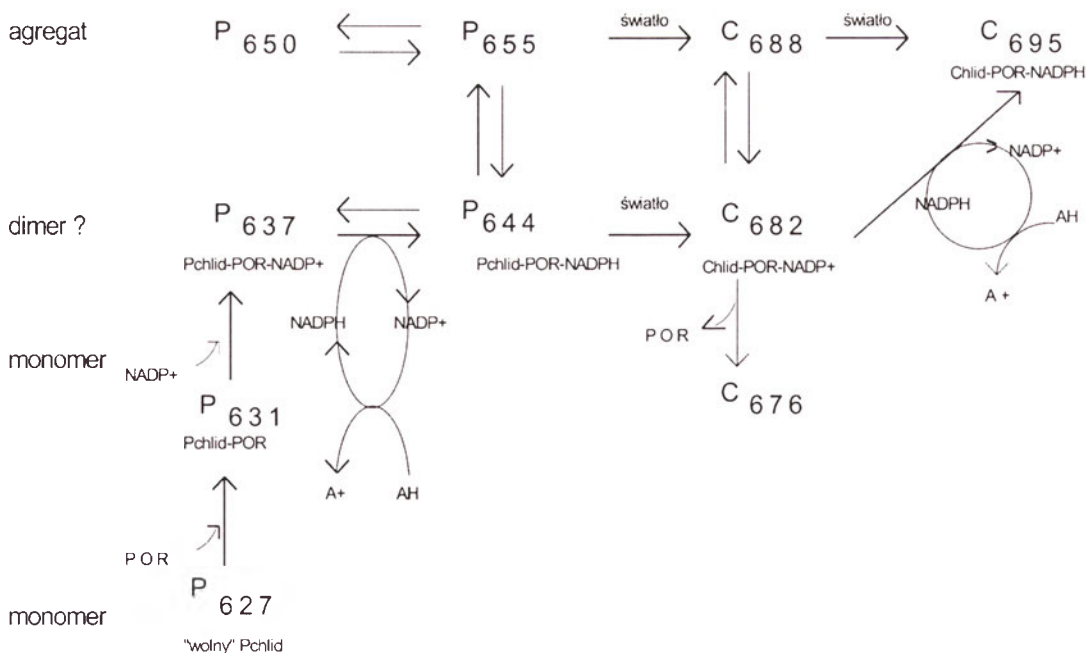
IV-1. Formy spektralne protochlorofilidu a jego stan fizyczny

Charakterystyczne widma absorpcyjne i emisyjne protochlorofilidu, a szczególnie położenie i intensywność długofalowego maksimum emisji, istotnie zależą od własności fizykochemicznych najbliższego otoczenia chromoforu. Analiza niskotemperaturowych widm emisji roślin etiolowanych wykazuje obecność czterech zasadniczych form spektralnych

protochlorofilidu przy: 633, 645, 657, 670 nm. Pasma odpowiadające ich podpoziomom oscylacyjnym (Emv) są zlokalizowane odpowiednio przy 693, 710, 726, i 740 nm [76]. Dwie z nich: P₆₃₃ (forma nieaktywna) i P₆₅₇ (główna forma fotoaktywna) są widoczne bezpośrednio w widmach próbek mierzonych w ciekłym azocie. Pomiar widm emisji (Em) i wzbudzenia (Ex) fluorescencji etiolowanych liści fasoli w temperaturze pokojowej oraz ich rozkład na składowe gaussowskie — także potwierdzają istnienie czterech form spektralnych z maksimami emisji przy 631, 644, 655 i 667 nm. Dodatkowo wykazano obecność dwóch wąskich pasm przy 637 i 650 nm. W zależności od pasma wzbudzenia w widmie dominują: Ex440-Em640, Ex 460-Em652 [77].

Względny udział poszczególnych pasm w sumarycznym widmie emisyjnym zależy od gatunku, wieku, stanu fizjologicznego i części rośliny. Zmienia się on także na skutek przekazywania energii między barwnikami. Krótkofalowe formy protochlorofilidu dominują w widmach emisyjnych epikotyli, hypokotyli i łodyg wielu gatunków roślin etiolowanych [78, 79]. W niskotemperaturowych widmach liści etiolowanych przeważa P₆₅₇. W warunkach fizjologicznych pozornie brak formy P₆₄₅. W nieuszkodzonych etioplastach przekazuje ona energię do formy P₆₅₇. Ustalono następujące korelacje: Ex436-Em633-Emv690, Ex443-Em645-Emv711, Ex451-Em657-Emv727, Ex463-Em671-Emv740 [80].

Techniką FLN udowodniono, że pasmo 628 nm jest emitowane przez pulę monomerów protochlorofilidu, pełniących funkcję źródła substratu. Natomiast pasmo 634-636 nm to monomer protochlorofilidu związanego z enzymem [81]. Proponowane przyporządkowania są zgodne z wynikami badań modelowych. Własności P₆₃₃ są zbliżone do własności spektralnych roztworów monomerów protochlorofilidu i protochlorofilu w rozpuszczalnikach organicznych. Sugeruje to, że P₆₃₃ jest monomerem protochlorofilidu „wolnego” lub na nośniku. Własności P₆₄₅ i P₆₅₇ odpowiadają agregatom protochlorofilidu w rozpuszczalnikach organicznych lub immobilizowanych w postaci warstw na szkle. W etioplastach agregaty protochlorofilidu są związane z białkami (*in vivo* głównie z POR), tworząc suprakompleksy, które wchodzi w skład ciał prolamellarnych (PB) i protylkoidów (PT) [82]. Różnice pomiędzy P₆₃₇, P₆₄₅, P₆₅₀ i P₆₅₇ mogą polegać między innymi na stopniu agregacji lub/i zróżnicowanym oddziaływaniu z NADPH i NADP⁺ [6]. Kompleks potrójny może występować w plastydach jako monomer, dimer lub multimer (Ryc. 5) [34, 77].



Rys. 5. Przemiany form spektralnych kompleksów Pchlidu i Chlidu związane z procesami fotoredukcji w temperaturze pokojowej [wg 77, zmienił].

IV-2. Mechanizm fotoredukcji protochlorofilidu

Dotychczasowe badania dostarczyły wielu informacji o przemianach spektralnych związanych z przekształceniami chromoforów: protochlorofilid → chlorofilid → chlorofil. Znacznie mniej wiadomo o zmianach w obrębie białka LPOR, które zachodzą w czasie fotoredukcji, ponieważ jego struktura wyżej-rzędowa nie jest jeszcze znana.

Fototransformacja jest związana z przeniesieniem 2 elektronów i wodorów na cząsteczkę protochlorofilidu i redukcją podwójnego wiązania w pierścieniu D. Energia świetlna jest absorbowana przez skompleksowany protochlorofilid [82]. Istnieją kontrowersje, czy fotoredukcja protochlorofilidu jest pojedynczą, ultraszybką fotoreakcją [83, 84], czy też obejmuje dwa sukcesywne [85] lub równoległe [86] procesy. Badania korelacji pomiędzy wydajnością fotoredukcji a intensywnością światła wzbudającego, wskazują na reakcje jednofotonową [86]. Generacja chlorofilidu zachodzi bardzo szybko ($t_{1/2} = 6.9 \mu s$) [83].

Po absorpcji kwantu światła w czasie $10^{-15} s$ powstaje szereg wzajemnie przekształcających się metastabilnych produktów pośrednich: X₁₆₄₀ (2ns), X₂₆₄₀ (250ns), oraz X₃₆₉₀ (1μs), który ulega relaksacji w ciągu 10 ms, dając produkt końcowy — chlorofilid [85]. Ignatov i wsp. [86] doszli do wniosku, że X₆₉₀ jest mieszaniną dwóch intermediatów R₆₈₈ i R₆₉₇ i zaproponowali schemat, w którym dwa równoległe procesy fotonowe prowadzą do powstania rodników protochlorofilidu PH₁₇ i PH₁₈, które w reak-

cji dysmutacji dają cząsteczki chlorofilidu. Według Griffithsa i wsp. [87] absorpcja światła przez barwnik powoduje powstanie centrum elektrofilowego przy węglu C₁₇ protochlorofilidu, dzięki rozszczepieniu jednego wiązania między węglami C₁₇ i C₁₈ oraz przeniesieniu elektronu od C₁₇ do C₁₈. Pojawienie się dodatniego ładunku na węglu C₁₇ pozwala na atak elektrofilowy H⁺, pochodzącego z NADPH. W ten sposób powstaje anion [Pchlid-H]⁻ (identyfikowany z X₆₉₀). Jest on następnie neutralizowany przez przyłączenie protonu do C₁₈. Według tego schematu w szeregu indukowanych światłem reakcji nie powstają rodniki. Brak sygnału EPR potwierdzono w późniejszych badaniach modelowych fotoredukcji *in vitro* z MBP-POR [51]. Układ, zawierający tylko substraty reakcji wykazywał bardzo wysoką aktywność fotoredukcji, pomimo braku flawiny. Świadczy to, że POR nie jest flawoenzymem, co sugerowano poprzednio [86].

Struktura wyżej-rzędowa cząsteczki LPOR nie jest znana. Bardzo ogólny model miejsca aktywnego ustalono na podstawie badań NMR [88]. *In vivo* enzym przeprowadza reakcję tylko z izomerem β-NADPH, a powstały produkt jest zawsze izomerem trans. Pierścień protochlorofilidu jest tak zorientowany w kieszeni enzymu, że H⁺, pochodzący z NADPH, jest dostarczany do C₁₇ z jednej strony, natomiast drugi wodór, pochodzący z wody lub reszty karboksylowej z centrum aktywnego, przyłącza się do C₁₈ z jego przeciwnej strony. Towarzyszące zmiany spektralne protochlorofilidu i chlorofilidu, są związane z relaksacją cząsteczki enzymu, uwalnia-

niem się produktu reakcji i jego dalszą, stopniową fitylizacją [77, 89.]

V. Rola światła, protochlorofilidu i LPOR i NADPH w regulacji syntezy chlorofilidu

Rozwój i utrzymanie aparatu fotosyntetycznego zdolnego do sprawnej adaptacji do zmieniającego się ciągle natężenia i składu spektralnego światła, wymaga stałej dostawy optymalnych ilości cząsteczek chlorofili a i b do błon tylakoidowych. Regulacja tego wieloetapowego i złożonego procesu odbywa się na różnych poziomach: zarówno na szlaku syntezy chromoforów, jak i białek z nimi związanych.

Redukcja protochlorofilidu do chlorofilidu jest obok powstawania kwasu δ -aminolewulinowego i Mg^{2+} protoporfiryny IX, jednym z kluczowych etapów regulacji syntezy chlorofili i rozwoju aparatu fotosyntetycznego. Szybkość i wydajność tego procesu zależy między innymi od aktualnego poziomu kosubstratów: protochlorofilidu i NADPH oraz poziomu aktywnej LPOR. W roślinach rosnących w cyklu dobowym światło/ciemność, protochlorofilid nagromadza się w nocy w otoczce plastydowej [22, 23]. W ciągu dnia jest on syntezowany tylko w niewielkim nadmiarze w stosunku do aktualnego poziomu LPOR. Na świetle wolny protochlorofilid ulega szybkiej fotooksydacji, natomiast związany z LPOR — natychmiastowej fotoredukcji. Dlatego też pasma protochlorofilidu trudno wykazać w widmach emisyjnych roślin hodowanych na świetle, jakkolwiek zdolność jego syntezy jest w takich roślinach utrzymana [90]. Barwnik związany z enzymem nie jest podatny na fotooksydację i nie może jednocześnie indukować destrukcyjnych procesów fotodynamicznych [91]. Światło, wpływając na aktualny poziom protochlorofilidu, reguluje aktywny transport pLPOR-A przez otoczkę plastydową [35, 36, 38].

W naświetlanych plastydach następuje, w miarę potrzeby, szybka regeneracja aktywnego kompleksu Pchlid-LPOR-NADPH. Niski potencjał redoks mikrośrodowiska reakcji oraz wysoki poziom NADPH sprzyjają powstawaniu i stabilizacji głównej formy fotoaktywnej P_{657} . Podwyższenie potencjału redoks w obecności nadmiaru $NADP^+$ faworyzuje tworzenie nieaktywnych form P_{638} i P_{650} , które są intermediatami w procesie regeneracji [55, 92].

Światło kontroluje syntezę chlorofili także poprzez wpływ na ekspresję genów (na poziomie transkrypcji i translacji) szeregu enzymów związanych z syntezą ALA. Na przykład: indukuje ekspresję mRNA deaminazy porfobilinogenu, Mg^{2+} -chelatazy, czy też genów *por*. W roślinach etiolowanych synta-

za kwasu δ -aminolewulinowego jest regulowana przez protochlorofilid na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [93].

Podczas naświetlania etiolowanych siewek, w rozwijających się plastydach obserwuje się stopniowe zanikanie struktury PLB, zmniejszanie aktywności i stężenia LPOR-A, podczas gdy stężenie LPOR-B pozostaje stałe, a LPOR-C wzrasta. Obniżenie ilości LPOR-A odbywa się dzięki kilku mechanizmom. Oprócz różnic w imporcie pLPOR-A i pLPOR-B obserwuje się pod wpływem światła gwałtowny spadek stężenia m-RNA, który koduje LPOR-A [33]. Badania przebiegu transkrypcji *in vitro* wykazały, że negatywny wpływ światła na stężenie m-RNA LPOR-A wiąże się ze zmniejszeniem transkrypcji genu *por-A* indukowanej przez fitochrom (P_{fr}) [94]. Dodatkowo ekspresja LPOR-A jest regulowana na poziomie stabilności m-RNA [34]. W regionie 3 transkryptu *por-A*, który nie ulega translacji, znaleziono element DST, stały dla innych niestabilnych transkryptów genów roślinnych. Elementu tego brak w m-RNA kodującym POR-B [95].

Światło indukuje także syntezę proteazy, która specyficznie degraduje kompleksy LPOR-A-chlorofilid [36, 96]. Fotoenzym pozbawiony substratów i produktów jest mniej wrażliwy na działanie proteazy niż związany z nimi. Sugeruje się, że proteza specyficzna dla LPOR-A odgrywa ważną rolę fizjologiczną w czasie transformacji etioplastów do chloroplastów i skorelowanej z tym dezintegracji PLB. Jest prawdopodobne, że proteolityczne fragmenty LPOR-A mogą służyć jako przenośniki chlorofilidu do rozwijających się tylakoidów, lub nawet regulować proces formowania fotosyntetycznie aktywnych kompleksów w błonach tylakoidowych [96]. Wykazano, że w warunkach *in vitro* kompleksy LPOR-A i LPOR-B są w równym stopniu wrażliwe na degradację proteolityczną [36]. Oprócz wielostronnego wpływu światła na syntezę chlorofilu wykazano także działanie endogenego zegara biologicznego o cyklu 20-24 godzinny [97].

VI. Podsumowanie

Aktywność fotosyntetyczna chlorofilu warunkuje życie na Ziemi. Jest to wystarczającym powodem do intensywnego badania kluczowego etapu jego biosyntezy. Zrozumienie mechanizmu fotoredukcji protochlorofilidu do chlorofilidu i jej wpływu na różne etapy rozwoju aparatu fotosyntetycznego roślin wyższych jest ważne zarówno z punktu widzenia naukowego, jak i praktycznego. Izoforny LPOR stanowią (obok fotolizy DNA) jedyne, odkryte dotąd, fotoen-

zymy, które wykorzystują bezpośrednio światło jako źródło energii aktywacji. Niestety, proces ten jest aktualnie znany tylko w ogólnych zarysach. Wiadomo, że fotoredukcja protochlorofilidu jest stereospecyficznie katalizowana przez izoenzymy LPOR. Znany jedynie ich sekwencje oraz udział poszczególnych elementów struktury drugorzędowej. Dotąd nie ustalono przestrzennej struktury LPOR, budowy centrum aktywnego, ani tym bardziej dokładnej budowy potrójnego kompleksu Pchlid-LPOR-NADPH. Fizjologiczna rola izoenzymów nie jest w pełni udowodniona. Dane dotyczące kinetyki fotoredukcji są dobrą podstawą dalszych badań nad molekularnymi mechanizmami tego procesu. Jednakże kluczowe znaczenie dla rozwiązania wszystkich wymienionych zagadnień ma poznanie pełnej struktury fotoenzymu i potrójnego kompleksu, co stanowi olbrzymie pole dalszych badań.

Artykuł otrzymano 28 lutego 2002

Zaakceptowano do druku 16 grudnia 2002

Piśmiennictwo

1. von Wettstein D, Gough S, Kannangara CG (1995) *Plant Cell* **7**: 1039-1057
2. Rüdiger W (1997) *Phytochemistry* **46**: 1151-1167
3. Beale S (1999) *Photosynth Res* **60**: 43-73
4. Sundqvist C, Dahlin C (1997) *Physiol Plant* **100**: 748-759
5. Senge MO (1993) *Photochem and Photobiol* **57**: 189-206
6. Griffiths WT (1991) W: Scheer H (red) *Chlorophylls* CRC Press, Boca Raton, FL, str 433-449
7. Hendrich W, Bereza B (1993) *Photosynthetica* **28**: 1-16
8. Schulz R, Senger H (1993) W: Sundqvist C, Ryberg M (red) *Pigment-Protein Complexes in Plastids: Synthesis and Assembly*, Acad Press Inc, N Y, str.179-218
9. Fujita Y (1996) *Plant and Cell Physiol* **37**: 411-421
10. Lebedev N, Timko M (1998) *Photosynth Res* **58**: 5-23
11. Schoefs B (1999) *Photosynthetica* **34**: 481-496
12. Armstrong GA (1998) *J Photoch Photobiol B-Biol* **43**: 87-100
13. Fujita Y, Bauer CE (2000) *J Biol Chem* **275**: 23583-23588
14. Krasnovsky AA, Bystrova MI; Safronova IA (1984) W: Sironval C, Brouers M (red), *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 331-339
15. Boddi B, Lang F (1984) W: Sironval C, Brouers M (red) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 341-349
16. Boddi B, Shioi Y (1990) *Biochim Biophys Acta* **1015**: 116-120
17. Parham R, Rebeiz CA (1992) *Biochemistry* **31**: 8460-8464
18. Shioi Y, Takamiya K (1992) *Plant Physiol* **100**: 1291-1295
19. Helfrich M, Rudiger W (1992) *Z Naturforsch* **47c**: 231-238
20. Schoch S, Helfrich M, Wiktorsson B, Sundqvist C, Rüdiger W, Ryberg M (1995) *Eur J Biochem* **229**: 291-298
21. Shioi Y (1991) W: Scheer H (red) *Chlorophylls* CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, str 59-87
22. Pineau B, Dubertret G, Joyard J, Douce R (1986) *J Biol Chem* **261**: 9210-9215
23. Pineau B, Garard-Hirne C, Douce R, Joyard J (1993) *Plant Physiol* **102**: 821-828
24. Ioannides IM, Fasuola DA, Robertson KR, Rebeiz CA (1994) *Biochem Syst Ecol* **22**: 211-220
25. AbdelMaged HA, El Sahhar KF, Robertson KR, Parham R, Rebeiz C A (1997) *Photochem Photobiol* **66**: 89-96
26. Rebeiz CA, Ioannides IM, Kolossov V, Kopetz KJ (1999) *Photosynthetica* **36**: 117-128
27. Griffiths WT (1978) *Biochem J* **174**: 681-692
28. Apel K, Santel HJ, Redlinger TE, Falk H (1980) *Eur J Biochem* **111**: 251-258
29. Ryberg M, Sundqvist C (1982) *Physiol Plant* **56**: 125-132
30. Barthelemy X, Bouvier G, Radunz A, Docquier S, Schmid GH, Franck F (2000) *Photosynth Res* **64**: 63-76
31. Joyard J, Block M, Pineau B, Albricieux C, Douce R (1990) *J Biol Chem* **265**: 21820-21827
32. Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K (1995) *Plant Physiol* **108**: 1505-1517
33. Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Bereza B, Apel K (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3254-3258
34. Holtorf H, Apel K (1996) *Planta* **199**: 289-295
35. Reinbothe S, Runge S, Reinbothe Ch, van Cleve B, Apel K (1995) *Plant Cell* **7**: 161-172
36. Reinbothe S, Reinbothe C, Runge S, Apel K (1995) *Journal of Cell Biology* **129**: 299-308
37. Reinbothe C, Lebedev N, Apel K, Reinbothe S (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8890-8894
38. Reinbothe S, Mache R, Reinbothe C (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9795-9800
39. Dahlin C, Aronsson H, Almkvist J, Sundqvist C (2000) *Physiol Plant* **109**: 298-303
40. Aronsson H, Almkvist J, Sundqvist C, Timko MP, Dahlin C (1999) W: Argyroudi-Akoyunoglou JH, Senger H (red) *Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*, t64 Kluwer Academic Publ, str167-170
41. Oosawa N, Masuda T, Awai K, Fusada N, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2000) *FEBS Lett* **23697**: 1-4
42. Kuroda H, Masuda T, Fusada N, Ohta H, Takamiya K (2000) *Plant and Cell Physiol* **41**: 226-229
43. Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shiraishi T, Shimada H, Ohta H, Takamiya K (2000) *Photosynth Res* **64**: 147-154
44. Beer NS, Griffiths WT (1981) *Biochem J* **195**: 83-92
45. Apel K, Santel HJ, Redlinger TE, Falk H (1980) *Eur J Biochem* **111**: 251-258
46. Röper U, Prinz H, Lutz C (1987) *Plant Sci* **52**: 15-19
47. Richards WR, Walker CJ, Griffiths, WT (1987) *Photosynth* **21**(4): 462-471
48. Ouazzani Chahdi MA, Schoefs B, Franck F (1998) *Planta* **206**: 673-680
49. Klement H, Helfrich M, Oster U, Schoch S, Rüdiger W (1999) *Eur J Biochem* **265**: 862-874
50. Martin GEM, Timko MP, Wilks M (1977) *Biochem J* **325**: 139-145
51. Townley HE, Griffiths WT, Nugent JP (1998) *FEBS Letters* **422**: 19-22
52. Heyes DJ, Martin GEM, Reid RJ, Hunter CN, Wilks HM (2000) *FEBS Lett* **483**: 47-51
53. Helfrich M, Schoch S, Schafer W, Ryberg M, Rüdiger W (1996) *J Amer Chem Soc* **118**: 2606-2611
54. Griffiths WT (1980) *Biochem J* **186**: 267-278
55. Bereza B, Laskowski M, Hendrich W (1984) W: Sironval C, Brouers M (red) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 149-159
56. Bereza B, Dujardin E (1984) W: Sironval C, Brouers M (red) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 161-173
57. Walter G, Kayser K, Dujardin E, Peine G, Bereza B, Hoffmann P (1980) *Photosynth* **24**: 529-538
58. Suzuki JY, Bauer CE (1995) *J Biol Chem* **270**: 3732-3740
59. Schulz R, Steinmüller K, Klaas M, Forreiter C, Rasmussen S, Hiller C, Apel K (1989) *Mol Gen Genet* **217**: 355-361

60. Darrah M, Kay SA, Teakle GR, Griffiths WT (1990) *Biochem J* **265**: 789-798
61. Benli M, Schulz R, Apel K (1991) *Plant Mol Biol* **16**: 615-625
62. Teakle GR, Griffiths WT (1993) *Biochem J* **296**: 225-230
63. Spano AJ, He Z-H, Michel H, Hunt D, Timko MP (1992) *Plant Mol Biol* **18**: 967-972
64. Spano AJ, He Z, Timko MP (1992) *Mol Gen Genet* **236**: 86-95
65. Birve S, Selstam E, Johansson B-A (1996) *Biochem J* **317**: 549-555
66. Leluk J (1998) *Computers Chem* **22**: 123-131
67. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B (1978) *J Mol Biol* **120**: 97-120
68. Carmenes RS, Freije JP, Molina MM, Martin JM (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 687-693.
69. Sander C, Schneider R (1991) *Proteins* **9**: 56-68
70. King RD, Sternberg MJE (1996) *Protein Sci* **5**: 2298-2310
71. King RD, Sagi M, Sayle R, Sternberg MJ (1997) *Comput Appl Biosci* **13**: 473-474
72. Wilks HM, Timko MP (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 724-728
73. Wilson RC, Cooper JB (1994) *Plant Physiol* **104**: 289-290
74. Widell A, Selstam E (1988) *Physiol Plant* **73** (19A)
75. Widell-Wigge A, Selstam E (1990) *Plant Physiol* **78**: 315-323
76. Boddi B, Ryberg M, Sundqvist C (1992) *J Photochem Photobiol B-Biol* **12**: 389-401
77. Boddi B, Franck F (1997) *J Photochem Photobiol B-Biol* **41**: 73-82
78. Boddi B, Lindsten A, Sundqvist C (1999) *J Photochem Photobiol B-Biol* **48**: 11-16
79. Skribanek A, Apatini D, Inaoka M, Boddi B (2000) *J Photochem Photobiol B-Biol* **55**: 172-177
80. Boddi B, Ryberg M, Sundqvist C (1993) *J Photochem Photobiol B-Biol* **21**: 125-133
81. Boddi B, Kis-Petik K, Kaposi AD, Fidy J, Sundqvist C (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 531-540
82. Virgin HI (1993) *Physiol Plant* **89**: 761-766
83. Franck F, Mathis P (1980) *Photochem Photobiol* **32**: 799-803
84. Van Bochove AC, Griffiths WT, van Grondede R (1984) W: Sironval C, Brouers M (red) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 113-125
85. Iwai J, Ikeuchi M, Inoue Y, Kobayashi T, (1984) W: Sironval C, Brouers M (red.) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 99-112
86. Ignatov NV, Belayeva OB, Litvin FF (1993) *Photosynth Res* **3**: 117-124
87. Griffiths WT, McHugh T, Blankenship RE (1996) *FEBS Lett* **398**: 235-238.
88. Begley TP, Young H (1989) *J Amer Chem Soc* **111**: 3095-3096
89. Sironval C, Franck F, Gysembergh R, Bereza B, Dujardin E (1984) W: Sironval C, Brouers M (red) *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers, The Hague-Boston-Lancaster, str 197-222
90. Franck F, Strzalka K (1992) *FEBS Letters* **309**: 73-77
91. Reinbothe S, Reinbothe C (1996) *Cell* **86**: 703-705
92. Franck F, Bereza B, Boddi B (1999) *Photosynth Res* **59**: 53-61
93. Beale SI, Weinstein J (1990) W: Dailey HA (red) *Biosynthesis of Heme and Chlorophyll*, New York: McGraw-Hill Publishing Co Inc, str 297-391
94. Mosinger E, Batschauer A, Schäfer E, Apel K (1985) *Eur J Biochem* **147**: 136-142
95. Holtorf H, Apel K (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 387-392
96. Reinbothe C, Apel K, Reibothe S (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 6206-6212
97. Argyroudi-Akoyunoglou JH, Prombona A (1996) *J Photochem Photobiol B-Biol* **36**: 271-277
98. Reinbothe S, Reinbothe C (1996) *Plant Physiol* **111**: 1-7

KOMUNIKAT

w dniach 9-11 października 2003 w Krakowie odbędzie się
XII ZJAZD Polskiego Towarzystwa Osteoartrologii
i Polskiej Fundacji Osteoporozy

pod auspicjami
International Osteoporosis Foundation

TEMATY

1. Osteoporoza:
 - patogeneza, epidemiologia,
 - diagnostyka, leczenie
 - osteoporoza u dzieci
 - osteoporozy wtórne
 - złamania w osteoporozie
2. Choroba zwyrodnieniowa stawów
 - leczenie farmakologiczne
3. Tematy wolne

TERMINY

Nadsyłanie streszczeń	31.03.03
Wczesna rejestracja	30.05.03
Wstępna lista uczestników	30.06.03
Potwierdzenie uczestnictwa	31.08.03
Rezerwacja hoteli	31.08.03

INFORMACJE

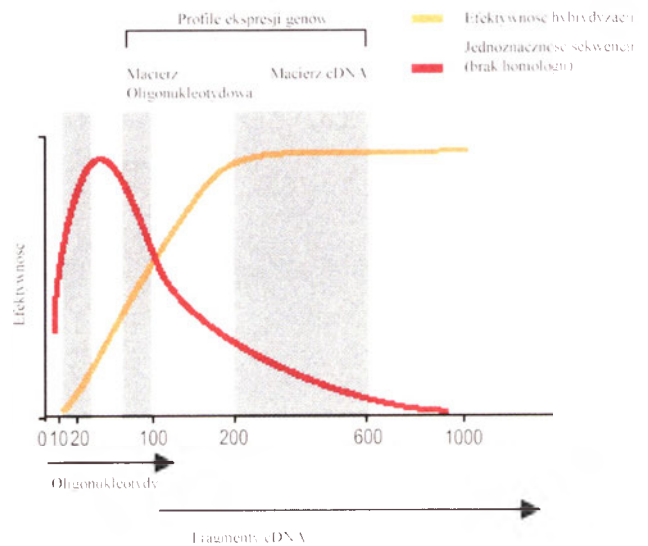
Komitet Organizacyjny XII Zjazdu PTOA i PFO
Krakowskie Centrum Osteoporozy
ul. Kopernika 32, 31-501 Kraków
tel. (+12) 423 2080, 430 3220; fax. (+) 4303153
e-mail: krakow@osteoporosis.org.pl
www.osteoporosis.org.pl

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
dr hab.med. Edward Czerwiński

Macierze DNA ATLAS™ BD Biosciences Clontech

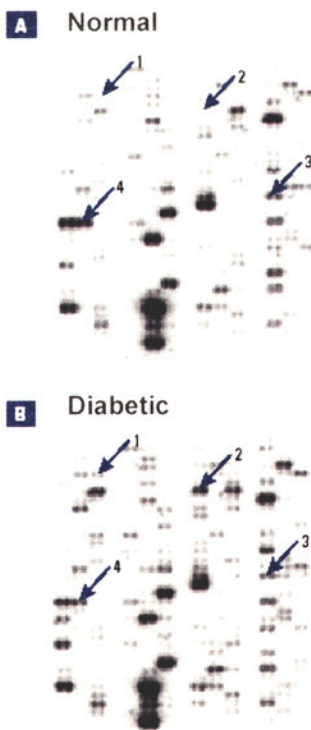
Nowoczesne narzędzie do analizy ekspresji genów

- Makromacierze nylonowe 190–1200 genów.
- Mikromacierze szklane 1200–7600 genów.
- Mikromacierze plastikowe ponad 12000 genów.
- Znakowanie ³³P — macierze plastikowe oraz nylonowe.
- Znakowanie fluorescencyjne — macierze szklane.
- Nadrukowywane sekwencje dobierane pod względem wydajności hybrydyzacji, jednoznaczności sekwencji, braku homologii z innymi genami z Banku Genów.
- Kontrola sekwencji nici nadrukowanych na macierz po procesie syntezy i nadruku.
- Możliwość kilkukrotnego użycia macierzy nylonowych i plastikowych.
- Standardy kalibracyjne dla poszczególnych partii produkcyjnych mikromacierzy plastikowych.



Zależność między długością nadrukowanego fragmentu DNA i efektywnością hybrydyzacji oraz jednoznacznością sekwencji (brakiem homologii do innych genów).

W mikromacierzach ATLAS™ stosuje się oligonukleotydy o długości 80 zasad.



Porównanie ekspresji genów mięśnia szkieletowego osoby zdrowej (A) i chorej na cukrzycę (B) z zastosowaniem Atlas Plastic Human Microarray 8 K (#7905-1). 1, 2 — wzrost ekspresji genów, 3, 4 — obniżenie poziomu ekspresji

Macierze ATLAS™ zawierają jedynie geny o znanej sekwencji i funkcji, opisane w Bankach Genów. Nie zawierają sekwencji EST.

Na mikromacierzach każdy gen jest reprezentowany przez jeden rodzaj oligonukleotydu (80 zasad) nadrukowany w jednym powtórzeniu (jeden gen — jeden spot).

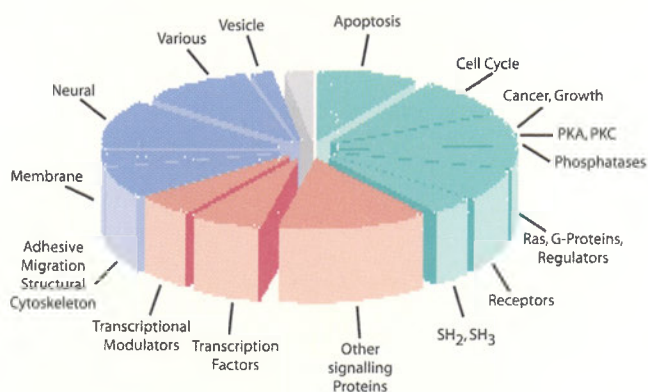
Makromacierze cDNA zawierają dla poszczególnych genów jeden rodzaj fragmentu cDNA nadrukowany w dwóch powtórzeniach.

System ATLAS™ obejmuje kompletne zestawy odczynników do izolacji RNA, syntezy i znakowania nici cDNA, izolacji znakowanych nici i hybrydyzacji do macierzy. Oferujemy również oprogramowanie do analizy macierzy i statystycznego opracowywania danych eksperymentalnych.

Becton Dickinson Polska Sp. z o.o.
02-916 Warszawa
ul. Okrężna 9
tel: +48 22 651 53 00
fax: +48 22 651 79 24

Mikromacierze białkowe BD Biosciences Clontech

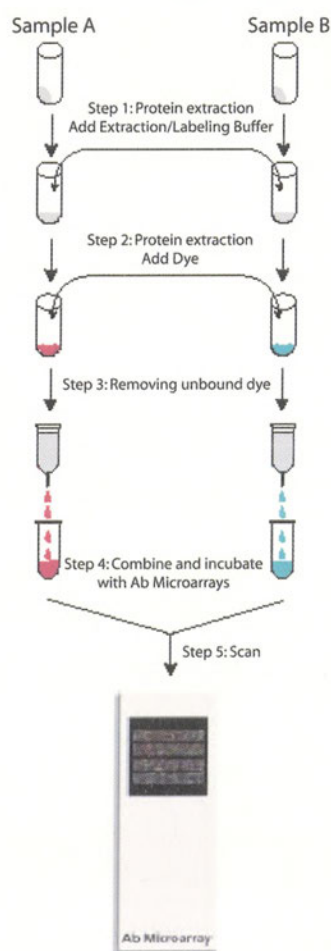
Najnowsza technika do badań proteomicznych



- Analiza profilu ekspresji kilkuset białek w jednym eksperymencie,
- Porównanie poziomu białek w różnych próbkach biologicznych,
- Wyniki uzyskiwane podczas jednego dnia pracy,
- Wysoka specyficzność uzyskana dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych dobranych zarówno pod względem specyficzności jak i powinowactwa do antygeny (jednoznaczność rozpoznawania i siła wiązania przeciwciał z białkami),
- znakowanie fluorescencyjne,
- kompletny zestaw (dwie mikromacierze, zestaw buforów do izolacji i znakowania białek).

Funkcjonalna klasyfikacja białek rozpoznawanych przez przeciwciała nadrukowane na Ab Microarray.

Pierwsza komercyjna mikromacierz białkowa (Ab Microarray 380 # K1847-1) zawiera 378 typów przeciwciał monoklonalnych nadrukowanych w dwóch powtórzeniach. Przeciwciała specyficjnie wiążą 378 rodzajów białek ludzkich (cytozolowych lub związanych z błonami). Duża część przeciwciał wykazuje krosreaktywność z białkami mysimi i szczurzymi. Na mikromacierzy reprezentowane są białka związane z różnorodnymi procesami na terenie komórki (apoptoza, cykl komórkowy, regulacja transkrypcji, adhezja itp.)



Procedura postępowania przy analizie ekspresji białek z zastosowaniem Mikromacierzy białkowych BD Clontech



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. 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 zawirusowanych „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