

2131

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2005
TOM 51
NUMER 3

50 lat Postępów Biochemii

Nauka w cytatach
Choroby związane z agregacją białek
Białka adaptorowe płytek krwi



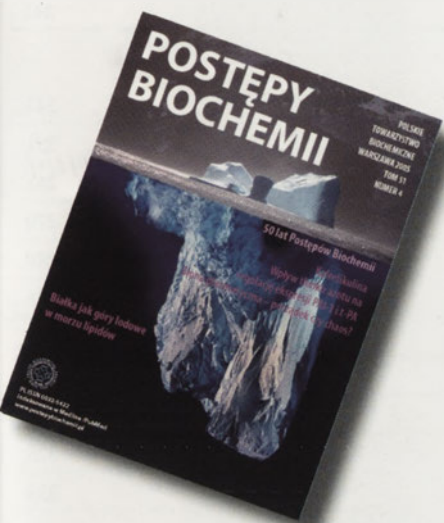
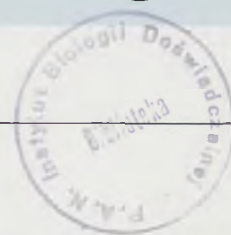
PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rom.org.pl>





MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego	237
--	-----

O TYM SIĘ MÓWI

List do Ministra Nauki i Informatyzacji, profesora Michała Kleibera	239
---	-----

Nauka w cytatach	240
------------------	-----

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

30-ty Kongres FEBS, Budapeszt 2005	242
------------------------------------	-----

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Zjawiska epigenetyczne w patogenezie nowotworów Nowe możliwości profilaktyki i terapii?	243
---	-----

Jarosław Paluszczak, Wanda Baer-Dubowska	
--	--

Kinazy tyrozynowe. Nowy cel terapii przeciwnowotworowej	251
---	-----

Ireneusz Majsterek, Dariusz Pytel, Janusz Błasiak	
---	--

Białka HMGA i ich geny jako potencjalne biomarkery nowotworowe	261
--	-----

Ewa Balcerczak, Mariusz Balcerczak, Marek Mirowski	
--	--

Wpływ bakterii enteropatogennych na apoptozę komórek układu pokarmowego człowieka	270
---	-----

Weronika Wronowska, Renata Godlewska, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka	
---	--

Aktywność prozapalna lipopolisacharydu	280
--	-----

Joanna Saluk-Juszczak, Barbara Wachowicz	
--	--

Tarczycowe czynniki transkrypcyjne związane z procesem biosyntezy hormonów tarczycy	288
---	-----

Michał Ambroziak, Alicja Nauman	
---------------------------------	--

Choroby związane z agregacją białek	297
-------------------------------------	-----

Daniel Bąk, Michał Milewski	
-----------------------------	--

Białka adaptorowe płytek krwi	308
-------------------------------	-----

Urszula Kralisz	
-----------------	--

Cystatyny, tyropiny i inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych	318
---	-----

Katarzyna Gawlik, Wojciech Poręba, Janu Gutowicz	
--	--

Naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców	328
---	-----

Tomasz Popławski, Janusz Błasiak	
----------------------------------	--

Oddziaływanie argininy z RNA	339
------------------------------	-----

Tomasz Popławski, Janusz Błasiak	
----------------------------------	--

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Zastosowanie metod biologii molekularnej do poszukiwania genów biosyntezy antybiotyków poliketydowych i peptydowych produkowanych przez promieniowce	345
--	-----

Magdalena Kotowska	
--------------------	--

W NASTĘPNYM NUMERZE:

NASI ZA GRANICĄ

Kalretikulina, białko opiekuńcze regulujące stężenie Ca^{2+} w siateczce śródplazmatycznej

Małgorzata Szperl, Michał Opas

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Wpływ tlenu azotu na regulację ekspresji PAI-1 i t-PA

Katarzyna Oszajca, Janusz Szemraj, Jacek Bartkowiak

Błona plazmatyczna - porządek czy chaos?

Grażyna Dąbrowska, Beata Głowacka

Aromataza - kluczowy enzym biosyntezy estrogenów

Ryszard Milczarek, Jerzy Klimek

Rysunek na okładce:

Erytrocyty, limfocyt typu T (wybarwiony na zielono) i płytki krwi (wybarwione na żółto) krwi obwodowej człowieka (front cover image copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc.; www.denniskunkel.com).

ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 51, NR 3, 2005

M. Nencki Institute of Experimental Biology	237
Letter to Minister of Science and Information Technology	239
Science in Citations	240
30 th FEBS Congress; Budapest July 2 – 7 July 2005	242

REVIEWS

Epigenome and cancer: New possibilities of cancer prevention and therapy?	243
Tyrosine kinases. New target of anticancer therapy	251
HMGA proteins and their genes as a potential neoplastic biomarkers	261
Influence of human gastrointestinal tract bacterial pathogens on host cell apoptosis	270
The proinflammatory activity of lipopolysaccharide	280
Thyroid transcription factors involved in the thyroid hormones biosynthesis	288
Diseases associated with protein aggregation	297
Adaptor proteins of blood platelets	308
Cystatins, thypopins and inhibitors homologous to propeptides of cysteine proteases	318
Non-homologous DNA end joining	328
Specific arginine mediated RNA recognition	339
Application of molecular biology for the discovery of biosynthetic genes of polyketide and peptide antibiotics produced by actinomycetes	345

DO PRZYSZŁYCH AUTORÓW ARTYKUŁÓW PUBLIKOWANYCH NA ŁAMACH „POSTĘPÓW BIOCHEMII”

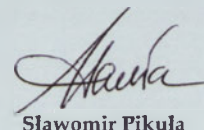
Szanowni Państwo,

Mój staż w redakcji kwartalnika „Postępy Biochemii”, w momencie oddania trzeciego numeru czasopisma do druku, to osiem miesięcy. Zbyt krótko żeby poznać wszystkie tajniki tej pracy, ale na tyle długo, żeby przekonać się, że czasopismo, oprócz grona zagorzałych Czytelników ma grono pełnych pisarskiej weny i wiernych Autorów, bez których jego byt byłby podobny swoją trwałością do mydlanej bańki. To dla Czytelników i Autorów zespół redakcyjny dba o wysoki poziom merytoryczny czasopisma i o to aby czasopismo stało się coraz ciekawsze, coraz bardziej atrakcyjne, i by wychodziło naprzeciw zapotrzebowaniom środowiska biochemików w naszym kraju. „Postępy Biochemii” mają w tym względzie niezbywalne i niezaprzeczalne tradycje, a ich wysoką pozycję jako czasopisma ugruntowuje obecność w tak liczącej się bazie danych jak Pub-Med. Większość wydawców czasopism zagranicznych uważa brak indeksacji czasopisma w tej bazie danych jako, cytuję, „eutanzja czasopisma”.

Ale świat redakcji bez kłopotów, której praca skupia się li tylko na dbałości o wysoki poziom artykułów, jest oczywistą mrzonką. Twarda rzeczywistość, z którą mamy ostatnio do czynienia, wskazuje, jak wiele zależy od sponsorów, dotacji i członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którzy czują się w obowiązku opłacać regularnie składki członkowskie, mówiąc dosadnie od pieniędzy. Dlatego rozumiem posunięcie Zarządu Głównego Towarzystwa, który reagując na gorącą „sytuację finansową” wydawanych czasopism, zmuszony był w nagłym trybie podjąć mało popularną i bolesną decyzję o wprowadzeniu częściowych opłat za druk artykułów w 2006 roku. To w oczywisty sposób zaburzyło normalną pracę redakcji, która pracuje nad artykułami przeznaczonymi do druku w 2006 roku.

Redakcja nikomu nie zamyka drogi do publikowania artykułów na łamach „Postępów Biochemii” ze względów finansowych; jedynym kryterium ważącym o opublikowaniu artykułu jest jego wartość merytoryczna i zgodność z profilem czasopisma. Spieszę z zapewnieniem tych wszystkich, którym przyszłe losy „Postępów Biochemii” leżą na sercu, że opłaty pobierane od Autorów nie są jedynym sposobem zdobywania środków finansowych i że czynimy wiele, żeby sytuację kwartalnika poprawić. W tym miejscu chciałbym podziękować Dyrektorom Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN, profesorowi Andrzejowi B. Legockiemu i profesorowi Jerzemu Duszyńskiemu, za przyznanie środków finansowych na częściowe pokrycie kosztów wydania kwartalnika „Postępy Biochemii” w zmienionej szacie graficznej w 2005 roku.

Wierzę, że świadomość konieczności wnoszenia częściowej opłaty za druk będzie miała także zbawienny wpływ na Autorów i ich artykuły, na związek stylu, na dokonanie właściwego wyboru materiału ilustracyjnego i liczbę cytowanych pozycji literaturowych tak, że w przyszłości artykuły przeglądowe w „Postępach Biochemii” będą być może krótsze, ale, paradoksalnie, będą niosły więcej treści. Ze swej strony redakcja przyrzeka uczynić wszystko, by zminimalizować koszty ponoszone przez Autorów prac.



Sławomir Pikula

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

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Grzegorz Bartosz, Andrzej Dzugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopočka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

Redakcja: Hanna Laskowska (Sekretarz); e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441; dyżur sekretarza redakcji: poniedziałki, czwartki, godz. 14-16; Skład i łamanie: Małgorzata Basaj

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

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

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Informatyzacji. „Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline i Agrolibrex. Nakład 850 egz.



Enzymy restrykcyjne, PCR, odwrotna transkrypcja, markery DNA, RNA i białkowe zestawy do biologii molekularnej;



Aparaty do elektroforezy poziomej i pionowej, do blottingu, zasilacze, ochrona przed promieniowaniem gamma i beta, drobne wyposażenie laboratoryjne;



Q-BIOgene

Transfekcja, elektroforeza, pożywki bakteryjne, drożdżowe, roślinne, PCR, izolacja i oczyszczanie DNA i RNA, ekspresja genów;



formerly ICN Biochemicals, Inc.

Podstawowe odczynniki, immunologia, apoptoza, biologia komórki, elektroforeza;



Synteza oligonukleotydów;



Agarozy;



MOBITEC
MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNOLOGIES

Biologia komórki, genomika, proteomika, przeciwiata, chromatografia.

Oferujemy odczynniki i wyposażenie laboratoryjne

DYSTRYBUTOR: abo Grażyna Boreysza
ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk
Biuro: ul. Małachowskiego 1, 80-262 Gdańsk
tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80
e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl



FEBS Practical Course



Frontiers in Molecular Biochemistry of Mitochondria

Warsaw, Poland, June 9-17, 2006



**Organized by
Adam Szewczyk and Jerzy Duszyński**



nencki institute
of experimental biology

<http://rcin.org.pl>

More info:

a.szewczyk@nencki.gov.pl

Profesor Jerzy Duszyński
 Dyrektor Instytutu
 ul. Pasteura 3; 02-093 Warszawa
 e-mail: dyrekcja@nencki.gov.pl

Marceli Nencki, urodzony w 1847 roku, był uczonym o światowej sławie. Jego dorobek naukowy stworzył podwaliny takich podstawowych działów biochemii jak struktura oraz funkcja białek, metabolizm i kataliza enzymatyczna. Wybitnymi dokonaniem Marcelego Nenckiego były prace poświęcone strukturze hemoglobiny, syntezie mocznika i przemianom puryn. Profesor Nencki był wieloletnim dyrektorem Medizinisch-Chemisches Institut w Bernie. W 1891 roku związał się z Instytutem Medycyny Doświadczalnej w St. Petersburgu. Zmarł przedwcześnie w 1901 roku.



Fot. 1. Gamach Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie, przy ulicy Pasteura 3.

Instytut im. Marcelego Nenckiego powstał w Warszawie z inicjatywy uczniów i współpracowników profesora Nenckiego. W 1911 roku Zarząd Towarzystwa Naukowego Warszawskiego podjął uchwałę o utworzeniu „Instytutu Biologicznego im. Marcelego Nenckiego”. Instytut zaczął w pełni działać w 1918 roku, do czego wydatnie przyczyniły się entuzjazm po odzyskaniu przez Polskę niepodległości i wsparcie inteligencji warszawskiej. Pierwszym dyrektorem Instytutu został profesor Kazimierz Białaszewicz. Już w okresie międzywojennym Instytut Nenckiego stał się wiodącą placówką

biologiczną w kraju. Do takiej roli predisponowała Instytut wybitna kadra, nowoczesny warsztat, tematyka badawcza i bogata biblioteka. Utworzony początkowo z trzech zakładów Towarzystwa Naukowego Warszawskiego (Zakładu Fizjologii, Zakładu Biologii Ogólnej i Zakładu Neurobiologii), w latach 20-tych powiększył się o Zakłady Embriologii Doświadczalnej, Morfologii i Biometrii. Powstała także sieć stacji terenowych, dzięki którym Instytut stał się kolebką polskiej hydrobiologii i oceanografii; najpierw Stacja Hydrobiologiczna nad Wigrami, później Stacja Morska na Helu i Stacja Rzeczna w Pińsku. Głównym źródłem autorytetu Instytutu i jego wpływu na rozwój biologii w Polsce były ukształtowane w ciągu dwóch dekad przedwojennej działalności szkoły naukowe – fizjologii i biochemii porównawczej (profesor Kazimierz Białaszewicz), protozoologii doświadczalnej (profesorowie Jan i Stanisława Dembowsy), etologii (profesor Romuald Minkiewicz) oraz polska szkoła limnologiczna (profesorowie Alfred Lityński i Mieczysław Bogucki).



Fot. 2. W 2004 roku Instytut świętował 85-tą rocznicę swojego powstania. Z tej okazji fotografia zbiorowa pracowników.

Wojna zniszczyła znaczący majątek Instytutu, zginęło wielu jego pracowników. Dzięki tym, którzy przeżyli, Instytut już w 1945 roku reaktywował swoją działalność. Początkowo mieścił się w czteropokojowym mieszkaniu w Łodzi. Szczególne zasługi w tym pionierskim okresie powojennym mają

profesorowie Włodzimierz i Stella Niemierko (Zakład Biochemii), Jan i Stanisława Dembowsy (Zakład Biologii), Jerzy Konorski i Liliana Lubińska (Zakład Neurofizjologii). Wymienieni profesorowie odtworzyli laboratoria, rozpoczęli prace badawcze i zgromadzili wokół siebie zdolną młodzież, z której



Fot. 3. Co roku w Instytucie odbywa się sesja naukowa, której towarzyszy piknik w ogrodzie przed Instytutem.

znakomita większość kontynuowała swą karierę naukową w Instytucie im. Marcelego Nenckiego przez wiele lat. Z chwilą powstania Polskiej Akademii Nauk, Instytut został włączony w jej strukturę. W latach 1953-55 wszystkie zespoły badawcze przeniosły się do Warszawy, do specjalnie wybudowanej siedziby przy ulicy Pasteura 3.

W ciągu ostatniego półwiecza Instytut przeszedł wiele zmian organizacyjnych, utrzymując jednak większość dotychczasowych kierunków badawczych i wzbogacając swoją działalność o szereg nowych. Obok działających od lat Zakładów Neurofizjologii, Biochemii Komórki, Biochemii Mięśni, Biologii Komórki, utworzono w 1997 roku Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej. Powołano wiele nowych laboratoriów zarówno badawczych, jaki i aparaturowych. Obecnie w Instytucie pracuje około 300 osób.

Specyfiką Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego jest interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Ich przedmiotem

są układy biologiczne o różnym stopniu złożoności, a więc całe organizmy, tkanki, komórki, organelle komórkowe, ale również struktura, właściwości i funkcje poszczególnych białek oraz badania na poziomie genomu. W ostatnich latach Instytut koncentruje swoje zainteresowania na zagadnieniach z zakresu neurobiologii. W Instytucie działa Europejskie Centrum Doskonałości w Neurobiologii o nazwie BRAINS, finansowane w ramach projektów naukowych Unii Europejskiej. Dodatkowo Instytut współpracuje z czołowymi instytucjami naukowymi na całym świecie, organizuje międzynarodowe konferencje i warsztaty naukowe.

A oto przykłady badań prowadzonych w Instytucie Nenckiego. W Zakładzie Biologii Komórki, przy użyciu nowoczesnych metod biochemicznych, biofizycznych oraz biologii molekularnej, prowadzone są badania nad regulacją endo- i egzocytozy, morfogenezą i procesami przekazywania sygnałów prowadzących do różnych odpowiedzi ruchowych w komórkach tkankowych i jednokomórkowych Eukaryota, a także nad funkcją i strukturą mechanoczułych kanałów jonowych w błonie cytoplazmatycznej *E. coli*.



Fot. 4. Wizyta ekspertów europejskich podczas przeglądu Instytutu we wrześniu 2003 roku.

Zakład Biochemii Komórki zajmuje się badaniami procesów generowania energii w komórkach ssaków oraz molekularnymi podstawami procesów starzenia. Dodatkowo w Zakładzie badane są funkcje białek wiążących jony wapnia i fosfolipidy oraz kanałów jonowych w błonach wewnątrzkomórkowych. W obrębie zainteresowań grup badawczych Zakładu zaczynają być również zagadnienia psychoneuroimmunologii i mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych.

Tematyka Zakładu Biochemii Mięśni koncentruje się wokół struktury i funkcji białkowych motorów biologicznych

i białek regulujących ich aktywność. Celem badań jest poznanie molekularnych mechanizmów skurczu różnego typu komórek. W badaniach stosuje się najnowszej generacji metody biologii molekularnej, fizykochemiczne i mikroskopię elektronową.

Badania prowadzone w Zakładzie Neurofizjologii obejmują szeroki wachlarz zagadnień biologii mózgu, począwszy od mechanizmów molekularnych i komórkowych, aż do integracyjnej aktywności sieci neuronowych i zachowania się zwierząt i ludzi. Badania prowadzone są zarówno z zastosowaniem metod tradycyjnych (np. warunkowanie, testy behawioralne), jak i najnowszych technik neurochemicznych, histologicznych, elektrofizjologicznych, neuroinformatycznych oraz modelowania. W ramach Zakładu pracują też pracownice psychologiczne zajmujące się badaniami układu wzrokowego i słuchowego oraz zróżnicowania międzypółkulowego i zaburzeń mowy. Zespół etologii prowadzi obserwacje zachowania się owadów, zarówno w laboratorium, jak i w terenie.

W Zakładzie Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej prowadzi się badania nad podstawami funkcjonowania komórek układu nerwowego. W szczególności prace te ogniskują się wokół zjawisk plastyczności neuronalnej, programowanej śmierci komórek nerwowych, szlaków przekazywania informacji wewnątrzkomórkowej, w tym roli białek wiążących wapń, oraz procesów transportu przez błony biologiczne i barierę krew-mózg. Badania te prowadzone są z wykorzystaniem nowoczesnych technik biologii komórkowej i molekularnej oraz biochemii, m.in. hodowli komórkowych, immunochemii, metod badania czynności białek i genów oraz ich regulacji przez czynniki transkrypcyjne, klonowania genów i modyfikacji genetycznej komórek, a także całych organizmów.

Blizszych informacji dotyczących zagadnień badawczych poszczególnych laboratoriów i zakładów można uzyskać na internetowej stronie Instytutu <http://www.nencki.gov.pl> w dokumencie - „Nencki Institute profile”.

Zasygnalizowana powyżej tematyka badawcza dowodzi, że Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcjelego Nenckiego jest miejscem, które daje

możliwość rozwoju naukowego i opowania wielu nowoczesnych technik badawczych. Instytut jest placówką otwartą i dynamicznie zmieniającą się. Wiosną każdego roku odbywa się nabór uczestników Studium Doktoranckiego Instytutu. Informacje o naborze i działalności Studium można znaleźć na stronie internetowej Instytutu lub bezpośrednio w Sekretariacie Studium (a.bujalska@nencki.gov.pl). Co roku na studium doktoranckie przyjmowanych jest 15-20 osób. Aktualnie w Instytucie pracuje 99 doktorantów. Wykonanie doktoratu w Instytucie otwiera możliwość zatrudnienia w najlepszych światowych placówkach naukowych. Po udanym stażu zagranicznym absolwenci Studium Doktoranckiego mają perspektywę pracy w Instytucie, a nawet otwarcia własnego laboratorium. W Instytucie zdajemy sobie sprawę z niebezpieczeństw, jakie niesie dla instytucji naukowej bazowanie jedy-



Fot. 5. Wizyta Prezesa PAN profesora Andrzeja B. Legockiego i Prezesa Narodowego Banku Polskiego, profesora Leszka Balcerowicza, w Instytucie w 2005 roku.

nie na własnych wychowankach, tak zwany „chów wsobny kadr”. Szczególnie ogranicza on rozwój nowatorskich tematów badawczych. Dlatego co jakiś czas, publicznie ogłaszany jest konkurs na otwarcie nowej pracowni. Ogłoszenie o ostatnim z nich ukazało się w *Nature* z 21 kwietnia 2005 roku. Do tego konkursu zgłosiło się 16 kandydatów z całego świata.

Jestem przekonany, że Instytut Biologii Doświadczalnej jest miejscem, które stwarza doskonałe warunki rozwoju naukowego i jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijającej się placówek naukowych w naszym kraju. Zapraszam do Instytutu przede wszystkim doktorantów, ale nie mniej gorąco bardziej już doświadczonych naukowców.

List do Ministra Nauki i Informatyzacji, profesora Michała Kleibera

Szanowny Pan

Prof. dr hab. Michał Kleiber

Minister Nauki
Ministerstwo Nauki i Informatyzacji
ul. Wspólna 1/3
00-529 Warszawa

Szanowny Panie Ministrze,

zbliżają się decyzje dotyczące kwestii żywotnej dla placówek Polskiej Akademii Nauk, a mianowicie sposobu finansowania ich działalności w roku 2006. Trudna sytuacja placowa w tych placówkach, będąca przedmiotem wzrastającego niepokoju naszego środowiska, jest świetnie już znana Panu Ministrowi z pism prof. Andrzeja Legockiego, Prezesa PAN, żeby wspomnieć choćby to z 24.03.2005 roku, skierowane na ręce Szefa Kancelarii Prezesa Rady Ministrów. W nawiązaniu do tej sprawy, trzeba stwierdzić, że wciąż są aktualne spostrzeżenia dotyczące sytuacji finansowej placówek PAN, wyłożone przez profesorów S. Bylinę i J. Lipkowskiego trzy lata temu, w liście otwartym Rady Dyrektorów naszych placówek z 10.04.2002 roku. Jest głęboko deprymujące, że co roku przed kolejnymi decyzjami budżetowymi, musimy wciąż przypominać o tych samych problemach i powtarzać te same argumenty. Sprawa wieloletniego niedofinansowania nauki a szczególnie specjalistycznych instytutów badawczych, skupionych w pionie PAN, musi jednak raz jeszcze być podjęta. Toteż przypominamy o tej sprawie i ponawiamy z uporem nasze postulaty. Jesteśmy bowiem przekonani, że przypomnienie o tym jest nie tylko zwykłą walką o pieniądze ale w istocie próbą opowiedzenia się za swoistą – naszym zdaniem wartościową – wizją społeczeństwa.

Twierdzimy, że badania podstawowe są nie tylko stymulatorem rozwiązań technicznych. Są też (a może przede wszystkim) próbą obiektywizacji rzeczywistości. To tu, na terenie tych nauk, nasza cywilizacja zrodziła

i utrzymuje kryteria pozwalające odróżnić prawdę od nieprawdy. To tu, w dynamice poznania, zawarty jest wymiar twórczy osoby ludzkiej, bez którego społeczności popadają w stagnację i zamierają. To zaniedbanie owego wymiaru doprowadziło do rozkładu systemu komunistycznego. To dbałość o ten wymiar – o istnienie nauki – jest jednym ze źródeł dynamiki Zachodu. Sądzimy, że w niewątpliwym kryzysie postaw, tak w Polsce ostatnio dokuczliwym, ważnym jest, że nauki podstawowe w samej swojej strukturze przechowują istotne normy zachowań. Stanowią jedną z „wysp przetrwania” czegoś, co nazwać należy spoiwem społecznym.

Naukowcy to nie banda nierobów pasożytujących na budżecie Państwa. Są wśród nas oczywiście lepsi i gorsi, mądrzejsi i głupszy. Ale na miarę swych sił biorą na siebie pewien obowiązek społeczny i tym samym państwowy – polegający na utrzymaniu więzi cywilizacyjnej z otaczającym nas światem. Trzeba przypomnieć, że nie byłoby dziś unijnych programów rozwoju naszego kraju, gdyby nie to, że właśnie nauka okazała się zdolna do bycia pierwszym pomostem łączącym Polskę z Unią, torującym drogę innym dziedzinom. Zgodnie z tą myślą naukowcy – tak jak siły zbrojne, sędziowie, nauczyciele – są rdzeniem Państwa. Nie może tak być, że spycha się ich do poziomu ludzi zbędnych, bo to destabilizuje organizm państwowy.

Mówi się często, że owa deprecjacja nauki w Polsce prowadzi do emigracji najzdolniejszych. Sądzimy, że to zjawisko, choć widoczne i uciążliwe, nie jest najgroźniejsze. Znacznie szkodliwsze, bo właśnie niewidoczne, niezauważalne w publicznej debacie, jest niszczenie na miejscu potencjału inwencji i talentów ludzi, którzy chcą pozostać i pozostają w kraju. Groźny jest nie tyle ów osławiony i na wszystkie przypadki odmieniany „drenaż mózgów”, bo to proces odwracalny, ile ów dziejący się tu na miejscu nieodwracalny proces „zabijania mózgów”, wynikający z de-

cyzji budżetowych w prymitywny sposób traktujących sprawy nauki.

Ta zła sytuacja finansowa instytucji badawczych jest szczególnie dotkliwa w placówkach PAN. Wobec ciągłego ograniczania środków finansowych na działalność statutową, w placówkach tych, mimo przeprowadzonej restrukturyzacji i zmniejszenia zatrudnienia o około 30%, płace pochłaniają prawie całość owych dotacji. Co więcej, obecnie owe płace stały się o 30-40% niższe niż w innych tzw. „pionach” nauki, co świadczy o zawodności kryteriów dystrybucji środków, jako że nie ma podstaw w obiektywnych ocenach jakości badań, prowadzonych w instytucjach przypisanych do owych różnych „pionów”. Systemy tej dystrybucji są przedmiotem stałych dyskusji, dających chwilowe przewagi różnym środowiskom naukowym. Dyskusje te wypełniają też znakomicie czas wielu różnych zebrań. Nie chcemy wchodzić w złożoność owych debat. Uważamy, że nadeszła pora na kilka prostych stwierdzeń. Oto one:

- parametryzacja instytucji musi się wiązać z oceną jakości prac badawczych dokonaną według standardów międzynarodowych przydających znaczną wagę publikacjom. Nie może ona podlegać corocznym mini-rewolucjom, ani grze cyfr zmiennych w zależności od interesów danych środowisk. Nauka potrzebuje stabilności w perspektywie kilkuletniej, i to nie wynikającej z formalnych wieloletnich planów, lecz opartej o oceny *a posteriori*;

- wchodzeniu w życie nowych siatek płac, wprowadzonych przecież przez Rząd powinno zawsze towarzyszyć wyrównywanie budżetów Instytutów, pozwalające na wzrost wynagrodzeń do górnych stawek. W 2006 roku za podstawę takiego wyrównania należy przyjąć oczywiście stan zatrudnienia i płac w 2005 roku;

- wobec zapowiadanego zwiększenia budżetu nauki o 30% w 2006 roku i dalszego jego wzrostu zgodnie z celami wyznaczonymi przez strategię lizboń-

ską, w 2006 roku powinno się również podnieść znacząco (o 30%) finansowanie statutowej działalności badawczej instytutów PAN, co pozwoli na trwanie sieci badań podstawowych tworzonej w znacznej mierze właśnie przez owe instytuty;

- rysującego się zagrożenia, tj. niewydolności nauki w Polsce nie rozwiąże sam system finansowania wieloletnich projektów badawczych czy różnego typu programów centralnych (np. Krajowych Programów Ramowych). Po to, by ów system mógł działać, muszą istnieć placówki zdolne do podjęcia wy-

Nauka w cytatach¹

Aleksandra Więcka

W nauce już dawno skończyła się epoka, kiedy jabłko spadające na głowę uczonego – nawet tej miary, co Albert Einstein – mogło być katalizatorem epokowego odkrycia. Dziś każdy mozolnie dorzuca swój kamyczek do naukowego ogródka, w postaci artykułów publikowanych na łamach prestiżowych periodyków. Te, które z punktu widzenia nauki są ważne, nowatorskie, są często cytowane. Dlatego świat nauki przyjmuje, że liczba cytowań to najbardziej obiektywna miara istotności danej teorii, odkrycia czy całego dorobku naukowca – tłumaczy prof. Andrzej Pilc, autor pierwszego w Polsce rankingu cytowań uczonych z dziedziny nauk biomedycznych, fizyki, chemii i pokrewnych. Tu najłatwiej o obiektywizm oceny, bo wszystkie liczące się prace publikowane są po angielsku, a periodyki naukowe są ważnym polem wymiany myśli.

Pomysłodawcą pierwszych takich zestawień był Eugenie Garfield, założyciel filadelfijskiego ISI (Institute for Scientific Information), który do dziś monitoruje łamy wszystkich ważnych pism naukowych i wszystkie nazwiska, jakie się na nich pojawiają. Pierwsze dane dla Polski Komitet Badań Naukowych kupił w latach siedemdziesiątych. Ostatnie otrzymałem dzięki uprzejmości przyjaciół z zagranicy, bo dostęp do dziesięcioletniej bazy danych kosztuje kilkanaście tysięcy dolarów rocznie – mówi Andrzej Pilc. Za wpływową publikację instytut filadelfijski uznaje artykuł, który zacytowano 50

zwań stawianych przez te programy. Tylko realne istnienie sprawnie funkcjonujących ośrodków badawczych pozwala na prowadzenie skutecznej polityki naukowej, zgodnej z potrzebami czasu wyrażanymi przez takie programy.

Wiedząc, że jest Pan nie tylko administratorem nauki, ale i jej współtwórcą, wierzymy, że wyrażone w tym piśmie nasze uwagi i postulaty, nie pozostaną bez echa. Zwracamy się więc do Pana Ministra z wnioskiem o wzmożenie strumienia finansowania działalności statutowej naszych instytutów, stano-

wiącej gwarancję efektywnej realizacji badań strategicznych.

Z poważaniem,
W imieniu Rady Dyrektorów Placówek Naukowych PAN

Prof. dr hab. Włodzimierz Zagórski-Ostoja

Prof. dr hab. Elżbieta Sarnowska-Temeriusz

Prof. dr hab. Edmund Przegaliński

Warszawa, 30.05.2005 r.

razy, za klasyka taki, na który powołało się 400 naukowców. Żeby znaleźć się w rankingu Pilca, obejmującego dorobek polskich uczonych w latach 1965 – 2001, naukowiec musiał być cytowany ponad tysiąc razy i mieć przynajmniej jedną publikację cytowaną ponad sto razy. Cytaty musiały dotyczyć badań prowadzonych w polskich instytutach naukowych. Najwięcej cytowań (17 tysięcy) „zgarwał” prof. Ryszard Gryglewski, farmakolog z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kolejni mają niewiele mniej. Spośród czołowej trzydziestki rankingu, 14 osób pochodzi właśnie z tego ośrodka badawczego, 7 osób z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Po 5 osób z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie i Akademii Medycznej w Warszawie oraz Akademii Medycznej w Gdańsku (4 osoby).

Ranking wyraźnie pokazał, że wybitni naukowcy mają tendencję do łączenia się w grupy wokół dobrych ośrodków badawczych – mówi profesor Pilc. Ma nadzieję, że dzięki tej wymiernej ocenie zmieni się polityka przyznawania grantów badawczych – dostaną je ci, którzy udowodnią, że przydają się nauce. To wcale niebanalny problem. Ponad połowa robionych w Polsce badań nie jest cytowana nawet raz – ich finansowanie to czyste marnotrawstwo pieniędzy.

Ale czy można w nauce ślepo ufać cyfrom? – Nie bardzo – śmieje się profesor Pilc. – Cytuje się to, co jest akurat na topie, czym zajmuje się wielu naukow-

ców. Zdarzają się jednak takie sytuacje, gdy wyniki badań wyprzedzają swój czas. Czasem wybitne prace przechodzą niezauważone aż do momentu, gdy zostaną na nowo odkryte – mówi Pilc. Klasycznym przykładem jest słynna teoria dziedziczenia Grzegorza Mendla, która po ogłoszeniu nie zyskała większej popularności. Zainteresowano się nią dopiero na początku XX wieku. Ale bywają i odwrotne sytuacje. – Teoria zimnej fuzji była niedawno jednym z najpopularniejszych tematów, miała bardzo wysoką cytowalność. Po kilku latach okazało się, że należy raczej włożyć ją między bajki – mówi autor rankingu. Takie „niewypały” zwykle żyją życiem komety – wypływają na chwilę, by po jakimś czasie zniknąć. Inaczej rzecz ma się z klasykami. Teorię względności uważa się za rzecz tak oczywistą, że nikt nie powołuje się na jej autora ani teksty źródłowe. Einstein nie mógłby pochwalić się wysokim miejscem na liście. – Za to gdyby zanalizować rosyjskie cytaty z lat 60-tych, palmę pierwszeństwa dzierżyłby pewnie Breżniew – żartuje profesor. Anegdota mi sypie jak z rękawa, bo ranking to jego hobby. Zawodowo profesor już od 30 lat zajmuje się biopsychiatrią. – Po naukowym światku krąży dowcip, że i tak lepiej być na liście Pilca niż liście Wildsteina – opowiada. A kiedy znudzi mu się przekopywanie archiwalnych egzemplarzy „Current contents” – pisma wydawanego przez Eugene Garfielda – pakuje plecak i aparat fotograficzny, czasem też raki i liny. Rusza w podróż (ostatnio do Namibii) albo

staje gdzieś pod górską ścianą. Nie zdobywa już sześciotysięczników, ale wciąż lubi wyzwania.

Profesor Andrzej Pilc z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie opracował raport najczęściej cytowanych polskich naukowców z dziedziny biologii, farmakologii i medycyny z lat 1965 - 2004. Badacze, czytając publikacje naukowe, odnoszą się do ich wyników, cytując ważne doniesienia z danej dziedziny nauki. Dobra, nowatorska praca ma szansę na wiele takich cytowań, zła zostaje zapomniana. Według światowych statystyk, ponad połowa badań nie jest cytowana w ogóle, takie publikacje to czyste marnotrawstwo czasu i pieniędzy. Przeciętna publikacja cytowana jest jeden-dwa razy. Więcej niż 50 cytowań uzyskuje jedynie około 1 procent prac, ponad 100 - tylko 0,35 procenta. Liczba cytowań jest podstawowym wskaźnikiem jakości publikacji naukowej w wielu dziedzinach nauki, takich jak biologia, medycyna, fizyka, chemia i innych. W kraju dostępne są 2 bazy danych, poświęcone analizie cytowań. Baza „Science Citation Report” dotyczy danych za lata 1996-2001. Zakupiona przez KBN baza „National Citation Report” dla Polski dotyczy lat 1979-99. Pierwsza z nich jest zawężona w czasie (6 ostatnich lat), druga w przestrzeni

(dotyczy jedynie publikacji z polskimi afiliacjami). Żadna z baz nie daje zatem dostatecznie szerokiego wglądu w całość kształtu publikacji i cytatów uzyskanych przez polskich naukowców. W związku z tym (korzystając z uprzejmości przyjaciół za granicą) postanowiono przeprowadzić analizę cytowań prac naszych badaczy, korzystając z dostępu do bazy „Science Citation Report” za lata 1965-2001, czyli okres twórczej pracy żyjącego pokolenia polskich naukowców. Uzyskane wyniki są blisko 10 razy bardziej korzystne dla polskich naukowców od danych dotychczas dostępnych. Do analiz wykorzystano: spis najczęściej cytowanych naukowców bazy „National Citation Report” dla Polski, spis najczęściej cytowanych publikacji z tejże bazy, z którego przeanalizowano cytowania wszystkich współautorów. Zbadano cytowania członków Polskiej Akademii Nauk oraz członków komitetów naukowych przy Prezydium PAN. Dodatkowo zanalizowano cytowania wszystkich samodzielnych pracowników naukowych z instytucji najczęściej cytowanych. Afiliację autora weryfikowano sprawdzając nazwisko w Informatorze Nauki Polskiej 2000, obecna analiza dotyczy zatem samodzielnych pracowników naukowych (od stopnia doktora habilitowanego w górę). Doświadczenie zresztą wyka-

zuje, że do uzyskania znaczącej ilości cytowań musi upłynąć kilka lat i mało który naukowiec bez habilitacji ma szansę na znaczącą ilość cytowań. By znaleźć się na liście, naukowiec musi spełniać następujące kryteria:

być cytowany ponad tysiąc razy, opublikować choć jedną pracę cytowaną 100 lub więcej razy. Drugie kryterium wprowadzono w celu „wyłowienia” naukowców, którzy opublikowali choć jedną pracę, która w warunkach świata można uznać za „klasyka cytowań”, oraz by ułatwić sobie ze względów technicznych utworzenie takiej listy. Doświadczenie nabyte przy sporządzaniu tej analizy wykazało, że olbrzymia większość autorów, którzy uzyskali ponad 1000 cytowań, ma na swoim koncie publikację cytowaną 100 lub więcej razy. Kryterium powyższe spełniło 221 naukowców, w tym 64 z dziedziny „biomed” (biologia i medycyna), 89 z fizyki, 48 z chemii oraz 20 z innych działów nauki. Opublikowali oni łącznie 846 prac cytowanych ponad 100 razy. Zakładając, że nasi naukowcy opublikowali w tym czasie około 200 tysięcy prac, ponad 100 cytowań uzyskało 0,42 procent publikacji, co nie odbiega od średnich światowych.

¹ Artykuł ukazał się po raz pierwszy w numerze „Pulsu Biznesu” z dnia 13/05/2005 roku. Przedruk za zgodą redakcji, autorki i prof. Andrzeja Pilca.

20 NAJCZĘŚCIEJ CYTOWANYCH POLSKICH NAUKOWCÓW NAUK BIOMEDYCZNYCH (DO 1 CZERWCA 2004 ROKU)

- 1 Gryglewski Ryszard** - farmakolog, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 17 000 cytowań
- 2 Gryniewicz Grzegorz** - farmaceuta, Instytut Farmaceutyczny, Warszawa, 16 506 cytowań
- 3 Konturek Stanisław** - fizjolog, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 14 991 cytowań
- 4 Jabłońska Stefania** - dermatolog, Akademia Medyczna, Warszawa, 10 190 cytowań
- 5 Shugar Dawid** - biofizyk, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, 8 900 cytowań
- 6 Kisielow Paweł** - immunolog, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Wrocław, 6 143 cytowań
- 7 Szczeklik Andrzej** - medycyna, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 5 874 cytowań
- 8 Maj Jerzy** - farmakolog, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 4 655 cytowań
- 9 Żylicz Maciej** - biolog, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej PAN, Warszawa, 4 365 cytowań
- 10 Vetulani Jerzy** - farmakolog, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 4 297 cytowań
- 11 Kaczmarek Leszek** - biolog, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, Warszawa, 4 155 cytowań
- 12 Zembala Marek** - immunolog, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 4 100 cytowań
- 13 Chorzeński Tadeusz** - dermatolog, Akademia Medyczna, Warszawa, 4 088 cytowań
- 14 Brzozowski Tomasz** - fizjolog, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 3 980 cytowań
- 15 Selmaj Krzysztof** - neurolog, Uniwersytet Medyczny, Łódź, 3 896 cytowań
- 16 Kostowski Wojciech** - farmakolog, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, 3 801 cytowań
- 17 Koj Aleksander** - biolog, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 3 775 cytowań
- 18 Przewłocki Ryszard** - farmakolog, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 3 694 cytowań
- 19 Potempa Jan** - biochemik, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, 3 666 cytowań
- 20 Stachura Jerzy** - patomorfolog, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 3 470 cytowań

30-ty KONGRES FEBS; Budapeszt 2 – 7 lipca 2005 roku

Prezes Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego
Prof. dr hab. Jolanta Barańska

W dniach 2-7 lipca tego roku w Budapeszcie odbył się 30-ty Kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), któremu towarzyszyła 9-ta Konferencja Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB). W Kongresie zorganizowanym przez Węgierskie Towarzystwo Biochemiczne wzięło udział około 2500 uczestników, w tym 110 osób z Polski (Fot. 1). Głównym tematem Kongresu były białka i peptydy („The Protein Word: proteins and peptides – structure, function and organization”). W czasie kongresu wygłoszono prawie trzysta wykładów, a w trakcie licznych sesji plakatowych zaprezentowano niemal dwa tysiące komunikatów. Wykład inauguracyjny wygłosił Peter Agree, laureat Nagrody Nobla za prace dotyczące akwaporyny. Wykłady plenarne wygłosili Ada E. Yonath z Rehovot, Izrael (FEBS-Datta Plenary Lectureship Award), Christopher M. Dobson z Cambridge, Wielka Brytania (50th Anniversary IUBMB Lecture), Douglas B. Kell z Manchester, Wielka Brytania (Teodor Bücher Lecture), Natalie C.J. Strynadka z Vancouver, Kanada (PABMB Lecture), Thomas Jenuwein z Wiednia, Austria (Sir Hans Krebs Lecture), Keiichi Namba z Osaki, Japonia (Special Plenary Lecture), Maria Carmo-Fonseca z Lizbony, Portugalia (EMBO Lecture), Attila Mocsai z Budapesztu, Węgry (EMBO Young Investigator Lecture), Ele Deuerling z Heilderbergu, Niemcy (FEBS Letters Young Scientists Award Lecture) oraz Chrystian Klamot z Frakfurtu, Niemcy (FEBS Journal Prize Award). Wśród polskich wykładowców byli m.in. Janusz M. Bujnicki z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Piotr Zielenkiewicz z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, a także Serhiy Havrylov, doktorant w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie. Więcej informacji na temat Kongresu FEBS w Budapeszcie moż-

na uzyskać łącząc się ze stroną internetową: <http://www.febs-iubmb-2005.com>. Polecam także stronę internetową FEBS (<http://www.febs.org>), skąd można bezpłatnie ściągnąć w postaci plików z rozszerzeniem pdf publikacje ze specjalnego wydania FEBS Letters „Budapest Special Issue: Proteins and Peptides”. Na zakończenie kongresu odbyło się zebranie przedstawicieli narodowych towarzystw biochemicznych wchodzących w skład FEBS, tzw. Council Meeting. W czasie obrad dokonano wyborów do władz FEBS. Miło jest mi poinformować, że członkiem FEBS Executive Committee jako Congress Councillor został wybrany Adam Szewczyk (Instytut Biologii Doświadczalnej PAN), zaś członkiem Komitetu FEBS d/s Europy Wschodniej Andrzej Dżugaj (Uniwersytet Wrocławski). Zdecydowano także, że w 2008 roku Kongres FEBS odbędzie się w Atenach. Przypominam, że w przyszłym roku, kolejny 31-ty Kongres FEBS zostanie zorganizowany w Stambule w dniach 24-29 czerwca. Więcej informacji na ten temat można znaleźć na stronie internetowej 31-go Kongresu pod adresem <http://www.febs2006.org>.

FEDERATION
OF EUROPEAN
BIOCHEMICAL
SOCIETIES



JEŻELI CHCESZ:

- OTRZYMYWAĆ BEZPŁATNĄ GAZETĘ FEBS,
- ZOBACZYĆ JAKIE KURSY TEORETYCZNE I EKSPERYMENTALNE ORGANIZUJE FEBS,
- JAKIE STYPENDIA NA WYJAZDY KRÓTKO- I DŁUGOTERMINOWE MOŻNA UZYSKAĆ Z FEBS,

WEJDŹ NA STRONĘ EUROPEJSKIEJ FEDERACJI TOWARZYSTW BIOCHEMICZNYCH

[HTTP://WWW.FEBS.ORG](http://www.febs.org)



Fot. 1. Niektórzy z polskich uczestników kongresu FEBS w Budapeszcie.

Santa Cruz Biotechnology Inc. Światowy lider w produkcji odczynników do biologii molekularnej

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

2005

RESEARCH
ANTIBODIES

- W katalogu 2005 możecie Państwo znaleźć
- 16000 I-rzędowych przeciwciał
 - ponad 2800 siRNA
 - ponad 1700 przeciwciał do ChIP
 - bogaty zestaw odczynników

Dystrybutor w Polsce
"AMX" PUJH, 93-362 Łódź, Bułgarska 12a
tel/fax 042-6450064
www.amx.pl.pl, e-mail: amx@amx.pl.pl
http://rcin.org.pl



The Power to Question

Zjawiska epigenetyczne w patogenezie nowotworów

Nowe możliwości profilaktyki i terapii?

Jarosław Paluszczak

Wanda Baer-Dubowska

Katedra Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Katedra Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań; e-mail: baerw@amp.edu.pl, tel. (61) 854 66 21

Artykuł otrzymano 2 grudnia 2004 r.

Artykuł zaakceptowano 31 stycznia 2005 r.

Słowa kluczowe: epigenom, metylacja DNA, histony, nowotwory, chemoprewencja

Wykaz skrótów: CpG - dinukleotyd 5'-CG-3'; DNMT - metylotransferaza DNA; DNMTi - inhibitory DNMT; HAT - acetylotransferaza histonów; HDAC - deacetylaza histonów; HDACi - inhibitory deacetylaz histonów; HMT - metylotransferaza histonów; MBP - białka wiążące zmetylowane cytozyny; mCpG - zmetylowane dinukleotydy 5'-CpG-3'; SAM - S-adenozylometionina

STRESZCZENIE

Ostatnie lata badań dostarczyły przekonujących dowodów, że obok zmian genetycznych w patogenezie nowotworów istotną rolę odgrywają także mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów. Zmiany epigenomu zachodzą na różnych etapach indukcji nowotworów i z tego powodu mogą być celem oddziaływania zarówno czynników chemoprewencyjnych, jak i chemioterapeutyków. Epigenetyczna kontrola transkrypcji związana jest z metylacją DNA i kowalencyjnymi modyfikacjami histonów, obejmującymi przede wszystkim ich acetylację i metylację. Obydwa mechanizmy są ze sobą ściśle powiązane. W komórkach nowotworowych hypometylacji całego genomu towarzyszy hypermetylacja sekwencji DNA charakterystycznych dla określonego typu nowotworu. Hypermetylacja promotorów genów supresorowych równie często jak mutacje przyczynia się do ich inaktywacji. W niniejszym artykule przedstawiono obecny stan wiedzy na temat molekularnego podłoża zmian epigenetycznych w nowotworach oraz możliwości wykorzystania tych zjawisk w profilaktyce i terapii.

WPROWADZENIE

Zjawiska epigenetyczne, a szczególnie epigenetyczna regulacja funkcjonalnej ekspresji genu, stały się w ostatnich latach jednym z najważniejszych obiektów badań w odniesieniu do patogeny nowotworów. Główną przyczyną tego zainteresowania stało się stwierdzenie istotnej roli współdziałania chromatyny i metylacji DNA w transkrypcyjnym wyciszaniu genów związanych z procesem onkogenezy [1, 2]. Integralną częścią epigenetycznej kontroli transkrypcji obok metylacji DNA są kowalencyjne modyfikacje białek histonowych [3, 4]. W stanie normy mechanizmy te są wykorzystywane w komórce do wyciszania licznych sekwencji powtórzonych (m.in. w centromerach, telomerach), piętnowania rodzicielskiego, wyłączenia drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich [5]. Metylacja DNA służy rozróżnianiu nici DNA w procesie naprawy błędnie sparowanych zasad. Jest także formą obrony przed ekspresją obcego DNA, co może być też jedną z przeszkód skutecznej terapii genowej [6]. Schemat metylacji DNA, ustalony na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, ulega małym zmianom podczas życia osobniczego [7-9]. Metylacji ulega głównie cytozyna dinukleotydów CpG pojedynczo rozrzuconych po całym genomie. W obrębie natomiast tzw. wysp CpG, czyli dłuższych obszarów DNA (minimum 500 kbp) o zwiększonej w porównaniu z całym genomem procentowej zawartości CpG (powyżej 55%), które występują w obrębie sekwencji promotorowych około 60% genów ulegających stałej ekspresji, reszty cytozyny pozostają niezmetylowane, niezależnie od stanu ekspresji [1, 10, 11]. W komórkach rakowych natomiast hypometylacji całego genomu towarzyszy hypermetylacja wysp CpG, co prowadzi do zakłócenia czynności wielu genów. Białka histonowe ulegają licznym modyfikacjom posttranslacyjnym takim jak acetylacja, metylacja, fosforylacja i ubikwitynacja. Acetylacja jest związana ze zmianą układu nukleosomów i aktywacją transkrypcji, natomiast deacetylacja prowadzi do represji transkrypcji w wyniku kondensacji chromatyny. Metylacja DNA i acetylacja histonów są ze sobą integralnie powiązane tworząc specyficzny epigenetyczny kod. Ich zakłócone funkcjonowanie w nowotworach, prowadzące do wyciszenia np. genów supresorowych, wydaje się być atrakcyjnym celem zarówno terapii jak i chemoprewencji.

METYLACJA DNA I MODYFIKACJE HISTONÓW

Metylacja reszt cytozyny w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego jest katalizowana przez enzymy z grupy metylotransferaz DNA (DNMT). Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina (SAM). Metylotransferazy DNA (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) charakteryzują się obecnością rejonu C-końcowego z domeną katalityczną, o zachowanej w ewolucji sekwencji, a różnice ich funkcji wynikają z dużej zmienności rejonu N-końcowego. DNMT1 ma powinowactwo

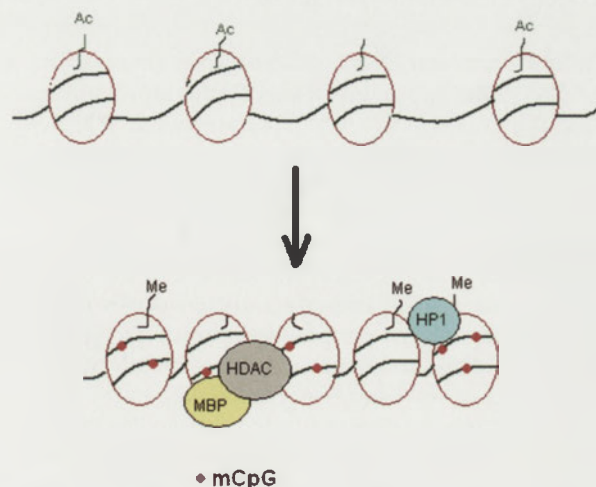
do hemimetylowanego DNA i służy kopiowaniu schematu metylacji na nić potomną podczas replikacji [10]. W późnej fazie S DNMT1 zakotwiczona na białku PCNA (jądrowy antygen proliferujących komórek) pojawia się w widelkach replikacyjnych [12]. Wierność odtwarzania schematu metylacji poszczególnych dinukletydów CpG na nici potomnej nie jest całkowita, lecz pozostaje zachowana, jeśli chodzi o większe domeny DNA [13]. DNMT1 posiada zwiększone powinowactwo do nieprawidłowych struktur DNA, które mogą pod jej wpływem ulegać metylacji [1, 13]. DNMT3a i 3b katalizują reakcje metylacji DNA *de novo*, stąd ich główną rolą jest tworzenie schematu metylacji podczas rozwoju zarodkowego. Powszechnie przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych brak ekspresji określonego genu podczas embriogenezy jest sygnałem do jego epigenetycznego wyciszenia. DNMT1 oraz 3a i 3b są niezbędne do prawidłowego rozwoju, czego dowodzi fakt, że myszy pozbawione tych genów giną na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego [10]. Metylacja DNA może rozprzestrzeniać się na sąsiadujące sekwencje. Sekwencje powtarzające się SINE (ang. *short interspersed nuclear elements*) oraz LINE (ang. *long interspersed nuclear elements*) mogą służyć jako miejsca metylacji *de novo*, z których sygnał ten jest przenoszony na przylegające fragmenty DNA [14]. Pewne sekwencje takie jak np. miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1, są chronione przed metylacją. Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny, a może polegać na sterycznym blokowaniu dostępu DNMT do tych sekwencji [14].

Histony są białkami zasadowymi o zachowanej w ewolucji sekwencji, będącymi podstawowymi składnikami strukturalnymi nukleosomu. Ich rola nie ogranicza się jednak tylko do tworzenia struktury chromatyny. Aminokwasy ogonów histonów rdzeniowych, zwłaszcza H3 oraz H4, stanowią miejsce licznych kowalencyjnych modyfikacji, które wpływając na strukturę chromatyny, decydują o aktywności transkrypcyjnej genów. Ściśle określone reszty aminokwasowe odpowiednich histonów ulegają odwracalnemu modyfikacjom kowalencyjnym, katalizowanymi przez specyficzne dla danych reszt aminokwasowych enzymy. Spektrum reakcji obejmuje acetylację reszt lizyny katalizowaną przez acetylotransferazy histonów (HAT) i ich deacetylację przez deacetylazy histonów (HDAC), metylację reszt lizyny i argininy katalizowaną przez metylotransferazy histonów (HMT), fosforylację reszt seryny i treoniny oraz ubikwitynację reszt seryny. Aktywność enzymów katalizujących wymienione reakcje jest regulowana przez oddziaływanie z szeregiem białek oddziałujących pośrednio lub bezpośrednio z DNA. Nie bez znaczenia biologicznego jest stopień metylacji lizyny i argininy, które mogą ulegać odpowiednio trój- i dwu-stopniowej metylacji [15-17].

Zmetylowane reszty cytozyny są dostatecznie trwałe, aby służyć przekazywaniu informacji epigenetycznej komórkom potomnym. Kowalencyjne modyfikacje histonów są znacznie bardziej labilne, przy czym metylacja histonów jest trwalsza od ich acetylacji. Jakkolwiek nie jest jasne, czy modyfikacje histonów mogą również brać udział w przenoszeniu informacji epigenetycznej na komórki potomne, wydaje się, że ze względu na trwałość, tylko metylacja histonów mogłaby służyć takiemu celowi [17].

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI TRANSKRYPCJI

Epigenetyczna kontrola transkrypcji jest wielopoziomowa. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa metylacja DNA, choć nie jest to mechanizm uniwersalny dla wszystkich organizmów żywych. Steryczna zawada, jaką stanowi grupa metylowa przyłączona do reszty cytozyny powoduje, że niektóre czynniki transkrypcyjne (np. NF- κ B, CREB, c-Myc, E2F) w wyniku metylacji CpG tracą powinowactwo do odpowiadającej im sekwencji (ang. *consensus sequence*) [1]. Sygnał w postaci symetrycznie zmetylowanego miejsca CpG jest rozpoznawany przez grupę białek MBP (ang. *methyl-CpG binding proteins*), mających przy końcu aminowym domenę wiążącą zmetylowany DNA (MBD): MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 [18]. Białka te nie mają zdolności rozpoznawania, tak jak czynniki transkrypcyjne, specyficznych sekwencji DNA (ang. *consensus sequence*). Pomimo braku specyficzności budowa sekwencji a szczególnie ilość i lokalne zagęszczenie dinukletydów mCpG rozpoznawanych przez białka MBP, może decydować o sile wiązania tych białek do określonych sekwencji DNA [19]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA, jak 8-oksyoGua hamują zdolność wiązania się białek MBP do zmienionych dinukletydów CpG [20]. Warunkiem wyciszenia ekspresji genu wskutek metylacji DNA jest utworzenie odpowiedniej struktury chromatyny (Rys. 1). MBP mają zdolność represji transkrypcji poprzez interakcję z HDAC i kompleksami przebudowującymi strukturę chromatyny [21]. Prowadzi to do kondensacji chromatyny, która staje się niedostępna dla czynników transkrypcyjnych. Najnowsze badania wskazują, że białko Lsh wchodzące w skład kompleksów przebudowujących strukturę chromatyny, jest niezbędne do metylacji DNA, co dowodzi złożoności wzajemnych powiązań wszystkich elementów odpowiedzialnych za powstawanie epigenomu [22]. Na efektywność represji transkrypcji wpływają takie czynniki jak pozycja i gęstość mCpG. Istnieje pewien efekt progowy, po którego przekroczeniu może dochodzić do rozprzestrzeniania metylacji na odcinku do kilkuset par zasad [23]. Powyższa sekwencja zdarzeń, w której metylacja DNA jest procesem pierwotnie indukującym wyciszenie genu, nie jest jedyną możliwą. Wiele dowodów wskazuje, że modyfikacje histonów również mogą prowadzić do represji transkrypcji, wtórnie indukując metylację DNA.



Rysunek 1. Mechanizm epigenetycznej represji transkrypcji.

Ogony histonów rdzeniowych zawierają wiele gęsto ułożonych reszt aminokwasowych, które mogą ulegać posttranslacyjnym modyfikacjom. Hipoteza kodu histonowego zakłada, że różne kombinacje modyfikacji reszt aminokwasów tworzących ogony histonów mogą dawać impuls do tworzenia euchromatyny lub heterochromatyny. Część modyfikacji wykazuje redundancję efektu. Modyfikacje jednej reszty aminokwasowej mogą stymulować modyfikacje innych reszt wzmacniając wywołany efekt, zaś hamować modyfikacje prowadzące do efektu przeciwnego [15-17]. Metylacja reszty lizyny w pozycji 4 histonu H3 koreluje z aktywacją genu, zaś metylacja reszt lizyny w pozycjach 9 i 27 histonu H3 z jego represją. Metylowane reszty lizyny i argininy rozpoznawane są przez białka efektorowe zawierające wspólny element strukturalny, domenę o charakterystycznej budowie, nazwaną chromodomeną. Przykładem białka, w którym obecna jest chromodomena jest białko heterochromatyny HP1 mające powinowactwo do zmetylowanej reszty lizyny w pozycji 9 histonu H3 [16, 17].

Efekt wyciszającej transkrypcję metylacji histonów może być odwrócony na zasadzie przełącznika, którego rolę odgrywa reakcja fosforylacji reszt seryny, bądź treoniny, przylegających do zmetylowanej reszty lizyny. Fosforylacja reszty seryny w pozycji 10 histonu H3 przylegającej do zmetylowanej reszty lizyny w pozycji 9 może zatem stanowić mechanizm umożliwiający funkcjonalne usunięcie efektu metylacji wskutek znacznego osłabienia oddziaływania ze swoistym dla metylowanej lizyny efektoorem i przywrócenie aktywności transkrypcyjnej wyciszonej sekwencji DNA [17]. Acetylowane reszty lizyny ogonów histonów rdzeniowych rozpoznawane są z kolei przez białka efektorowe mające wspólny motyw strukturalny, zwany bromodomeną. Acetylowanie histonów koreluje zasadniczo z występowaniem chromatyny aktywnej transkrypcyjnie [16]. Dodatkowym elementem kontroli transkrypcji jest wymiana histonów na ich warianty. Wariant H3.3 jest wbudowywany na miejsce histonu H3 podczas aktywacji ekspresji genów [24]. DNMT mogą bezpośrednio oddziaływać zarówno z metylotransferazą histonów SUV39H1, jak i białkiem HP1, co dowodzi złożoności wzajemnych zależności czynników odpowiedzialnych za tworzenie epigenomu [25].

EPIGENETYKA NOWOTWORÓW

Zmiany metylacji DNA w komórkach nowotworowych obejmują ogólną hypometylację genomu, której towarzyszy lokalna hypermetylacja wysp CpG promotorów genów supresorowych. Hypometylacji ulegają głównie powtarzające się sekwencje satelitarne i w obrębie centromerów. Obserwuje się również hypometylację i związany z tym wzrost ekspresji protoonkogenów, np. *ras*, *fos*, *myc*. Metylacja promotorów genów supresorowych prowadzi do wyciszenia niezmutowanych alleli i może stanowić zarówno pierwszy, jak i drugi etap ich dwustopniowej, czyli wymagającej wyciszenia obu alleli, inaktywacji. Zmiany metylacji DNA pojawiają się już na wczesnych etapach onkogenezy i narastają wraz z rozwojem procesu nowotworowego [26, 27]. Zestaw wyciszonych genów supresorowych jest charakterystyczny dla danego typu nowotworu, np. *BRCA1* ulega hypermetylacji tylko w nowotworach sutka i jajnika, *p73* i *p15* – w no-

wotworach układu krwiotwórczego, *VHL* – nowotworach nerek. Dany typ nowotworu można z kolei podzielić na określone „metylotypy” [28]. Epigenetyczna inaktywacja może dotyczyć jednocześnie kilku dróg prowadzących do transformacji nowotworowej. Można przyjąć, że w każdym klonie komórek rozregulowanie kilku punktów kontrolnych może być wynikiem hypermetylacji genów białek regulacyjnych (Tabela 1) [26, 29]. Hypometylacja DNA prowadzi do destabilizacji struktury chromosomów, a jej skutkiem mogą być niestabilność i rearanżacje chromosomów [30]. Na podstawie analizy epigenomu nowotworów jelita grubego zaproponowano hipotezę fenotypu metylatorowego (CIMP – ang. *CpG island methylator phenotype*), analogicznie do fenotypu mutatorowego. Zgodnie z tą hipotezą, komórki wykazujące CIMP charakteryzują się szczególnie istotnymi zmianami poziomu metylacji DNA. Przyczyny występowania CIMP nie są jasne [31].

Do tej pory nie stwierdzono jednoznacznie, co wywołuje zmiany epigenomu w komórkach nowotworowych. Mogą one powstawać pod wpływem promieniowania X oraz związków chemicznych takich jak związki chromu i niklu [32, 33]. Znaczenie mogą mieć również czynniki genetyczne. Polimorfizmy S-transferazy glutationu P1 oraz oksydo-

Tabela 1. Przykłady epigenetycznie wyciszanych genów w komórkach nowotworowych

Gen	Funkcja	Typy nowotworów
p15	regulacja cyklu komórkowego	białaczki, nowotwory żołądka, wątroby
VHL	czynnik transkrypcyjny	nowotwory nerek
GSTpi	metabolizm ksenobiotyków	guzy prostaty
RARbeta	wzrost i różnicowanie komórek	nowotwory jelita grubego i piersi
APC	transdukcja sygnału	nowotwory jelita grubego
p16	regulacja cyklu komórkowego	większość typów nowotworów
AR	wzrost i różnicowanie komórek	nowotwory prostaty
ER	wzrost i różnicowanie komórek	nowotwory piersi, jelita grubego
O ⁶ -MGMT	naprawa DNA	nowotwory przewodu pokarmowego, płuc, mózgu
E-CAD	adhezja komórkowa, metastazy	nowotwory piersi, płuc, prostaty, przewodu pokarmowego, białaczki
DAPK	apoptoza	nowotwory płuc
pRb	regulacja cyklu komórkowego	retinoblastoma
hMLH1	naprawa DNA	nowotwory przewodu pokarmowego
BRCA1	naprawa DNA	nowotwór piersi
MDR1	transport ksenobiotyków	ostre białaczki

Objaśnienie skrótów: VHL - czynnik von Hippel-Lindau, GSTpi - S-transferaza glutationu P, RARbeta - receptor beta kwasu retinowego, APC - gen polipowatości jelita grubego, AR - receptor androgenów, ER - receptor estrogenów, O⁶-MGMT - metylotransferaza O⁶ metyloguanina:DNA, E-CAD - E-kadheryna, DAPK - kinaza białek związana ze śmiercią komórkową, BRCA1 - gen nowotworu piersi, MDR1 - białko oporności wielolekowej. Przygotowano na podstawie: 4, 51, 55.

reduktazy NAD(P)H: chinon korelują z częstszą metylacją promotorów genów *p16* i *MGMT* w komórkach nowotworów dróg oddechowych [34]. Wyciszenie genów supresorowych może być zjawiskiem wtórnym wobec pierwotnego spadku ich ekspresji wywołanego innymi czynnikami, bowiem wiadomo, że brak aktywności transkrypcyjnej może być impulsem takiej reakcji [35].

Przeciwstawne zmiany metylacji DNA (z jednej strony ogólna hypometylacja, której towarzyszy miejscowa hypermetylacja) sugerują, że w komórkach rakowych dochodzić może do błędnego nakierowywania DNMT. Niektóre obecne w komórkach nowotworowych nieprawidłowe białka fuzyjne mogą nakierowywać DNMT do określonych sekwencji DNA. Fuzyjne białko PML-RAR może służyć za przykład takiego nakierowywania. Prawdopodobne są również inne mechanizmy. Białko p21 oddziałuje z PCNA w tym samym miejscu, co DNMT1, uniemożliwiając na początku fazy S przyłączenie DNMT1 do PCNA i metylację wysp CpG. Na wczesnych etapach rozwoju nowotworów piersi, płuc, jajnika ma miejsce nadekspresja genu *waf1/cip1*, kodującego białko p21, która może prowadzić do hypometylacji genomu. Późniejsza utrata funkcji p21 w komórkach rakowych umożliwia przyłączenie DNMT1 do widełek replikacyjnych we wczesnej fazie S i nieprawidłową metylację wysp CpG [1, 10]. Przyczyną wyciszenia genów może być również nieprawidłowe nakierowywanie HDAC. W przewlekłej białacze szpikowej fuzyjne białko AML1-ETO oddziałuje z miejscami wiązania AML1 prowadząc do hamowania transkrypcji wskutek interakcji ETO z kompleksem N-CoR zawierającym m.in. HDAC1 i białko przebudowujące chromatynę Sin3 [36]. Jednym z możliwych mechanizmów prowadzących do hypermetylacji genomu w komórkach nowotworowych może być wzrost ekspresji i aktywności DNMT. Brak jednak zgody, co do prawdziwości takiego scenariusza. W niektórych badaniach wykazano nadekspresję DNMT, jednak wyniki są rozbieżne i trudno obecnie uznać prawdziwość takiej tezy. Wzrost ekspresji i aktywności DNMT obserwowano w nowotworach wątroby szczurów wywołanych niedoborem grup metylowych [37].

mCpG stanowią gorące miejsca mutacji. Zmetylowana cytozyna często ulega hydrolitycznej deaminacji, co może prowadzić do tranzycji cytozyna→tymina. W komórkach obecny jest specyficzny system naprawy takich uszkodzeń. Białko MBD4 jest glikozylazą DNA, która koryguje niekomplementarne pary guanina-tymina oraz guanina-uracyl powstałe w wyniku hydrolitycznej deaminacji odpowiednio metylocytozyny i cytozyny, preferencyjnie usuwając tyminę lub uracyl i prowadząc do powstania miejsc apirymidynowych. Część C-końcowa tego białka zawierająca domenę katalityczną jest homologiczna do domen kilku białek naprawczych bakterii. Enzym ten może służyć minimalizacji mutacji mCpG [16, 38, 39]. Inaktywacja MBD4 prowadzi do wzrostu tranzycji cytozyna→tymina, a w połączeniu z mutacją genu *Apc* u myszy powoduje wzrost częstotliwości występowania nowotworów przewodu pokarmowego i przyspieszenie ich progresji [38]. Ponadto mCpG stanowią preferowane miejsce reakcji tworzenia adduktów m. in. przez powszechnie występujące w środowisku kancerogeny - policykliczne węglowodory aromatyczne i lek przeciwnowotworowy - mitoksantron [40].

METYLACJA DNA W DIAGNOSTYCE I PROGNOZOWANIU ONKOLOGICZNYM; TERAPIA EPIGENETYCZNA

Zmiany metylacji DNA zachodzą na bardzo wczesnych etapach nowotworzenia, dlatego sygnał ten może służyć wczesnej diagnostyce onkologicznej. Materiał w postaci DNA nie musi pochodzić z komórek guza, gdyż wystarczy pomiar poziomu metylacji DNA pozyskanego z krwi, moczu, stolca, śliny, nasienia (w zależności od typu nowotworu) [3, 26, 41]. Nieprawidłową metylację DNA można łatwo analizować. Techniki oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) umożliwiają w niezbyt skomplikowany sposób wykrycie zmian metylacji wysp CpG towarzyszących określonym genom, a także ich sklasyfikowanie, określenie stopnia zaawansowania choroby i prognozowanie [26, 42]. Profil metylacji może pomóc w przewidywaniu zachowania komórek nowotworowych określonego pacjenta [26]. Hypermetylacja pewnych genów w określonych typach nowotworów koreluje z gorszym rokowaniem [43].

Skoro procesy związane z nieprawidłowym formowaniem aktywnych i nieaktywnych domen DNA mogą być przyczyną nieprawidłowej funkcji komórek nowotworowych, to modulacja tych procesów powinna dawać pozytywne efekty terapeutyczne. Inhibitory DNMT (DNMTi) i HDAC (HDACi) stanowią zatem nowe grupy potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Zastosowanie DNMTi powinno przywrócić ekspresję wyciszonych genów supresorowych i zdolności autoregulacyjne komórki. Działanie wspomagające powinny wykazywać HDACi. Rzeczywiście połączenie tych dwóch typów inhibitorów powoduje wzrost efektu i pozwala na redukcję dawek obu substancji [44]. Zastosowanie wyłącznie HDACi przywraca ekspresję tylko części genów. Duża gęstość metylacji chroni bowiem część sekwencji przed derepresją [23]. Jako środki demetylujące stosuje się obecnie 5-azacytydynę oraz decytabinę (5-aza-2'-deoksycytydyna). Są to analogi nukleozydów, które po przemianie w komórkach do trifosforanów, są wbudowywane do DNA podczas replikacji w fazie S cyklu komórkowego i wiążą kowalencyjnie DNMT1 prowadząc do spadku puli dostępnego enzymu do metylacji zachowawczej i w konsekwencji do demetylacji DNA [41, 42, 45, 46]. Decytabina w niskich dawkach działa demetylująco, natomiast w wyższych dawkach wykazuje działanie cytotoksyczne [41].

HDACi charakteryzują się zróżnicowaną budową chemiczną, lecz mają wspólne elementy budowy, warunkujące aktywność farmakologiczną: ugrupowanie chelatujące atom metalu, kilkuwęglowy łącznik oraz hydrofobowy fragment wiążący się powierzchniowo z HDAC. Można je podzielić na kilka grup chemicznych: kwasy hydroksamowe (np. trichostatyna A), krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe (np. kwas fenylomasłowy), benzamidy, ketony, cykliczne peptydy (np. depsyptetyd) [47]. HDACi mogą indukować proces różnicowania komórkowego, zatrzymanie wzrostu komórki, apoptozę. Apoptoza wywołana przez HDACi jest niezależna od p53 i wynika z indukcji ekspresji p21 [46, 48].

Kliniczne zastosowanie terapii epigenetycznej nie jest na razie możliwe. Obecnie stosowane DNMTi nie są specyficz-

ne wobec tego enzymu, a ich działanie przeciwnowotworowe jest przynajmniej częściowo podyktowane bezpośrednim działaniem cytotoksycznym [42, 45]. Skuteczność tych związków, jak pokazują dotychczasowe badania kliniczne, nie jest satysfakcjonująca, a ogranicza się praktycznie do nowotworów układu krwiotwórczego, guzy lite są najczęściej odporne na ich działanie [41]. Wyzwaniem dla naukowców będzie znalezienie selektywnych inhibitorów DNMT i HDAC, określenie ich skuteczności przeciwnowotworowej i opracowanie schematów ich podawania. Trzeba mieć również na uwadze fakt, że nie u wszystkich chorych stosowanie terapii epigenetycznej będzie miało sens [29]. Zatem ważną kwestią pozostanie opracowanie szybkich testów określających występowanie lub brak fenotypu metylatorowego w komórkach rakowych indywidualnego pacjenta.

Potencjalne działanie uboczne terapii epigenetycznej, wynikające z demetylacji sekwencji powtórzonych (np. rodzina Alu), transpozonów czy genów piętnowanych rodzicielsko w komórkach prawidłowych organizmu chorego na nowotwór, muszą być brane pod uwagę, jednak badania kliniczne wskazują, że nie powinny one stanowić dużego problemu, choć trudno przewidzieć, czy skutki stosowania DNMTi nie będą manifestować się z opóźnieniem. Biorąc pod uwagę wpływ hypometylacji genomu na stabilność chromosomów, można się spodziewać wystąpienia nieprawidłowości chromosomalnych po zastosowaniu azanukleozydów, jednak po terapii nie zaobserwowano żadnych wyraźnych zmian chromosomów [46]. Jakkolwiek terapia epigenetyczna sama w sobie najprawdopodobniej nie będzie dawać efektu cytotoksycznego, może służyć jako „bioczulacz” dla konwencjonalnych schematów leczenia [43].

WPLYW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH NA METYLACJĘ DNA

Na poziom metylacji DNA i jego zmiany w nowotworach w istotny sposób może wpływać podaż czynników metylujących w diecie. Donorem grup jednowęglowych do metylacji DNA jest S-adenozylometionina (SAM). W metabolizmie SAM uczestniczą: kwas foliowy, metionina, cholina, witamina B₁₂ oraz cynk. Niedobory tych składników pokarmowych prowadzą do obniżonej zdolności komórek do metylacji DNA [49, 50]. Całkowite wyłączenie z pokarmu kwasu foliowego indukuje u szczurów powstawanie nowotworów wątroby. Poprzez znaczne uszczuplenie poziomu SAM i spadek stosunku SAM do homocysteiny (SAH) dochodzi do hypometylacji genomu i aktywacji niektórych protoonkogenów. Obserwuje się wzrost poziomu mRNA dla *c-fos*, *c-Ha-ras*, *c-myc*. Do hypometylacji dochodzi pomimo wzrostu ekspresji i aktywności DNMT. Dzieje się tak dlatego, że enzym wiąże się z licznymi miejscami uszkodzeń DNA, obniżając efektywność ich naprawy i prowadzi do nieprawidłowej metylacji tych sekwencji, zaś ogranicza pulę enzymu potrzebnego do metylacji zachowawczej w widelkach replikacyjnych [37].

W eksperymentach na myszach wykazano, że poziom nośników grup metylowych w diecie ciężarnej matki wpływa istotnie na stabilną ekspresję allelu *A^{vy}* genu *agouti*, kodującego barwę sierści, u jej potomstwa. W zależności od regulacji epigenetycznej u identycznych genetycznie myszy

allel ten ulega zróżnicowanej ekspresji. Niski poziom nośników grup metylowych w diecie matek prowadzi do braku metylacji elementu kontrolnego IAP allelu *A^{vy}*, co wiąże się z powstawaniem dłuższego transkryptu. Fenotyp obejmuje występowanie żółtej barwy sierści, a także pojawienie się otyłości i cukrzycy, zwiększonej zapadalności na nowotwory i spadku żywotności u ich potomstwa. Odpowiedni poziom tych nośników gwarantował prawidłowy stopień metylacji IAP i ekspresję allelu, związaną z powstawaniem krótszego transkryptu, wyłącznie w mieszkach włosowych oraz normalny fenotyp [51]. Co więcej, samice o żółtej barwie sierści częściej niż samice o dzikim fenotypie wydawały potomstwo również o żółtej barwie sierści. Takie wyniki mogą dowodzić, że również u ludzi czynniki zewnętrzne, takie jak składniki diety mogą indukować zmiany epigenomu, których akumulacja z biegiem lat może prowadzić do przyspieszenia manifestacji objawów choroby nowotworowej, przynajmniej u genetycznie podatnych osobników [52].

Oprócz diety również inne czynniki środowiskowe mogą indukować zmiany epigenomu [53]. Dobrze udokumentowane właściwości indukcji metylacji DNA mają wirusy. Metylacja ma służyć wyciszaniu obcego genomu, lecz może rozprzestrzeniać się na przyległe do miejsca integracji wirusa obszary DNA gospodarza. Nowotwory indukowane przez wirusy, np. nowotwory wątroby indukowane HBV lub HCV rzeczywiście odznaczają się wyższym poziomem metylacji genów niż nowotwory o innej etiologii. Przynajmniej częściowo czynnikiem odpowiedzialnym może tu być również przewlekły stan zapalny [31].

EPIGENOM JAKO CEL CHEMOPREWENCJI

Chemoprewencja w przeciwieństwie do chemioterapii, to postępowanie polegające na stosowaniu naturalnych lub syntetycznych czynników w celu odwrócenia lub zahamowania procesu nowotworzenia. Taktyka ta ma na celu interwencję na możliwie najwcześniejszych etapach indukcji procesu nowotworowego poprzedzających pojawienie się klinicznej postaci nowotworu [54]. Zmiany epigenetyczne są odwracalne i zachodzą na wczesnych etapach nowotworzenia, zatem mogą stanowić dogodny cel działań chemoprewencyjnych [55]. Ze względu na fakt, że postępowanie chemoprewencyjne jest adresowane przede wszystkim do osób o zwiększonym ryzyku, które jednak nie wykazują objawów choroby, najcenniejszą grupą potencjalnych czynników chemoprewencyjnych są składniki żywności. Jednym ze składników diety, który jak wspomniano wyżej, może korygować niewłaściwą metylację DNA, jest kwas foliowy. Badania kliniczne wykazały, że dieta o dużej zawartości tej witaminy lub jej wzbogacenie na drodze suplementacji może chronić przed rakiem jelita grubego. Zrozumienie mechanizmu tego zjawiska komplikuje jednak fakt, że suplementacja kwasem foliowym obniża stopień hypometylacji DNA w śluzówce jelita, natomiast w raku jelita grubego obok ogólnej hypometylacji obserwuje się hypermetylację regionów promotorowych specyficznych genów [56, 57]. Dalsze badania w odniesieniu do specyficznych populacji uwzględniające polimorfizm genów związanych z podatnością na ten typ nowotworu powinno ułatwić poznanie tego mechanizmu. Poza kwasem foliowym, zdolność modulacji

procesów epigenetycznych wykazano także dla niektórych innych związków naturalnych np. zawartego w zielonej herbacie galusanu epigallokatechiny [58].

Syntetyczne DNMTi oraz HDACi wykazywały działanie profilaktyczne u testowanych zwierząt, jednak ich zastosowanie chemoprewencyjne u ludzi jest ze względu na poziom ich toksyczności niemożliwe. Decytabina zapobiegała u szczurów utrzymywanych na diecie ubogiej w selen, tworzeniu w jelicie grubym przedrakowych uszkodzeń (ang. *crypt foci*) indukowanych dimetylohydrazyną [59]. Z kolei decytabina i kwas fenylomasłowy stosowane łącznie zapobiegały u myszy rozwojowi nowotworów płuc [60].

Założeniem chemoprewencji jest długotrwałe podawanie czynników chemoprewencyjnych. Ponieważ nie poznano jednak do tej pory całkowicie biologii epigenomu, trudno przewidzieć efekty długotrwałego stosowania takich związków. Spodziewać się można zahamowania postępujących z wiekiem zmian metylacji DNA, które mogą wyciszać geny supresorowe np. w komórkach nabłonka jelit. Niezależnie od tego, czy zmiany epigenetyczne są zjawiskiem pierwotnym czy też wtórnym, takie postępowanie powinno przynieść realne korzyści, ponieważ zmiany te zachodzą na bardzo wczesnych etapach powstawania większości typów nowotworów, zatem ich blokada uniemożliwi utworzenie klonów komórek o wyraźnie uprzywilejowanym wzroście.

UWAGI KOŃCOWE

Współdziałanie metylacji DNA i acetylacji histonów w regulacji ekspresji genu jest w tej chwili już dobrze udokumentowane. Aby jednak w pełni zrozumieć funkcjonalne powiązanie pomiędzy tymi zjawiskami w wyciszaniu genów niezbędne są narzędzia badawcze umożliwiające równoczesne wykrycie zmian w ekspresji genu, metylacji DNA i acetylacji histonów. Takie zintegrowane podejście jest konieczne w celu identyfikacji nowych celów terapeutycznych i/ lub prewencyjnych. Badania aktualnie prowadzone w wielu ośrodkach na świecie zmierzają w tym kierunku. Niedawno opracowany [61] zintegrowany „potrójny” system mikroprocesorowy umożliwiający określanie epigenetycznej hierarchii regulacji ekspresji genu w komórkach rakowych zdaje się ten cel przybliżać.

PIŚMIENNICTWO

1. Singal R, Ginder G D (1999) DNA methylation. *Blood* 93: 4059-4070
2. Kuzmin I, Geil L (2001) DNA methylation and chromatin modifications in cancer and development. *Int Arch Biosci* 1047-1056
3. Plass C (2002) Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 11: 2479-2488
4. Strathdee G, Brown R (2002) Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Exp Rev Mol Med* 1-17
5. Zingg J-M, Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18: 869-882
6. Bestor TH (2000) Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 105: 409-411
7. Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093
8. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa J-P (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 58: 5489-5494

9. Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM (2003) Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12253-12258
10. Robertson KD (2002) DNA methylation and chromatin- unraveling the tangled web. *Oncogene* 21:5361-5379
11. Ng H-H, Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9: 158-163
12. Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* 7: 997-1007
13. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21
14. Jones PA, Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070
15. Zhanf Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343-2360
16. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1079
17. Fischle W, Wang Y, Allis D (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425: 475-479
18. Ballestar E, Wolffe AP (2001) Methyl-CpG-binding proteins. *Eur J Biochem* 268: 1-6
19. Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res* 31: 1765-1774
20. Valinluck V, Tsai H-H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC (2004) Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32: 4100-4108
21. Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15: 827-832
22. Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, Muegge K (2001) Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15: 2940-2944
23. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 22: 3157-3173
24. Goll MG, Bestor TH (2002) Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev* 16: 1739-1742
25. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31: 2305-2312
26. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10: 687-692
27. Costello JF, Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet* 38: 285-303
28. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229
29. Jones PA (1996) DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56: 2463-2467
30. El-Osta A (2004) The rise and fall of genomic methylation in cancer. *Leukemia* 18: 233-237
31. Issa J-P (2002) Epigenetic variation and human disease. *J Nutr* 132: 2388S-2392S
32. Klein CB, Su L, Bowser D, Leszczynska J (2002) Chromatin-induced epimutations in mammalian cells. *Environ Health Perspect* 110(suppl 5): 739-743
33. Moggs JG, Orphanides G (2004) The role of chromatin in molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci* 80: 218-224
34. Gilliland FD, Harms HJ, Crowell RE, Li Y-F, Willink R, Belinsky SA (2002) Glutathione S-Transferase P1 and NADPH quinone oxidoreductase polymorphisms are associated with aberrant promoter me-

- thylation of P16^{INK4a} and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in sputum. *Cancer Res* 62: 2248-2252
35. Clark SJ, Melki J (2002) DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21: 5380-5387
 36. Hake SB, Xiao A, Allis CD (2004) Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 90: 761-769
 37. James SJ, Pogribny IP, Pogribna M, Miller BJ, Jernigan S, Melnyk S (2003) Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 133: 3740S-3747S
 38. Wong E, Yang K, Kuraguchi M, Werling U, Avdievich E, Fan K, Faz-zari M, Jin B, Brown AMC, Lipkin M, Edelmann W (2002) Mbd4 inactivation increases C→T transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14937-14942
 39. Bellacosa A (2001) Role of MED1 (MBD4) gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* 187: 137-144
 40. Parker BS, Cutts SM, Phillips DR (2001) Cytosine methylation enhances mitoxantrone-DNA adduct formation at CpG dinucleotides. *J Biol Chem* 276: 15953-15960
 41. Santini V, Kantarjian HM, Issa J-P (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 134: 573-586
 42. Worm J, Guldborg P (2002) DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 31: 443-449
 43. Widschwendter M, Jones PA (2002) The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. *Clin Cancer Res* 8: 17-21
 44. Zhu W-G, Lakshmanan RR, Beal MD, Otterson GA (2001) DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* 61: 1327-1333
 45. Gilbert J, Gore SD, Herman JG, Carducci MA (2004) The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* 10: 4589-4596
 46. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463
 47. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S (2003) Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 46: 5097-5116
 48. Richon VM, O'Brien JP (2002) Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 8: 662-664
 49. Niculescu MD, Zeisel SH (2002) Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 132: 2333S-2335S
 50. Johanning GL, Heimbürger DC, Piyathilake CJ (2002) DNA methylation and diet in cancer. *J Nutr* 132: 3814S-3818S
 51. Cooney C, Dave AA, Wolff GL (2002) Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 132: 2393S-2400S
 52. Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33(suppl): 245-254
 53. Poirier LA (2002) The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 132: 2336S-2339S
 54. Baer-Dubowska W (1998) Chemoprewencja- nowa strategia w profilaktyce nowotworów, W: Koroniak H, Barciszewski J, Markiewicz WT, Ziemiński K (red) Na pograniczu chemii i biologii t.I. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 201-214
 55. Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR (2003) The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 95: 1747-1757
 56. Potter JD (1999) Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *J Natl Cancer Inst* 91: 916-932
 57. Cravo ML, Pinto AG, Chaves P (1998) Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: correlation with nutrient intake. *Clin Nutr* 17: 45-49
 58. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63: 7563-7570
 59. Davis CD, Uthus EO (2002) Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. *J Nutr* 132: 292-297
 60. Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa J-P, Herman JG, March TH, Baylin SB (2003) Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* 63: 7089-7093
 61. Shi H, Wei SH, Leu Y-W, Rahmatpanah F, Liu JC, Yan PS, Nephew KP, Huang TH-M (2003) Triple Analysis of the Cancer Epigenome: An Integrated Microarray System for Assessing Gene Expression, DNA Methylation, and Histone Acetylation. *Cancer Res* 63: 2164-2171

Epigenome and cancer: New possibilities of cancer prevention and therapy? Jarosław Paluszczak, Wanda Baer-Dubowska

Department of Pharmaceutical Biochemistry, University of Medical Sciences, 6 Grunwaldzka St., 60-780 Poznań, Poland
e-mail: baerw@amp.edu.pl

Key words: epigenome, DNA methylation, histones, cancer, chemoprevention

ABSTRACT

In recent years it became evident that epigenetic control of gene expression plays important role in the development of cancer. Epigenetic alterations occur throughout all stages of carcinogenesis, what makes them excellent targets for both chemoprevention and, at later stages, chemotherapy. Two changes integral to epigenetic transcriptional control are DNA methylation and covalent modifications of histone proteins. In cancer cells, genome-wide hypomethylation is accompanied by local DNA hypermethylation with unique patterns exhibited by each tumor type. Hypermethylation of promoter regions of classic tumor suppressor genes in human cancers is at least as common as mutation as a mechanism for their inactivation. The second major layer of epigenetic transcriptional control is modification of histone proteins, particularly their acetylation. These two ways of epigenetic control are integrally linked. In this review we summarize the current knowledge about epigenetic events related to cancer and discuss the possibility of using them as chemotherapy or chemoprevention targets.

Kinazy tyrozynowe

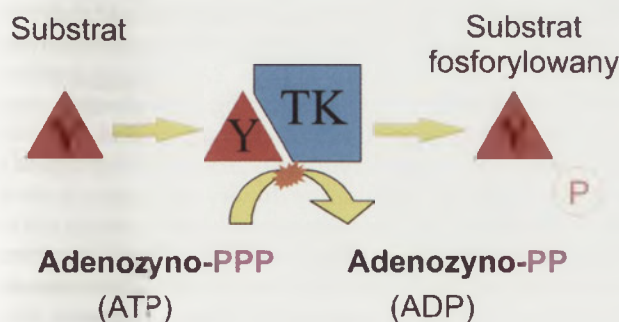
Nowy cel terapii przeciwnowotworowej

STRESZCZENIE

Badania ostatnich lat potwierdziły praktyczne zastosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych jako leków. Testy kliniczne wykazały efektywne przeciwnowotworowe właściwości Herceptyny, która jest monoklonalnym przeciwciałem dla receptora kinazy tyrozynowej Her2/neu, a także STI571, niskocząsteczkowego inhibitora kinaz BCR/ABL, c-Kit i PDGFR. Niektórym nowotworom złośliwym towarzyszy ekspresja fuzyjnych kinaz tyrozynowych, zatem ich inhibitory mogą mieć znaczenie terapeutyczne. Dla efektywnego stosowania inhibitorów w klinice konieczne jest jak najlepsze poznanie mechanizmów aktywacji kinaz tyrozynowych i ich roli w transformacji nowotworowej. Wydaje się, że wnioski wynikające z dotychczasowej wiedzy na temat roli tych enzymów w procesie nowotworzenia mogą otworzyć drogę nowym metodom terapii oraz diagnostyki wykorzystującym jako cel onkogenne formy kinaz tyrozynowych, ulegające ekspresji w różnych nowotworach złośliwych.

WPROWADZENIE

Około 20% genów człowieka koduje produkty biorące udział w przesyłaniu sygnałów w komórkach. Głównymi modulatorami tych procesów są reakcje fosforylacji/defosforylacji, w których grupa fosforanowa ulega enzymatycznemu przeniesieniu z ATP na resztę aminokwasową białka. Fosforylacja może być prowadzona przez kinazy, a defosforylacja przez fosfatazy. Dotychczas opisano ponad 500 kinaz i 150 fosfataz, wśród których odrębną klasę stanowią kinazy tyrozynowe (PTK, ang. *protein tyrosine kinases*), fosforylujące tyrozinę białka docelowego. Do tej pory poznano 90 kinaz tyrozynowych, jednak ich liczba może być większa. Kinazy tyrozynowe uczestniczą w przesyłaniu sygnałów związanych z podstawowymi funkcjami komórki w tym, ze wzrostem, podziałem, migracją, syntezą i apoptozą. Onkogenne formy kinaz tyrozynowych ulegają ekspresji w różnych nowotworach złośliwych, dlatego regulacja ich aktywności może mieć zasadnicze znaczenie w patogenezie. Ogólny mechanizm działania PTK przedstawiono na Rys. 1.



Rysunek 1. Ogólny mechanizm działania kinaz tyrozynowych. Y - fosforylowane reszty tyrozyny substratu, P - reszta fosforanowa

KINAZY TYROZYNOWE

Wszystkie kinazy tyrozynowe można podzielić na dwie grupy - transbłonowe kinazy receptorowe oraz cytoplazmatyczne kinazy niereceptorowe. Pierwszą grupę stanowią enzymy, które przekazują sygnały od receptorów

blonowych do wnętrza komórki i są zakotwiczone w błonie komórkowej przez hydrofobową domenę transbłonową. Sygnały zewnątrzkomórkowe odbierane są przez enzymy tej grupy poprzez wiązanie liganda z domeną zewnątrzkomórkową, stymulujące aktywację domeny cytoplazmatycznej. W procesie aktywacji wyróżnić można dwa podstawowe etapy, z których pierwszy polega na dimezyzacji receptorów, a w konsekwencji zmianie ich konformacji, natomiast w drugim enzym ulega autofosforylacji. Procesy te zapoczątkowują kaskadę reakcji fosforylacji, dzięki którym aktywowane są kolejne białka do momentu, aż sygnał zostanie przekazany do jądra, gdzie spowoduje ekspresję określonych genów docelowych. Receptorowe kinazy tyrozynowe zaliczyć można do następujących rodzin:

Ireneusz Majsterek

Dariusz Pytel

Janusz Błasiak

Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-250 Łódź; e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl, tel. (42) 635 44 89, faks: (42) 635 44 84

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 11 lutego 2005 r.

Słowa kluczowe: onkogenne kinazy tyrozynowe, leki przeciwnowotworowe, BCR/ABL, Her2/neu, STI571, herceptyna

Wykaz skrótów: ALL - ostra białaczka limfocytarna; CML - przewlekła białaczka szpikowa; FTKs - fuzyjne kinazy tyrozynowe; Ph - chromosom Filadelfia; PTK - kinazy tyrozynowe

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego KBN 3 P04A 032 25

- naskórkowych czynników wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor family*), do których zalicza się EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4;
- receptorów insuliny (ang. *insulin receptor family*) InsR, IGF1R, IRR;
- płytkowych czynników wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor family*): PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, Kit, Flk2;
- naczyńniowo-śródbłonowych czynników wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor family*): VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3;
- czynników wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor family*): FGFR1, FGFR2, FGR3, FGFR4
- czynników wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor receptor family*): Met, Ron, Sea;
- czynników Ret (ang. *recombined in transfection*).

Do cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych zalicza się enzymy związane z receptorami komórkowymi, a które ulegają aktywacji w wyniku przyłączenia liganda do ich receptora oraz kinazy wolne, aktywowane transportem jonów przez błonę komórkową lub podczas przejścia komórki z jednej fazy cyklu komórkowego do drugiej. Mechanizm aktywacji i działania kinaz tej grupy jest podobny do kinaz receptorowych, które mają również podobne domeny katalityczne. Każda domena katalityczna kinaz tyrozynowych ma miejsce wiązania ATP, będące donorem grup fosforanowych oraz miejsce wiążące substrat, do którego przenosi grupę fosforanową z ATP. Cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe podzielić można na następujące rodziny (klasyfikację kinaz tyrozynowych oparto o ich analizę strukturalną [1]; wykaz dotąd poznanych kinaz człowieka dostępny jest pod adresem www.kinase.com/human/kinome):

- Src, biorąca udział w mitogenezie, aktywacji kinaz MAPK, aktywacji komórek T i B, przekazywaniu sygnału przez immunoreceptory Fc, związana z receptorami PDGFR oraz EGFR;
- rodzina JAK (ang. *janus kinase*) związana z receptorami cytokin, aktywuje czynniki STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*);
- rodziny FAK, ABL, Csk, Syk/ZAP70 oraz Ack.

KINAZY TYROZYNOWE W NOWOTWORACH ZŁOŚLIWYCH

Aktywność fosforylacyjna kinaz tyrozynowych w komórce podlega ścisłej kontroli przez fosfatazy tyrozynowe, które odłączają grupy fosforanowe od kinaz oraz ich substratów, prowadząc do inaktywacji enzymu [2-4]. Jednakże istnieją mechanizmy, które pozwalają kinazom wydostać się spod tej kontroli umożliwiając ciągle przesyłanie sygnałów, na przykład do proliferacji, przez co zaburzona zostaje homeostaza komórki, a to z kolei sprzyja procesom prowadzącym do transformacji nowotworowej. Kinazy tyrozynowe mogą nabywać właściwości onkogenne, poprzez mutacje w kodujących je genach, które stają się protoonkogenami komórkowymi. W wyniku translokacji chromosomowych, geny kinaz tyrozynowych mogą ulegać fuzji z innymi, a powstające geny fuzyjne (np. *BCR/ABL*) kodują zmienione białka o najczęściej zwiększonej aktywności fosforylacyjnej

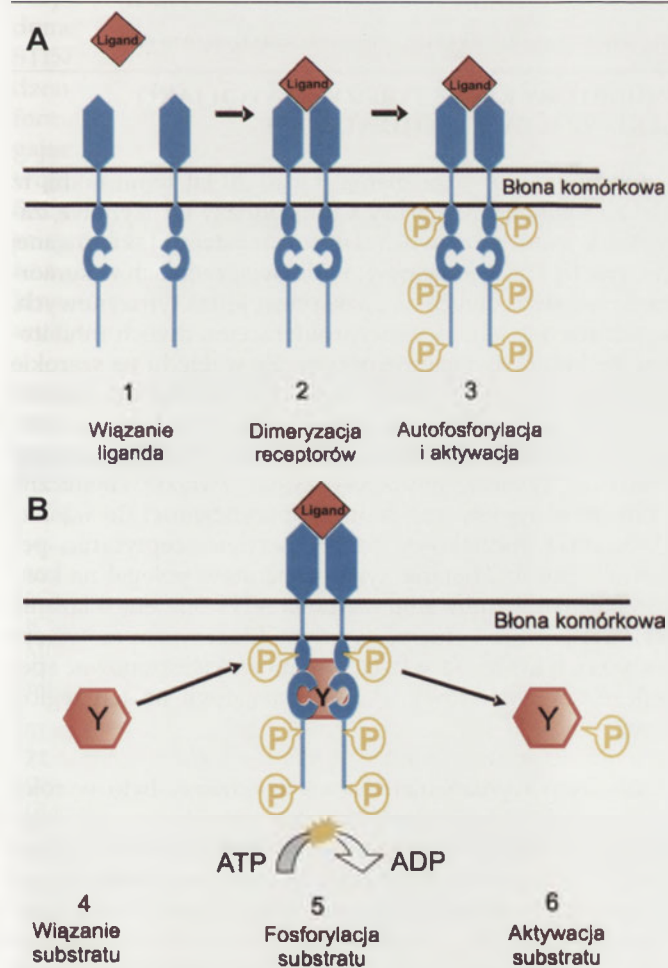
w porównaniu z kinazami typu dzikiego. Natomiast mutacje punktowe w obrębie domen zewnątrzkomórkowej, transbłonowej lub cytoplazmatycznej przyczyniają się do nabycia zdolności do dimeryzacji i/lub autofosforylacji, bez konieczności wiązania liganda z receptorem [5, 6]. Wśród kinaz tyrozynowych znajdują się białka odpowiedzialne za przemiany biochemiczne, które regulują wzrost komórek, różnicowanie oraz ich śmierć, wskazuje się również na ich udział w procesie nowotworzenia. Nowotwór może rozwijać się w procesie wieloetapowym na skutek kumulacji odziedziczonych i/lub nabytych wad w genach, których produkty regulują cykl komórkowy [7]. Kinazy tyrozynowe mogą zatem przyczyniać się do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych, rozwoju nowotworu, jego uzłośliwienia, wreszcie prowadzić mogą do metastazy bez bezpośredniej inicjacji procesu nowotworzenia. Kinazy tyrozynowe stymulują procesy angiogenezy bezpośrednio związane ze wzrostem nowotworu. Niektóre nowotwory złośliwe, przede wszystkim białaczki charakteryzują się ekspresją białek wykazujących właściwości kinaz tyrozynowych, takich jak BCR/ABL czy c-Kit. W porównaniu z komórkami prawidłowymi, białka te wykazują zwiększoną aktywność enzymatyczną, w czego wyniku w niewłaściwy sposób przejmują i przekształcają wewnątrzkomórkowe sygnały transkrypcji, proliferacji i apoptozy. Zatem zakłócają prawidłowy przebieg procesów komórkowych i tym samym przyczyniają się do powstawania fenotypu chorobowego. Wydaje się, że te specyficzne białka o aktywności kinaz tyrozynowych mogą być wykorzystane jako cel terapii przeciwnowotworowej.

ONKOGENNA AKTYWACJA KINAZ TYROZYNOWYCH

W prawidłowym szlaku aktywacji kinaz tyrozynowych, ligand wiążący się z receptorem kinazy tyrozynowej indukuje oligomeryzację receptora (Rys. 2) [8]. Zmiana konformacyjna, będąca następstwem wiązania liganda oraz dimeryzacji receptora, zapoczątkowuje wzajemne oddziaływanie pomiędzy sąsiednimi domenami cytoplazmatycznymi i aktywację kinazy tyrozynowej (Rys. 2A). Zmiany konformacyjne w receptorze wywołują mogą ligandy monomeryczne, powodując jego dimeryzację, na przykład podczas aktywacji naskórkowego czynnika wzrostu EGF lub ligandy biwalentne, które pośredniczą w dimeryzacji leżących obok siebie receptorów, tak jak w przypadku płytkowego czynnika wzrostu PDGF i jego receptora PDGFR [9-13]. Możliwa jest również heterodimeryzacja receptorów, która została potwierdzona dla transformującego czynnika wzrostu alfa, TGF α , wywołującego aktywację kinaz c-ErbB2 i EGFR [14, 15]. Aktywacja cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych może być zapoczątkowywana w odpowiedzi na sygnały pozakomórkowe, zmiany stężenia Ca²⁺ lub mitogenezę [8]. Cytoplazmatyczne kinazy JAK są aktywowane na drodze oligomeryzacji [16-19], podczas gdy aktywacja kinaz z rodziny SRC wymaga defosforylacji tyrozyny w pozycji 527 w kinazie Src oraz jej odpowiedników w innych kinazach tej rodziny [20]. Kinazy z rodziny SRC w N-końcu mają trzy domeny SH (ang. *Src homology domain*), odpowiedzialne odpowiednio za aktywność enzymatyczną (SH1), wiązanie fosfotyrozyny (SH2) i regulację aktywności enzymu (SH3) [21, 22]. W formie nieaktywnej, w kinazie Src domena SH2 wiąże się z fosforylowaną resztą tyrozyny 572 w ten sposób,

że zmiany konformacyjne utrzymują ją w bezpośrednim kontakcie z domeną SH3. Ponadto wykazano, że wiązanie SH2-SH3 hamuje autofosforylację tyrozyny w centrum aktywnym enzymu w pozycji 416 niezbędną dla utrzymania aktywnej konformacji enzymu [23]. Aktywacja zarówno receptorowych, jak i cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych inicjuje kaskadę reakcji fosforylacji obejmujących autofosforylację enzymu oraz fosforylację substratów cytoplazmatycznych i białek pomocniczych, na przykład białka adaptorowego Crk-L, specyficznego dla onkogennej formy kinazy BCR/ABL (Rys. 2B). Sygnały generowane przez kinazę mogą następnie zostać przekazane do jądra, gdzie indukowana jest ekspresja genów docelowych wywołując odpowiedź komórki, na przykład jej podział. Należy ocenić, że wzrastającemu poziomowi kinaz tyrozynowych, towarzyszyć będzie wzrost sygnałów pochodzących od inhibitorów generowanych po to, aby zapobiec stymulacji proliferacji przez aktywne kinazy.

Onkogenna aktywacja kinaz tyrozynowych zaburza proces równowagi i prowadzi do ustanowienia konstytutywnej aktywności enzymu. Proces ten może przebiegać na drodze kilku mechanizmów, które można podzielić na dwie główne kategorie [24]. Pierwsza obejmuje aktywację na drodze mutacji, które nadają stałą aktywność kinazom tyrozynowym.



Rysunek 2. Aktywacja szlaku sygnałowego kinazy tyrozynowej poprzez wiązanie ligandu. (A) Etap 1 - wiązanie ligandu, etap 2 - dimeryzacja receptorów, etap 3 - autofosforylacja enzymu. (B) Etap 4 - wiązanie substratu, etap 5 - fosforylacja substratu, etap 6 - uwolnienie substratu i aktywacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Y - fosforylowane reszty tyrozyny substratu, P - reszta fosforanowa.

Mechanizm ten prowadzi do aktywacji enzymu niezależnie od wiązania liganda i jest obserwowany dla wielu receptorowych kinaz tyrozynowych izolowanych z onkogennych wirusów zwierzęcych. Mechanizmy aktywacji mutagennej enzymu obejmować mogą translokacje chromosomalne oraz mutacje punktowe prowadzące do zmian w domenach pozakomórkowych, kompleksie wiążącym ATP oraz zmian w części katalitycznej kinazy [25-29]. Druga kategoria obejmuje szereg różnych zdarzeń, które mogą być związane z powielaniem liganda, hamowaniem przeciwnych szlaków regulacji, nadekspresją lub amplifikacją samej kinazy tyrozynowej, prowadzących do pobudzenia autokatalizacyjnej pętli podstawowego szlaku aktywacji enzymu.

AKTYWACJA PRZEZ MUTACJE

Znanych jest kilkanaście przypadków kinaz tyrozynowych ulegających ekspresji w ludzkich nowotworach złośliwych, które są aktywowane przez mutacje. Mutacje te są stosunkowo łatwe do wykrycia w porównaniu z identyfikacją zmian ekspresji enzymu. Wiele z tych mutacji zostało odkrytych podczas badań różnych postaci raka, dlatego jednocześnie stanowią przesłankę do etiologicznej roli onkogennych kinaz tyrozynowych w procesie nowotworzenia. W 1960 roku opisano pierwszą specyficzną nieprawidłowość chromosomalną nowotworów krwi związaną z obecnością chromosomu Filadelfia (Ph) jako wynik translokacji fragmentu chromosomu 22 do chromosomu 9 [t(9;22)] [30]¹. W wyniku tej translokacji następuje aktywacja protoonkogenu komórkowego *c-ABL* z chromosomu 9 poprzez połączenie go z genem *BCR* w chromosomie 22 [31, 32]. Stwierdzono, że geny tworzą funkcjonalną hybrydę *BCR/ABL* kodującą onkogenne białko mające aktywność cytozolowej kinazy tyrozynowej [33, 34]. Istnieje cała grupa onkogennych kinaz tyrozynowych aktywowanych na drodze mutacji zaliczanych ze względu na podobieństwo strukturalne do rodziny fuzyjnych kinaz tyrozynowych (ang. *fusion tyrosine kinases*, FTKs) powstających w wyniku translokacji chromosomalnych (Tabela 1). Wszystkie one wykazują podobieństwo strukturalne do *BCR/ABL*, które obejmuje N-końcowy region oligomeryzacji odpowiedzialny za konstytutywną aktywację związanych z nim C-końcowych partnerów fuzyjnych, najczęściej domen wykazujących aktywności kinaz tyrozynowych. Stwierdzono, że poziom ekspresji FTKs ma

Tabela 1. Onkogenne kinazy tyrozynowe powstające na skutek translokacji chromosomalnych oraz stowarzyszone z nimi zespoły chorobowe

Kinaza FTK	Translokacja chromosomalna	Zespół chorobowy
BCR/ABL	[t(9;22)]	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna
TEL/ABL	[t(9;12)]	przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, ostra białaczka szpikowa
TEL/JACK2	[t(9;12)]	ostra białaczka limfoblastyczna
TEL/PDGFR	[t(5;12)]	przewlekła białaczka mielomonocytoza
TEL/TLKCR(L)	[t(12;15)]	ostra białaczka szpikowa, wrodzony mezoblastyczny rak nerki
NPM/ALK	[t(2;5)]	rozległy chłoniak anaplastyczny

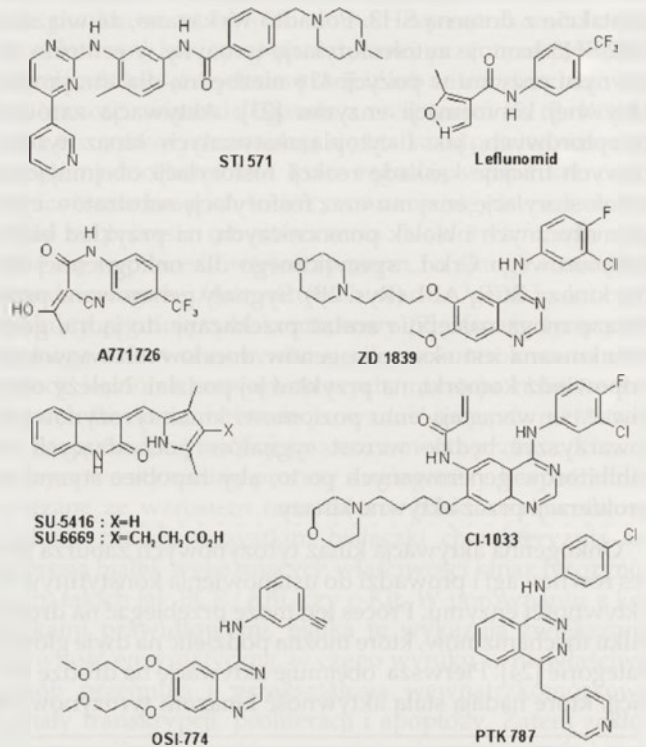
¹ Majsterek I, Błasiak J (2002) Chromosom Filadelfia. *Postępy Biochemii* 48: 156-166

zasadniczy wpływ na przebieg transformacji blastycznej w białaczkach u ludzi [35]. Onkogenne kinazy tyrozynowe takie jak: BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/TRKC(L), TEL/PDGFR oraz NPM/ALK powstające w komórkach w wyniku translokacji chromosomalnych związane są z występowaniem zarówno ostrych jak i przewlekłych białaczek szpikowych oraz chłoniaków [36, 37]. Kinazy te aktywują szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału stymulujące komórki do podziałów, chronią komórki przed apoptozą, a także indukują oporność na leki cytostatyczne oraz promieniowanie γ [38].

Mutacje punktowe obok aberracji chromosomowych są drugim potencjalnym źródłem onkogennej aktywacji kinaz tyrozynowych. Zmiany sekwencji nukleotydowej genów dla domeny transbłonowej mogą powodować niezależną od liganda aktywację kinazy, którą obserwowano w przypadku onkogennej kinazy NEU/c-erbB-2 [39, 40, 41]. Mutacje w domenie transbłonowej mogą powodować również rozszerzenie zakresu swoistości enzymu do substratów jak w przypadku v-ROS [42]. Obserwuje się także delecje w obrębie zewnątrzkomórkowych domen regulatorowych kinaz tyrozynowych, które powodują onkogenną aktywację kinaz [26]. Dodatkowo mutacje mające wpływ na negatywną regulację kinazy tyrozynowej, takie jak mutacja tyrozyny 527 kinazy SRC oraz mutacje w miejscu wiązania fosforanu, mogą prowadzić do zaburzeń regulacji enzymu i prowadzić do jego onkogennej aktywacji.

AUTOWYDZIELNICZA AKTYWACJA ENZYMU

Aktywacja autowydzielnicza polega na pobudzaniu aktywności kinaz tyrozynowych niezależnie od sygnałów komórkowych. Mechanizm ten odgrywa rolę w czasie niekontrolowanej ekspresji genów dla kinaz tyrozynowych lub nadekspresji liganda. Geny te w przypadku prawidłowej kinazy aktywowane są tylko w obecności przyłączonego liganda, lecz stymulacja autowydzielnicza doprowadza do zamknięcia pętli, w której sygnały wychodzące z kinazy są źródłem dla ekspresji jej własnych genów lub nadekspresji liganda (Rys. 3). Wykazano, że kinazy tyrozynowe zdolne są do stymulacji jądrowych czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT. Mechanizm aktywacji pętli autowydzielniczej został opisany dla kinazy EGFR (pętla EGF-EGFR) w raku piersi, pęcherza, jajników, płuc oraz mózgu, kinazy PDGFR (pętla PDGF-PDGFRb) w raku mózgu, kinazy IGF1R (pętla IGF1-IGF1R) w raku piersi, płuc oraz prostaty, a ostatnio również dla receptorowej kinazy tyrozynowej MET – czynnika wzrostu hepatocytów [35-44]. Onkogenna aktywacja kinaz może być również wynikiem modyfikacji pomocniczych szlaków regulujących, które wpływają na ich aktywność. Na przykład mutacje, które pojawiają się w negatywnych szlakach sygnałowych fosfataz, mogą doprowadzić do zaburzenia aktywności regulujących i pobudzenia autowydzielniczej pętli kinaz. Inne mechanizmy są bardziej złożone i obejmują zmiany dotyczące dostępności substratu dla receptorowych kinaz tyrozynowych lub konstytutywnej aktywacji kompleksu receptorowego połączonego z niereceptorową kinazą tyrozynową. Może to nastąpić w przypadku nadprodukcji liganda lub mutacji w obrębie receptora, a oba przypadki prowadzą do trwałej aktywacji kinazy tyrozynowej.



Rysunek 3. Struktura niektórych inhibitorów kinaz tyrozynowych.

INHIBITORY KINAZ TYROZYNOWYCH JAKO LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Od momentu rozpoznania ponad 20 lat temu faktu, iż niektóre onkogenne wirusy kodują kinazy tyrozynowe, zaczęto rozważać możliwość zastosowania terapii skierowanej przeciw tej klasie enzymów. W doświadczeniach w komórkach nowotworowych z nadekspresją kinaz tyrozynowych, wykazano właściwości antyproliferacyjne dwóch inhibitorów herbimicyny i staurosporiny. Ze względu na szerokie spektrum działania i toksyczność tych inhibitorów, prowadzącą do hamowania aktywności całych kompleksów kinaz, konieczna stała się potrzeba zwiększenia specyficzności ich działania. Wysiłki, aby wykorzystać związki chemiczne i preparaty syntetyczne o dużej specyficzności do wąskiej klasy kinaz początkowo zostały przyjęte sceptycznie, ponieważ sposób działania tych preparatów polegał na konkurencyjnym hamowaniu wiązania ATP. Domena wiązania ATP jest wysoce konserwatywnym, kluczowym motywem wszystkich kinaz. Ta właściwość może kwestionować specyficzność substratową leków działających na ten region kinaz.

Ważnym wydarzeniem w tej dziedzinie, było w roku 2001 wprowadzenie do badań klinicznych nowego leku przeciwnowotworowego o właściwościach inhibitora kinaz tyrozynowych. Lekiem tym była herceptyna, monoklonalne przeciwciało skierowane przeciw receptorowi kinazy tyrozynowej Her2/neu. Zastosowanie herceptyny w chemioterapii u pacjentek z przerzutami raka piersi, zwiększało szansę ich przeżycia. Przełomem w leczeniu białaczek stało się zastosowanie niskocząsteczkowego inhibitora STI571 dla onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL, które zrewolucjonizowało strategię terapii dla chorych z translokacją

Ph² ZD1839 był pierwszym z nowej klasy leków przeciwnowotworowych znanych jako inhibitory receptorowych kinaz tyrozynowych. ZD1839 jest inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR i obecnie stosowany jest w leczeniu raka płuc, ale trwają testy kliniczne wykorzystujące aktywność leku w terapii raka jelita grubego, raku piersi, szyi i głowy. Podsumowując należy stwierdzić, że zastosowanie inhibitorów w leczeniu nowotworów otworzyło drogę dla nowej generacji leków skierowanych przeciw onkogennym kinazom tyrozynowym. Poszukiwanie inhibitorów selektywnie oddziałujących na docelowe kinazy jest obecnie jednym z głównych kierunków badań współczesnej farmakologii klinicznej. Postęp tych badań wyznacza rosnąca liczba związków wprowadzanych do badań klinicznych (Tabela 2, Rys. 4).

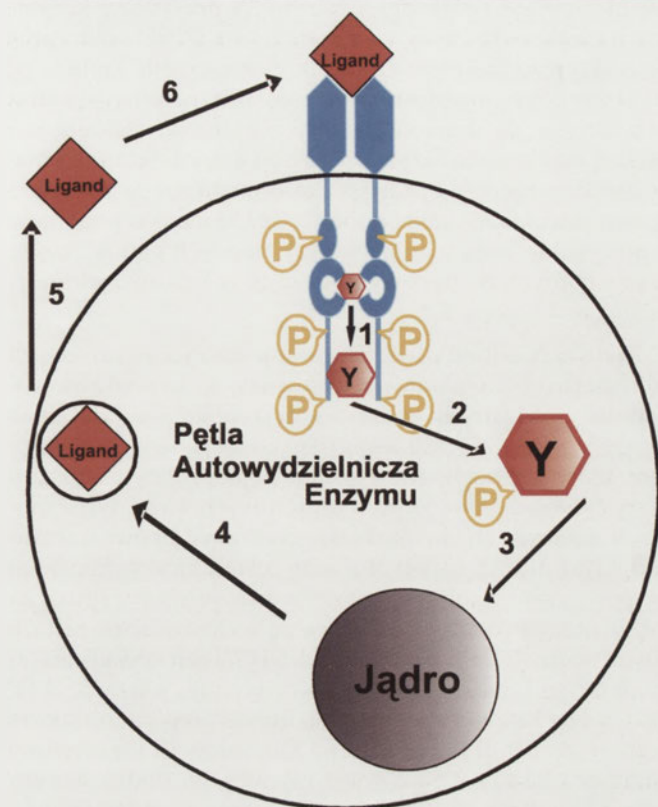
NISKOCZĄSTECZKOWE BLOKERY DOMENY ATP

Niskocząsteczkowe blokery domeny ATP są najbardziej uniwersalną grupą inhibitorów, dzięki którym udaje się wybiórczo zahamować aktywność zarówno receptorowych jak i niereceptorowych kinaz tyrozynowych (Rys. 5). Badania krystalograficzne struktury STI571 (Gleevec, Glivec, Imatinib metylase), pierwszego z testowanych klinicznie blokerów wiążącego się z kinazą c-ABL, wskazały na jego bezpośrednie oddziaływanie na wysoce konserwatywną domenę enzymu wiążącą ATP. Pod względem chemicznym STI571 jest pochodną 2-fenylaminopirymidyny. Stwierdzono, że inhibitor wiąże się preferencyjnie z nieaktywną formą konformacyjną kinazy (nieufosforylowaną), zapobiegając przez to jej autofosforylacji i aktywacji. Dzięki możliwości współzawodnictwa z cząsteczką ATP, inhibitor STI571 działa antagonistycznie poprzez fizyczne blokowanie miejsca wiążącego ATP, uniemożliwiając przenoszenie grup fosforanowych na tyrozynę substratu. Pomimo, iż wszystkie kinazy w formie aktywnej są bardzo do siebie podobne, to wykazują odmienną strukturę w konformacji nieaktywnej.

Tabela 2. Inhibitory kinaz tyrozynowych znajdujących się w fazie testów klinicznych

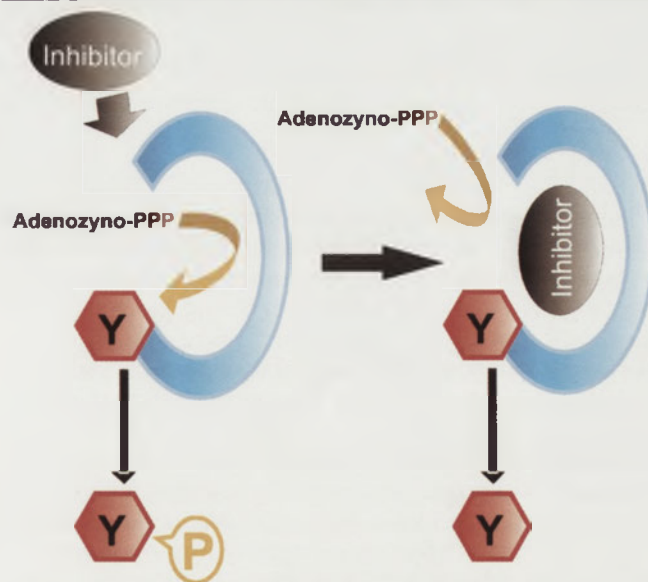
Lek	Kinaza tyrozynowa
Przeciwciała monoklonalne	
Herceptyna	Her-2/ neu (ErbB-2)
MDX-H210	Her-2/ neu (ErbB-2)
2C4	Her-2/ neu (ErbB-2)
ICM-C225	EGFR (ErbB-1)
MDX-477	EGFR (ErbB-1)
Inhibitory niskocząsteczkowe	
STI-571	ABL, c-Kit, PDGFR
ZD1839	EGFR (ErbB-1)
OSI-774	EGFR (ErbB-1)
CI-1033	EGFR, Her-2/ neu
PKI-166	EGFR, Her-2/ neu
PTK-787	VEGFR (Flk-1/ KDR)
SU5416	VEGFR (Flk-1/ KDR), PDGFR,
SU6668	FGFR
Inhibitory niespecyficzne	
Lefunomic	
A771726	

² Czechowska A, Błasiak J (2003) Inhibitor kinaz tyrozynowych STI571 – nadzieja na przełom w leczeniu białaczek. Postępy Biochem 49: 157-167



Rysunek 4. Pętla autowydzielnicza kinazy tyrozynowej. Przebieg reakcji: 1, wiązanie i fosforylacja substratu w centrum aktywnym enzymu; 2, aktywacja wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego kinazy tyrozynowej; 3, stymulacja jądrowych czynników transkrypcyjnych; 4, nadekspresja liganda dla kinazy tyrozynowej; 5, synteza i uwolnienie ligandu; 6, związanie ligandu i aktywacja kinazy tyrozynowej. Y – fosforylowane reszty tyrozyny substratu, P – reszta fosforanowa.

Różnice między konformacjami kinaz dotyczą głównie pętli aktywacyjnej. W przypadku konformacji aktywnej, pętla ta przyjmuje postać otwartą, w której jej część C-końcowa jest odsunięta od centrum katalitycznego, tworząc platformę



Rysunek 5. Hamowanie aktywności kinaz tyrozynowych poprzez blokowanie domeny wiążącej ATP. Lewa strona rysunku: kinaza tyrozynowa z centrum katalitycznym w formie aktywnej. Prawa strona rysunku: centrum katalityczne enzymu z inhibitorem, zahamowanie fosforylacji substratu i przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Y – fosforylowane reszty tyrozyny substratu, P – reszta fosforanowa

mę ułatwiającą wiązanie substratu. W przypadku konformacji nieaktywnej tworzącej kompleks z STI571, położenie pętli aktywacyjnej zmienia się tak, że część pętli, która w tej strukturze jest nieufosforylowana, przypomina substrat przyłączony do domeny katalitycznej, czego efektem jest blokowanie miejsca aktywacji. STI571 jest inhibitorem kinazy c-ABL, c-Kit oraz PDGFR β . Zastosowanie tego inhibitora spowodowało radykalną odpowiedź kliniczną u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, mających gen *BCR/ABL* oraz u chorych ze zrębowymi guzami żołądkowo-jelitowymi, mających gen *c-Kit*.

ZD1839 (Gefitinib, IRESSA), jest jednym z najnowszych biologicznych preparatów, stosowany w leczeniu nowotworów związanych z aktywnością onkogennych kinaz tyrozynowych. ZD1839 jest niskocząsteczkowym inhibitorem, który jest pochodną 4-anilinokwainazoliny i wykazuje specyficzną do grupy receptorowych kinaz tyrozynowych zaliczanych do naskórkowych czynników wzrostu EGFR (ErbB1) [42, 43, 44]. Białka te zostały zidentyfikowane na powierzchni komórek nowotworowych i przypuszcza się, że mogą być odpowiedzialne za wzrost oraz metastazę nowotworu. ZD1839 podobnie jak STI571 jest specyficznym inhibitorem kompetecyjnym, który blokuje wiązanie ATP do domeny katalitycznej enzymu. Innym preparatem specyficznym do EFGR jest testowany klinicznie (III faza testów) inhibitor OSI-774. OSI-774 jest również pochodną 4-anilinokwainazoliny, ZD1839 i OSI-774 mają ponad 100-krotnie wyższą specyficzność substratową dla ErbB1 niż ErbB2. Atom N1 kwainazoliny poprzez wiązanie wodorowe oddziałuje z azotem Met769; oddziaływanie to jest kluczowe dla wiązania ATP. W wiązaniu inhibitora biorą także udział Thr776, Gly767 i Met769 kinazy EGFR [45]. We wstępnych badaniach klinicznych przeprowadzonych na pacjentkach z rakiem jajników, podczas podawania leku zaobserwowano całkowite zahamowanie rozwoju nowotworu. Obecnie podstawowym celem jest wykazanie zdolności ZD1839 do obniżenia aktywacji szlaków sygnałowych kinazy EGFR, AKT oraz ERK. Nowe dane dostarczają dowodów skutecznego zastosowania ZD1839 w leczeniu zaawansowanego raka jelita grubego, raka płuc, piersi oraz raka szyi i głowy [46].

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

Jedną ze strategii hamowania kinaz tyrozynowych jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (mAb), które są białkami systemu odpornościowego rozpoznającymi obce antygeny i wiążące się pojedynczo z każdym z nich prowadząc do ich wyeliminowania przez system odpornościowy organizmu. Pierwszym przykładem zastosowania mAb w terapii skierowanej przeciw kinazom tyrozynowym były przeciwciała, które rozpoznają onkogen *neu* [47, 48]. Pozakomórkowe domeny receptorów stanowią unikalne struktury, co sprzyja możliwości wykorzystania wysoce specyficznych przeciwciał. Sposób działania tak skonstruowanych przeciwciał jest wielostronny i może obejmować procesy prowadzące do blokowania wiązania liganda, hamowania dimeryzacji receptora lub inicjacji procesu jego degradacji. Herceptyna jest pierwszym lekiem z grupy mAb rozpoznającym receptor Her-2/neu (ErbB2) kinazy tyrozynowej. Herceptyna stosowana jest w leczeniu raka piersi, jej

wiązanie zapobiega oligomeryzacji receptora onkogennej kinazy tyrozynowej Her-2/neu [49, 50]. Przeciwciała rozpoznaje zewnątrzkomórkowy fragment kinazy, epitopem jest C-terminalny fragment domeny IV. Nie wiadomo jaki jest dokładnie mechanizm działania Herceptyny na Her-2/neu ponieważ domena IV nie bierze bezpośrednio udziału w dimeryzacji receptora, wiadomo natomiast, że w domenie tej zlokalizowane są miejsca rozpoznawane przez metaloproteazy. Wykazano, że przecięcie domeny IV przez metaloproteazę stymuluje dimeryzację wewnątrzkomórkowych receptorów w szlaku zależnym od kinazy Her-2/neu. Być może w tym kontekście wiązanie mAb może hamować aktywność metaloproteaz i blokować sygnały pochodzące z receptora kinazy Her-2/neu [45]. IMC-C225 (cenuximab, Erbitux) jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciw innej receptorowej kinazie tyrozynowej EGF (ErbB1). IMC-C225 wiąże się z domeną receptora i blokuje wiązanie liganda. IMC-C225 znajduje się w fazie testów klinicznych w terapii raka płuc, szyi i głowy [45]. Szacuje się, że przeciwciała monoklonalne stworzone przy użyciu ludzkich genów stanowią obecnie jedną czwartą produktów opracowywanych klinicznie, dlatego najprawdopodobniej zwiastują one nową erę w medycynie.

TERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA Z ZASTOSOWANIEM INHIBITORÓW KINAZ TYROZYNOWYCH

Uzasadnienie stosowania inhibitorów onkogennych form kinaz w leczeniu raka wynika bezpośrednio z badań klinicznych. W komórkach nowotworowych bardzo często dochodzi do nadekspresji kinaz tyrozynowych jak również kinaz serynowo/treoninowych. Jednakże nadekspresja konkretnej kinazy w przypadku ludzkich nowotworów niekoniecznie musi oznaczać, że jest ona efektywnym celem dla leków. Wydaje się, że inhibitor kinazy może być skuteczny tylko wtedy, gdy zahamują aktywność, która jest istotna dla utrzymania nowotworu. Jak można zidentyfikować takie kinazy? W dwóch chorobach człowieka, w raku piersi i przewlekłej białaczce szpikowej, dwie kinazy tyrozynowe, Her-2/neu i BCR/ABL, zostały zidentyfikowane na podstawie amplifikacji genu i translokacji chromosomalnej [50, 51]. Fakt, że do zaburzeń dochodzi na poziomie DNA dowodzi, iż są to zmiany pierwszorzędowe, które mają zasadnicze znaczenie w procesie inicjacji transformacji nowotworowej. Ostatnie badania kliniczne nad inhibitorami tych kinaz dostarczyły dowodów, iż ich aktywność jest również niezbędna do podtrzymania fenotypu nowotworowego w fazie progresji.

TERAPIA Z ZASTOSOWANIEM PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH W LECZENIU RAKA PIERSI

Onkogenne białko Her-2/neu (znane również jako ErbB-2) spokrewnione z rodziną receptorów EGFR po raz pierwszy zostało zidentyfikowane, jako czynnik transformujący w neuroblastomie szczurów. U człowieka gen Her-2/neu jest obecny w około jednej trzeciej przypadkach raka piersi i jest wyznacznikiem przeżywalności [52]. Nadekspresja Her-2/neu w modelu *in vitro* prowadzi do utworzenia heterodimeru z innymi białkami rodziny ErbB, co prowadzi do nabycia konstytutywnej aktywności kinazy tyrozynowej oraz inicjacji transformacji nowotworowej komórek. Wyka-

ziano, że ekspresja aktywnego allelu Her-2/neu w tkance nabłonkowej gruczołu piersiowego myszy transgenicznych wywołuje rozwój raka piersi [53]. Badania wykorzystujące Her-2/neu jako cel leków przeciwnowotworowych skupiały się wokół poszukiwania pozakomórkowych domen specyficznych dla przeciwciał monoklonalnych [47, 54-56]. Ostateczne testy kliniczne wykazały, że leczenie z zastosowaniem Herceptyny połączone z chemioterapią przedłuża okres życia kobiet z rakiem piersi z onkogenem Her-2/neu [57]. Połączona terapia Herceptyną z inhibitorem ZD1839 dla kinazy EGFR (ErbB1) spowodowała przedłużenie okresu życia średnio do 1 roku, u pacjentek z nawracającymi przerzutami raka piersi, u których zawiodło leczenie z zastosowaniem silnych chemioterapeutyków. W roku 2001 Herceptyna została wprowadzona na listę leków posiadających certyfikat FDA.

TERAPIA Z ZASTOSOWANIEM NISKOCZĄSTECZKOWYCH INHIBITORÓW KINAZ W LECZENIU BIAŁACZEK I RAKA PŁUC

Onkogenowa kinaza BCR/ABL wykrywana jest w aż 95% przypadków przewlekłej białaczki szpikowej (CML; ang. *chronic myeloid leukemia*). Translokacje typu BCR/ABL mogą różnić się punktem pęknięcia w BCR, a powstałe geny fuzyjne kodują białka różnych wielkości od 180 do 230 kDa [36, 58-60] identyfikowane dodatkowo w około 5% ostrej białaczki limfocytarnej (ALL; ang. *acute lymphoblastic leukemia*) u dzieci i 15-25% ALL u dorosłych. CML rozpoczyna się fazą ostrą charakteryzującą się przekroczeniem prawidłowego poziomu dojrzałych komórek szpikowych, stan ten rozwija się przez okres 4 do 5 lat i przechodzi w fazę nieuleczalną choroby zwaną kryzysem blastycznym (ang. *blast crisis*). BCR/ABL ulega ekspresji przez cały okres choroby, natomiast komórki charakterystyczne dla fazy nieuleczalnej kryzysu blastycznego zawierają dodatkowe wielokrotne cytogenetyczne i molekularne nieprawidłowości. STI571 (ang. *signal transduction inhibitor 571*) jest niskocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej odkrytym w trakcie badań preparatów hamujących kinazę białkową C. Po dodatkowych analizach, które zainicjowały w roku 1999 fazę testów klinicznych stwierdzono, że przy użyciu STI571 można również zahamować produkty protoonkogenów *c-ABL* i *c-Kit* z niewielką aktywnością przeciw dużej grupie innych kinaz tyrozynowych i serynowo/treoninowych [61]. W fazie testów klinicznych przebadano prawie 1000 pacjentów. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że STI571 hamuje wzrost komórek z ekspresją BCR/ABL, w niewielkim stopniu wpływając na komórki prawidłowe [61, 62]. Niezwykle istotne było, że u prawie wszystkich pacjentów w fazie przewlekłej CML inhibitor STI571 wykazywał minimalną toksyczność w dawkach wystarczających, aby zablokować aktywność enzymatyczną BCR/ABL [63-67]. STI571 w rekordowym, jak na standardowe procedury tempie został w roku 2001 zatwierdzony przez FDA i obecnie w dawkach 400 mg/dzień jest pierwszorzędnym lekiem stosowanym z wyboru w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej u pacjentów z chromosomem Ph.

Onkogen EGFR (ErbB1) należy do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych, które zostały zidentyfikowane na powierzchni komórek nowotworowych i jest skojarzony

z rakiem piersi, jąder, jajników, płuc oraz mózgu. ZD1839 jest pierwszym preparatem z nowej klasy niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz stosowanych w terapii, której celem jest blokowanie naskórkowego czynnika wzrostu EGFR. ZD1839 jest preparatem biologicznych, stosowanym doustnie i dobrze tolerowanym przez pacjentów [46, 47]. Zastosowanie kliniczne zostało poprzedzone badaniami przeprowadzonymi na 216 pacjentach z rakiem płuc i średni czas trwania odpowiedzi wynosi 7 miesięcy. ZD1839 został zatwierdzony w Australii oraz Japonii, a w 2003 roku uzyskał certyfikat FDA w USA, stosuje się go doustnie, raz dziennie jako 250 mg tabletkę. Na początku roku 2004 ZD1839 został zatwierdzony również jako lek w Europie. Stosowany jest jako trzecia seria terapii u pacjentów z miejscowo zaawansowanym rakiem płuc po chemioterapii [44]. W badaniach klinicznych u pacjentów, u których nie było żadnej dostępnej opcji leczenia ZD1839 spowodował zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych i stabilizację choroby. Ponieważ ZD1839 działa docelowo na kinazy tyrozynowe, efekty uboczne są mniej dotkliwe i osłabiające organizm niż w przypadku chemioterapii. Obecnie prowadzone są dalsze badania umożliwiające użycie tego rodzaju terapii do leczenia innych odmian nowotworów w tym: raka jelita grubego, raka piersi oraz mózgu.

OPORNOŚĆ NA INHIBITORY KINAZ TYROZYNOWYCH

Wraz z upowszechnieniem się STI571 jak leku przeciwbiałaczkowego pojawiły się nowe problemy związane z nabywaniem oporności. U pacjentów CML z chromosomem Filadelfia, w fazie kryzysu blastycznego zaobserwowano uaktywnienie się BCR/ABL pomimo leczenia z zastosowaniem STI571. Ostatnie badania pacjentów, u których zaobserwowano nawrót choroby dowodzą, iż BCR/ABL odgrywa krytyczną rolę w rozwoju nowotworu nawet w bardzo późnych stadiach choroby, dlatego oporność na STI571 stanowi poważny kryzys terapii przeciwnowotworowej. U tych pacjentów zidentyfikowane zostały dwa mechanizmy oporności na STI571: amplifikacja genu BCR/ABL oraz mutacje w domenie enzymu odpowiedzialnej za wiązanie ATP [68-69]. Ostatnie badania pokazały, że pewne mutacje w domenie wiążącej ATP mogą powodować konformacyjne zmiany w onkogenym białku BCR/ABL, które utrudniają jego oddziaływanie z inhibitorem STI571 i prowadzą do oporności [62, 70]. Niektóre mutacje powodują całkowite zahamowanie wiązania się STI571 do domeny ATP, inne mogą prowadzić tylko do częściowej utraty specyficzności substratowej do inhibitora [63, 71]. W takim przypadku, aby przełamać oporność na działanie inhibitora stosuje się kilka metod: zwiększenie dawki lub połączenie z tradycyjnymi chemioterapeutykami, poszukuje się alternatywnych inhibitorów BCR/ABL lub inhibitorów innych kinaz tyrozynowych aktywowanych przez BCR/ABL, wreszcie stosuje się strategię antysensową dla mRNA BCR/ABL [66]. Ważne jest jednak aby zrozumieć, że metody te różnią się zasadniczo skutecznością, która zazwyczaj zależy od mechanizmu prowadzącego do nabycia oporności.

Identyfikacja całkowitej liczby możliwych mechanizmów oporności na inhibitory wymaga dodatkowych badań, pewne jest jednak to, że mutacje są charakterystyczne dla pacjentów będących w zaawansowanym stadium choroby. Te

odkrycia nasuwają kilka ważnych pytań. Dlaczego powstają te mutacje? Jakie dodatkowe posunięcia kliniczne trzeba podjąć, aby zahamować nawrót choroby? Opracowany model wskazuje na to, iż w późnym stadium CML komórki są genetycznie niestabilne i akumulują mutacje podczas postępującego rozwoju choroby. Leczenie z zastosowaniem STI571 wykorzystuje skuteczną selekcję alleli lekoopornych dlatego ważnym zagadnieniem w przyszłości, które może zadecydować o wyborze inhibitora, będzie odpowiedź na pytanie, czy mutacje te mogą występować u pacjentów we wczesnym stadium choroby nowotworowej.

INŻYNIERIA INHIBITORÓW KINAZ TYROZYNOWYCH, NOWE STRATEGIE W LECZENIU NOWOTWORÓW

W przeciągu ostatnich lat dokonał się istotny przełom w badaniach nad molekularnymi mechanizmami aktywacji szlaku przemian BCR/ABL, jednej z najlepiej poznanych onkogennych kinaz tyrozynowych. BCR/ABL wywołuje oporność na tradycyjne leki stosowane w leczeniu białaczek stymulując mechanizmy naprawy DNA [59]. Jednocześnie STI571 uczyła komórki, w których zachodzi ekspresja BCR/ABL na działanie leków genotoksycznych uszkadzających strukturę DNA [72]. Te odkrycia przyczyniły się do zastosowania nowej strategii w leczeniu białaczek, która ma na celu stworzenie leku posiadającego jednocześnie właściwości uszkodzenia DNA oraz bezpośredniego hamowania kinazy BCR/ABL. Ten rodzaj terapii określanej jako „combi target” jest nowym podejściem do ukierunkowanej inżynierii blokerów kinaz tyrozynowych przez co możliwe byłoby zwiększenie „siły” przeciwnowotworowej leków z tej grupy [73]. Synteza pojedynczych takich inhibitorów w przypadkach nabywania oporności na STI571 mogłaby być alternatywą dla efektywnego leczenia CML. Pierwszym związkiem z grupy nowych inhibitorów jest 3-metylo-1,2,3-triazen (ZRCM5) [69]. ZRCM5 należy do grupy triazenów, wcześniej używanych już w leczeniu wielu nowotworów, w tym: raka mózgu, białaczek oraz czerniaków. Mechanizm działania tej grupy leków polega na wytwarzaniu, w toku przemian metabolicznych alkilowanej pochodnej diazonu, która powoduje podstawienie guaniny w DNA w pozycjach O6 i N7 [73]. Dwuskładnikowy kompleks ZRCM5 oparty jest na strukturze cząsteczki 2-fenylaminopirymidyny (podobnie jak w STI571), która blokuje kinazę BCR/ABL, ale która zawiera dodatkowo triazenowy łańcuch przekształcany w procesie hydrolizy do metyldiazonu i zdolny uszkadzać DNA. W ten sposób ZRCM5 posiada właściwość równoczesnego hamowania aktywności kinazy BCR/ABL oraz blokowania (a co najmniej spowalniania) procesów naprawy DNA i w ten sposób przyczynia się do niszczenia komórek białaczkowych.

Wydaje się, że łączenie ZRCM5 z inhibitorem STI571 w leczeniu pacjentów z ekspresją BCR/ABL może przynieść wysoce obiecujące skutki, szczególnie w przypadkach, gdy w fazie kryzysu blastycznego wymagana jest terapia wyniszczająca [74]. Obecnie trwają badania *in vitro*, które mają na celu wykazanie aktywności ZRCM5 jako samodzielnego blokera. Zastosowanie strategii „combi target” może stać się odpowiedzią na zjawisko nabywania oporności w leczeniu z zastosowaniem tradycyjnych inhibitorów dla onkogen-

nych form kinaz tyrozynowych spotykanych w różnych formach raka.

UWAGI KOŃCOWE

Herceptyna, STI571 oraz ZD1839 są przykładem inhibitorów kinaz tyrozynowych, których potencjalne, szerokie zastosowanie w leczeniu różnych odmian nowotworów jest wielkim wyzwaniem współczesnej medycyny. Wysoce specyficzna aktywność tych leków, która ogranicza się do nowotworów uwarunkowanych zmianami genetycznymi w poszczególnych kinazach stanowi ogromną przewagę leczenia nad ogólnie wyniszczającymi, ze względu na skutki uboczne, metodami stosowanymi w chemio- i radioterapii. Niezaprzeczalny kliniczny „sukces” STI571 w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej zrewolucjonizował nasze pojęcie o molekularnych podłożach chorób nowotworowych. Wydaje się, że inne postaci raka mogą być podobnie hamowane przy użyciu specyficznych inhibitorów, wcześniej należy jednak rozpoznać docelowe kinazy tyrozynowe zaangażowane w ich patogenezę.

PIŚMIENNICTWO:

1. Hubbard, SR (1999) Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 343-358
2. Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236
3. Tonks NK, Neel BG (1996) From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 87: 365-368
4. Matozaki T, Kasuga M (1996) Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signalling. *Cell Signal* 8: 13-19
5. Czechowska A, Blasiak J (2003) Inhibitor kinaz tyrozynowych STI-571 - nadzieja na przełom w leczeniu białaczek? *Post Biochem* 49: 157-167
6. Kolibaba KS, Druker BJ (1997) Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1333: 217-248
7. Varmus HE (1985) Viruses, genes, and cancer. I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia. *Cancer* 55: 2324-2328.
8. Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223
9. Yarden Y, Schlessinger J (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26: 1443-1451
10. Greenfield C, Hils I, Waterfield MD, Frederwisch M, Wollmer A, Blundell TL, McDonald N (1989) Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J* 8: 4115-4123
11. Hurwitz DR, Emanuel SL, Nathan MH, Sarver N, Ullrich A, Felder S, Lax I, Schlessinger J (1991) EGF induces increased ligand binding affinity and dimerization of soluble epidermal growth factor (EGF) receptor extracellular domain. *J Biol Chem* 266: 22035-22043
12. Lax I, Mitra AK, Ravera C, Hurwitz DR, Rubinstein M, Ullrich A, Stround RM, Schlessinger J (1991) Epidermal growth factor (EGF) induces oligomerization of soluble, extracellular, ligand-binding domain of EGF receptor. A low resolution projection structure of the ligand-binding domain. *J Biol Chem* 266: 13828-13833
13. Heldin CH, Erlund A, Rorsman C, Ronnsrand L (1989) Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem* 264: 8905-8912
14. Goldman R, Ben Levy R, Peles E, Yarden Y (1990) Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry* 29: 11024-11028

15. Wada T, Qian X, Greene MI (1990) Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell* 61: 1339-1347
16. Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212
17. Cooper J (1994) Membrane-associated tyrosine kinases as molecular switches. *Semin Cell Biol* 5: 377-387
18. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* 19: 222-227
19. Ihle JN, Kerr IM (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11: 69-74
20. Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231: 1431-1434
21. Taylor SJ, Shalloway D (1993) The cell cycle and c-Src. *Curr Opin Genet Dev* 3: 26-34
22. Cooper JA, Howell B (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* 73: 1051-1054
23. Young M.A, Gonfloni S, Superti-Furga G, Roux B, Kuriyan J (2001) Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-Terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105: 115
24. Rodrigues GA, Park M (1994) Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curry Opin Genet Dev* 4: 15-24
25. Ullrich A, Coussens L, HAYflick J.S, Dull T.J, Gray A, Tam A.W, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield M.D, Seeburg P.H (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425
26. Besmer P, Lader E, George PC, Bergold PJ, Qiu .H, Zuckerman EE, Hardy WD (1986) A new acute transforming feline retrovirus with fms homology specifies a C-terminally truncated version of the c-fms protein that is different from SM-feline sarcoma virus v-fms protein. *J Virol* 60: 194-203
27. Smith DR, Vogt PK, Hayman MJ (1989) The v-sea oncogene of avian erythroblastosis retrovirus S13: another member of the protein-tyrosine kinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5291-5295
28. Wetters TVD, Hawkins SA, Roussel MF, Sherr CJ (1992) Random mutagenesis of CSF-1 receptor (FMS) reveals multiple sites for activating mutations within the extracellular domain. *EMBO J* 11: 551-557
29. Shu HK, Pelley RJ, Kung HJ (1990) Tissue-specific transformation by epidermal growth factor receptor: a single point mutation within the ATP-binding pocket of the erbB product increases its intrinsic kinase activity and activates its sarcomagenic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9103-9107
30. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038-42
31. Raitano AB, Whang YE, Sawyers CL (1997) Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* 1333: 201-216
32. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG (1994) Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77: 307-316
33. Gambacorti-Passerini C, Piazza R, D'Incalci M (2003) Bcr-Abl mutations, resistance to imatinib, and imatinib plasma levels. *Blood* 102: 1933-1934
34. Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato Di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M et al (2001) Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 358: 1421-1423.
35. Di Cristofano A, Pandolfi PP (200) The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100: 387-390
36. Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T (2001) BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs resulting in drug resistance. *Mol Cell* 8: 795-806
37. Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR (2001) Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293: 2163
38. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross NC, Linkesch W, Druker BJ, Hehlmann R et al (2001) Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293: 2163
39. Bargmann CI, Weinberg RA (1988) Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J* 2043-2052
40. Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI (1989) A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339: 230-231.
41. Zong CS, Ponn B, Chen J, Wang LH (1993) Molecular and biochemical bases for activation of the transforming potential of the proto-oncogene c-ros. *J Virol* 67: 6453-6462
42. McDonough SK, Larsen S, Brodey RS, Stock ND, Hardy Jr WD (1971) A transmissible feline fibrosarcoma of viral origin. *Cancer Res* 31: 953-956
43. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y et al (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 21: 2237-2246
44. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H, Rowinski EK (2002) ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 20: 2240-2250
45. Roskoski RA Jr. (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1-11
46. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61: 8887-95
47. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelso tyrosine kinase. *Science* 289: 1938-1942
48. Drebin JA, Link VC, Stern DF, Weiberg RA, Greene MI (1985) Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41: 695-706
49. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26: 60-70
50. Clynes RA, Towers TI, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6: 443-446
51. Press MF, Jones LA, Godolphin W, Edwards CL, Salomon DJ (1990) Her-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res* 354A: 209-221
52. Sawyers CL (1999) Chronic myeloid leukemia. *N Engl j Med* 340: 1330-1340
53. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mcguire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER - 2/neu oncogene. *Science* 235: 177 - 182
54. Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P (1989) Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 57: 931-936
55. Drebin JA, Link VC, Weinberg RA, Greene MI (1986) Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9129-9133
56. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J et al (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2

- monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14: 737-744
57. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G et al (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648
 58. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs V, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M et al (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792
 59. Majsterek I, Blasiak J, Mlynarski W, Hoser G, Skorski T (2002) Does the bcr/abl-mediated increase in the efficacy of DNA repair play a role in the drug resistance of cancer cells? *Cell Biol Int* 26: 363-370
 60. Hoser G, Majsterek I, Romana DL, Slupianek A, Blasiak J, Skorski T (2003) Fusion oncogenic tyrosine kinases alter DNA damage and repair after genotoxic treatment: role in drug resistance? *Leukemia Res* 27: 267-273
 61. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB (1996) Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56: 100-104
 62. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-566
 63. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-1037
 64. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038-1042
 65. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette RL, Rao N, Sawyers CL (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293: 876-880
 66. Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR (2001) Roots of clinical resistance to STI571 cancer resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293: 2163
 67. Azam M, Latek RR, Daley GQ (2003) Mechanisms of autoinhibition and STI-571/Imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112: 831-843
 68. Gambacorti-Passerini C, Piazza R, D'Incalci M (2003) Bcr-Abl mutations, resistance to imatinib, and imatinib plasma levels. *Blood* 102: 1933-934
 69. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, Furukawa Y (2001) In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97: 1999-2007
 70. Qiyu Q, Dudouit F, Matheson SL, Brahini F, Banerjee R, McNamee JP, Jean-Claude BJ (2003) The combi-targeting concept: a novel 3,3-disubstituted nitrosourea with EGFR tyrosine kinase inhibitory properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 1-10
 71. Matheson S, McNamee J, Jean-Claude BJ (2001) Design of a chimeric 3-methyl-1,2,3-triazene with mixed receptor tyrosine kinase and DNA damaging properties: a novel tumor targeting strategy. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 832-840
 72. Newlands ES, Stevens MFG, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23: 35-61
 73. Yoshida C, Melo JV (2004) Biology of chronic myeloid leukemia and possible therapeutic approaches to imatinib-resistant disease. *Int J Hematol* 79: 420-433
 74. Thiesing JT, Ohno-Jones J, Kolibaba KS, Druker BJ (2000) Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other anti-leukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood* 96: 3195-3199

Tyrosine kinases

New target of anticancer therapy

Ireneusz Majsterek, Dariusz Pytel, Janusz Błasiak 

Department of Molecular Genetics, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

e-mail januszbl@biol.uni.lodz.pl

Key words: oncogenic tyrosine kinases, anticancer drugs, BCR/ABL, Her2/neu, STI571, herceptin

ABSTRACT

Recently, clinical studies of new drugs development to target specific forms of cancer were reported. Herceptin, a monoclonal antibody against the Her2/neu receptor tyrosine kinase, prolonged the survival of women with Her2/neu positive metastatic breast cancer. STI571, a small molecule inhibitor of the BCR/ABL, c-Kit and platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase, produced pronounced clinical responses in patients with BCR/ABL positive chronic myeloid leukemia and c-Kit positive gastrointestinal stromal tumors. In order to consider the use of the inhibitor of tyrosine kinases activity as anticancer drug, their mechanisms of the oncogenic activation and their impact on tumor transformation should be studied. The treatment with tyrosine kinase inhibitors such as STI571 or herceptin was a spectacular clinical success which stimulated research on the structure and function of both kinases and their inhibitors.

Białka HMGA i ich geny jako potencjalne biomarkery nowotworowe

STRESZCZENIE

Białka HMGA kodowane przez geny *HMGA* mają zdolność wiązania się z regionami promotorowymi genów, bogatymi w sekwencje AT, powodując wzmocnienie lub wyciszenie ekspresji tych genów. W stanie normy w organizmach dorosłych białka HMGA występują w niewielkich ilościach. Wzrost ich stężenia obserwuje się w trakcie embriogenezy. Wysoki poziom ekspresji białek HMGA wydaje się charakteryzować fenotyp nowotworowy, zarówno spontaniczne jak i doświadczalne nowotwory złośliwe, co wiąże się ze złym prognozowaniem i może być symptomem powstawania przerzutów. Ekspresja genów *HMGA* może być także znacznikiem progresji nowotworu. Prowadzone badania nad terapią genową nowotworów, opartą na zablokowaniu syntezy białka HMGA przy użyciu wektorów wirusowych z genem kodującym to białko w orientacji antysensowej, jak również nad nową grupą leków przeciwnowotworowych działających poprzez tworzenie kowalencyjnego wiązania krzyżowego pomiędzy DNA i białkiem HMGA, wskazują na możliwość wykorzystania tych genów i ich białkowych produktów jako celu terapii przeciwnowotworowej.

WPROWADZENIE - BIAŁKA HMGA I ICH GENY

Białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (HMG) należą do jednej z największych i najlepiej scharakteryzowanych grup niehistonowych białek chromatynowych. Cechami charakterystycznymi tych białek są możliwość ekstrakcji z jąder lub chromatyny komórek eukariotycznych w obecności 0.35 M NaCl, rozpuszczalność w 5% kwasie nadchlorowym lub trichlorooctowym, wysoka zawartość obdarzonych ładunkiem reszt polarnych aminokwasów, masa cząsteczkowa mniejsza niż 30 kDa [1]. Białka te dzieli się na trzy rodziny HMGA, HMGB i HMGN (Tabela 1).

Tabela 1. Nazewnictwo białek i genów rodziny HMG

Białko - nowe nazewnictwo	Białko - stare nazewnictwo	Gen - nowe nazewnictwo
Białka HMGA		
HMGA1a	HMG-1, HMGI, HMG I HMG-1/Y, a-protein	<i>HMGA1</i> Hmga1
HMGA1b	HMG-Y, HMGY, HMG Y	<i>HMGA1</i> Hmga1
HMGA1c	HMG-I/R	<i>HMGA1</i> Hmga1
HMGA2	HMGI-C	<i>HMGA2</i> Hmga2
Białka HMGB		
HMGB1	HMG1, HMG-1, HMG 1 (ang. <i>amphoterin</i>)	<i>HMGB1</i> Hmgb1
HMGB2	HMG2, HMG-2, HMG 2	<i>HMGB2</i> Hmgb2
HMGB3	HMG2a, HMG-2a, HMG 2a (HMG-4)	<i>HMGB3</i> Hmgb3
Białka HMGN		
HMGN1	HMG-14, HMG14, HMG 14	<i>HMGN1</i> Hmgn1
HMGN2	HMG-17, HMG17, HMG 17	<i>HMGN2</i> Hmgn2
HMGN3	Trip7	<i>HMGN3</i> Hmgn3
HMGN3a		<i>HMGN3</i> Hmgn3
HMGN4		<i>HMGN4</i>

Dane zaczerpnięto ze strony internetowej <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/genefamilies/hmgfamily.shtml>

Ewa Balcerczak¹

Mariusz Balcerczak^{1,2}

Marek Mirowski^{1,2,3}

¹Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny

²Oddział Chirurgii Ogólnej NZOZ w Łęczycy

³Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź; e-mail: mirowski@ich.pharm.am.lodz.pl, tel./faks: (42) 677 91 30

Artykuł otrzymano 22 października 2004 r.
Artykuł zaakceptowano 20 stycznia 2005 r.

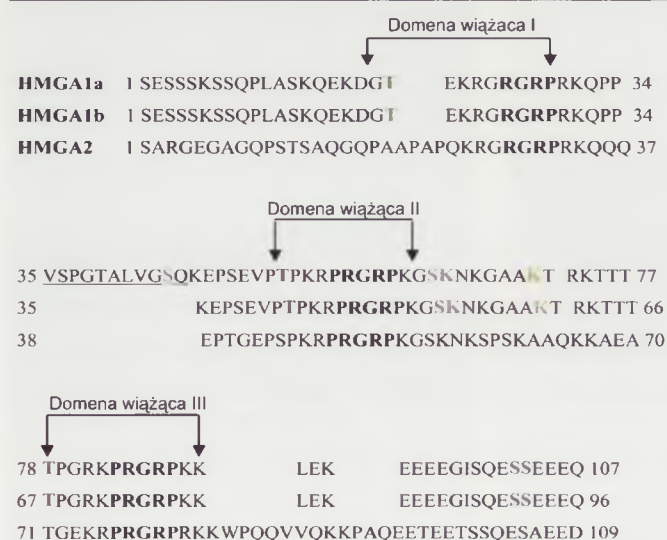
Słowa kluczowe: białka HMGA, geny HMGA

Wykaz skrótów: HMG (ang. *high mobility group proteins*) – białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej; HMGA – rodzina białek HMG kodowanych przez geny HMGA

Podziękowania: Praca finansowana ze środków tematu własnego 502-13-334 oraz statutowego 503-315-2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Autorzy dziękują Panu prof. Ryszardowi Wierzbickiemu za cenne merytoryczne wskazówki w trakcie redagowania pracy

W skład rodziny HMGA wchodzi cztery białka, HMGA-1a, HMGA1b, HMGA1c i HMGA2. Białko HMGA1a (11.9 kDa) składa się ze 107 reszt aminokwasowych. Białko HMGA1b (10.6 kDa) różni się od niego wewnętrzną delecją 11 reszt aminokwasowych, a białko HMGA1c (19.7 kDa) zbudowane jest ze 179 reszt aminokwasowych [2]. Wymienione białka są produktem różnicowego cięcia i składania transkryptu kodującego je genu *HMGA1* [3] zlokalizowanego na chromosomie 6 [4]. Białko HMGA2 o masie cząsteczkowej 12 kDa, składające się ze 109 reszt aminokwasowych z charakterystyczną dla HMGA1b delecją, wykazuje ponad 50% homologię sekwencji aminokwasowej z białkami HMGA1a i HMGA1b głównie w obrębie domen wiążących DNA. Kodowane jest ono przez gen *HMGA2* zlokalizowany na chromosomie 12 [3]. Cechą charakterystyczną białek HMGA jest występowanie trzech niezależnych domen wiążących DNA (ang. *AT-hook*), poprzez które białka te wiążą się z mniejszą bruzdą helisy DNA bogatej w sekwencje AT (4 - 6 pz). Każda z nich zawiera wysoce konserwatywną sekwencję palindromową **P-R-G-R-P** (R-G-R-P motyw niezmienny), która stanowi jej rdzeń otoczony przez inne dodatnio naładowane reszty aminokwasowe [5] (Rys. 1).

Struktura białek HMGA ulega modyfikacji po połączeniu z innymi cząsteczkami (DNA, białko). Domeny wiążące po asocjacji z DNA przyjmują płaską strukturę. Takie zachowanie domeny umożliwiła centralnie ulokowana glicyna i występowanie reszt prolinowych w konformacji *trans* [5-7]. Ścisłe dopasowanie obu połączonych struktur stabilizowane jest przez wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Białka HMGA nie wiążą się z jednakowym powinowactwem do wszystkich odcinków DNA bogatych w sekwencje AT, co pozwala sądzić, że rozpoznają one raczej strukturę niż sekwencję odcinka DNA, z którym się wiążą [5-7]. Konsekwencją wiązania białek HMGA z DNA jest zmiana ich struktury oraz indukcja



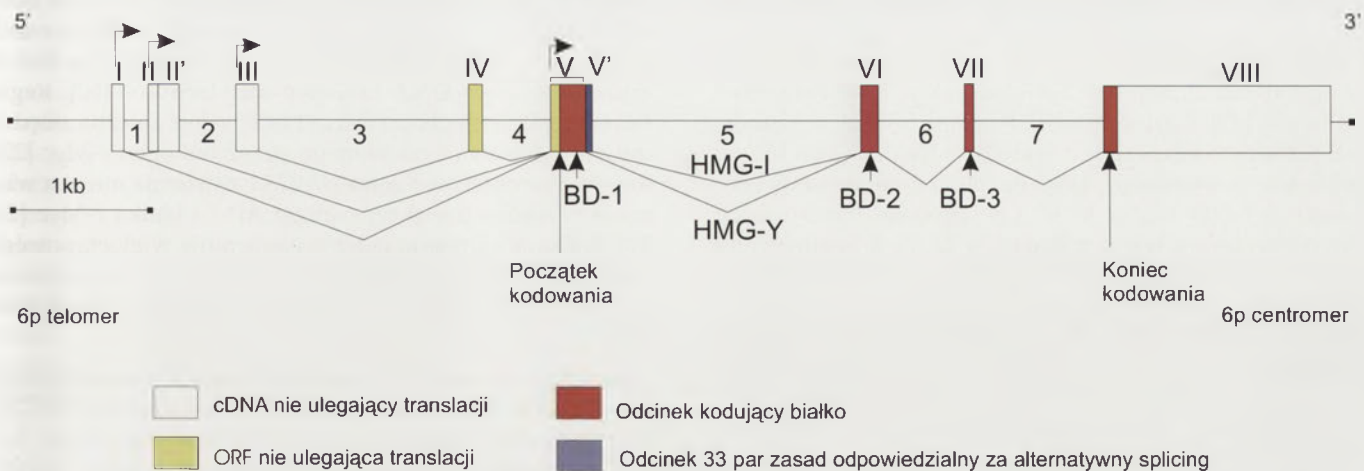
Rysunek 1. Sekwencje aminokwasowe białek HMGA1a, HMGA1b i HMGA2. Klamry ograniczone strzałkami oznaczają fragmenty białek tworzące domeny wiążące DNA (ang. *AT-hooks*). Podkreśleniem zaznaczono 11 aminokwasowy odcinek, którego brak jest cechą różniącą białka HMGA1a i HMGA1b. Miejsca fosforylacji białek HMGA1a i HMGA1b *in vivo* zależne od kinazy cdc2 oznaczono kolorem czerwonym, zależne od kinazy CK2 kolorem niebieskim, a zależne od kinazy PKC kolorem zielonym. Miejsca acetylacji zależne od acetylotransferazy CBP zaznaczono kolorem różowym, a zależne od P/CAF kolorem żółtym [80].

zmian strukturalnych w związanym odcinku kwasu nukleinowego. Zmiany te obejmują prostowanie, zginanie, rozwijanie i tworzenie pętli w odcinkach DNA. Mogą one być wynikiem: wiązania cząsteczki białka HMGA z odległymi regionami tej samej cząsteczki DNA, kooperacyjnego i/lub równoczesnego wiązania wielu cząsteczek białek HMGA do określonego regionu tej samej cząsteczki DNA, wiązania różnych cząsteczek DNA przez określoną cząsteczkę HMGA [8-10]. Ilość i rodzaj zmian struktury DNA może zależeć od stężenia białek HMGA.

Białka HMGA należą do najintensywniej potranslacyjnie modyfikowanych białek jądrowych. Modyfikacje te obejmują fosforylację, acetylację, metylację i poli-ADP-rybozylację. Zachodzą one w odpowiedzi na różne sygnały wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe, czego konsekwencją jest zmiana ich biologicznych właściwości. Przykładem jest zależna od cyklu komórkowego fosforylacja treonin w pozycji 53 i 78 powodująca ponad dwudziestokrotne zmniejszenie powinowactwa białek HMGA1 względem odcinków DNA bogatych w sekwencje AT [11-13].

Gen kodujący białka HMGA1a, HMGA1b i HMGA1c, zlokalizowany na ramieniu krótkim chromosomu 6 (6p21) ma długość 10 144 pz. Składa się z 7 intronów, 8 eksonów i ma 4 miejsca promotorowe/wzmacniające i 4 miejsca startu transkrypcji [2, 3]. Ujawnia złożony mechanizm różnicowego cięcia i składania pierwotnego transkryptu mRNA, czego wynikiem jest obecność trzech wymienionych wyżej izoform białkowych (Rys. 2). Natomiast znacznie dłuższy gen kodujący białko HMGA2 (ok. 37000 pz), zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 12 (12q15) składa się z 4 intronów i 5 eksonów i ma tylko jedno miejsce promotorowe/wzmacniające i jedno miejsce startu transkrypcji [4] (Rys. 3). Również w przypadku tego genu wykryto różnicowe cięcie i składanie mRNA [14, 15]. Cechą charakterystyczną obu genów jest kodowanie trzech domen wiążących DNA i odcinka C-terminalnego przez oddzielne eksony (eksony 5,6,7 - domeny wiążące, ekson 8 - odcinek C terminalny w genie *HMGA1* oraz odpowiednio 2,3,4 i 5 w genie *HMGA2*). Transkrypcja genu *HMGA1* może rozpoczynać się w czterech różnych miejscach zależnie od typu komórki i czynnika ją stymulującego. Wzrasta ona po stymulacji transformującym czynnikiem wzrostu alfa [16], czynnikiem wzrostu fibroblastów i płytek krwi [17], interleukiną-1beta, endotoksyną [18], estrami forbolu [19], kwasem retinowym [20], niedotlenieniem [21] a także czynnikiem transkrypcyjnymi AP-1 i onkogenem c-Myc [22]. Część z nich stymuluje również ekspresję genu *HMGA2*. W kontroli ekspresji tych genów bierze udział wiele czynników, co tłumaczyć może różnorodność mechanizmów prowadzących do zaburzeń koekspresji tych genów. Geny te mogą ulegać również rearanżacjom, występującym najczęściej w genie *HMGA2* ze względu na znacząco długą jego trzeciego intronu (ok. 25000 pz) [23].

Białka HMGA odgrywają w komórkach m.in. rolę tzw. architektonicznych czynników transkrypcyjnych, które biorą udział w pozytywnej i negatywnej regulacji transkrypcji genów eukariotycznych. Rejony promotorowe tych genów zawierają szereg sekwencji AT funkcjonujących jak „kod paskowy” odczytywany przez białka HMGA. Umożliwia



Rysunek 2. Struktura genu *HMGA1* człowieka. Cyframi rzymskimi oznaczono eksony, cyframi arabskimi oznaczono introny. Zakrzywione strzałki wskazują różne miejsca startu transkrypcji, linie łączące poszczególne eksony pokazują różne wzory różnicowego cięcia i składania [80].

to oddziaływanie tych białek z DNA i indukowanie w nich zmian konformacyjnych, a także bezpośrednio oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, z którymi tworzą kompleksy. Szczegóły tworzenia tych kompleksów poznano w badaniach nad indukowaną wirusem transkrypcją genu kodującego interferon beta człowieka. Wykazano w nich tworzenie zbudowanego z wielu podjednostek kompleksu z DNA, służącego jako stereospecyficzna platforma dla polimerazy RNA i innych czynników niezbędnych w inicjacji transkrypcji [24-26]. Poznano wiele czynników, z którymi oddziałują białka HMGA. Należą do nich czynniki transkrypcyjne (AP-1, ATF-2, c-Jun, NF- κ B, Elf-1, Oct-1, Pu-1, RNF-4, SRF) i czynniki regulatorowe (IRF-1, C/EBP β , NF-AT, NF-Y) [27]. Czynniki te oddziałują z różnymi rejonami w cząsteczce białka. Rejon taki zawsze zawiera część lub całość jednej lub kilku domen wiążących DNA oraz resztę aminokwasową, która ulega fosforylacji, acetylacji lub metylacji, co pozwala na regulację powinowactwa tych białek do DNA [27].

Regulacja transkrypcji genów z udziałem białek HMGA może również odbywać się poprzez bezpośrednie oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, czego konsekwencją jest zmiana trójwymiarowej struktury tych czynników i wzrost ich powinowactwa do DNA [28-30]. Poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi białka HMGA biorą udział w regulacji aktywności wielu genów, np. selektyny E [31], interferonu beta [32], COX-2 [21], TNF- β [33], IL-2 [34], leptyny [35] i receptora insulinowego [36]. Białka HMGA mogą również hamować aktywność genów, np. ge-

nów kodujących interleukinę 4 człowieka [37], a także genu kodującego łańcuch epsilon embrionalnej immunoglobuliny G myszy [38]. Działania te można wytłumaczyć wiązaniem się białek w rejonach promotorowych lub w ich pobliżu i blokowaniem tworzenia kompleksów białkowych, które wpływają na transkrypcję i ekspresję genu. Regulacja aktywności genów przez białka HMGA może wynikać z ich wpływu na strukturę chromatyny. Białka te są zaangażowane w utrzymaniu chromosomu mitotycznego i uczestniczą w różnych aspektach kondensacji chromatyny [39]. Obecnie postuluje się dwa różne, ale nie wykluczające się mechanizmy regulacji transkrypcji genów poprzez wpływ na strukturę chromatyny. Pierwszy z nich obejmuje działanie antyrepresorowe białka HMGA1, polegające na blokowaniu wiązania lub usuwaniu już związanego histonu H1 z bogatymi w sekwencje AT rejonami SAR, co powoduje aktywację nieczynnych pętli chromatynowych [40]. Podobna do opisanego wydaje się być regulacja transkrypcji zależna od sekwencji wzmacniających, warunkowana wpływem HMGA1 na topologię DNA [10]. Drugi z mechanizmów obejmuje przekształcenie cząsteczki nukleosomu blokującego miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, czego konsekwencją jest uaktywnienie tych miejsc [27].

BIAŁKA HMGA W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH EX VIVO I NOWOTWORACH DOŚWIADCZALNYCH

Ekspresja genu *HMGA* jest wysoka w tkankach embrjonalnych, które nie uległy jeszcze zróżnicowaniu [41], co świadczy o ich zaangażowaniu w procesy kontroli wzrostu i różnicowania komórek. W zróżnicowanych komórkach



Rysunek 3. Struktura genu *HMGA2* człowieka. Cyframi rzymskimi oznaczono eksony, cyframi arabskimi oznaczono introny. Zakrzywiona strzałka wskazuje miejsce startu transkrypcji [80].

somatycznych jest natomiast bardzo niska (na granicy czułości metody pomiarowej). Wysoki poziom ekspresji wydaje się być cechą charakterystyczną fenotypu nowotworowego spontanicznych i doświadczalnych nowotworów złośliwych [42]. Poziom produktu genu *HMGA* w komórkach transformowanych jest wysoki i niezależny od tempa proliferacji komórkowej [43]. Bezpośrednie dowody potwierdzające rolę białek *HMGA* w procesie transformacji nowotworowej pochodzą z badań, w których analizowano wpływ transgenów kodujących pełne lub skrócone formy białek *HMGA* na fenotyp komórki. Wykazano w nich, że ekspresja zarówno pełnej długości [22, 44], jak i skróconych bądź chimerycznych [45] białek *HMGA*, powoduje niezakotwiczony wzrost komórek w płynnym agarze, co jest wczesną oznaką transformacji nowotworowej. Ponadto, transfekowane genem *HMGA* nieinwazyjne komórki raka prostaty wykazują zwiększoną szybkość proliferacji i inwazyjność [46]. Wprowadzenie do organizmu bezgranicznych myszy zmodyfikowanych fibroblastów szczura i komórek MCF-7 z nadekspresją pełnej długości białek *HMGA1* indukuje rozwój guzów złośliwych i tworzenie przerzutów odległych [44]. Wygenerowanie transgenicznych myszy z genem *HMGA1* wprowadzonym do komórek limfoidalnych indukuje rozwój agresywnego i przeszczepialnego chłoniaka [47]. Zablockowanie syntezy białek *HMGA2* w komórkach tarczycy szczura hamuje transformację nowotworową [48]. Dokładniejszy wgląd w mechanizmy biorące udział w procesie nowotworzenia z zaangażowaniem białek *HMGA1* uzyskano w badaniach komórek MCF-7 raka piersi człowieka, do których wprowadzono wektory plazmidowe z sekwencjami kodującymi białka *HMGA1a* i *HMGA1b* znajdujące się pod kontrolą promotora zależnego od tetracykliny. Komórki wykazujące nadekspresję, zarówno białek *HMGA1a* jak i *HMGA1b*, były zdolne do niezakotwiczonego wzrostu w płynnym agarze, jednakże nie wykazywały podobnej tumorogenności *in vivo*. Izofорма *HMGA1b* była efektywniejsza w tworzeniu pierwotnych i przerzutowych guzów niż izofорма *HMGA1a* [44]. Dane te sugerują, że za stwierdzone różnice odpowiada rejon o długości 11 reszt aminokwasowych, różniący oba białka. Dodatkowo różnice te mogą być spowodowane m.in. częściej występującymi modyfikacjami potranslacyjnymi białka *HMGA1b*. Potwierdza to również, oparta o mikromacierze cDNA, porównawcza analiza profilu ekspresji genów modulowanych zwiększonymi poziomami tych białek. Białka *HMGA1a* i *HMGA1b* wpływają na zmianę ekspresji wielu genów w podobny sposób, powodując jej wzrost bądź też obniżenie. Jednakże na szereg innych genów białka te działają w sposób zróżnicowany. Geny, wrażliwe na nadekspresję białek *HMGA1* są odpowiedzialne za transdukcję sygnałów, proliferację komórkową, inwazję, migrację, indukcję angiogenezy i kolonizację. Szczególną rolę wydaje się pełnić w tym procesie indukcja szlaków zależnych od integryny [44].

Udział białek *HMGA* w procesie transformacji nowotworowej wydaje się bezsporny, lecz sama ich nadekspresja i powodowane przez nią zmiany profilu ekspresji wielu genów nie są wystarczające do zmiany fenotypu komórki. Wykazano, że ekspresja genu *HMGA2* nie jest konieczna do transformacji nowotworowej komórek tarczycy *in vivo* [49]. Nadekspresja białek *HMGA1* prowadzi do zmian w regulacji cyklu komórkowego polegających na przyspieszeniu

wejścia w fazę S i opóźnieniu przejścia z fazy G2 do M. Konsekwencją tego jest skierowanie prawidłowych komórek tarczycy na drogę apoptozy, do czego niezbędne są trzecia domena wiążąca DNA i miejsce acetylacji K60 [50]. Regulacja transkrypcji genu *HMGA1 in vivo* jest zależna między innymi od białka kodowanego przez onkogen *c-Myc* [22]. Rejony promotorowe genu *HMGA1* zawierają miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego AP-1 i białka *c-Myc* [22, 51]. Białka te stanowią jeden z elementów wieloetapowego ciągu zdarzeń prowadzącego do transformacji nowotworowej, co pozwoliło zaliczyć gen *HMGA* do grupy onkogenów [47].

Badania prowadzone w ostatnich latach zwracają uwagę na znaczenie modyfikacji potranslacyjnych białka *HMGA1* w określaniu fizjologicznego i fenotypowego stanu komórek. Wzrost acetylacji i metylacji reszt lizyny i arginy w białku *HMGA1* raka piersi jest typowy dla komórek o silnym potencjale przerzutowania [52]. Wzrost metylacji białka *HMGA1* komórek nowotworowych towarzyszy procesowi programowanej ich śmierci. Metylacja w cząsteczce białka *HMGA1* ulega arginina znajdująca się pomiędzy dwiema resztami glicyny. Sekwencja taka występuje w jednej z trzech domen wiążących DNA [53]. Wykazano również związek pomiędzy stopniem fosforylacji białka *HMGA1* a procesem apoptozy [54]. Wysoki stopień fosforylacji (przynajmniej 5 reszt fosforanowych na cząsteczkę *HMGA1*) przeciwdziała wiązaniu tego białka z DNA i powoduje rozluźnienie struktury chromatyny. Z kolei, defosforylacja (jedna reszta fosforanowa lub jej zupełny brak na cząsteczkę *HMGA1*) prowadzi do kondensacji chromatyny i tworzenia ciał apoptotycznych.

BIAŁKA *HMGA* W CHOROBACH NOWOTWOROWYCH CZŁOWIEKA

Obecność białek *HMGA* zaobserwowano w różnych postaciach nowotworu tarczycy [55-57]. U pacjentów, u których zdiagnozowano łagodne nowotwory tarczycy, poziom ekspresji genu *HMGA* i zawartość białek *HMGA* były znacząco niższe niż w nowotworach złośliwych. Stosując technikę RT-PCR we wszystkich badanych pooperacyjnych skrawkach raków brodawkowatych tarczycy stwierdzono ekspresję genu *HMGA* [56]. Odsetek tkanek wykazujących w badaniach immunochemicznych obecność jego produktu był tylko nieznacznie niższy (96%). Badania z zastosowaniem techniki RT-PCR wykazały ekspresję genu *HMGA1* we wszystkich przebadanych pooperacyjnych skrawkach tkankowych raka pęcherzykowego tarczycy. W tkankach, które zostały sklasyfikowane jako łagodne nowotwory pęcherzykowe, nie stwierdzono ekspresji tego genu. U tych pacjentów oznaczono dodatkowo ekspresję genu *HMGA1* we krwi pobranej przed zabiegiem chirurgicznym, stwierdzając w większości przypadków raka pęcherzykowego (83%) jego ekspresję [58].

Ekspresję genu *HMGA1* na poziomie mRNA i białka zaobserwowano także w różnych postaciach raka jelita grubego, znacznie niższą w gruczolakowatych polipach, a brak w prawidłowej śluzówce jelita [59-61]. Wykazano zależność pomiędzy poziomem białka *HMGA1* a parametrami kliniczno-patologicznymi (głębokością naciekania guza,

przerzutami do węzłów chłonnych, zajęciem naczyń krwionośnych), co wiąże się ze złą prognozą dla pacjentów [62]. W 63% przypadków stwierdzono ekspresję genu *HMGA1* w pooperacyjnych tkankach raka jelita grubego [63]. Dane te wskazują, że ekspresja genu *HMGA1* nie zawsze towarzyszy tej chorobie. Wykazano jednak istotną statystycznie zależność pomiędzy ekspresją genu *HMGA1* a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych. Zależność tę potwierdzono w badaniach poziomu ekspresji genu *HMGA1* techniką PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) [64]. Powyższe dane świadczą o zaangażowaniu genów *HMGA* w mechanizmy związane z powstawaniem przerzutów. Spostrzeżenie to może być ważne diagnostycznie. Pacjenci, u których stwierdzono ekspresję genu *HMGA1* a nie wykryto przerzutów odległych, powinni być poddani bardziej wnikliwym badaniom zmierzającym do poszukiwania mikroognisk przerzutowania.

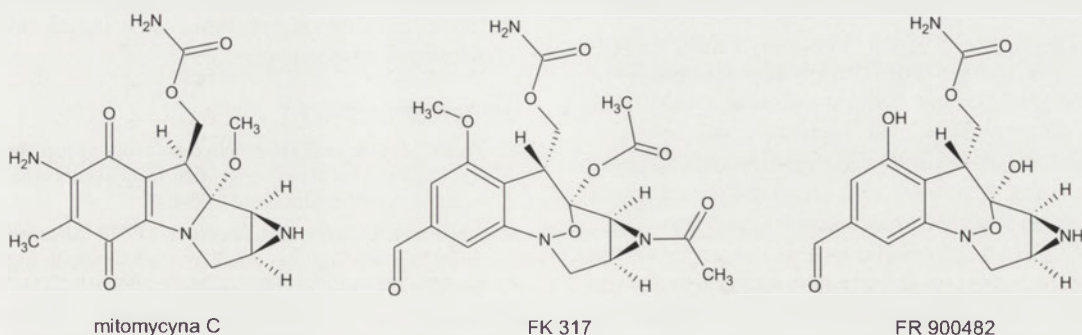
Wzrost poziomu białek *HMGA* w porównaniu z materiałem kontrolnym stwierdzono również w niektórych liniach komórkowych raka piersi [65], m.in. w komórkach MDA-MB-231 raka piersi o silnej zdolności przerzutowania [66]. Badając reakcję immunochemiczną dla białka *HMGA* w pierwotnych rakach piersi stwierdzono, że w badanej grupie 170 przypadków była ona zróżnicowana [67]: silna w 14.1%, umiarkowana w 24,7% i słaba w 25.3% przypadków. Pozostałe przypadki (35.9%) nie wykazywały reakcji z przeciwciałem anti-*HMGA*. Pozytywna reakcja immunochemiczna była obserwowana we wszystkich typach histologicznych raka piersi z wyjątkiem inwazyjnego raka brodawkowego oraz raka sitowego. Analiza statystyczna wykazała wysoki stopień pozytywnej korelacji pomiędzy zaawansowaniem nowotworu a ekspresją białek *HMGA1*. Ponadto, wykazano udział białka *HMGA1* w procesie regulacji transkrypcji genu *BRCA1* w agresywnym sporadycznym raku piersi [68], polegającym na wiązaniu białka z promotorem anty-onkogenu, co może wyjaśniać drastyczne obniżenie ekspresji genu *BRCA1*.

W badaniach histologicznych z użyciem przeciwciał anti-*HMGA1* wykazano, że w przypadkach wewnątrzprzewodowego śluzobrodawkowego guza trzustki dodatnia reakcja była ograniczona do przypadków wykazujących cechy wzrostu o charakterze inwazyjnym [69]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku raka jajnika [70]. Silna reakcja towarzyszyła pierwotnym gruczolakorakom jajnika,

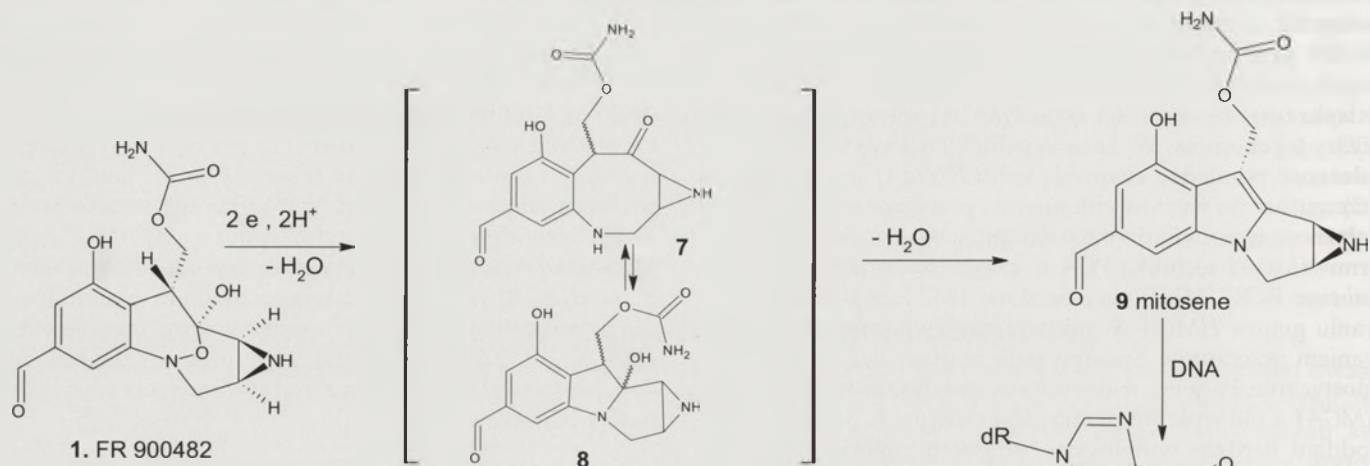
słaba nowotworom o potencjalnie niskiej złośliwości, a jej brak był typowy dla powierzchni zdrowego nabłonka jajnika. Wzrost ekspresji genu *HMGA1* stwierdzono techniką mikromacierzy DNA w raku drobnokomórkowym płuc (SSC) w porównaniu z prawidłową tkanką [71]. Technika mikromacierzy DNA posłużyła również do określenia różnic w ekspresji genów w rakach w porównaniu z prawidłową śluzówką żołądka. Wśród genów wykazujących zwiększoną ekspresję zidentyfikowano m. in. *HMGA1* [72]. Mikromacierze oligonukleotydowe umożliwiły wskazanie genu *HMGA1* jako molekularnego markera przerzutowania w raku wątroby [73]. Ponadto zwiększoną ekspresję *HMGA1/HMGA1* opisano także dla raków szyjki macicy [74], prostaty [75], nerwiaka zarodkowego [20] i wszystkich typów białaczek [76].

HMGA/HMGA POTENCJALNYM CELEM TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Występowanie nadekspresji genu *HMGA* w wielu typach nowotworów w połączeniu z faktem, że komórki szczerzej tarzycy z zablokowaną ekspresją białka *HMGA2* są odporne na transformujące działanie wirusów onkogennych [48], dało podstawę do podjęcia prób terapii antynowotworowej. Przy udziale wektora wirusowego, zawierającego gen *HMGA1* w orientacji antysensowej, uzyskano zahamowanie wzrostu i śmierć komórek linii ARO i FBI wywodzących się z anaplastycznego raka tarczycy człowieka, SW620, LoVo i GEO z raka jelita grubego człowieka, A549 i H1355 z raka płuc oraz MCF-7 i MDA468 z raka piersi. Uzyskano również znaczącą redukcję masy guza nowotworowego indukowanego u bezgranicznych myszy komórkami ARO [77]. Udział białek *HMGA* w regulacji transkrypcji różnych genów eukariotycznych, poprzez oddziaływanie z ich regionami promotorowymi zawierającymi sekwencje AT, pozwala na opracowanie nowej grupy leków przeciwnowotworowych, działających poprzez tworzenie kowalencyjnego wiązania krzyżowego pomiędzy DNA a białkiem *HMGA* [78, 79]. Do takich związków, będących w fazie badań klinicznych, należą m. in. FR 900482 i FK 317, które zalicza się do rodziny antybiotyków przecinowotworowych o strukturze podobnej do mitomycyny C (Rys. 4). Są one uznane za proleki, aktywowane *in vivo* poprzez dwuelektronową redukcję wiązania N-O w obecności śladowych ilości jonów Fe^{2+} . Powstająca w ten sposób grupa ketonowa (7) ulega procesowi szybkiej cyklizacji (8) w trakcie którego eliminowana



Rysunek 4. Struktura chemiczna mitomycyny i potencjalnych proleków przeciwnowotworowych nowej generacji FK 317 i FR 900482 aktywowanych w komórce nowotworowej [78, 79].



Rysunek 5. Mechanizm redukcyjnej aktywacji związku FR 900482 i sposób indukowania wiązań krzyżowych z DNA [78 i 79].

jest cząsteczką wody i powstaje wysoce reaktywna forma elektrofilowa związku (9), która tworzy wiązania krzyżowe z DNA (10) (Rys. 5).

Związek FK 317 jest zmodyfikowaną chemicznie pochodną FR 900482 (Rys. 4). Modyfikacja polega na wprowadzeniu grupy metylowej i dwóch grup acetylowych, które ułatwiają przenikanie FK 317 przez błonę komórkową. Grupy metylowe są usuwane w komórce. Pozostająca reszta metylowa stanowi jedyną różnicę pomiędzy aktywnymi formami tych związków. Prolek FR 900482 powoduje powstanie groźnego efektu ubocznego objawiającego się przeciekaniem naczyń, który jest prawdopodobnie wywołany przez indukcję procesu nekrozy w komórkach. Bezpieczniejszym i efektywniejszym lekiem przeciwnowotworowym wydaje się być FK 317. Komórki traktowane niskimi stężeniami tego związku również ulegają nekrozie, ale przy wyższych stężeniach są eliminowane na drodze apoptozy. Eliminacja grup acetylowych z FK 317 po wnikięciu do wnętrza komórki powoduje, że związek ten nie może być substratem glikoproteiny P. Proces aktywacji stymulowany jest również niedoborem tlenu. Powszechnie uznany fakt występowania niedotlenienia guza nowotworowego dodatkowo sprzyja kumulacji tego leku w komórkach docelowych.

PODSUMOWANIE

Ocena ekspresji genu *HMGA* może być przydatna w diagnostyce onkologicznej. Aktywność tego genu może być markerem progresji nowotworu. Korelacja ekspresji genu *HMGA* z niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi sugeruje potencjalnie złe rokowanie dla pacjentów z ekspresją/nadekspresją tego genu. Wskazuje się na związek pomiędzy ekspresją genu *HMGA* a procesem formowania przerzutów. Można wysunąć hipotezę, że u chorych, u których nie stwierdzono zajęcia węzłów chłonnych i przerzutów odległych, a u których wykryto badaniem molekularnym ekspresję genu *HMGA*, mogą występować mikroprzerzuty prowadzące do nawrotów choroby po radykalnym w założeniu leczeniu chirurgicznym. Zważywszy na fakt, że komórki z potencjałem do zasiedlania i namnażania w odległych miejscach mogą pojawić się już we wczesnych stadiach roz-

woju nowotworu, kiedy postępowaniem rutynowym jest tylko leczenie operacyjne, określenie prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów w indywidualnych przypadkach jest niezwykle ważne dla podjęcia decyzji terapeutycznych o wdrożeniu lub zaniechaniu terapii adjuwantowej. Wykrycie ekspresji genu *HMGA* u pacjentów bez przerzutów do węzłów i przerzutów odległych może wskazywać na potrzebę zastosowania takiej terapii w grupach chorych, u których nie jest ona rutynowo stosowana. Prowadzone badania nad terapią genową nowotworów opartą na zablokowaniu syntezy białka *HMGA* przy użyciu wektorów wirusowych z genem *HMGA1* w orientacji antysensowej, jak również nad nową grupą leków przeciwnowotworowych działających poprzez tworzenie kowalencyjnego wiązania krzyżowego pomiędzy DNA i białkiem *HMGA*, wskazują na możliwość wykorzystania tych białek jako celu terapii przeciwnowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

- Bustin M, Reeves R (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35-100
- Johnson KR, Lehn DA, Reeves R (1989) Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol Cell Biol* 9: 2114-2123
- Friedmann M, Holth LT, Zoghbi HY, Reeves R (1993) Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res* 21: 4259-4267

4. Chau KY, Patel UA, Lee KL, Lam HY, Crane-Robinson C (1995) The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element. *Nucleic Acids Res* 23: 4262-4266
5. Salomon M, Strauss F, Varshavsky A (1986) A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A-T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1276-1280
6. Reeves R, Nissen MS (1990) The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins: a novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265: 8573-8582
7. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, Clore GM (1997) The solution structure of an HMG-(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4: 657-665
8. Falvo JV, Thanos D, Maniatis T (1995) Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* 83: 1101-1111
9. Chase MB, Haga SB, Hankins WD, Williams DM, Bi Z, Strovel JW, Obriecht C, Berg PE (1999) Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in silencer of the human beta-globin gene. *Am J Hematol* 60: 27-35
10. Bagga R, Michalowski S, Sabinis R, Griffith JD, Emerson BM (2000) HMGI/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res* 28: 2541-2550
11. Nissen MS, Langan T, Reeves R (1991) Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J Biol Chem* 266: 19945-19952
12. Reeves R, Langan TA, Nissen MS (1991) Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1671-1675
13. Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* 2: 457-467
14. Hauke S, Rippe V, Bullerdiek J (2001) Chromosomal rearrangements leading to abnormal splicing within intron 4 of HMGIC? *Genes Chromosomes Cancer* 30: 302-304
15. Kurose K, Mine N, Iida A, Nagai H, Harada H, Araki T, Emi M (2001) Three aberrant splicing variants of the HMGIC gene transcribed in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 212-217
16. Ram TG, Reeves R, Hosick HL (1993) Elevated high mobility group-I(Y) gene expression is associated with progressive transformation of mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 53: 2655-2660
17. Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D (1992) Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol* 12: 3919-3929
18. Pellacani A, Chin MT, Wiesel P, Ibanez M, Patel A, Yet SF, Hsieh CM, Paulauskis JD, Reeves R, Lee ME, Perrella MA (1999) Induction of high mobility group-I(Y) protein by endotoxin and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. Role in activation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 274: 1525-1532
19. Ogram SA, Reeves R (1995) Differential regulation of a multipromoter gene: selective 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of a single transcription start site in the HMG-I/Y gene. *J Biol Chem* 270: 14235-14242
20. Giannini G, Kim CJ, Marcotullio LD, Manfioletti G, Cardinali B, Cerignoli F, Ristori E, Zani M, Frati L, Screpanti I, Guilino A (2000) Expression of the HMGI(Y) gene products in human neuroblastic tumours correlates with differentiation status. *Br J Cancer* 83: 1503-1509
21. Ji YS, Xu Q, Schmedtje JF Jr (1998) Hypoxia induces high-mobility-group protein I(Y) and transcription of the cyclooxygenase-2 gene in human vascular endothelium. *Circ Res* 83: 295-304
22. Wood LJ, Mukherjee M, Dolde CE, Xu Y, Maher JF, Bunton TE, Williams JB, Resar LMS (2000) HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol Cell Biol* 20: 5490-5502
23. Tallini G, Dal Cin P (1999) HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation; a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol* 6: 237-246
24. Kim TK, Maniatis T (1997) The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* 1: 119-129
25. Merika M, Williams A J, Chen G, Collins T, Thanos D (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1: 277-287
26. Agaloti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103: 667-678
27. Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277: 63-81
28. Reeves R, Beckerbauer L (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519: 13 - 29
29. Chin MT, Pellacani A, Wang H, Lin SS, Jain MK, Perrella MA, Lee ME (1998) Enhancement of serum-response factor-dependent transcription and DNA binding by the architectural transcription factor HMG-I(Y). *J Biol Chem* 273: 9755- 9760
30. Lewis RT, Andreucci A, Nikolajczyk BS (2001) PU.1-mediated transcription is enhanced by HMG-I(Y)-dependent structural mechanisms. *J Biol Chem* 276: 9550- 9557
31. Lewis H, Kaszubska W, DeLamarer J F, Whelan J (1994) Cooperativity between two NF-kB complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol Cell Biol* 14: 5701- 5709
32. Maniatis T, Weintraub H (1992) Gene expression and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2: 197-198
33. Fashena S J, Reeves R, Ruddle N H (1992) A poly(dA-dT) upstream activating sequence binds high-mobility group I protein and contributes to lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) gene regulation. *Mol Cell Biol* 12: 849-903
34. Himes SR, Reeves R, Attema J, Nissen M, Li Y, Shannon M F (2000) The role of high-mobility group I(Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation. *J Immunol* 164: 3157-3168
35. Melillo R M, Pierantoni G M, Scala S, Battista S, Fedele M, Stella A, De Biasio M C, Chiappetta G, Fidanza V, Condorelli G, Santoro M, Croce C M, Viglietto G, Fusco A (2001) Critical role of the HMGI(Y) proteins in adipocytic cell growth and differentiation. *Mol Cell Biol* 21: 2485-2495
36. Brunetti A, Manfioletti G, Chieffari E, Goldfine ID, Foti D (2001) Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high mobility group protein HMGI(Y). *Fed Am Soc Exp Biol* 15: 492-500
37. Chuvpilo S, Schomberg C, Gerwig R, Heinfing A, Reeves R, Grummt F, Serfling E (1993) Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 21: 5694-5704
38. Kim J, Reeves R, Rothman P, Boothby M (1995) The non-histone chromosomal protein HMG-I(Y) contributes to repression of the immunoglobulin heavy chain germ-line epsilon RNA promoter. *Eur J Immunol* 25: 798-808
39. Strick R, Laemmli U K (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* 83: 1137 - 1148
40. Zhao K, Kas E, Gonzalez E, Laemmli UK (1993). SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-dependent chromatin. *EMBO J* 12: 3237-3247
41. Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, Merciai B M, Fidanza V, Giancotti V, Santoro M, Simeone A, Fusco A (1996) High level expression of the HMGI(Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13: 2439-2446
42. Giancotti V, Pani B, D'Andrea P, Berlingieri MT, DiFiore PP, Fusco A, Vecchio G, Philip R, Crane-Robinson C, Nicolas RH, Wright CA, Goodwin GH (1987) Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by co-transfection with c-myc and polyoma middle T antigens. *EMBO J* 6: 1981-1987

43. Johnson K R, Disney J E, Wyatt C R, Reeves R (1990) Expression of mRNAs encoding mammalian chromosomal proteins HMG-I and HMG-Y during cellular proliferation. *Exp Cell Res* 187: 69-76
44. Reeves R, Edberg DD, Li Y (2001) Architectural transcriptional factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 21: 575-594
45. Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, Rippel V, Bullerdiek J, Santoro M, Fusco A (1998) Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 17: 413-418
46. Takaha N, Resar LM, Vindivich D, Coffey DS (2004) High mobility group protein HMGI(Y) enhances tumor cell growth, invasion, and matrix metalloproteinase-2 expression in prostate cancer cells. *Prostate* 60:160-167
47. Xu Yi, Sumter TF, Bhattacharya R, Tesfay A, Fuchs EJ, Wood LJ, Huso DL, Resar LMS (2004) The HMG-I oncogene causes highly penetrant, aggressive lymphoid malignancy in transgenic mice and is overexpressed in human leukemia. *Cancer Res* 64: 3371-3375
48. Berlingieri MT, Manfioletti G, Santoro M, Bandiera A, Visconti R, Giacotti V, Fusco A (1995) Inhibition of HMG-IC protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15: 1545-1553
49. Scala S, Portella G, Vitagliano D, Ledent C, Chiappetta G, Giacotti V, Dumont J, Fusco A (2001) HMGI-C gene expression is not required for in vivo thyroid cell transformation. *Carcinogenesis* 22: 251-256
50. Fedele M, Pierantoni GM, Berlingieri MT, Battista S, Baldassarre G, Munshi N, Dentice M, Thanos D, Santoro M, Viglietto G, Fusco A (2001) Overexpression of proteins HMGA1 induces cell cycle deregulation and apoptosis in normal rat thyroid cells. *Cancer Res* 61: 4583-4590
51. Pedulla ML, Treff NR, Resar LM, Reeves R (2001) Sequence and analysis of the murine Hmg1 (Hmga1) gene locus. *Gene* 271: 51-58
52. Edberg D D, Bruce J E, Siems W F, Reeves R (2004) In vivo posttranslational modifications of the high mobility group a1a proteins in breast cancer cells of differing metastatic potential. *Biochemistry* 43:11500-11515
53. Sgara R, Diana F, Bellarosa C, Dekleva V, Rustighi A, Toller M, Manfioletti G, Gianconti V (2003) During apoptosis of tumor cells HMGA1a protein undergoes methylation: identification of the modification site by mass spectrometry. *Biochemistry* 42: 3575-3585
54. Diana F, Sgarra R, Manfioletti G, Rustighi A, Poletto D, Sciortino MT, Mastino A, Gianconti V (2001) A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group protein I leukemic cells. *J Biol Chem* 276: 11345-11361
55. Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri M T, Visconti R, Manfioletti G, Battista S, Martinez-Tello F J, Santoro M, Gianconti V, Fusco A (1995) The expression of high mobility group HMGI(Y) proteins correlate with malignant phenotype of human thyroid neoplasia. *Oncogene* 10: 1307-1314
56. Chiappetta G, Tallini G, De Biasio M C, Manfioletti G, Martinez-Tello FJ, Pentimalli F, de Nigris F, Mastro A, Botti G, Fedele M, Berger N, Santoro M, Giacotti V, Fusco A (1998) Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 58: 4193-4198
57. Dal-Cin P, Fusco A, Belge G, Chiappetta G, Fedele M, Pauwels P, Bullerdiek J, Van den Berghe H (1999) Involvement of the HMGI(Y) gene in microfollicular adenoma of thyroid. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 286-289
58. Czyż W, Balcerzak E, Jakubiak M, Pasięka Z, Kuzdak K, Mirowski M (2004) HMGI(Y) gene expression as a potential marker of thyroid follicular carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 389: 193-197
59. Fedele M, Bandiera A, Chiappetta G, Battista S, Viglietto G, Manfioletti G, Casamassima A, Santoro M, Giacotti V, Fusco A (1996) Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins *Cancer Res* 56: 1896-1901
60. Kim DH, Park YS, Park CJ, Son KC, Nam ES, Shin HS, Ryu JW, Kim DS, Park CK, Park Y E (1999) Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 84: 376-380
61. Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, Abe N, Di Bonito M, Vento MT, Giuliano A, Fedele M, Viglietto G, Santoro M, Watanabe T, Giacotti V, Fusco A (2001) High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 91: 147-151
62. Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, Uchimura H, Chiappetta G, Fusco A (1999) Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res* 59: 1169-1174
63. Balcerzak M, Pasz-Walczak G, Balcerzak E, Wojtylak M, Kordek R, Mirowski M (2003) HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging. *Pathol Res Pract* 199: 641-646
64. Balcerzak M (2004) Ekspresja genów *P65* i *HMGI(Y)* w rakach jelita grubego. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, praca doktorska
65. Dolde CE, Mukherjee M, Cho C, Resar LM (2002) HMGI-1/Y in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 71: 181-191
66. Liu WM, Guerra-Vladusic FK, Kurakata S, Lupu R, Kohwi-Shigematsu T. (1999) HMGI(Y) recognizes base-unpaired regions of matrix attachment sequences and its increased expression is directly linked to metastatic breast cancer phenotype. *Cancer Res* 59: 5695-5703
67. Flohr AM, Rogalla P, Bonk U, Puettmann B, Buerger H, Gohla G, Packeisen J, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J (2003) High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade. *Histol Histopathol* 18: 999-1004
68. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, Trapasso F, Fedele M, Pierantoni G, Croce CM, Fusco A (2003) Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol* 23: 2225-2238
69. Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Chiappetta G, Fusco A, Fujioka Y, Atomi Y (2002) Diagnostic significance of high mobility group I(Y) protein expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Pancreas* 25: 198-204
70. Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, Berlingieri MT, Boccia A, Chiappetta G, Palazzo J, Manfioletti G, Giacotti V, Viglietto G, Scambia G, Fusco A (2003) HMGA1 protein over-expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. *Carcinogenesis* 24: 1191-1198
71. Kettunen E, Antila S, Seppanen J K, Karjalainen A, Edgren H, Lindstrom I, Salovaara R, Nissen A M, Salo J, Mattson K, Hollmen J, Knuutila S, Wikman H (2004) Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 149: 98-106
72. Nam ES, Kim DH, Cho SJ, Chae SW, Kim HY, Kim SM, Han JJ, Shin HS, Park YE (2003) Expression of HMGI(Y) associated with malignant phenotype of human gastric tissue. *Histopathology* 42: 466-471
73. Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S, Sakamoto M (2004) Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J Med* 53: 90-97
74. Bandiera A, Bonifacio D, Manfioletti G, Mantovani F, Rustighi A, Zancanati F, Fusco A, Di Bonito L, Giacotti V (1998) Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix. *Cancer Res* 58: 426-431
75. Tamimi Y, van der Poel HG, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA (1996) A retrospective study of high mobility group protein I(Y) as a progression marker for prostate cancer determined by in situ hybridization. *Br J Cancer* 74: 573-578
76. Pierantoni GM, Agosti V, Fedele M, Bond H, Caliendo I, Chiappetta G, Lo Coco F, Pane F, Turco M C (2003) High-mobility group A1 proteins are overexpressed in human leukaemias. *Biochem J* 372: 145-150
77. Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A (2000) Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential

therapy of human malignant neoplasias. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4256-4261

78. Beckerbauer L, Tepe JJ, Cullison J, Reeves R, Williams RM (2000) FR900482 class of anti-tumor drugs cross linking oncoprotein HMG I/Y to DNA in vivo. Chem Biol 7: 805-812

79. Beckerbauer L, Tepe JJ, Eastman RA, Mixer PF, Williams RM, Reeves R (2002) Differential effects of FR900482 and FK317 on apoptosis, IL-2

gene expression, and induction of vascular leak syndrom. Chem Biol 9: 427-441

80. Reeves R (2000) Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. Environ Health Perspect 108: 803-809

HMGA proteins and their genes as a potential neoplastic biomarkers

Ewa Balcerczak¹, Mariusz Balcerczak^{1,2}, Marek Mirowski^{1,✉}

¹Molecular Biology Laboratory, Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University, 1 Muszynskiego St., 90-151 Łódź, Poland

²Department of Surgery Hospital, Łęczyca, Poland

✉e-mail: mirowski@ich.pharm.am.lodz.pl

Keywords: HMGA proteins, HMGA genes

ABSTRACT

HMGA proteins and their genes are described in this article. HMGA proteins reveal ability to bind DNA in AT-rich regions, which are characteristic for gene promoter sequences. This interaction lead to gene silencing or their overexpression. In normal tissue HMGA proteins level is low or even undetectable. During embriogenesis their level is increasing. High HMGA proteins level is characteristic for tumor phenotype of spontaneous and experimental malignant neoplasms. High HMGA proteins expression correlate with bad prognostic factors and with metastases formation. HMGA genes expression can be used as a marker of tumor progression. Present studies connected with tumor gene therapy based on HMGA proteins sythesis inhibition by the use of viral vectors containing gene encoding these proteins in antisense orientation, as well as a new potential anticancer drugs acting as crosslinkers between DNA and HMGA proteins suggest their usefulness as a targets in cancer therapy.

Wpływ bakteryjnych patogenów układu pokarmowego na szlaki apoptyczne komórek eukariotycznych

Weronika Wronowska

Renata Godlewska

Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-
-Krynicka✉

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii,
Uniwersytet Warszawski, Warszawa

✉ Zakład Genetyki Bakterii, Instytut
Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul.
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail:
kjkryn@biol.uw.edu.pl, tel. (22) 554 12 16

Artykuł otrzymano 3 lutego 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 4 marca 2005 r.

Słowa kluczowe: apoptoza, enteropatogen,
Salmonella, *Helicobacter*, *Yersinia*

Wykaz skrótów: AvrA – białko blokujące wirulencję (ang. *avirulence protein*); CagA – białko związane z cytotoksycznością (ang. *cytotoxin-associated gene product*); ICE – enzym przekształcający interleukinę-1 β (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*); LPS – lipopolisacharydy; PKB/Akt – białkowa kinaza B (ang. *protein kinase B*); SipB – białko inwazyjności *Salmonella* (ang. *Salmonella invasion protein B*); SigD – gen inwazyjności *Salmonella* (ang. *Salmonella invasion gen*); SopB – czynnik sekrecyjny *Salmonella* (ang. *Salmonella outer protein B*); SpvB – plazmidowe białko wirulencji *Salmonella* (ang. *Salmonella plasmid virulence protein B*); VacA – toksyna wakuolizująca (ang. *Vacuolating toxin A*); Yop – białko sekrecyjne *Yersinia* (ang. *Yersinia outer proteins*)

STRESZCZENIE

Liczne patogenne bakterie są zdolne do indukcji apoptozy komórek gospodarza, jednak mechanizm tego procesu oraz jego chorobotwórcze konsekwencje mogą być różne. Wynikająca z infekcji bakteryjnej indukcja apoptozy lub też blokowanie programowanej śmierci komórek zależą od złożonych oddziaływań między białkami bakterii a białkami komórek gospodarza zaangażowanymi w przekazywanie sygnału i apoptozę. W niniejszym artykule omówiono pro i antyapoptyczne aktywności bakterii *Salmonella enterica* i *Yersinia spp.* oraz bakterii *Helicobacter pylori* kolonizujących żołądek oraz rolę apoptozy w patogenezie chorób układu pokarmowego.

WPROWADZENIE

Tradycyjny podział procesów śmierci komórek wyróżnia dwa ich typy: nekrozę i apoptozę. Każdy z nich charakteryzuje się charakterystycznymi zmianami morfologicznymi komórek. Nekroza, będąca procesem chaotycznym, niekontrolowanym i prowadzącym do uwalniania zawartości komórek powoduje stan zapalny. Apoptoza czyli programowana śmierć komórek to proces ściśle regulowany w sposób genetyczny i biochemiczny, niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, odgrywający rolę w procesach rozwojowych oraz utrzymaniu homeostazy tkanek. Apoptoza może być indukowana przez różnorodne czynniki jak np.: pobudzenie receptorów błonowych lub wewnątrzkomórkowych, uszkodzenia DNA lub brak kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową. W odróżnieniu od nekrozy, programowana śmierć komórek przebiega bez indukcji stanu zapalnego, w sposób „cichy” immunologicznie. Podczas apoptozy szybkie usuwanie ciał apoptycznych przez komórki żerne zapobiega nagromadzeniu induktorów stanu zapalnego. Głównymi komponentami apoptotycznej maszyny są enzymy z rodziny kaspaz, będące cysteinowymi proteazami oraz białka z rodziny Bcl-2. Wszystkie kaspazy są syntetyzowane w formie zymogenów podlegających aktywacji na drodze proteolizy. Przyjmując jako kryterium podziału strukturę, charakterystyczną dla tej rodziny sekwencji podpisowej, kaspazy podzielono na trzy grupy: 1) aktywatory cytokin lub kaspazy stanu zapalnego (kaspazy 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14); 2) inicjatory (kaspazy 8, 9, 10, 2); 3) efekторы fazy wykonawczej apoptozy (kaspazy 3, 6, 7). Wśród kaspaz wyróżnić można dwie podgrupy różniące się długością N-końcowej prodromeny, pełniące kluczową funkcję w rekrutacji prokaspaz do kompleksów białkowych. Pierwsza z nich to białka charakteryzujące się długą prodomeną, która może zawierać domenę śmierci DED (ang. *death effector domain*), typową dla kaspaz 8 i 10 lub domenę rekrutacji kaspaz CARD (ang. *caspase recruitment domain*), obecną w sekwencji aminokwasowej kaspaz 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12. Drugą grupę stanowią kaspazy fazy wykonawczej (3, 6, 7) mające zdecydowanie krótszą N-końcową prodomenę. Wydaje się, że struktura prodomen w znacznym stopniu determinuje mechanizmy aktywacji prokaspaz. Proces ten polega na proteolitycznej modyfikacji łańcucha peptydowego przez inną kaspazę, granzym B, proteazę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) lub na drodze autokatalizy, przy czym czynniki mogące aktywować kaspazy inicjatorowe są różne od indukujących dojrzewanie kaspaz wykonawczych. Procesy te zazwyczaj wiążą się z rekrutacją kaspaz do kompleksów białkowych, kompleksu DISC (ang. *death inducing complex*) w przypadku kaspazy 8 i 10 lub kompleksu zwanego apoptosomem w przypadku kaspazy 9. Pojawienie się na terenie komórki czynnych form kaspaz może wywoływać lawinową aktywację kolejnych białek z tej rodziny, co prowadzi do włączenia tzw. kaskady kaspaz i wprowadza komórkę na drogę apoptozy. Aktywacja kaspaz wykonawczych kontrolowana jest przez białka należące do rodziny IAP (ang. *inhibitor of apoptosis*). W regulacji bierze też udział białko Smac (ang. *second mitochondrial derived activator*, zwane też DIABLO). Aktywne kaspazy odpowiedzialne są za degradację wielu białek cyto- i nukleos-

kieletu, białek związanych z naprawą DNA, kontrolą cyklu komórkowego czy zaangażowanych w sygnalizację komórkową.

Istotne znaczenie w regulacji procesu apoptozy mają białka należące do rodziny Bcl-2, grupującej ponad 20 białek, o charakterze zarówno proapoptycznym jak i antyapoptycznym. Kontrolują one uwalnianie z mitochondriów cząsteczek efektorowych takich, jak np.: cytochrom *c*, Smac/DIABLO, AIF, endonukleaza G, odpowiedzialnych za stymulację apoptozy zależnej lub niezależnej od aktywności kaspaz. Ich cechą charakterystyczną, a zarazem podstawą do podziału, jest występowanie którejs z tzw. domen homologii. Obecność domen homologii wpływa na zdolność białek do tworzenia homo- i heterodimerów oraz oddziaływania z innymi białkami apoptocznymi. W rodzinie białek Bcl-2 wyodrębnia się trzy klasy: 1) podrodzinę Bcl-2 obejmującą białka anty-apoptyczne (np. Bcl-2, Bcl-X_l, Mcl); 2) podrodzinę Bax, w której skład wchodzi białka o charakterze pro-apoptycznym (np. Bax, Bak, Bok); 3) podrodzinę BH3, gromadzącą pro-apoptyczne białka (np. Bad, Bid, Bik, Bim).

W przebiegu apoptozy wyróżnia się trzy etapy - inicjacji, egzekucji i zniszczenia. Pierwszy etap może przebiegać różnorodnie w zależności od przyczyny wejścia komórki na drogę samobójczą, dwie kolejne fazy są dla większości komórek podobne. Program śmierci komórki może być uruchamiany przez wiele czynników, których działanie prowadzi do uruchomienia charakterystycznych szlaków sygnalizacyjnych. Wyróżnia się dwie podstawowe ścieżki aktywacji apoptozy: ścieżkę zewnątrzpochodną, niemitochondrialną z udziałem tzw. receptorów śmierci oraz ścieżkę wewnątrzpochodną, mitochondrialną. Indukcja ścieżki zewnątrzpochodnej obejmuje przyłączenie ligandów (np. FAS-L, TNF, APO3L, APO2L) do receptorów śmierci, należących do rodziny TNF (ang. *tumor necrosis factor*), co prowadzi do ich trymerzacji. Obecność w cytoplazmatycznym fragmencie receptorów domeny śmierci DD (ang. *death domain*) umożliwia wiązanie białek adaptorowych posiadających specyficzne motywy np. FADD (ang. *Fas-associated death domain*), czy TRADD (ang. *TNF-R1-associated death domain*) i utworzenie kompleksu białkowego zwanego DISC, do którego rekrutowane są kaspazy 8 i 10. Na terenie kompleksu DISC dochodzi do aktywacji kaspaz inicjatorowych. Szlak wewnątrzpochodny nierozłącznie związany jest z mitochondriami. Sygnały, inicjujące apoptozę, indukują otwieranie megakanalów w błonie mitochondrialnej. Zmiany te znajdują się pod ścisłą kontrolą białek z rodziny Bcl-2. Uwolniony do cytosolu cytochrom *c* bierze udział w formowaniu kompleksu zwanego apoptosomem. Kluczową rolę w jego tworzeniu pełni białko adaptorowe Apaf-1(ang. *apoptosis protease activating factor-1*), mające na C-końcu domenę WD, wiążącą się do domeny WD cytochromu *c*, zaś na N-końcu domenę CARD, pozwalającą na przyłączenie kaspazy 9. W apoptosomie dochodzi do aktywacji kaspazy 9, która może kolejno aktywować kaspazy wykonawcze 3 i 7.

Fazie wykonawczej i fazie zniszczenia towarzyszą charakterystyczne zmiany morfologiczne. Obejmują one utratę turgoru komórki, a co za tym idzie jej obkurczanie się. Na tym etapie komórki tracą kontakt z macierzą zewnątrzko-

mórkową. Obserwuje się również fragmentację i marginalizację chromatyny. W wyniku cięcia DNA przez nukleazy (np. CAD ang. *caspase activated DNA-se*) powstają odcinki DNA o długości ok. 180-200 par zasad. W komórkach apoptycznych dochodzi do przeorganizowania cytoszkieletu i reorganizacji sieci aktynowej. Ostatecznie następuje degradacja jądra komórkowego, zaś błona komórkowa uwy-pukla się, tworząc ciała apoptyczne, oblonione pęcherzyki zawierające fragmenty cytoplazmy, jądra komórkowego oraz funkcjonalne organella. Ciała apoptyczne są pochłaniane przez komórki żerne, dzięki czemu śmierć komórki na ogół nie wywołuje odczynu zapalnego. Sygnałem rozpoznawczym dla komórek fagocytujących jest ekspozycja na powierzchni ciałek apoptycznych fosfatydyloseryna. Czytelnikom, zainteresowanym poznaniem szczegółów dotyczących mechanizmów przebiegu i regulacji procesów apoptozy, polecamy lekturę prac przeglądowych [1, 2, 3, 4 oraz tomu 1644 *Biochim Biophys Acta*]. W ostatnich latach zebrano dużą liczbę danych doświadczalnych wskazujących na udział procesów programowanej śmierci komórek w modulowaniu przebiegu chorób infekcyjnych, zarówno wirusowych jak i bakteryjnych. Mechanizmy indukcji lub blokowania apoptozy przez mikroorganizmy są bardzo różnorodne i nie w pełni wyjaśnione.

Indukcja apoptozy jest procesem nieobojętnym zarówno dla patogenu, jak i dla gospodarza. Zniszczenie ciągłości tkanek (apoptoza komórek nabłonkowych i śródbłonkowych) ułatwia rozprzestrzenianie się mikroorganizmów chorobotwórczych. Aktywacja apoptozy, zamiast nekrozy makrofagów, zazwyczaj związana jest z ograniczeniem stanu zapalnego. Zniszczenie komórek żernych chroni patogeny przed fagocytozą. Z drugiej strony zaobserwowano, że apoptoza makrofagów często połączona jest z uruchamianiem mechanizmów antybakteryjnych.

Coraz częściej podkreśla się udział apoptozy w procesach patogenezy wywoływanych infekcją bakteriami rodzajów *Yersinia*, *Salmonella* i *Helicobacter*. Na tej podstawie zostanie zaprezentowana złożoność obserwowanych wśród patogenów przewodu pokarmowego oddziaływań prowadzących do indukcji lub blokowania apoptozy. Choć wszystkie wymienione mikroorganizmy są patogenami przewodu pokarmowego, każdy charakteryzuje się odmiennym „trybem życia”. Bakterie *H. pylori* to patogeny zewnątrzkomórkowe kolonizujące głównie część przedodźwiernikową żołądka. Kolonizacja nabłonka dwunastnicy doprowadza często do rozwoju choroby wrzodowej, a kolonizacja trzonu żołądka do choroby nowotworowej. Enteropatogenne *Yersinia* przekraczają błonę śluzową jelit wykorzystując komórki M, a następnie namnażają się zewnątrzkomórkowo w warstwie podśluzówkowej. W wypadku bakterii gatunku *Salmonella enterica* przebieg infekcji zależny jest od gatunku gospodarza oraz serowaru patogenu. *S. enterica* sv. Typhi do przekroczenia bariery śluzówki wykorzystuje głównie komórki M, choć posiada też zdolność do inwazji enterocytów. Ten wewnątrzkomórkowy mikroorganizm może docierać wraz z makrofagami do głębiej położonych tkanek i organów wywołując ogólnoustrojową infekcję.

YERSINIA

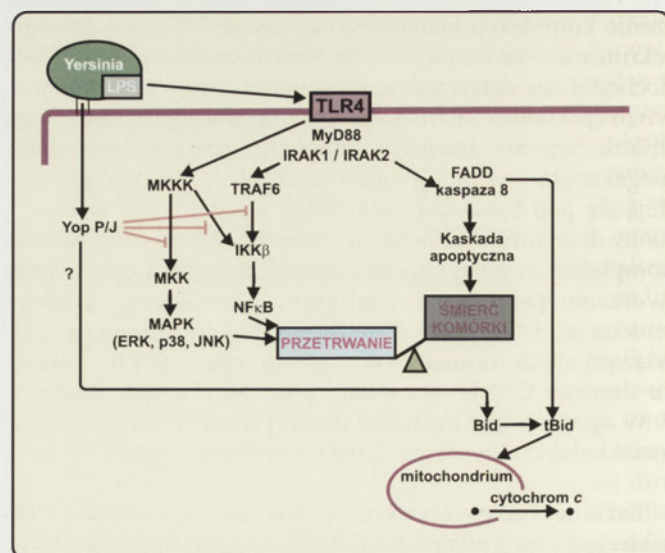
Enteropatogenne bakterie z rodzaju *Yersinia* „wykształciły szeroki zakres taktyk” mających chronić je, lub też obracać na ich korzyść odpowiedź immunologiczną gospodarza. Jedną ze strategii wykorzystywanych przez *Yersinia* spp. jest indukcja apoptozy makrofagów, które w naturalnych warunkach są zdolne do hamowania rozprzestrzeniania się patogenu. Zdolność do indukcji apoptozy przez te mikroorganizmy jest procesem zależnym od typu „atakowanej” tkanki. Indukcja apoptozy w komórkach makrofagów, przez *Yersinia* spp., determinowana jest obecnością 70 kb plazmidu, typowego dla enteropatogennych gatunków: *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*. Plazmid pYV (ang. *Yersinia virulence plasmid*) koduje wiele białek efektorowych, należących do grupy białek Yop (ang. *Yersinia outer proteins*), oraz białka budujące system sekrecyjny typu trzeciego TTSS (ang. *type three secretion system*). Umożliwia on wprowadzenie białek efektorowych bezpośrednio z cytoplazmy patogenu do cytoplazmy komórek gospodarza [5]. Do tej pory opisano sześć białek efektorowych Yop (YopE, YopH, YopM, YopT, YopO/YpkA oraz YopP/YopJ). Pozostają one nieaktywne na terenie komórki prokariotycznej z powodu braku ich substratów, aktywatörów, a także dzięki oddziaływaniu ochronnemu specyficznych białek opiekuńczych. Ich działanie ujawnia się dopiero na terenie komórek eukariotycznych i polega na reorganizacji filamentów aktynowych oraz blokowaniu procesu fagocytozy [6]. Poza bezpośrednią inhibicją fagocytozy, procesem umożliwiającym przeżycie, enteropatogennych *Yersinia* na terenie kępek Payera, jest hamowanie przez bakterie produkcji prozapalnego czynnika TNF- α oraz indukcja apoptozy makrofagów [7]. Proteina YopP u *Y. enterocolitica* i jej homolog YopJ u *Y. pseudotuberculosis*, uznawana jest za jeden z głównych czynników sprawczych obu tych procesów. Istotną rolę w aktywacji śmierci komórek żernych odgrywają również lipopolisacharydy (LPS), będące składnikami błony zewnętrznej komórek bakteryjnych. Zahamowanie syntezy czynnych immunologicznie substancji jest głównie wynikiem działania YopP/J, uniemożliwiającego aktywację kinaz z rodziny MKK (ang. *mitogen-activated protein kinase kinases*) oraz IKK β (ang. *I κ B kinase complex*) [7, 8]. Porównanie sekwencji aminokwasowej i struktury II rzędowej białek YopP/J z odpowiednimi fragmentami adenowirusowej proteazy AVP (ang. *adenovirus protease*) oraz proteazy Ulp1 (ang. *ubiquitin-like protein protease1*) sugeruje, iż YopJ ma właściwości proteolityczne, pozwalające na usuwanie ze zmodyfikowanych białek reszt SUMO (ang. *small ubiquitin related modifier*). Likwidacja tych posttranslacyjnych modyfikacji może zaburzać procesy przekazywania sygnałów. Udowodniono, że YopJ powoduje zmniejszenie ilości białek związanych z resztami SUMO oraz spadek stężenie białek ubikwitynowanych. Jak dotąd jednak nie zidentyfikowano bezpośredniego substratu YopP/J [9].

Istnieją dwa modele wyjaśniające sposób, w jaki YopP/J wywołuje apoptozę makrofagów (Rys. 1). Według pierwszego z nich YopP/J bezpośrednio aktywuje program śmierci komórki poprzez proces, który angażuje proteolityczne rozcinanie białka Bid. Drugi model zakłada, że YopP/J jedynie wzmacnia proapoptyczny sygnał indukowany przez lipopolisacharydy, wchodzące w skład osłon gramujem-

nych bakterii. Głównym efektem działania YopP/J jest tu wstrzymanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*).

INDUKCJA APOPTOZY PRZEZ LIPOPOLISACHARYDY

Lipopolisacharydy bakterii gramujemnych są rozpoznawane przez receptory TLR 4 (ang. *Toll like receptors*). Receptory TLR, należą do rodziny receptorów PRR (ang. *pattern recognition receptors*), rozpoznających charakterystyczne struktury na powierzchni komórek mikroorganizmów patogennych. Stymulacja kompleksu receptorowego TLR4-CD14 (ang. *cluster of differentiation 14*), obecnego na powierzchni komórek żernych przez LPS doprowadza do zapoczątkowania serii zdarzeń: aktywacji ubikwitynowanej ligazy TRAF6 (ang. *TNF receptor-associated factor 6*), aktywacji kompleksu TAK1 (ang. *transforming growth factor-beta-activated kinase*), oraz fosforylacji i aktywacji białek MKK oraz IKK. W następstwie uruchomione zostają ścieżki związane z kinazami MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) i NF- κ B, czego ostateczną konsekwencją jest produkcja cytokin i innych czynników chroniących komórki gospodarza przed infekcją [10]. Ścieżka ta, przebiegająca z udziałem mieloidalnego czynnika różnicującego My88 (ang. *myeloid differentiation factor 88*) i białek IRAK1 (ang. *IL-1R-associated kinase*) w górnym odcinku szlaku, pozwala na przekazywanie sygnału promującego przetrwanie. Jednakże pobudzenie receptorów TLR może również prowadzić do uruchomienia programu samobójczej śmierci komórek eukariotycznych. W transdukcji proapoptycznego sygnału indukowanego przez LPS zaangażowane są białka My88 oraz IRAK2. My88 i IRAK2 mogą wiązać się z FADD poprzez odpowiednie domeny śmierci (DD), co skutkuje aktywacją kaspazy 8 lub 9 i uruchomieniem programu śmierci komórki. Opierając się na badaniach Aliprantis i wsp., analizujących interakcje między My88, a białkami FADD, Ruckdeschel i wsp. sugerują, iż podobne oddziaływania mogą mieć miejsce w przypadku indukowanej przez *Yersinia* apoptozy [11, 12, 13]. W świetle dostępnych wyników eksperymentów można wnioskować, że kluczową rolę w mechanizmie indukcji apoptozy przez *Yersinia* odgrywa



Rysunek 1. Mechanizm indukcji apoptozy komórek makrofagów przez enteropatogenne *Yersinia* spp.

hamowanie antyapoptycznej funkcji NF- κ B. Gdy związany z NF- κ B szlak promujący przetrwanie blokowany jest przez YopP/J, dominująca staje się ścieżka cytotoksyczna i makrofagi ulegają apoptozie [11]. Rodzinę transkrypcyjnych aktywatorów NF- κ B tworzą konserwowane białka, niezwykle istotne w procesach regulujących działanie systemu immunologicznego. Ich aktywacja doprowadzająca do translokacji aktywnych cząsteczek z cytoplazmy do jądra komórkowego, powoduje podniesienie poziomu ekspresji genów kodujących wiele cytokin, receptorów czy cząsteczek adhezyjnych. Dodatkowo czynnik NF- κ B pełni rolę w regulacji poziomu białek przeciwdziałających procesowi apoptozy. Do aktywacji NF- κ B dochodzi w wyniku uwolnienia go od białek inhibitorowych I κ B α (ang. *inhibitor κ B*), I κ B β oraz I κ B ϵ utrzymujących NF- κ B w cytoplazmie. Aby NF- κ B mógł swobodnie przemieścić się do jądra, białka I κ B muszą ulec fosforylacji i ubikwitynacji, a następnie degradacji w proteosomie. Krytycznym punktem w tym procesie jest fosforylacja I κ B przeprowadzana przez kompleks IKK złożony z trzech części IKK α , IKK β i IKK γ , z czego domenę katalityczną posiadają podjednostki IKK α oraz IKK β [14]. YopP/J oddziałuje na IKK β . Wprowadzenie YopJ do makrofagów powoduje spadek ilości zaktywowanych IKK β i NF- κ B [8]. Jak dotąd jednak nie udowodniono by IKK β było modyfikowane przez ubikwitynację, lub też aby stanowiło bezpośredni substrat YopP/J. Ubikwitynacja jest natomiast niezbędna do aktywacji TRAF6 [15]. Możliwe, że blokowanie aktywacji IKK β jest wynikiem oddziaływania YopP/J właśnie na TRAF6, które wydaje się być istotnym ogniwem antyapoptycznej ścieżki NF- κ B [16].

W komórkach makrofagów podczas infekcji *Yersinia* po początkowej aktywacji NF- κ B dochodzi, stosunkowo szybko (~60-90 min.), do zablokowania tego szlaku. Białko YopP/J doprowadza do supresji aktywności IKK β , co w połączeniu z indukowanym przez bakteryjny LPS sygnałem, determinuje wprowadzenie makrofagów na drogę apoptozy [8].

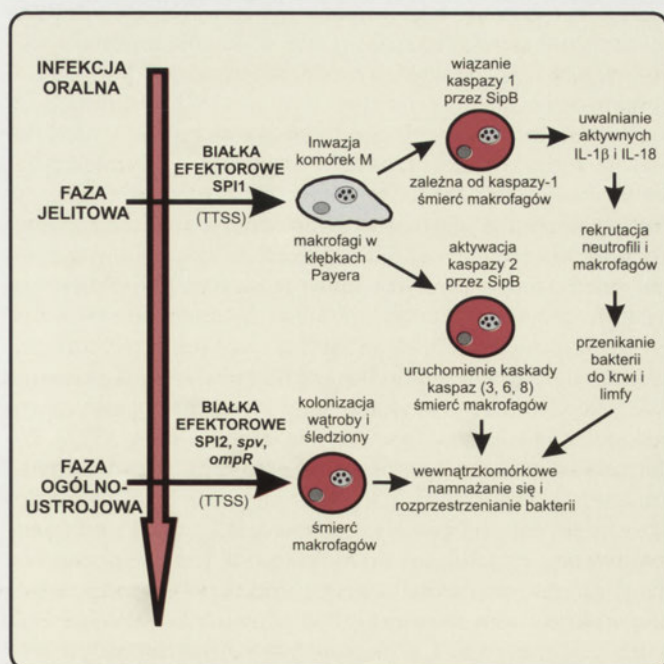
AKTYWACJA APOPTOZY PRZEZ BIAŁKO YOPP/J

Na podstawie opublikowanych ostatnio wyników doświadczeń można stwierdzić, iż białko YopP/J działa również jako samodzielny czynnik zdolny do bezpośredniej aktywacji maszynierii śmierci komórkowej. Badania przeprowadzone przez Deneckera i wsp. udokumentowały rolę mitochondriów w procesie samobójczej śmierci makrofagów indukowanej infekcją *Yersinia*. Wykazali oni aktywację proapoptycznego białka Bid, będącego bezpośrednim substratem kaspazy-8. Powstający 13 kDa C-końcowy fragment proteiny (t-Bid) ulega translokacji do błony mitochondriów, gdzie indukuje uwalnianie cytochromu *c*, doprowadzając do utworzenia aktywnego kompleksu apoptosomowego. Konsekwencją tego procesu jest aktywacja kaspaz fazy wykonawczej. Bakterie *Yersinia*, które nie syntetyzują białka YopP/J lub produkują białko o zmienionej domenie katalitycznej, pozbawione aktywności proteolitycznej, nie indukują przedstawionego procesu. Szczegóły działania YopP/J doprowadzające do powstawania t-Bid nie zostały wyjaśnione. Zastosowanie różnorodnych inhibitorów kaspaz, pozwala sugerować oddziaływanie białka efektorowego w górnych odcinkach szlaku sygnalizacyjnego tak więc

prawdopodobne jest, że jego substrat stanowi prokaspaza-8 [17]. Jeżeli cięcie białka Bid wynika z aktywacji kaspazy 8, możliwe jest, że to nie YopP/J bezpośrednio uczestniczy w tym procesie, lecz właśnie białka MyD88 i IRAK2. Istnienie takiej ścieżki pozwalałoby na połączenie obserwacji Deneckera i Ruckdeschela (Rys. 1) [11, 17].

SALMONELLA

Salmonella będąca fakultatywnym wewnątrzkomórkowym patogenem ulega namnażaniu w specyficznych przedziałach, nazywanych wakuolami zawierającymi Salmonelle SVC (ang. *Salmonella containing vacuoles*). Aby je utworzyć bakteria modyfikuje cytoskielet komórki, strukturę przestrzenną błon komórkowych oraz blokuje fuzję wakuol z lizosomami [18]. Związane z wirulencją geny, o różnorodnych funkcjach, stanowią około 4% chromosomu *Salmonella*. Wiele spośród nich, w tym geny odpowiedzialne za modulowanie procesów apoptozy, zlokalizowane jest w rejonie dwóch dużych obszarów chromosomu bakterii nazywanych wyspami patogenności SPI1 i SPI2 (ang. *Salmonella pathogenicity island 1 2*) [19]. Obie one kodują niezależnie funkcjonujące układy sekrecyjne typu III. Aktywność genów SPI1 jest szczególnie ważna we wczesnej fazie infekcji, umożliwiając patogenom przekroczenie bariery śluzówki jelit [20, 21]. Białka kodowane przez SPI1, a przede wszystkim białko inwazyjności SipB (ang. *Salmonella invasion protein B*), są również odpowiedzialne za indukcję wczesnej SipB-zależnej śmierci makrofagów (Rys. 2) [22]. Geny SPI2 pełnią istotną rolę w ogólnoustrojowej fazie infekcji, nadając bakterii zdolność do namnażania się wewnątrz makrofagów; są one także odpowiedzialne za indukcję opóźnionej apoptozy makrofagów (Rys. 2) [23]. W procesie tym uczestniczy również białko regulatorowe kodowane przez chromosomowy gen *ompR* oraz produkty obecnych na plazmidzie genów operonu *spv* [24, 25]. Tkankowy tropizm indukcji apoptozy komórek eukariotycznych przez bakterie *S. enterica* zależy jest od



Rysunek 2. Indukcja apoptozy makrofagów przez komórki *Salmonella enterica* na różnych etapach infekcji.

serowaru patogenu. I tak np. *S. enterica* sw. Typhimurium nie wywołuje śmierci komórek epitelialnych, podczas gdy zakażenie *S. enterica* sw. Dublin bezpośrednio wprowadza komórki nabłonkowe jelita grubego na drogę apoptozy, ale dopiero w późnym etapie infekcji. Mechanizm tego procesu nie został w szczegółach wyjaśniony.

ZALEŻNA OD SIPB ŚMIERĆ MAKROFAGÓW

Bakterie rodzaju *Salmonella* hodowane w warunkach optymalnych dla inwazji komórek nabłonka (późna logarytmiczna faza wzrostu i niskie stężenie tlenu), w doświadczeniach *in vitro*, indukują śmierć makrofagów w ciągu dwóch godzin od momentu infekcji [26]. Zdolność ta wiąże się z syntezą białek kodowanych w obrębie SPI1, umożliwiających wprowadzenie do komórki gospodarza białka efektorowego SipB, pełniącego kluczową rolę w modulacji procesu apoptozy [22]. SipB wiąże i aktywuje kaspazę 1 zwaną ICE (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*), co prowadzi do śmierci komórki [27]. SipB zbudowane jest z dwóch funkcjonalnych domen, warunkujących zdolność białka do oddziaływania z błonami. N-końcowy rejon odpowiada za oligomeryzację, podczas gdy C-końcowy odcinek oddziałuje z lipidami błon. Analizy topologii SipB sugerują, że białko to może łączyć dwie warstwy osłon komórek bakterii gramujemnych [28]. Nie zostało jednak udokumentowane czy aktywność ta manifestuje się *in vivo* [28]. Białko SipB odgrywa również rolę translokatora, umożliwiając przeniesienie innych białek efektorowych na teren komórek eukariotycznych [29]. Populacja makrofagów, podlegających śmierci, indukowanej przez *Salmonella*, nie jest homogenna. Poszczególne komórki wykazują cechy typowe zarówno dla procesu apoptozy jak i nekrozy, a proporcje komórek o różnej morfologii zależne są od poziomu ekspresji genów SPI1 oraz od wielokrotności zakażenia [26]. Zależny od kaspazy 1 program śmierci znacząco różni się od klasycznej apoptozy. Proces ten nie wymaga aktywacji kaspazy-3 [30]. Również nadekspresja antyapoptycznych białek Bcl-2 i Bcl-x_l nie hamuje tego rodzaju śmierci [31]. Dodatkowo, myszy pozbawione kaspazy-1 nie wykazują anomalii rozwojowych, w przeciwieństwie do zwierząt z uszkodzonymi genami kodującymi pozostałe kaspazy [32]. Ostatnią, lecz bardzo istotną dla przebiegu infekcji i patogenyzy nietypowością, indukowanej przez *Salmonella* wczesnej śmierci makrofagów, jest jej prozapalny charakter typowy dla nekrozy. Apoptozę uważa się za proces, który nie wywołuje zapalnego, podczas gdy kaspaza-1, należąca do aktywatorów cytokin, ma działanie zdecydowanie prozapalne [30]. Proces ten ostatnio określa się, programowaną nekrozą [30, 33]. Choć wykazano, że mikroiniekcja SipB do makrofagów stymuluje ich śmierć to nie wiadomo, w jaki sposób SipB aktywuje ICE [26]. Badania z wykorzystaniem immunoprecypitacji wskazują na zdolność SipB do wiązania kaspazy 1 [27]. Podejrzewa się, że ten bezpośredni kontakt może powodować zmiany w konformacji ICE. Alternatywnie SipB może doprowadzać do miejscowej kondensacji ICE, ułatwiając jej autoaktywację [34], lub też do aktywacji ICE może dochodzić dzięki przenoszeniu białka przez SipB w pobliżu odpowiedniego aktywatora mogącego być proteiną związaną z błonami [35]. Kaspaza 1 wykazuje proteolityczną aktywność w stosunku do nieaktywnych prekursorów prozapalnych cytokin: interleukiny IL-1 β i IL-18, umożliwiając powstanie

ich dojrziałych, aktywnych form. Ponieważ cytokiny te nie mają sekwencji sygnałnej, typowej dla białek podlegających sekrecji, pozostaje niejasne, w jaki sposób są one uwalniane z komórek makrofagów. Sekrecja IL-1 β może przebiegać na drodze egzocytozy lub też do uwolnienia aktywnych cytokin dochodzi w trakcie apoptozy makrofagów [35, 36]. IL-1 β i IL-18 są odpowiedzialne za wystąpienie objawów ostrego stanu zapalnego w miejscu infekcji. We wczesnym etapie infekcji kępek Peyer'a patogen „ucieka” z makrofagów indukując ich śmierć. Wywołany stan zapalny powoduje rekrutację do miejsca infekcji neutrofilów oraz innych komórek systemu odpornościowego, mogących stanowić dogodnie miejsce namnażania się wewnątrzkomórkowych bakterii. Zarazem ostry stan zapalny przyczynia się do przełamania ciągłości tkanki nabłonkowej jelit i umożliwia rozpoczęcie ogólnoustrojowej fazy infekcji.

Badania przeprowadzone *in vitro* na komórkach linii makrofagowych z unieczynnionym genem kaspazy 1 dowodzą, że udział kaspazy-1 nie jest konieczny do wywołania apoptozy komórek żernych przez *S. enterica* w logarytmicznej fazie wzrostu. Ten, niezależny od kaspazy 1 proces śmierci, jest znacznie wolniejszy (komórki apoptyczne obserwuje się po 4-6 godzinach) i dochodzi w nim do uruchomienia kaskady kaspaz oraz uwolnienia cytochromu *c* z mitochondriów. Pierwszą kaspazą aktywowaną w tej ścieżce jest kaspaza 2, następną kaspaza 3, a na późniejszym etapie zaktwowane zostają kaspazy 6 i 8 [37]. W proteolityczną aktywację prokaspazy 2 zaangażowane jest białko SipB. Ponieważ nie zaobserwowano bezpośredniego wiązania SipB do kaspazy 2 podejrzewa się, że do aktywacji dochodzi w wyniku formowania przez SipB kompleksu z białkiem adaptorowym zawierającym domenę CARD. Taki kompleks mógłby wiązać i aktywować kaspazę 2. Alternatywnie, SipB może służyć jako specyficzna translokaza pozwalająca na wprowadzenie do komórki innych czynników wirulencji w tym białka aktywującego kaspazę 2 [37]. Jedną z konsekwencji uruchomienia kaskady kaspaz jest wypływ cytochromu *c* z mitochondrium. Rola aktywacji kaspazy 2 wydaje się polegać na wspomagającym działaniu, zależnej od kaspazy 1, apoptozy. Prawdopodobnie podczas infekcji indukowana przez kaspazę 1 apoptoza nie przebiega tak gwałtownie jak w warunkach laboratoryjnych. Osłabienie siły, zależnej od kaspazy 1, apoptozy *in vivo* może wynikać między innymi z faktu, że aktywne makrofagi są znacznie mniej „skłonne do ulegania” apoptozie, niż komórki wykorzystywane w eksperymentach *in vitro*. Ponadto oddziaływanie LPS powoduje indukcję syntezy specyficznego inhibitora kaspazy 1. Także wytwarzany przez aktywowane makrofagi tlenek azotu znacząco osłabia działanie niektórych kaspaz w tym kaspazy 1 [37]. Podejrzewa się, że *Salmonella* zwiększa prawdopodobieństwo indukcji samobójczej śmierci makrofagów poprzez jednoczesne modulowanie kilku ścieżek proapoptycznych: ścieżki działającej bezpośrednio po zakażeniu makrofagów oraz szlaku opóźnionego, niewymagającego aktywności kaspazy-1. Oba zależne są od białka SipB.

NIEZALEŻNA OD SIPB OPÓŹNIONA ŚMIERĆ MAKROFAGÓW

S. enterica w stacjonarnej fazie wzrostu, hodowane w warunkach, w których nie zachodzi ekspresja genów SPI1, nie wywołują wczesnej apoptozy komórek żernych. Nato-

miast są zdolne do indukcji programu śmierci makrofagów w ciągu 12-13 godzin po infekcji [24]. Udokumentowano zależność tego procesu od genów SPI2, genu *ompR* oraz *spvB*. *OmpR*, będące elementem dwuskładnikowego systemu regulatorowego *ompR-envZ*, jest białkiem regulującym ekspresję operonów kodujących białka, budujące aparat sekrecyjny SPI2 [38]. Białko *SpvB* (ang. *Salmonella plasmid virulence protein B*) jest kodowane przez operon *spv*, obecny na plazmidzie wirulencji wielu serotypów *Salmonella* spp. *SpvB* należy do grupy toksyn zdolnych do przenoszenia ADP-rybozy z NAD na białko docelowe, którym w tym wypadku jest aktyna, budująca cytoszkielet komórki. Aktywność *SpvB* doprowadza do zablokowania przebudowy filamentów aktynowych [39]. Wiele zagadnień dotyczących indukcji bardzo opóźnionej apoptozy nie zostało zbadane. Ciekawą wydaje się obserwacja, że podczas tego zjawiska nie dochodzi do aktywacji kaskady kaspaz [25]. Do wyrażenia się cytotoksycznej aktywności *SpvB* niezbędna jest ekspresja niektórych genów SPI2, lecz rola, jaką pełnią jest niejasna [40]. Początkowo podejrzewano, że kodowany w obrębie SPI2 system sekrecyjny umożliwi wprowadzenie *SpvB* do komórki eukariotycznej. Jednak analizy Kurity i wsp. dowodzą, że sekrecja *SpvB* odbywa się na drodze niezależnej od systemu sekrecyjnego typu trzeciego. Autorzy nie tłumaczą jednak mechanizmu transportu tego białka z cytoplazmy bakterii do wnętrza wakuoli, a stąd na teren cytoplazmy komórek ssaczy [25]. Ostatnio opublikowane dane eksperymentalne wykazały, że opóźniona śmierć makrofagów wiąże się ze stymulacją ścieżek sygnalizacyjnych, indukowanych aktywacją receptorów TLR4 [13]. Mechanizm oddziaływań produktów genów SPI2 i/lub *SpvB* z białkami tych szlaków pozostaje nadal do wyjaśnienia. Jeśli chodzi o rolę tego procesu w patogenezie można spekulować, że indukcja apoptozy na tym etapie infekcji pozwala na przedostanie się bakterii do nowych komórek makrofagów wraz z podlegającymi endocytozie ciałkami apoptocytycznymi.

WPŁYW BAKTERII *SALMONELLA* NA APOPTOZĘ KOMÓREK NABŁONKOWYCH

Proces indukowanej przez mikroorganizmy *Salmonella* samobójczej śmierci komórek jest zależny od rodzaju tkanki. W oddziaływaniach między *Salmonella*, a komórkami nabłonka można wyróżnić dwa zasadnicze kierunki. Z jednej strony bakteria najprawdopodobniej „dąży” do ograniczenia apoptozy komórek nabłonka, które dzięki temu mogą stanowić rezerwar bakterii. Z drugiej strony, indukcja apoptozy w zakażonych komórkach może być czynnikiem ograniczającym rozprzestrzenianie się infekcji. Zniszczone na drodze apoptozy komórki nabłonkowe są stosunkowo szybko zastępowane nowymi, powstającymi w kryptach kosmków jelitowych, a uwalniane bakterie niszczone są przez komórki niespecyficznego układu immunologicznego. Ograniczanie rozprzestrzeniania się bakterii poprzez indukcję apoptozy komórek nabłonka wiąże się z obecnością białka *AvrA* (ang. *avirulence protein A*) [41]. Gen *avrA* nie jest obecny w genomach wszystkich *Salmonella* spp. Brak go w chromosomie serowarów wywołujących u ludzi ogólnoustrojowe infekcje np. *S. enterica* sw. Typhi i *S. enterica* sw. Paratyphi [42]. Może to sugerować, że niszczenie komórek nabłonka stanowi jeden z mechanizmów obronnych gospo-

darza. *AvrA* należy do rodziny białek YopJ/Avr [43] i podobnie jak YopP/J *Yersinia* hamuje ścieżkę sygnalizacyjną NF-κB, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy. Choć końcowy efekt wywierany przez *AvrA* i YopP/J na szlak sygnalizacyjny NF-κB jest podobny, to mechanizmy ich działania są różne [41, 43]. W przeciwieństwie do YopP/J, będącego inhibitorem procesu fosforylacji IκB *in vitro* i *in vivo*, *AvrA* nie blokuje tego procesu [43]. Ponadto zidentyfikowano białko efektorowe, o aktywności fosfatazy fosforanów inozytolu [44, 45], kodowane w rejonie SPI5, zdolne do aktywacji w komórkach nabłonka, kinazy promującej przeżycie Akt/PKBα [46, 47]. Efektem tego jest hamowanie aktywności kaspazy 3 [47]. Białko to nazywane *SopB*/SigD wywołuje aktywację Akt/PKBα, nie bierze jednak udziału w niezbędnej do jego aktywacji rekrutacji Atk/PKBα do błon plazmatycznych [46]. Hipoteza tłumacząca hamowanie przez *Salmonella* apoptozy komórek nabłonka nie została jeszcze potwierdzona. Jest jednak prawdopodobne, że *SopB*, promujące przeżycie, pozwala na znaczące opóźnienie śmierci tych komórek [41].

HELICOBACTER PYLORI

Oddziaływania pomiędzy komórkami wyścielającymi układ pokarmowy gospodarza, a bakteriami z gatunku *H. pylori* powodują wiele zdarzeń na poziomie molekularnym i komórkowym, mogących zaburzyć homeostazę przewodu pokarmowego, wywołując rozmaite schorzenia. *H. pylori* jest zewnątrzkomórkowym patogenem, kolonizującym błonę śluzową żołądka. Część populacji bakteryjnej może wiązać się z komórkami epitelialnymi. Infekcje *H. pylori* powodują zaburzenia stanu równowagi między częstością podziałów, a obumieraniem komórek nabłonkowych. Jak dotąd nie udało się jednoznacznie określić czy indukcja apoptozy i proliferacji jelitowych komórek epitelialnych przez *H. pylori* muszą być zjawiskami współwystępującymi. W niektórych badaniach nie zaobserwowano wpływu infekcji *H. pylori* na liczebność komórek apoptocytycznych [48]. Jednakże wiele innych publikacji donosi, że oddziaływania bakterii *H. pylori* powodują zarówno wzrost liczby komórek dzielących się jak i realizujących program śmierci samobójczej [49]. Według jednej z często przytaczanych teorii wzmożona proliferacja komórek epitelialnych stanowi reakcję organizmu gospodarza na indukowaną przez bakterie apoptozę. Jak się obecnie przypuszcza, reakcja ta może znacznie zwiększyć ryzyko rozwoju chorób nowotworowych. Prawdopodobnie brak takiej odpowiedzi powoduje utratę integralności tkanek nabłonkowych układu pokarmowego, a w konsekwencji występowanie ran oraz zanik gruczołów trawiennych, co prowadzi do dysplazji i atrofii jelitowej [50, 51]. Pomimo wielu lat intensywnych badań, wciąż pojawiają się nowe, często sprzeczne hipotezy, usiłujące wyjaśnić mechanizm oraz znaczenie indukowanej przez *H. pylori* apoptozy. Choć opisano liczne szlaki sygnalizacyjne oraz wiele białek mogących uczestniczyć w zależnej od *H. pylori* śmierci komórek, wiedza na temat ich wzajemnych powiązań jest fragmentaryczna. Białka kodowane w obrębie wyspy patogenności (PAI) *cag* (ang. *cytotoxin-associated gene*) oraz białko *VacA* (ang. *Vacuolating toxin A*) uważa się za jedno z istotniejszych dla rozwoju infekcji *H. pylori* oraz aktywacji szlaków apoptocytycznych. Poziom ekspresji i struktura *VacA* oraz obecność PAI decy-

dują o przynależności mikroorganizmu do odpowiedniego typu, wywołującego określone objawy chorobowe. *Cag PAI* jest 40 kb regionem, a białka kodowane przez geny tego fragmentu chromosomu są zdolne do formowania systemu sekrecyjnego typu IV [52, 53]. Wydaje się prawdopodobne, że produkty genów PAI nie są bezpośrednio zaangażowane w indukcję apoptozy a jedynie umożliwiają dostarczenie do atakowanej komórki czynników inicjujących proces śmierci. Mutacje w tym regionie ograniczają zarówno anty jak i proapoptyczny wpływ bakterii na atakowane komórki [49]. *H. pylori* po adhezji do powierzchni komórki może indukować apoptozę bezpośrednio (oddziaływanie białek bakteryjnych z czynnikami komórkowymi), lub pośrednio, poprzez indukcję wzmożonego uwalniania cytokin stanu zapalnego. Kwestią sporną pozostaje, który z produkowanych przez bakterie czynników odgrywa kluczową rolę w apoptozie i patogenezie chorób wywołanych przez *H. pylori*.

BEZPOŚREDNIA I POŚREDNIA INDUKCJA APOPTOZY PRZEZ *H. PYLORI*

Badania przeprowadzone *in vivo* na liniach komórek HeLa, MKN45 i TMK1 dowodzą, że jeden z głównych mechanizmów powodowanej przez *H. pylori* apoptozy opiera się na uwalnianiu z mitochondriów cytochromu *c*, w co zaangażowane są białka z rodziny Bcl-2 [49]. Analizy zmian w poziomie ekspresji poszczególnych białek z rodziny Bcl-2 dostarczyły niejednoznacznych wyników. W jednym z eksperymentów zaobserwowano wzmożoną ekspresję białka Bak, z zaledwie niewielką zmianą w poziomie syntezy pozostałych członków rodziny Bcl-2 [54]. W innym, wzrost poziomu syntezy dwóch, odmiennych proapoptycznych członków rodziny Bcl-2, Bad i Bid [55]. Z kolejnych przeprowadzonych niezależnie doświadczeń *in vitro* wynika, że wzrost poziomu apoptozy podczas infekcji *H. pylori* łączy się ze stymulacją syntezy białka Bax i jednocześnie hamowaniem ekspresji Bcl-2 [51]. Z powyższych badań wnioskować można, iż indukcja syntezy proapoptycznych białek, a zarazem wstrzymywanie produkcji antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2, stanowi istotny element procesu wiodącego do śmierci komórek nabłonkowych. Do powyższej tezy przychyliła się również Maeda, choć w przeprowadzonych przez jego zespół doświadczeniach nie zaobserwowano wzrostu ekspresji Bax, Bak czy Bcl-X. Fakt ten, wg badaczy, nie wyklucza jednak udziału któregoś z białek Bcl-2-podobnych w procesach apoptycznych, indukowanych przez *H. pylori*. Brak zmian w stężeniu badanych białek tłumaczą oni możliwością przemieszczania się niektórych spośród proapoptycznych członków rodziny Bcl-2 z cytosolu do mitochondriów, co powoduje uwalnianie cytochromu *c*, przy niezmiennym poziomie białka w cytosolu [49]. Zmiany w poziomie syntezy białek z rodziny Bcl-2 mogą mieć różne znaczenie w kolejnych etapach rozwoju schorzeń związanych z infekcją *H. pylori*. W chorobach charakteryzujących się łagodnymi uszkodzeniami tkanek infekcja *H. pylori* prawdopodobnie zwiększa poziom ekspresji proapoptycznych białek takich jak Bid i Bax; co powoduje wzmożoną apoptozę komórek. Podczas rozwoju choroby nowotworowej stopniowo może wzrastać intensywność produkcji białek antyapoptycznych np. Bcl-2, ostatecznie doprowadzając do zahamowania apoptozy i przewagi niekontrolowanej proliferacji komórek nabłonkowych [56]. Choć wielu

badaczy podejrzewa, że to właśnie białka z rodziny Bcl-2 są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za aktywację mitochondrialnej ścieżki apoptycznej w indukowanej przez *H. pylori* apoptozie, nie wyjaśniony pozostaje mechanizm regulacji syntezy tych białek przez patogenne drobnoustroje. Jest prawdopodobne, że w wywoływanej przez *H. pylori* apoptozie współuczestniczy wiele ścieżek sygnalizacyjnych. Niektórzy badacze wiążą uwalnianie cytochromu *c* z mitochondriów z aktywnością białka VacA. Kilka niezależnych zespołów badawczych udokumentowało zdolność VacA do indukcji apoptozy komórek epitelialnych. Dowiedziono, że tylko bakterie produkujące VacA powodują wzrost liczby komórek apoptycznych [57, 58, 59]. Wykorzystując oczyszczone białko VacA udowodniono, że indukcja apoptozy zależy od stężenia toksyny w środowisku oraz jest skorelowana z jej zdolnością do formowania wakuol [59]. Gen *vacA* jest obecny we wszystkich klinicznych izolatach *H. pylori*, choć poszczególne szczepy różni poziom syntezy i struktura produkowanego białka. Różnice strukturalne dotyczą głównie N-końcowego fragmentu toksyny (sekwencje sygnałne s1/s2), oraz rejonu środkowego (m1/m2). Białko VacA typu s1/m1 może indukować wakuolizację komórek i apoptozę [59]. Apoptoza wywołwana przez VacA jest zależna od obecności w środowisku NH₄Cl. Sam NH₄Cl nie jest związkiem wywołującym apoptozę. Wakuolizacja komórek może być tylko jednym z kroków prowadzących do apoptozy, umożliwiającym dostarczenie białka VacA do cytosolu. Prawdopodobny mechanizm uwalniania VacA z pęcherzyków błonowych polega na stymulacji puchnięcia pęcherzyków aż do ich rozerwania. Wykazano, że większość cząstek VacA, dostarczonych do komórki, pozostaje związana z błonami wakuol, zaś pewna frakcja ulega translokacji do cytosolu [60]. Następnie, VacA przemieszcza się do mitochondriów, powodując uwalnianie cytochromu *c*. Apoptyczna aktywność VacA wiąże się z obecnością N-końcowego fragmentu białka (p34/p37). Również sama proteina p37 wykazuje zdolność do indukcji wpływu cytochromu *c* z mitochondrialnej przestrzeni między-błonowej. Podejrzewa się, że jest to możliwe dzięki udziałowi VacA p34/p37 w formowaniu porów na styku wewnętrznej i zewnętrznej błony mitochondrialnej [57]. W oparciu o zgromadzone dane doświadczałne zaproponowano, że proapoptyczne działanie toksyny może być istotnym elementem strategii bakterii, ułatwiającym kolonizację niszy ekologicznej, poprzez obniżenie syntezy HCL w żołądku. Komórki produkujące kwas solny zawierają liczne mitochondria, niezbędne do pompowania protonów do światła żołądka. Powinny, więc być szczególnie wrażliwe na działanie VacA. *H. pylori* stwarza sobie korzystniejsze warunki do kolonizacji tkanek gospodarza poprzez indukcję apoptozy komórek okładzinowych, syntetyzujących kwas solny [60].

Wielu naukowców, analizujących indukowaną przez *H. pylori* apoptozę, zgadza się z poglądem, że VacA jest czynnikiem odgrywającym istotną rolę w tym procesie. Istnieją jednak liczne teorie sugerujące, iż kluczowe znaczenie w tego rodzaju śmierci samobójczej pełnią inne białka. Z obserwacji Shibayamy i wsp. wynika, że bakterie niezdolne do syntezy funkcjonalnego białka, kodowanego przez gen HP1118, posiadającego aktywność γ -glutamylu transpeptydazy, w znacznym stopniu tracą zdolność do indukcji apoptozy. Autorzy nie wyjaśniają jednak, w jaki sposób białko

to zaangażowane jest w proces indukcji apoptozy podczas infekcji *H. pylori* [61].

O udział w indukcji apoptozy podejrzewa się także indukowalną syntazę tlenu azotu iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*). Wykazano, że zwiększony poziom iNOS oraz powstającego w wyniku jej działania tlenu azotu może promować apoptozę w skolonizowanej przez *H. pylori* śluzówce jelit. W wielu badaniach potwierdzono obserwację, że infekcja *H. pylori* powoduje intensyfikację syntezy specyficznego mRNA i białka iNOS. Podejrzewa się, że ekspresja iNOS jest indukowana przez LPS *H. pylori* [62, 63]. W miejscu infekcji *H. pylori* gromadzą się neutrofile i komórki limfoidalne, zdolne do wydzielania cytokin stanu zapalnego. Co więcej, występujący podczas infekcji stan zapalny, na równi z działaniem samych bakterii, może powodować wydzielanie cytokin i innych czynników zapalnych. Uważa się, że cytokiny, np. TNF- α , IL-1, IL-2 i INF- γ , współaktywują proces apoptozy [63]. Mikroorganizm *H. pylori* są zdolne do oddziaływania na komórki, poprzez ścieżkę sygnalizacyjną Fas-FasL. Nieznane czynniki bakteryjne modyfikują liczbę eksponowanych receptorów Fas oraz regulują sekrecję liganda [64]. Do aktywacji tej ścieżki przyczynia się również wydzielany w rejonie infekcji INF- γ mogący zarazem indukować zależną od iNOS apoptozę. INF- γ powoduje wzmoczoną syntezę iNOS potęgując apoptyczny wpływ bakterii na komórki atakowanego organizmu [63].

WPLYW *H. PYLORI* NA APOPTOZĘ INNYCH KOMÓREK

Infekcje *H. pylori* powodują indukcję śmierć komórek różnego typu. Jak dotąd najwięcej badań poświęcano wpływowi *H. pylori* na komórki nabłonkowe, wiadomo jednak, że mikroorganizm ten indukuje także apoptozę granulocytów, limfocytów T i makrofagów. Wywołwana przez *H. pylori* śmierć makrofagów może stanowić ważny element modyfikacji odpowiedzi immunologicznej oraz rozwoju ogólnoustrojowej infekcji [64]. W indukcję apoptozy makrofagów zaangażowane jest białko VacA oraz produkt jednego z genów PAI – CagA. Podczas przebiegu tego procesu zaobserwowano aktywację kaspazy-8, zanikanie nieaktywowanego białka Bid, wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych i uwalnianie cytochromu *c* do cytosolu. Przypuszcza się, iż indukowana przez *H. pylori* apoptoza makrofagów przebiega głównie ścieżką mitochondrialną; nie wyklucza się jednak udziału szlaku receptorowego, na co może wskazywać aktywacja kaspazy-8 [65].

ANTYAPOPTYCZNE DZIAŁANIE *H. PYLORI*

Odpowiedź na pytanie, czy proliferację komórek w rejonie infekcji powoduje sama bakteria, czy też jest ona przejawem odpowiedzi organizmu na proapoptyczne działanie patogenu, nie jest jednoznaczna. W hamowanie apoptozy, podobnie jak w jej aktywację, zaangażowane jest wiele białek. Pozostaje niejasne, na które spośród nich oddziałują czynniki bakteryjne. W przytaczanych już wcześniej badaniach Zhang i wsp. zaobserwowali wzrost poziomu antyapoptycznego białka Bcl-2 w tkankach zainfekowanych przez *H. pylori* [56]. Z kolei Maeda i wsp. wykazali, że aktywacja NF- κ B obserwowana w tkankach zakażonych *H. pylori* powoduje inhibicję apoptozy. Aktywowany przez

bakterie NF- κ B hamuje obumieranie komórek, poprzez stymulację ekspresji antyapoptycznych białek c-IAP1 i 2 [49]. Varro i wsp. donoszą, że *H. pylori* indukując NF- κ B powoduje pobudzenie inhibitora aktywacji plasminogenu-2, który hamuje apoptozę komórek. NF- κ B wzmacnia także sekrecję interleukiny-8 i cyklooksygenazy-2, mogących powodować hamowanie apoptozy komórek nie atakowanych bezpośrednio przez bakterie [66].

PODSUMOWANIE

Wiele patogenów układu pokarmowego wywołuje apoptozę różnego typu komórek gospodarza. Zarówno patogeny zewnątrzkomórkowe (np. *Yersinia* czy *Helicobacter*) jak i fakultatywnie wewnątrzkomórkowe (np. *Salmonella*) wypracowały szereg strategii, umożliwiających przejście kontroli nad szlakami sygnalizacyjnymi decydującymi o indukcji apoptozy. Znaczenie tych procesów dla patogenez chorób wywołanych przez każdy z opisywanych mikroorganizmów, jest odmienne. Wpływ, jaki *Salmonella* wywiera na procesy życiowe komórek gospodarza zależy nie tylko od rodzaju atakowanej tkanki, ale i od fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. W trakcie zakażenia bakteriami *Salmonella* indukcja apoptozy przyczynia się do osłabienia układu immunologicznego gospodarza, poprzez destrukcję komórek żernych. Wzbudzany podczas infekcji stan zapalny, powodujący werbowanie kolejnych komórek układu odpornościowego, nie hamuje rozprzestrzeniania się wewnątrzkomórkowego patogenu. Inicjując samobójczą śmierć zainfekowanych makrofagów, *Salmonella* wewnątrz ciałek apoptycznych może skutecznie przenosić się do nowych komórek, nie wydostając się do zewnątrzkomórkowego środowiska. Równocześnie w obrębie tkanki epitelialnej *Salmonella*, najprawdopodobniej, może wstrzymywać śmierć komórek, które służą jako rezerwuary bakterii. Do aktywacji proapoptycznych ścieżek w komórkach makrofagów są także zdolne bakterie z rodzaju *Yersinia*. Mechanizm prowadzący do śmierci komórek żernych znacznie różni się od obserwowanego podczas infekcji *Salmonella* obumierania makrofagów. Dla patogenu jakim jest *Yersinia*, kluczowe znaczenie ma hamowanie syntezy czynników prozapalnych. Wykorzystywany przez komórki *Salmonella*, nietypowy mechanizm aktywacji programu śmierci komórek żernych połączony z wydzielaniem cytokin, byłby zabójczy dla *Yersinia*. Funkcja, jaką pełni apoptoza w infekcji *H. pylori* i *Yersinia* wydaje się być podobna. Śmierć komórek epitelialnych indukowana przez *H. pylori*, również pozwala na modyfikowanie otaczającego środowiska. Poprzez unicestwienie na drodze apoptozy, komórek produkujących kwas solny, mikroorganizm dąży do osiągnięcia warunków optymalnych do życia i namnażania się. Nie jest jasne, jakie znaczenie dla rozwoju infekcji bakteryjnej ma intensyfikacja proliferacji komórek nabłonkowych. Należy zaznaczyć, że infekcja *H. pylori* ma charakter chroniczny zakażenie może nastąpić we wczesnym dzieciństwie i utrzymywać się przez lata. Oddziaływanie patogenu z komórkami gospodarza nie jest jednakowe podczas całego okresu infekcji i uzależnione jest od genotypów zarówno gospodarza jak i patogenu. Opisane powyżej mechanizmy oddziaływań między patogenami, a komórkami gospodarza potwierdzają teorię, że proces śmierci samobójczej odgrywa kluczową rolę w rozwoju wielu chorób infekcyjnych.

PIŚMIENICTWO

1. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245
2. Zimmermann KC, Green DR (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 108: 99-103
3. Shiozaki ER, Shi Y (2004) Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanism from structural biology. *Trends Biochem Sci* 39: 486-494
4. Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanism of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907
5. Bleves S, Cornelis GR (2000) How to survive in the host: the *Yersinia lesson*. *Microbes Infect* 2: 1451-1460
6. Bliska JB (2000) Yop effectors of *Yersinia* spp. and actin rearrangements. *Trends Microbiol* 8: 205-208
7. Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 27: 953-965
8. Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trülsch K, Rouot B, Heesemann J (2001) *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously block the nuclear factor- κ B pathway and exploits lipopolysaccharide to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 166: 1823-1831
9. Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin like protein protease. *Science* 290: 1594-1597
10. Zhang Y, Bliska JB (2003) Role of toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. *Infect Immun* 71: 1513-1519
11. Ruckdeschel K, Mannel O, Schröttner P (2002) Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J Immunol* 168: 4601-4611
12. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A (2000) The apoptotic signaling pathway activated by toll-like receptor-2. *EMBO J* 19: 3325-3336
13. Hsu L-C, Park JM, Zhang K, Luo J-L, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M (2004) The protein kinase PRK is required for macrophages apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 428: 341-345
14. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C (2000) NF- κ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12: 52-58
15. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 required dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103: 351-361
16. Orth K (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* 5: 38-43
17. Denecker G, Declercq W, Geuijen CAW, Boland A, Bbenabdillah R, van Grup M, Sory M-P, Vandebeele P, Cornelis GR (2001) *Yersinia enterocolitica* Yop-P induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of Bid. *J Biol Chem* 276: 19706-19714
18. Holden DW (2002) Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* 3:161-169
19. Hansen-Western I, Hensel M (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion system. *Microbes Infect* 3: 549-559
20. Darwin KH, Miller VL (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12: 405-428
21. Lostroh CP, Lee CA (2001) The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* 3: 1281-1291
22. Santos RL, Tsois RM, Bäumlner AJ, Smith R, Adams LG (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early sipB-dependent and delayed sipB-independent mechanisms. *Infect Immun* 69: 2293-2301
23. Hensel M (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 36: 1015-1023
24. van der Velden AW, Lindgren SW, Worley MJ, Heffron F (2000) *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium. *Infect Immun* 68: 5702-5709
25. Kurita A, Gotoh H, Eguchi M, Okada N, Matsuura S, Matsui H, Danbara H, Kikuchi Y (2003) Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, causes apoptotic cell death in eucaryotic cells. *Microb Pathog* 35: 43-48
26. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S (1996) *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9833-9838
27. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2396-2401
28. McGhie E, Hume P, Hayward R, Torres J, Koronakis V (2002) Topology of *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol Microbiol* 44: 1309-1312
29. Collazo C, Galán JE (1997) The invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium directs the translocation of Sip protein into the host cell. *Mol Microbiol* 24: 747-756
30. Brennan M, Cookson B (2000) *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1 dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38: 31-40
31. Yasuchara N (1997) Evidence against a functional site for Bcl-2 downstream of caspase cascade in preventing apoptosis. *Oncogen* 15: 1921-1928
32. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-2003
33. Bois LH, Collins CM (2001) *Salmonella*-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol* 9: 64-67
34. Shi Y (2002) Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-470
35. Järveläinen HA, Galmiche A, Zychlinsky A (2003) Caspase-1 activation by *Salmonella*. *Trends Cell Biol* 13: 204-209
36. Monack DM, Navarre W W, Falkow S (2001) *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* 3: 1201-1212
37. Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M (2000) *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophage in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* 192: 1035-1045
38. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182: 771-781
39. Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG (2001) The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 39: 1464-1470
40. Browne SH, Lesnick ML, Guiney DG (2002) Genetic requirements for *Salmonella*-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 70: 7126-7135
41. Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, Madara JL, Orth K, Neish AS (2002) *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway. *J Immunol* 169: 2846-2850
42. Prager R, Mirolid S, Tietze E, Strutz U, Knuppler B, Rabsh W, Hardt W D, Tzape H (2000) Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 290: 605-617
43. Schesser K, Dukuzumuremyi JM, Cilio C, Borg S, Wallis TS, Petterson S, Galyov EE (2000) The *Salmonella* YopJ-homologue AvrA does not possess YopJ activity. *Microb Pathog* 28: 59-70
44. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW (1998) SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14057-14059
45. Marcus SL, Wenk MR, Steele-Mortimer O, Finlay BB (2001) A synaptotxin-homologous region of *Salmonella typhimurium* SigD is essential

- for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett* 494: 201-207
46. Steele-Mortimer O, Knodler LA, Marcus SL, Scheid MP, Goh B, Pfeifer CG, Duronio V, Finlay BB (2000) Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector SigD. *J Biol Chem* 275: 37718-37724
47. Knodler LA, Finlay BB, Steele-Mortimer O (2005) The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells against apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* 280: 9058-9064
48. de Freitas D, Urbano M, Goulao MH, Donato MM, Baldaia C, Martins MI, Souto P, Gregorio C, Figueiredo P, Gouveia H, Romaozinho JM. (2004) The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology* 51: 876-882
49. Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Ometa M (2002) Analysis of apoptotic and antiapoptotic pathways induced by *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 55: 286-293
50. Shirin H, Moss SF (1998) *Helicobacter pylori* induced apoptosis. *Gut* 43: 592-594
51. Yang Y, Deng CS, Peng JZ, Wong B C-Y, Lam SK, Xia HH-X (2003) Effect of *Helicobacter pylori* on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells. *Mol Pathol* 56: 19-24
52. Atherton JC (1998) *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 54:105-120
53. Iamarque D, Peek Jr RM (2003) Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8: 21-30
54. Chen G, Sordillo EM, Ramey WG (1997) Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 626-632
55. Shibayama K, Doi Y, Shibata N, Yagi T, Nada T, Iinuma Y, Arakawa Y (2001) Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions. *Infect Immun* 69: 3181-3189
56. Zhang H, Fang D-C, Wang R-Q, Yang S-M, Liu H-F, Luo Y-H (2004) Effect of *Helicobacter pylori* infection on expressions of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 10: 227-230
57. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard J C, Contanim S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P (2000) The N-terminal 34kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 19: 6361-6370
58. Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J (2001) vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69: 5080-5087
59. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63: 951-957
60. Boquet P, Ricci V, Galmiche A, Gauthier NC (2003) Gastric cell apoptosis and *H. pylori*: has the main function of VacA finally been identified? *Trends Microbiol* 11: 410-413
61. Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y, Arakawa Y (2003) A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 47: 443-451
62. Miyazawa M, Suzuki H, Masaoka T, Kai A, Suematsu M, Nagata H, Miura S, Ishii H (2003) Suppressed apoptosis in the inflamed gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-colonized iNOS-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 34: 1621-1630
63. Perfetto B, Buommino E, Canozo N, Paoletti I, Corrado F, Greco R, Donnarumma G (2004) Interferon-gamma cooperates with *Helicobacter pylori* to induce iNOS-related apoptosis in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Res Microbiol* 155: 259-266
64. Jones NL, Day AS, Jennings HA, Sherman PM (1999) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun* 67: 4237-4242
65. Menaker RJ, Ceponis PJM, Jones NL (2004) *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. *Infect Immun* 72: 2889-2898
66. Varro A, Noble P-JM, Pritchard D, Kennedy S, Hart CA, Dimaline R, Dockray GJ (2004) *Helicobacter pylori*-induces plasminogen activator inhibitor 2 in gastric epithelial cells through nuclear factor- κ B and RhoA: implications for invasion and apoptosis. *Cancer Res* 64: 1695-1702

Influence of human gastrointestinal tract bacterial pathogens on host cell apoptosis

Weronika Wronowska, Renata Godlewska, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka 

Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Warsaw University, 1 Miecznikowa Str., 02-096 Warszawa, Poland

e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

Key words: apoptosis, enteropathogens, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Yersinia*

ABSTRACT

Several pathogenic bacteria are able to trigger apoptosis in the host cell, but the mechanisms by which it occurs differ, and the resulting pathology can take different courses. Induction and/or blockage of programmed cell death upon infection is a result of complex interaction of bacterial proteins with cellular proteins involved in signal transduction and apoptosis. In this review we focus on pro/anti-apoptotic activities exhibited by two enteric pathogens *Salmonella enterica*, *Yersinia spp.* and gastric pathogen *Helicobacter pylori*. We present current knowledge on how interaction between mammalian and bacterial cell relates to the molecular pathways of apoptosis, and what is the role of apoptosis in pathogenesis.

Joanna Saluk-Juszczak

Barbara Wachowicz

Katedra Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

Katedra Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź;
e-mail: wachbar@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 15 lipca 2004 r.

Artykuł zaakceptowano 13 stycznia 2005 r.

Słowa kluczowe: endotoksyna, lipopolisacharyd, stan zapalny, mediatory zapalne

Wykaz skrótów: BPI – ang. *bactericidal/permeability – increasing protein* – bakteriobójcze białko zwiększające przepuszczalność komórek bakteryjnych; CD – ang. *cluster differentiation* – antygen różnicowania; CETP – ang. *cholesterin ester transporting protein* – białko przenoszące estry cholesterolu; DIC – ang. *disseminated intravascular coagulation* – rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe; HDL – ang. *high density lipoprotein* – frakcja lipoprotein o wysokiej gęstości; IL – interleukina; IFN- γ – interferon γ ; Kdo – kwas 2 – keto – 3 – deoksyoktonowy; LBP – ang. *LPS binding protein* – białko wiążące LPS; LDL – ang. *low density lipoprotein* – frakcja lipoprotein o niskiej gęstości; LPS – lipopolisacharyd; NK – ang. *natural killer* – naturalna komórka cytotoksyczna; NO $^{\circ}$ – rodnik tlenku azotu; PAF – ang. *platelet activating factor* – czynnik aktywujący płytki; PLTP – ang. *phospholipid transporting protein* – białko przenoszące fosfolipidy; TLR – ang. *toll-like receptor* – receptor typu Toll; TNF- α – ang. *tumor necrosis factor- α* – czynnik martwicy nowotworu; VLDL – ang. *very low density lipoprotein* – frakcja lipoprotein o bardzo niskiej gęstości

STRESZCZENIE

Lipopolisacharyd (LPS) jest głównym składnikiem błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii gramujemnych, chroniącym je przed działaniem czynników antybakteryjnych. Jest heteropolimerem zbudowanym z części hydrofobowej, tzw. lipidu A oraz z hydrofilowego łańcucha cukrowego. Uwalniane w wyniku lizy komórki bakteryjnej cząsteczki LPS mają zdolność aktywowania układu immunologicznego makroorganizmu poprzez stymulację monocytów, makrofagów, granulocytów, a także płytek krwi i komórek śródbłonna. LPS posiada zdolność wiązania się z białkami osocza i tworzenia kompleksów, które wzmagają toksyczność LPS i zwiększają jego powinowactwo do receptorów komórkowych. W wyniku aktywacji komórek układu immunologicznego dochodzi do uwalniania mediatorów zapalnych, cytokin, chemokin, enzymów, eikozanoidów, cząsteczek adhezyjnych i wolnych rodników, które mają wpływ na rozwój reakcji zapalnych i powodują zmiany patofizjologiczne, m.in. szok septyczny.

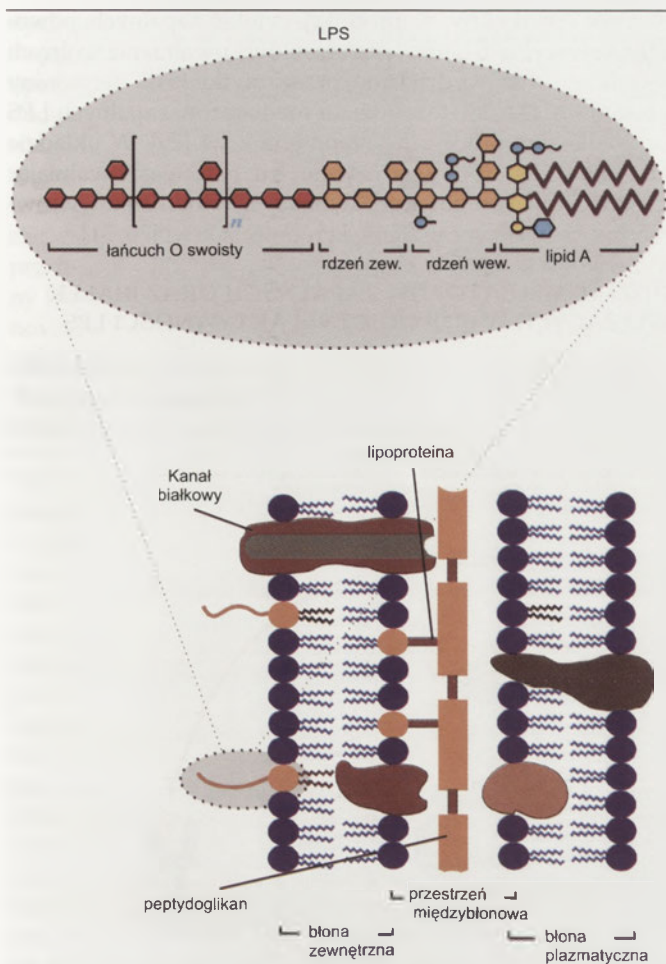
WPROWADZENIE

Endotoksyny (lipopolisacharydy, LPS) odpowiedzialne za patogenność bakterii gramujemnych, stanowią charakterystyczny składnik ściany komórkowej tych bakterii [1]. Ściana komórkowa bakterii gramujemnych wykazuje specyficzne własności funkcjonalne i strukturalne, których nie wykazują osłony zewnętrzkomórkowe żadnych innych organizmów [1, 2]. Zbudowana jest z cienkiej warstwy peptydo-glikanowej oraz zewnętrznej błony białkowo-lipidowej. Błona ta stanowi zewnętrzną barierę fizyczną, efektywnie ograniczającą wnikanie do komórki antybiotyków i warunkuje specyficzność ściany komórkowej bakterii gramujemnych [1, 3]. Dwuwarstwa lipidowa wykazuje całkowicie asymetryczną, rzadko spotykaną w naturze strukturę chemiczną, gdyż jej zewnętrzną warstwę stanowi głównie lipopolisacharyd [2] (Rys. 1).

BUDOWA LIPOPOLISACHARYDU

Wszystkie endotoksyny pochodzące z różnorodnych rodzajów bakterii gramujemnych, stanowią modyfikacje cząsteczki o określonej strukturze przedstawionej na Rys. 1. LPS jest heteropolimerem złożonym z części hydrofobowej zwanej lipidem A i z kowalencyjnie związanego z nim hydrofilowego heteropolisacharydu. Dzięki ścisłemu połączeniu lipidu A z innymi składnikami dwuwarstwy lipidowej, lipopolisacharyd jest integralną częścią ściany komórkowej bakterii gramujemnych [4]. W budowie LPS wyróżnić można trzy zasadnicze, oddzielnie syntetyzowane części: wysoce konserwatywną część lipidową – lipid A, region korowy o względnej zmienności będący heterooligosacharydem oraz fragment o wysokiej zmienności, tzw. łańcuch O-specyficzny (O-swoisty, antygen-O) złożony z powtarzających się jednostek oligosacharydowych [4-6]. Lipid A lipopolisacharydu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zbudowany jest z hydrofilowego rdzenia, który stanowi disacharyd, zwykle glukozamino-glukozaminowy β -GlcN-(1-6)- α -D-GlcN podstawiony dwiema resztami fosforanowymi przypadającymi po jednej na każdy monosacharyd – w pozycjach 1(GlcN I) i 4' (GlcN II) oraz acylowany czterema resztami minimum 12-węglowych kwasów tłuszczowych w pozycjach 2, 3, 2', 3' [1, 5]. Natywne lipopolisacharydy bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* charakteryzują się asymetrycznym ułożeniem reszt kwasów tłuszczowych typu 4 + 2 lub 4 + 3. Takie podstawienie rdzenia lipidowego warunkuje dużą toksyczność LPS tych bakterii [7]. Pomimo znacznej konserwatywności lipidy A bakterii gramujemnych różnią się między sobą rodzajem cukrów, wzorem podstawienia kwasów tłuszczowych oraz długością ich łańcuchów. Nawet wśród stosunkowo bliskich filogenetycznie bakterii należących do *Enterobacteriaceae* znaleziono różnice w budowie lipidu A [7].

Lipid A łączy się z częścią polisacharydową poprzez kowalencyjne kwasolabilne wiązanie α -ketozydowe między glukozaminą (pozycja 6') i resztą kwasu



Rysunek 1. Schemat przekroju poprzecznego ściany komórkowej bakterii gramujemnych. W zewnętrznej błonie ściany komórkowej znajdują się cząsteczki endotoksyn (lipopolisacharyd, LPS), których obecność jest cechą charakterystyczną bakterii gramujemnych. Wbudowany w dwuwarstwę lipidową, poprzez swój lipid A, LPS stanowi integralny składnik ściany komórki bakteryjnej. Wszystkie lipopolisacharydy stanowią modyfikację tej samej cząsteczki, której ogólny plan budowy przedstawia schematycznie zaznaczony wycinek. W cząsteczce LPS wyróżnić można rejon hydrofobowy, tzw. lipid A, oraz rejon hydrofilowy złożony z rdzenia cukrowego i ze swoistego łańcucha polisacharydowego.

Kdo (2-keto-3-deoksyoktonowego, zwanego także kwasem 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowym) o wzorze sumarycznym $\text{COOH-CO-CH}_2\text{-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$ [8]. Bezpośrednio z lipidem połączony jest oligosacharyd rdzeniowy, w którym wyróżnia się region wewnętrzny i region zewnętrzny. Wewnętrzny oligosacharyd rdzeniowy, leżący proksymalnie w stosunku do lipidu A, zawiera oprócz reszt kwasu Kdo różnego typu heptozy, stąd też nosi nazwę regionu heptozowego. Dodatkowo, do składników tych, zwykle w ilościach nie stechiometrycznych dołączone są: fosforan, pirofosforan, fosforyloetanolamina i pirofosforyloetanolamina [6]. Obecność wewnętrznego regionu rdzenia cukrowego jest niezbędna do życia komórek bakteryjnych. Szczególną rolę odgrywają tu reszty kwasu Kdo. Nie udało się wyizolować mutantów, które nie zawierałyby tych reszt. Lipid A z dwiema resztami Kdo, niekiedy z jedną ufosforylowaną lub podstawioną kwasem uronowym stanowi minimalny fragment LPS niezbędny do życia bakterii gramujemnych [2, 4, 7]. W części rdzeniowej oligosacharydu, oprócz fragmentu wewnętrznego, wyróżniono region zewnętrzny, który ze względu na obecność w nim 6-węglowych cukrów, nosi nazwę regionu heksozowego [2, 6]. Kompletny fragment oligosacharydu rdzeniowego może

zawierać do 12 reszt monosacharydowych [7]. Przypuszcza się, iż cały oligosacharyd rdzeniowy wykazuje modulujący wpływ na właściwości części lipidowej uznawanej za centrum aktywne LPS, np. poprzez zmianę płynności łańcuchów kwasów tłuszczowych lipidu A [4, 7, 8]. Zewnętrzny region oligosacharydu rdzeniowego połączony jest z częścią O-swoistą lipopolisacharydu. Łańcuch O-swoisty stanowi dystalną część LPS skierowaną do środowiska zewnętrznego i wystającą nawet do 9,6 nm poza ścianę komórki bakteryjnej. Jest to heteropolisacharyd zbudowany z reszt cukrowych (od 2 do 8) tworzących tzw. jednostki powtarzające się [6]. Oligosacharydy O-swoiste poszczególnych rodzajów bakterii wykazują ogromną różnorodność strukturalną, różniąc się zarówno typem występujących monosacharydów, jak i całkowitą długością łańcuchów [4]. W łańcuchach tych mogą występować też składniki niecukrowe, np. lizyna, alanina, fosfoetanolamina [9]. Charakterystyczny jest ogromna zmienność region O-specyficzny decyduje o swoistości antygenowej bakterii [1, 3, 4]. O-swoiste łańcuchy polisacharydowe są odpowiedzialne za indukowanie limfocytów B do produkcji specyficznych przeciwciał antybakteryjnych oraz za aktywację układu dopełniacza [8, 10].

Zarówno kompletna cząsteczka LPS, jak i sam lipid A, zawierają polarne składniki hydrofilowe takie jak kwas Kdo, kwasy uronowe czy reszty fosforanowe oraz hydrofobowe, apolarnie łańcuchy kwasów tłuszczowych [2, 4, 6], co powoduje, iż są one amfifilowymi cząsteczkami w środowisku wodnym tworzącymi agregaty powyżej tzw. krytycznego stężenia. Struktura agregatów jest zależna nie tylko od składu chemicznego i konformacji przestrzennej LPS, ale także od warunków środowiska: pH, temperatury oraz stężenia jedno- i dwuwartościowych kationów [2]. Stopień i forma agregatów, jakie tworzą cząsteczki lipopolisacharydów w roztworach wodnych odgrywa ogromną rolę w aktywności biologicznej LPS [11, 12]. Najnowsze badania wykazały, że agregaty LPS charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością biologiczną [11] niż monomeryczna niezagregowana postać LPS, uznawana do niedawna za jedyną czynną biologicznie postać LPS [12]. Zmiany temperatury i pH środowiska oraz obecność jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} mają istotny wpływ na toksyczne właściwości LPS [2]. Tworzenie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy kationami tych metali i kwasowymi grupami LPS wzmacnia powstawanie kamieni w przewodach moczowych zakażonego organizmu [13]. Trójwymiarowe struktury agregatów LPS to formy micelarne, lamelarne, heksagonalne, nielamelarne sześciiany lub odwrócone formy heksagonalne [2, 5]. W wyniku podwyższenia temperatury struktury te przechodzą z formy żelu β do aktywnej formy ciekło-kryształicznej α . Przejście fazowe $\beta \rightarrow \alpha$ wiąże się ze zwiększeniem płynności łańcuchów kwasów tłuszczowych i zachodzi przy określonej temperaturze zwanej temperaturą przejścia fazowego [2, 5] zależną od długości i stopnia nasycenia reszt kwasów tłuszczowych oraz od gęstości i rozmieszczenia ładunków w regionie hydrofobowym [2]. Większą aktywnością biologiczną wykazują lipopolisacharydy o niższej temperaturze przejścia fazowego [7]. Interakcje molekuł LPS z humoralnymi i komórkowymi czynnikami gospodarza charakteryzują się wysoką specyficznością i zależą nie tylko od pierwszorzędowej struktury chemicznej, ale także od supramolekularnej struktury cząstek LPS [14].

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ LIPOPOLISACHARYDU BAKTERII

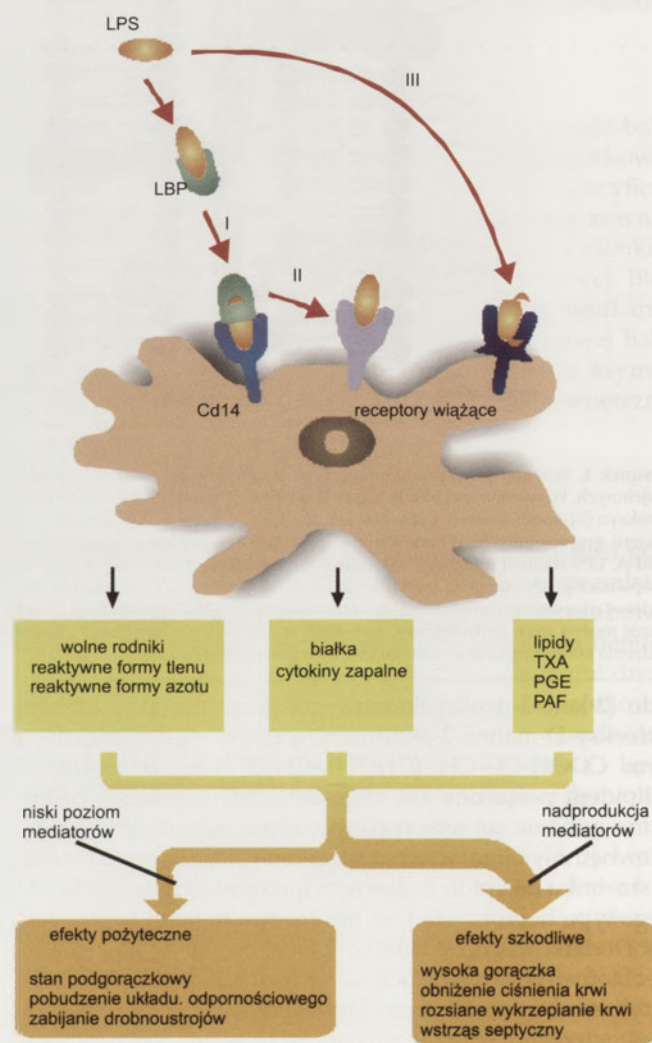
Cząsteczki lipopolisacharydu tworząc osłonę na powierzchni wytwarzających je bakterii utrudniają wnikanie antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej, chronią błonę cytoplazmatyczną mikroorganizmów przed działaniem zaktywowanego dopełniacza oraz stanowią ochronę bakterii przed komórkami żernymi makroorganizmu [6]. Śmierć komórki bakteryjnej i liza, wywołane np. stosowaniem leku, pozwalają na uwolnienie LPS ze ściany komórkowej bakterii i wzmagają jego toksyczne działanie [14, 15]. Endotoksyny bakterii gramujemnych są jednym z głównych antygenów powierzchniowych, które odpowiadają za powstawanie przeciwciał antybakteryjnych w zakażonym makroorganizmie [14, 16]. Dostając się do organizmu endotoksyny zdolne są do indukowania zarówno fizjologicznych jak i morfologicznych zmian w wielu tkankach. Działanie LPS zależy od gatunku zakażonego makroorganizmu oraz od rodzaju endotoksyny i może obejmować zarówno odczyn uogólniony jak i miejscowy [15, 17]. Cząsteczki lipopolisacharydów są odpowiedzialne za zaburzenia homeostazy organizmów gospodarza prowadzące do szoku septycznego. Do negatywnych skutków działania LPS należą: trombocytopenia, hiperglikemia, leukopenia z następującą leukocytozą, nadciśnienie płucne, obniżenie ciśnienia krwi, krwawienia oraz powstawanie zakrzepów, indukowanie szoku septycznego związanego z zaburzeniami krążenia, prowadzące do powstania DIC i do nieprawidłowego funkcjonowania narządów całego ciała, a w konsekwencji do śmierci [18-20]. Zakażenia spowodowane przez bakterie gramujemne, związane z powstaniem szoku septycznego, stanowią ok. 40 % wszystkich infekcji populacji ludzkiej [16], z czego prawie połowa prowadzi do śmierci [21].

Toksyczne działanie LPS związane jest przede wszystkim ze stymulacją immunologicznie kompetentnych komórek makroorganizmu do produkcji mediatorów zapalnych uczestniczących w kaskadzie procesów prowadzących do sepsy i szoku septycznego (Rys. 2) [17, 21]. Mediatory uwalniane są w wyniku oddziaływania LPS z komórkami fagocytarnymi, komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych oraz z płytkami krwi [16, 22, 23]. Do komórek aktywowanych przez endotoksynę należą głównie makrofagi, monocyty i granulocyty. Mediatory zapalne, wydzielane przez te komórki, wywołują i wzmacniają swoistą i nieswoistą odpowiedź immunologiczną gospodarza [16, 23]. Lipopolisacharyd wykazuje także aktywność mitogenną wobec limfocytów B. Jako antygen grasicznie niezależny wzmagają m.in. aktywność komórek NK (ang. *natural killer*) wobec komórek nowotworowych [24]. Działa również na leukocyty obojętne i zasadochłonne, uwalniając z nich PAF [25, 26]. LPS ma także zdolność aktywowania klasycznej drogi dopełniacza poprzez bezpośrednie wiązanie lipidu A z czynnikiem C1, a także przez kompleks wiązania lipidu A z czynnikiem C1, a także przez kompleks LPS-przeciwciała. Ponadto, zupełnie niezależnie, LPS może aktywować alternatywną drogę dopełniacza poprzez swój łańcuch O-swoisty oraz rdzeniową część polisacharydu [8, 10]. Uruchomienie kaskady dopełniacza przez LPS powoduje aktywację czynnika C5, który jako aktywna anafilatoksyna C5a stymuluje serię reakcji zapalnych prowadzących do uszkodzenia naczyń krwionośnych i wzrostu ich przepuszczalności. C5a również aktywuje neutrofile, makrofagi,

bazofile i płytki krwi do produkcji cytokin zapalnych, powoduje tzw. wybuch tlenowy neutrofilów i uwalnianie wolnych rodników oraz wydzielanie przez płytki krwi serotoniny i histaminy [27, 28]. Bez udziału mediatorów zapalnych LPS uczestniczy w procesach krzepnięcia krwi [29]. W układzie krzepnięcia LPS aktywuje czynnik XII, natomiast uwalniając z monocytów i komórek śródbłonna czynnik tkankowy również może inicjować kaskadę krzepnięcia krwi [30, 31].

UDZIAŁ MEDIATORÓW ZAPALNYCH ORAZ BIAŁEK WIAŻĄCYCH W BIOLOGICZNEJ AKTYWNOŚCI LPS

Objawy szoku septycznego są skutkiem aktywacji monocytów, makrofagów, i granulocytów związanej z wydzielaniem przez te komórki cząsteczek przekaźnikowych zwa-



Rysunek 2. Prawdopodobne mechanizmy aktywacji komórek przez cząsteczki endotoksyn. I. Krążący we krwi LPS wiąże się z białkiem LBP, a powstały kompleks przyłącza się do receptora CD14 powodując aktywację komórek CD14-pozytywnych. II. Przyłączenie kompleksu LPS-LBP nie jest wystarczające do transdukcji sygnału, która następuje dopiero po przeniesieniu cząsteczki LPS na inny receptor (np. typu Toll). III. Możliwa jest również aktywacja komórek gospodarza poprzez przyłączenie LPS do innych receptorów obecnych na ich powierzchni. Przekazywanie sygnału i aktywacja komórek przez LPS prowadzi do wytworzenia mediatorów zapalnych (białka, wolne rodniki, lipidy). Wraz z rozwojem reakcji zapalnych wzrasta poziom mediatorów zapalnych. Uwalnianie w niewielkich ilościach związki powodują efekty pozytywne pobudzając układ immunologiczny. Ich wzmocniona produkcja daje jednak efekty szkodliwe prowadzące do wstrząsu septycznego.

nych mediatorami zapalnymi. Mediatorami mogą być takie związki chemiczne jak: peptydy, białka (cytokiny, enzymy), lipidy (eikozanoidy) oraz wolne rodniki. Działają one jednocześnie lub w odpowiedniej sekwencji wywołując szereg różnorodnych efektów biologicznych. Mediatorzy uczestniczą w aktywności biologicznej LPS działając lokalnie w miejscu uwolnienia lub rozprzestrzeniając się wraz z krążącą krwią [32-35]. Do cytokin prozapalnych wydzielanych przez pobudzone endotoksyną komórki należą: interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8), interferon γ (IFN- γ) i czynnik martwicy nowotworu TNF- α uważany za najważniejszy czynnik zapalny odpowiedzialny za rozwój ostrej reakcji zapalnych w szoku septycznym [23, 34]. Cytokiny, związki o budowie polipeptydów lub glikopolipeptydów uwalniane w trakcie infekcji powodują podwyższenie temperatury ciała, senność i jadłowstręt, a także schorzenia immunologiczne i procesy nowotworowe [17, 35]. Wykazują właściwości chemotaktyczne względem monocytów, makrofagów i neutrofilów oraz wzmagają cytotoksyczność tych komórek. Wywołują także degranulację komórek fagocytarnych i uwalnianie enzymów proteolitycznych oraz generują syntezę wolnych rodników tlenowych [36]. Działanie cytokin na śródbłonek powoduje wzrost jego przepuszczalności i aktywuje kaskadę krzepnięcia [17]. Cytokiny hamują również fibrynoлизę poprzez obniżenie ekspresji tkankowego aktywatora plazminogenu oraz wzmożenie syntezy jego inhibitorów. Odpowiedzialne są również za adhezję limfocytów, monocytów i neutrofilów do komórek śródbłonna naczyń [17]. Oddziałując ze śródbłonkiem cytokiny stymulują produkcję PAF, co ma znaczącą rolę w indukowaniu szoku septycznego [37, 38]. W wyniku działania endotoksyny PAF uwalniany jest z licznych komórek gospodarza: neutrofilów, makrofagów, komórek śródbłonna naczyń i z płytek. Uwalnianie związane jest zarówno z bezpośrednim działaniem LPS na wymienione komórki, jak i z ich pośrednią stymulacją przez wydzielane w czasie zapalenia mediatory zapalne, głównie TNF- α i IL-1 [37, 39, 40]. Działając poprzez specyficzny receptor należący do receptorów metabotropowych (serpentynowych), PAF może funkcjonować jako mediator zewnątrzkomórkowy, odpowiedzialny za przekazywanie sygnału pomiędzy komórkami, lub też może działać jako przekaznik wewnątrzkomórkowy [41]. Uczestniczy w patogenezie zapalenia, w szoku wywołanym działaniem endotoksyn i w uszkodzeniu tkanek indukowanym zarówno LPS, jak i TNF- α [38, 42]. Powoduje także spadek ciśnienia krwi i zmniejszenie liczby płytek (poprzez wywołanie agregacji płytek) [43]. Wraz z TNF- α , interleukinami prozapalnymi i trombiną, PAF wzmacnia adhezję neutrofilów do śródbłonna naczyń krwionośnych, co ma istotne znaczenie w ostrych stanach zapalnych [44]. PAF wykazuje zdolność do wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach fagocytarnych. Działając na monocyty, PAF podobnie jak TNF- α i IFN- γ , powoduje długotrwałe utrzymywanie się wysokiego stężenia reaktywnych form tlenu [44]. PAF jest silnym agonistą zarówno płytek krwi jak i neutrofilów. Uczestniczy w powstawaniu lipidowych czynników zapalnych stymulując syntezę eikozanoidów: prostaglandyn, prostacykliny, tromboksanu A_2 , leukotrienów, kwasów epoksy- i hydroksyeikozatetraenowych oraz lipoksyn [38, 45]. Będąc tlenowymi pochodnymi kwasu arachidonowego eikozanoidy powstają w wyniku przemian enzymatycz-

nych na drodze zależnej od lipooksygenazy lub cyklooksygenazy i są silnymi lipidowymi mediatorami zapalnymi [45-47]. Główną rolę odgrywają prostaglandyny, głównie prostaglandyna E_2 oraz prostacyklina, które wskutek właściwości rozszerzających naczynia krwionośne powodują zwiększenie dopływu krwi do miejsca zapalenia i przyczyniają się do wysięku w ognisku zapalnym. Przypuszcza się, że prostaglandyny szeregu E wzmagają działanie histaminy i bradykininy potęgując ból i powodując gorączkę [48]. Lipopolisacharyd jest zdolny do wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$, rodnika hydroksylowego OH^{\cdot} , a także tlenu azotu NO^{\cdot} i H_2O_2 [33, 49]. Te wysoce reaktywne cząsteczki powstają natychmiast po zadziałaniu toksyny i jako przekazywniki sygnału pełnią rolę mediatorów zapalnych [33]. Zdolne są także do zwalczania drobnoustrojów wnikających do komórek gospodarza. Jednak powstawanie dużych ilości wolnych rodników tlenowych prowadzi do przesunięcia równowagi reakcji red-ox i może powodować znaczne uszkodzenia komórek organizmu [17, 50]. Ważnym czynnikiem zapalenia jest indukowany w wyniku działania LPS rodnik tlenu azotu NO^{\cdot} syntetyzowany przez wiele rodzajów komórek: makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty, komórki mięśni gładkich, płytki krwi i neurony. Jest on ściśle zaangażowany w patogenezę szoku septycznego wywołanego działaniem LPS [32]. NO^{\cdot} jest wielofunkcyjnym, wysoce reaktywnym związkiem endogennym, który działając miejscowo, przejściowo rozszerza naczynia krwionośne (jest wazodilatorem), hamuje agregację i adhezję płytek krwi, indukuje proliferację limfocytów i komórek mięśni gładkich oraz wywołuje chemotaksję neutrofilów. Niedobór NO^{\cdot} prowadzi do agregacji płytek krwi i powstawania zakrzepów naczyniowych [51-53]. Konstytutywne formy syntazy NO^{\cdot} odpowiedzialne są za niskie stężenia tego rodnika i odpowiedzialne są za utrzymanie prawidłowych fizjologicznych warunków przepływu i ciśnienia krwi, agregacji płytek i neurotransmisji [51, 52]. Ekspresja indukowanej izofromy enzymu zawsze związana jest z aktywacją komórek przez czynniki immunologiczne. Powstający wskutek tego rodnik tlenu azotu zaangażowany jest w cytotoksyczny lub cytostatyczny mechanizm obronny skierowany przeciwko komórkom nowotworowym lub wnikającym do organizmu drobnoustrojom [51, 52]. NO^{\cdot} uczestniczy w zwalczaniu bakterii, grzybów, pierwotniaków, komórek nowotworowych, a nawet wielokomórkowych pasożytów, ale uwalniany w dużych ilościach podczas zakażenia, działa toksycznie nie tylko na patogeny, ale także na komórki gospodarza [7, 17]. Lipopolisacharyd wzmacnia ekspresję indukowanej izofromy syntazy powodując nadprodukcję NO^{\cdot} , co prowadzi do zaburzenia homeostazy organizmu. Wzrost stężenia NO^{\cdot} w odpowiedzi na działanie LPS ma implikacje w immunologicznych stanach patologicznych takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów [20].

Uruchomienie całej kaskady mechanizmów obronnych uczestniczących w procesach zapalnych, w wyniku interakcji cząsteczek LPS z komórkami gospodarza, jest modulowane przy udziale licznych białek obecnych we krwi i w tkankach organizmów gospodarza [15, 54].

Pierwsze badania dotyczące mechanizmu oddziaływania cząsteczek lipopolisacharydu z komórkami układu immu-

nologicznego wykazały, że LPS działa na komórki poprzez specyficzny receptor CD14 [55] (Rys. 2). Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 55 kDa, która występuje w dwóch formach: (mCD14) w postaci związanej z błoną komórkową poprzez fosfatydyloinozitol (obecna na makrofagach, monocytach i granulocytach) oraz w formie rozpuszczalnej (sCD14) obecnej w osoczu w stężeniu ok. 2 - 6 µg/ml [56, 57]. Rola, jaką odgrywa ten antygen w przekazywaniu sygnału nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Wiązanie LPS z receptorem CD14 może być warunkiem niezbędnym, ale nie wiadomo czy wystarczającym do aktywacji większości komórek uczestniczących w patogenezie zakażenia, przynajmniej przy niskich stężeniach endotoksyny [58]. Główną funkcją receptora CD14 może być wiązanie cząsteczek LPS, a następnie przenoszenie ich na kolejny receptor odpowiedzialny za indukcję sygnału [59]. W ten sposób receptor CD14 jest zaangażowany w produkcję cytokin zapalnych indukowaną LPS, która jest blokowana poprzez przeciwciała anti-CD14, a także w syntezę PAF, tromboksanu A₂, NO^{*}, prostaglandyn, leukotrienów i rodników tlenowych [58]. Nie określono jeszcze jednoznacznie jak zachowuje się receptor CD14 po przyłączeniu lipopolisacharydu, jednak cząsteczka CD14 pozbawiona domeny wewnątrzkomórkowej musi zawierać sekwencję konieczną dla przekazania sygnału do koreceptorów odpowiedzialnych za aktywację komórek [60]. Wiadomo, że receptor CD14 nie wiąże samej cząsteczki LPS, ale jej kompleks z krążącym we krwi białkiem LBP wiążącym LPS [61, 62]. LBP jest białkiem ostrej fazy syntetyzowanym w wątrobie. W stanach zapalnych jego poziom wzrasta w surowicy ponad 10-krotnie. LBP jest glikoproteina osoczową (60 kDa), która wiążąc się z lipidem A lipopolisacharydu tworzy kompleks LPS-LBP o dużym powinowactwie do receptora CD14. Będąc koligandem dla LPS, białko LBP wzmacnia od 100 do ponad 1000-krotnie odpowiedź komórek zawierających antygen CD14 na działanie endotoksyny [15, 63]. LBP pełni istotną funkcję w transporcie lipopolisacharydu we krwi [61, 63, 64]. Tworząc kompleks z LBP endotoksyna jest dostępna zarówno dla błonowej jak i rozpuszczalnej formy receptora CD14 [65]. W tym ostatnim przypadku wiązanie LPS z LBP nie jest niezbędne, ale powstanie takiego kompleksu znacznie przyspiesza reakcję komórek pozbawionych receptora mCD14 na niskie stężenia LPS [37, 66]. Rozpuszczalna forma receptora jest odpowiedzialna za zdolność endotoksyny do aktywowania komórek, które nie mają błonowego receptora CD14 [65, 66]. Powstający kompleks LPS-LBP-CD14 oddziałuje z receptorami typu Toll oraz z innymi białkami regulatorowymi prowadząc do przekazywania sygnału i aktywacji komórek [65]. Białko LBP, wykazując zdolność wiązania i transportu LPS, uczestniczy także w interakcji LPS z cząstkami lipoprotein osocza VLDL, LDL, HDL [63]. Do rodziny białek osoczowych przenoszących lipidy zaliczane są również: bakteriobójcze białko zwiększające przepuszczalność bakterii (BPI), białko przenoszące estry cholesterolu (CETP) oraz białko przenoszące fosfolipidy (PLTP) [64, 67]. Białka te charakteryzują się powinowactwem do substratów lipidowych. W osoczu krwi są zasocjowane z HDL oraz z VLDL [67, 68]. Wszystkie wymienione białka charakteryzują się wysoką homologią sekwencji, co pozwala przypuszczać, że są zdolne do wiązania i przenoszenia lipopolisacharydu [64, 67]. Oprócz LBP najlepiej poznane jest kationowe białko BPI (55 kDa),

obecne w azurofilowych ziarnistościach dojrzałych neutrofilów [64]. Wiąże ono LPS z większym powinowactwem niż LBP dając przy tym kompleks, który nie stymuluje komórek poprzez żadną z form receptora CD14. Asocjacja białka BPI z LPS hamuje toksyczną aktywność endotoksyny ograniczając możliwość tworzenia reaktywnego kompleksu LPS-LBP, przez co chroni organizm gospodarza przed rozwojem reakcji zapalnych w sepsie [69, 70]. Zdolność inaktywacji LPS poprzez wiązanie się z nim i tworzenie kompleksów wykazują także inne białka: składnik dopełniacza Clq [10], laktoferyna [61], albumina [71], lizozym [72], a także wszystkie frakcje lipoprotein osoczowych VLDL, LDL, HDL [73]. Łącząc się z LPS białka te ograniczają oddziaływanie endotoksyny z komórkami immunologicznie kompetentnymi i przez to ograniczają jej aktywność biologiczną [61, 74]. Najlepiej opisana jest interakcja LPS z lizozymem, enzymem występującym w ziarnistościach neutrofilów, monocytów i makrofagów, a także w większości płynów tkankowych i wykazującym silne działanie przeciwbakteryjne poprzez niszczenie ściany komórkowej bakterii, głównie bakterii gramdodatnich, pozbawionych zewnętrznej błony komórkowej. Powstawanie kompleksu lizozym-LPS hamuje syntezę mediatorów zapalnych: TNF-α, IL-1, IL-6. Lizozym wiąże się zarówno z LPS, jak i z samym lipidem A. Przyłączanie lizozymu do LPS odbywa się poprzez hydrofobowe oddziaływanie z lipidem A i prowadzi nie tylko do neutralizacji immunostymulujących właściwości LPS, ale także do hamowania enzymatycznej aktywności lizozymu [72]. Podobnie, poprzez lipid A LPS wiąże się z albuminą, jednak to połączenie nie ogranicza szerokiego spektrum działania endotoksyny. Można przypuszczać, że albumina ułatwia jedynie transport LPS we krwi [71]. We krwi makroorganizmu znajdują się także białka, które wiążąc się z LPS wzmacniają jego biologiczną aktywność. Główną rolę pełni opisane wcześniej białko LBP. Podobne właściwości wykazuje również hemoglobina, która uwalniana do krwioobiegu w wyniku hemolizy erytrocytów, wywołanej zakażeniem bakteriami gramujemnymi, oddziałuje z endotoksyną wzmacniając jej patologiczne właściwości. Oddziaływanie hemoglobiny z LPS prowadzi do zmiany właściwości fizycznych endotoksyny i powstania trwałych kompleksów z hemoglobina. Hemoglobina moduluje toksyczność LPS, poprzez dezagregację agregatów lipopolisacharydowych i dostarczanie jego monomerów do komórek wiążących LPS. Poprzez zmniejszenie stopnia agregacji cząsteczek zostaje obniżona masa cząsteczkowa i gęstość endotoksyny, przez co LPS staje się lepiej rozpuszczalny. Nie jest wykluczone, że hemoglobina, oprócz dezagregacji LPS, może powodować chemiczną modyfikację cząsteczek lipopolisacharydu [75]. Hemoglobina uczestniczy w interakcji LPS z komórkami śródbłonna, co wzmacnia (nawet 10-krotnie) indukowaną w tej tkance przez endotoksynę produkcję czynnika tkankowego biorącego udział w procesie krzepnięcia [75]. Wykazano również, że hemoglobina powoduje wzrost produkcji TNF-α przez monocyty aktywowane endotoksyną [76].

Wśród białek wykazujących zdolność wiązania LPS znajdują się także niektóre receptory komórkowe, inne niż antygen CD14 (Rys. 2). Należą do nich przede wszystkim odkryte i dokładnie opisane w ciągu ostatnich kilku lat receptory typu Toll: TLR2 i TLR4 [77]. Inne receptory uczestniczące w wiązaniu LPS to przypuszczalnie: receptor PAF [78], inte-

gryny z podjednostką β_2 [79], białko 73 kDa [80] oraz selektyny [81]. Sugeruje się, że przyłączenie LPS do receptora PAF odpowiedzialne jest za przekazywanie sygnału i powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{+2} w różnego typu komórkach, np. w makrofagach, neutrofilach, czy w płytkach krwi powodując ich aktywację oraz wzmacnia agregację płytek. Efekty te są blokowane poprzez inhibitory receptora PAF. Antagoniści receptora PAF nie powodują jednak zahamowania syntezy TNF- α ani produkcji anionorodnika nadtlenkowego. Można zatem przypuszczać, że istnieją przynajmniej dwie różne drogi aktywacji komórek przez endotoksynę, z których jedna związana jest z receptorem PAF i może odgrywać istotną rolę w powstawaniu zakrzepów w trakcie zakażenia, podczas gdy druga jest niezależna od receptora PAF i przekazywania sygnału z udziałem jonów Ca^{+2} [78].

Do glikoprotein z rodziny integryn β_3 wiążących LPS należą receptory CD11a/CD18, CD11b/CD18 i CD11c/CD18 obecne na neutrofilach, makrofagach i monocytach [79]. LPS oddziałując z tymi receptorami nie indukuje wprawdzie syntezy cytokin, ale stymuluje aktywację fosfolipazy C, powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i aktywuje kinazy białkowe, których stymulacja prowadzi do aktywacji czynnika jądrowego κ B [79, 80]. Czynniki jądrowy κ B zlokalizowany jest w cytoplazmie, gdzie tworzy kompleks z jednostką inhibitorową I κ B. W wyniku aktywacji komórek przez endotoksynę, w której uczestniczyć mogą różne receptory komórkowe, następuje usunięcie inhibitora i natychmiastowe przeniesienie czynnika κ B do jądra. Działający w jądrze czynnik κ B powoduje transkrypcję wielu genów związanych z układem odpornościowym, np. genów kodujących cytokiny [82]. Intensywne badania nad molekularnymi mechanizmami przekazywania sygnału indukowanego przez LPS doprowadziły do wyjaśnienia istotnej roli receptorów typu Toll w aktywacji komórek przez toksyny bakterii gramujemnych. Ustalono, że receptory TLR2 i TLR4 bezpośrednio odpowiadają za przekazywanie sygnału do jądra komórkowego, aktywację czynnika jądrowego κ B i syntezę cytokin, a ich aktywacja następuje w wyniku przeniesienia z receptora CD14 cząsteczki LPS połączonej z LBP i wytworzenia kompleksu receptorowego [83, 84]. Słabo poznanym receptorem LPS jest glikoproteina błonowa o m. cz. 73 kDa obecna na limfocytach, granulocytach, makrofagach i płytkach krwi. Wydaje się, że receptor ten bierze udział w regulowaniu cytotoxyczności komórek zapalnych pod wpływem działania LPS, jednak jego obecność nie jest niezbędna do aktywacji tych komórek [80]. Innym białkiem powierzchniowym zaktywowanych płytek krwi jest selektyna-P, która prawdopodobnie uczestniczy w wiązaniu cząsteczek LPS, podobnie jak selektyna-L obecna na powierzchni neutrofilów [81].

LPS ma także zdolność aktywowania komórek na drodze całkowicie niezależnej od receptorów, dotyczy to jednak wyłącznie wysokich stężeń endotoksyny [85]. Mechanizm związany jest z bezpośrednim aktywowaniem komórek przez niespecyficzne hydrofobowe oddziaływania LPS z fosfolipidami błony komórkowej. W obecności białek transportujących LPS dochodzi do interkalacji lipopolisacharydowych agregatów do fosfolipidów komórkowych poprzez reszty acylowe lipidu A, co może np. indukować syntezę cytokin zapalnych [2]. Dzięki oddziaływaniom niespecyficznym komórki pozbawione receptorów LPS są zdolne do odpowiedzi na wysokie

dawki endotoksyny. Interkalację LPS obserwowano dotychczas *in vitro* w liposomach oraz w błonach niektórych komórek ssaków: monocytów, makrofagów, erytrocytów i hepatocytów [55, 85].

PODSUMOWANIE

Różnorodność mediatorów zapalnych uwalnianych w czasie infekcji bakteriami gramujemnymi może stwarzać ogromne możliwości zwalczania zakażenia przez komórki obronne gospodarza. Ilość wytwarzanych mediatorów jest różna w zależności od ilości uwalnianych do krwiobiegu endotoksyn. Niewielkie zakażenie zostaje zwykle szybko zahamowane przy udziale czynników zapalnych, poprzez wywołanie miejscowej, kontrolowanej odpowiedzi immunologicznej. Dochodzi wówczas do pobudzenia układu odpornościowego, co pozwala na zwalczanie zakażenia i chroni przed kolejną infekcją bakteryjną. Przy ciężkim zakażeniu duże ilości endotoksyn gromadzone są w krążącej krwi i powodują uwalnianie znacznych ilości mediatorów, dochodzi do kaskady uogólnionych reakcji obronnych organizmu. Ta odpowiedź układu immunologicznego w postaci rozwoju reakcji zapalnej musi być ściśle kontrolowana, gdyż uruchomienie nadmiernych mechanizmów obronnych może spowodować, zamiast efektów pozytywnych, zaburzenia homeostazy i wstrząs często prowadzący do śmierci. Wzmoczone uwalnianie mediatorów zapalnych powoduje niszczenie nie tylko czynników patogennych, ale również komórek gospodarza znajdujących się w pobliżu ogniska zapalnego, co wraz z rozwojem reakcji zapalnej może prowadzić do wyniszczenia całego organizmu.

Te same cząsteczki endotoksyn, które stanowią zagrożenie życia ludzkiego, mogą zwiększać ogólną odporność organizmu na zakażenia bakteryjne i wirusowe oraz na procesy nowotworowe poprzez stymulację układu immunologicznego, indukowanie klasycznej i alternatywnej drogi dopełniacza oraz aktywację czynnika Hagemana, czy przez działanie nekrotyczne na komórki nowotworowe.

PIŚMIENNICTWO

1. Russell AD (2003) Bacterial outer membrane and cell wall penetration and cell destruction by polluting chemical agents and physical conditions. *Sci Prog* 86: 283-311
2. Seydel U, Wiese A, Schromm AB, Brandenburg K (red) (1999) A biophysical view on the function and activity of endotoxins, W: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC Endotoxin in Health and Disease N.York, Basel str.195-218
3. Ding B, Yin N, Liu Y, Cardnas-Garcia J, Evanson R, Orak T, Fan M, Turing G, Savage PB (2004) Origins of cell selectivity of cationic steroid antibiotics. *J Am Chem Soc* 126: 13642-13648
4. Knirel YA, Kaca W, Różalski A, Sidorczyk Z (1999) Structure of the O-antigenic polysaccharides of *Proteus* bacteria. *Polish J Chem* 73: 895-907
5. Brandenburg K, Seydel U (red) (1996) Fourier transform infrared spectroscopy of cell surface polysaccharides, W: Mantsch HH, Chapman D *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, t. 8: 203-237
6. Kaszowska M (2004) Chemical structure and biosynthesis of lipopolysaccharide—important component of the cell envelope of Gram-negative bacteria. *Post Hig Med Dośw* 58: 333-342
7. Klink M, Kaca W (1996) Neutrophil activation by bacterial endotoxins. *Post Hig Med Dośw* 50: 333-350
8. Klink M, Sonn Ch, Kaca W, Kim YS (1999) Investigation of influence of *Proteus mirabilis* LPS polysaccharide part on the murine immune cells activation. *Arch Immunol Ther Exp* 47: 195-201

9. Kondakova AN, Toukach FV, Senchenkova SN, Arbatsky NP, Shashkov AS, Knirel YA, Bartodziejska B, Zych K, Różalski A, Sidorczyk Z (2003) New structures of the O-specific polysaccharides of *Proteus*. 3. Polysaccharides containing non-carbohydrate organic acids. *Biochemistry (Mosc)*. 2003 Apr; 68 (4): 446-57.
10. Kaca W, Literacka E, Sjöholm AG, Weintraub A (2000) Complement activation by *Proteus mirabilis* negatively charged lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* 6: 223-234
11. Mueller M, Lindner B, Kusumoto S, Fukase K, Schromm AB, Seydel U (2004) Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J Biol Chem* 279: 26307-26313
12. van Deventer SJH, Pajkrt D (red) (1999) Interactions of lipopolysaccharides and lipoproteins, W: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC *Endotoxin in Health and Disease* ed. N.York, Basel str. 379-388
13. Różalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K (1997) Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 65-89
14. Brandenburg K, Wiese A (2004) Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr Top Med Chem* 4: 1127-1146
15. Glauser MP (1996) The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 52: 9-17
16. Lynn WA (1998) Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. *J Antimicrobial Chemother* 41: 71-80
17. Beishuizen A, Vermes I, Haanen C (1999) Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv Clin Chem* 33: 55-131
18. Dickneite G, Kroez M (2001) Treatment of porcine sepsis with high-dose antithrombin III reduces tissue edema and effusion but does not increase risk for bleeding. *Blood Coagul Fibrinol* 12: 459-467
19. Carlstedt F, Eriksson M, Kiiski R, Larsson A, Lind L (2000) Hypocalcaemia during porcine endotoxaemic shock: effects of calcium administration. *Crit Care Med* 28: 2909-2914
20. Ito Y, Machen NW, Urbaschek R, McCuskey RS (2000) Biliary obstruction exacerbates the hepatic microvascular inflammatory response to endotoxin. *Shock* 14: 599-604
21. Koo DJ, Chaudry IH, Wang P (1999) Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J Surgical Res* 83: 151-157
22. Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB, Tridandapani S (2004) Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J Immunol* 173: 360-366
23. Araya AV, Pavez V, Perez C, Conzalez F, Columbo A, Aguirre A, Schiattino I, Aguillo JC (2003) Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE2 secretion in whole blood from Type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw* 14: 128-133
24. Andersson M, Girard R, Cazenave PA (1999) Interaction of NK lysin, a peptide produced by cytolytic lymphocytes, with endotoxin. *Infect Immun* 67: 201-205
25. Mariano F, Bussolati B, Migliori M, Russo S, Triolo G, Camussi G (2003) Platelet-activating factor synthesis by neutrophils, monocytes, and endothelial cells is modulated by nitric oxide production. *Shock* 19: 339-344
26. Tsuyuki K, Ichinowatari G, Tanimoto A, Yamada M, Yaginuma H, Ohuchi K (2002) Possible participation of intracellular platelet-activating factor in NF- κ B activation in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1583: 26-34
27. Riedemann NC, Guo RF, Bernacki KD, Reuben JS, Laudes JJ, Neff TA, Gao H, Speyer C, Sarma VJ, Zetoune FS, Ward PA (2003) Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity* 19: 193-202
28. Riedemann NC, Guo RF, Laudes JJ, Keller K, Sarma VJ, Padgaonkar V, Zetoune FS, Ward PA (2002) C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *Faseb J* 16: 887-888
29. Carey MJ, Rodgers GM (1998) Disseminated intravascular coagulation: clinical and laboratory aspects. *Am J Hematol* 59: 65-73
30. Miller DJ, Welty-Wolf K, Carraway MS, Ezban M, Ghio A, Suliman H, Piantadosi CA (2002) Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 650-658
31. Okajima K (2001) Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev* 184: 258-274
32. Ward PA, Lentsch AB (1999) The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg* 134: 666-669
33. Garcia R, de Salamanca EA, Portoles MT (1999) Calcium and reactive oxygen species as messengers in endotoxin action on adrenocortical cells. *Bioch Bioph Acta* 1454: 1-10
34. Keelan JA, Sato TA, Hansen WR, Gilmour JS, Gupta DK, Helsby NA (1999) Interleukin-4 differentially regulates prostaglandin production in amnion-derived WISH cells stimulated with pro-inflammatory cytokines and epidermal growth factor. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 60: 255-262
35. Dembinski J, Behrendt D, Martini R, Heep A, Bartmann P (2003) Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine* 21: 200-206
36. Koval'chuk LV, Saigitov RT (2000) Chemokines—a new family of cytokines regulating leukocyte migration. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 1: 90-94
37. Ivanov AJ, Patel S, Kulchitsky VA, Romanovsky AA (2003) Platelet-activating factor: a previously unrecognized mediator of fever. *J Physiol* 553: 221-228
38. Mariano F, Bussolati B, Migliori M, Russo S, Triolo G, Camussi G (2003) Platelet-activating factor synthesis by neutrophils, monocytes, and endothelial cells is modulated by nitric oxide production. *Shock* 19: 339-344
39. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyre TM (2003) Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem* 278: 33161-33168
40. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Repine JE (2002) Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med* 140: 312-319
41. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2003) Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40: 643-672
42. Wang X, Evans RhD (1997) Effect of endotoxin and platelet-activating factor on lipid oxidation in the rat heart. *Mol Cell Cardiol* 29: 1915-1926
43. Bocheński J, Chłopicki S, Gryglewski RJ (1999) Role of thromboxane A2 and platelet activating factor in early haemodynamic response to lipopolysaccharide in rats. *J Physiol Pharmacol* 50: 287-297
44. Hotter G, Closa D, Prats N, Pi F, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1997) Free radical enhancement promotes leucocyte recruitment through a PAF and LTB4 dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 22: 947-954
45. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT (2002) Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 169: 6498-6506
46. Werz O (2002) 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 23-44
47. Hu W, Mathey E, Hartung HP, Kieseier BC (2003) Cyclo-oxygenases and prostaglandins in acute inflammatory demyelination of the peripheral nerve. *Neurology* 61: 1774-1779
48. Ivanov AI, Romanovsky AA (2004) Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 9: 1977-941993
49. Sibelius U, Hattar K, Hoffmann S, Mayer K, Grandel U, Schenkel A, Seeger W, Grimminger F (2002) Distinct pathways of lipopolysaccharide priming of human neutrophil respiratory burst: role of lipid mediator synthesis and sensitivity to interleukin-10. *Crit Care Med* 30: 2306-2312
50. Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG (2004) Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Curr Med Chem* 11: 359-368
51. Boveris A, Alvarez S, Navarro A (2002) The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 33: 1186-1193
52. Sharma R, Coats AJS, Anker SD (2000) The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Intern J Card* 72: 175-186
53. Corseaux D, Ollivier V, Fontaine V, Huisse MG, Philippe M, Louedec L, Vranckx R, Ravanat C, Lanza F, Angles-Cano E, Guillin MC, Michel JB (2002) Hemostasis imbalance in experimental hypertension. *Mol Med* 8: 169-178
54. Schumann RR, Latz E (2000) Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 74: 42-60

55. Pugin J, Kravchenko VV, Lee JD, Kline L, Ulevitch RJ, Tobias PS (1998) Cell activation mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored or transmembrane forms of CD14. *Infect Immun* 66: 1174-1180
56. de Haas CJ, van der Zee R, Benaissa-Trouw B, van Kessel KPM, Verhoef J, van Strijp JAG (1999) Lipopolysaccharide (LPS)-binding synthetic peptides derived from serum amyloid P component neutralize LPS. *Infect Immun* 67: 2790-2796
57. Catala M, Anton A, Portoles MT (1999) Characterization of the simultaneous binding of *Escherichia coli* endotoxin to Kupffer and endothelial liver cells by flow cytometry. *Cytometry* 36: 123-130
58. Schutt C (1999) CD14. *Intern J Bioch Cell Biol* 31: 545-549
59. Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Arnaout MA, Golenbock DT, Freeman MW (2000) Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* 165: 4272-4280
60. Kirikae T, Kirikae F, Iwai H, Qreshi N, Fukase K, Kusumoto S, Nakano M (1999) LPS-dependent changes in the expression of 57 kDa and 53 kDa cell membrane proteins without participation of CD14. *J Endotoxin Res* 5: 62-65
61. Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G (1998) Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 2: 486-491
62. Knapp S, de Vos AF, Florquin S, Golenbock DT, Van der Poll T (2003) Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infect Immun* 71: 6747-6753
63. Schutt C, Bernheiden M, Grunwald U, Stelter F, Menzel R, Muller HP, Fan X, Jack RS (1999) Implications for a general role of LPS-binding proteins (CD14, LBP) in combating bacterial infections. *J Endotoxin Res* 5: 75-80
64. Abrahamson SL, Wu HM, Williams RE, Der K, Ottah N, Little R, Gazzano-Santoro H, Theofan G, Bauer R, Leigh S, Orme A, Horwitz AH, Carroll SF, Dedrick RL (1997) Biochemical characterization of recombinant fusions of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein. Implications in biological activity. *J Biol Chem* 272: 2149-2155
65. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Gomez R, Kim JC, Yoshimatsu J, Edwin S, Rathnasabapathy C, Yoon BH (2002) Evidence of participation of soluble CD14 in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation in term and preterm gestations. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12: 304-312
66. Bannerman DD, Goldblum SE (1999) Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 79: 1181-1199
67. Bingle CD, Craven CJ (2004) Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol* 25: 53-55
68. Kitchens RL, Thompson PA (2003) Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *J Endotoxin Res* 9: 113-118
69. van der Schaft DWJ, Toebes EAH, Haseman JR, Mayo KH, Griffioen AW (2000) Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood* 96: 176-181
70. Ciornei CD, Egesten A, Eugstrom M, Tornebrandt K, Bodelsson M (2002) Bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin-induced vascular nitric oxide synthesis. *Acta Anaesthesiol Scand* 46: 1111-1118
71. Sunil A (red)(1999) The interaction of lipid A and lipopolysaccharide with human serum albumin, W: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC *Endotoxin in Health and Disease* ed. N.York, Basel str. 413-419
72. Brandenburg K, Koch MHJ, Seydel U (1998) Biophysical characterization of lysozyme binding to LPS Re and lipid A. *Eur J Biochem* 258: 686-695
73. Maziere C, Conte MA, Dantin F, Maziere JC (1999) Lipopolysaccharide enhances oxidative modification of low density lipoprotein by copper ions, endothelial and smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 143: 75-80
74. Jerala R, Porro M (2004) Endotoxin neutralizing peptides. *Curr Top Med Chem* 4: 1173-1184
75. Su D, Roth RI, Yoshida M, Levin J (1997) Hemoglobin increases mortality from bacterial endotoxin. *Infect Immun* 65: 1258-1266
76. Carrillo EH, Gordon LE, Richardson JD, Polk Hc Jr (2002) Free hemoglobin enhances tumor necrosis factor-alpha production in isolated human monocytes. *J Trauma* 52: 449-452
77. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M (2004) Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock* 22: 403-409
78. Nakamura M, Honda Z, Waga I, Matsumoto T, Noma M, Shimizu T (1992) Endotoxin transduces Ca²⁺ signaling via platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett* 314: 125-129
79. Schmidt A, Caron E, Hall A (2001) Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. *Mol Cell Biol* 21: 438-448
80. Shinji H, Akagawa KS, Tsuji M, Maeda M, Yamada R, Matsuura K, Yamamoto S, Yoshida T (1997) Lipopolysaccharide-induced biphasic inositol 1,4,5-trisphosphate response and tyrosine phosphorylation of 140-kilodalton protein in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 158: 1370-1376
81. Malhotra R, Priest R, Bird M (1996) Role for L-selectin in lipopolysaccharide-induced activation of neutrophils. *Bioch J* 320: 589-593
82. Stelter F, Bernheiden M, Menzel R, Jack RS, Witt S, Fan X, Pfister M, Schutt C (1997) Mutation of amino acids 39-44 of human CD14 abrogates binding of lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 243: 100-109
83. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162
84. Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ (2004) Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol* 12: 484-488
85. Schromm AB, Brandenburg K, Rietschel ETH, Flad HD, Carroll SF, Seydel U (1996) Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett* 399: 267-271

The proinflammatory activity of lipopolysaccharide

Joanna Saluk-Juszczak, Barbara Wachowicz 

Department of General Biochemistry, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

✉ e-mail: wachbar@biol.uni.lodz.pl

Key words: endotoxin, lipopolysaccharide, inflammation, inflammatory mediators

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) is the major component of the outer membranes of the walls of gramnegative bacteria that protects bacterial cells against antibacterial agents. LPS is the heteropolimer consisting of two parts: the hydrophobic lipid A and hydrophilic polysaccharide. After lysis of bacterial cells LPS is released into the circulation and it is able to activate the immunological system by stimulation of monocytes, macrophages, neutrophils, blood platelets and endothelial cells. LPS can bind to plasma proteins and form complexes that increase toxic activity of LPS and affinity of LPS to cell receptors. The activation of immune cells by LPS leads to release of inflammatory mediators: cytokines, chemokines, enzymes, eicosanoids, adhesion agents and free radicals that are responsible for progression of inflammatory reactions and may induce pathophysiological processes including septic shock.

Tarczycowe czynniki transkrypcyjne związane z procesem biosyntezy hormonów tarczycy

Michał Ambroziak[✉]

Alicja Nauman

Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

[✉]Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; e-mail: ambroz@amwaw.edu.pl, tel. (22) 834 01 65

Artykuł otrzymano 13 stycznia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 28 lutego 2005 r.

Słowa kluczowe: biosynteza hormonów tarczycy, tarczycowe czynniki transkrypcyjne, Foxe1, Pax8, Ttf1/Nkx2-1

Wykaz skrótów: CRE – element odpowiedzi cAMP; CREB – białko wiążące element odpowiedzi cAMP; D1, D2 – jodotyroninowe 5' dejodynazy typu 1 i typu 2; Foxe1 – tarczycowy czynnik transkrypcyjny 2; HD – homeodomena; NIS – symporter Na⁺/I⁻; Pax8 – czynnik transkrypcyjny; T3 – 3,5,3'-trijodo-L-tyronina; T4 – 3,5,3',5'-tetrajodo-L-tyronina; Tg – tyreoglobulina; Ttf1/Nkx2-1 – tarczycowy czynnik transkrypcyjny 1; TPO – tyreoperoksydaza; TR – receptory jądrowe trijodotyroniny; TRH – tyreoliberyna, podwzgórzowy hormon uwalniający tyreotropinę; TSH – tyreotropina, przysadkowy hormon glikoproteinowy; TSH-R – receptor TSH; TTF – tarczycowe czynniki transkrypcyjne

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN PO5A 128 26 projektu CMKP 501-2-1-22-32/04

STRESZCZENIE

Prawidłowy przebieg biosyntezy hormonów tarczycy zależy od poziomu ekspresji i działania podstawowych białek zaangażowanych w ten proces: receptora tyreotropiny (TSH-R), sodowo-jodkowego symportera (NIS), tyreoglobuliny (Tg), peroksydazy tarczycowej (TPO) oraz jodotyroninowych dejodynaz typu 1 (D1) i typu 2 (D2). Zasadniczy wpływ na aktywację transkrypcji genów kodujących te białka mają, oprócz kaskady tyreotropina/cAMP, specyficzne dla tarczycy czynniki transkrypcyjne. Spośród znanych obecnie tarczycowo-swoistych czynników transkrypcyjnych największe znaczenie dla prawidłowego rozwoju, wzrostu i funkcjonowania gruczołu tarczowego mają czynniki: Ttf1/Nkx2-1, Foxe1 i Pax8. Upośledzenie ekspresji i/lub funkcji wymienionych czynników transkrypcyjnych mogą być zarówno przyczyną wrodzonych nieprawidłowości gruczołu tarczowego, jak i leżać u podłoża procesów nowotworzenia w tym narządzie.

WPROWADZENIE

Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp wiedzy, dotyczącej współdziałania białek biorących udział w regulacji biosyntezy hormonów tarczycy. Proces ten jest kontrolowany przez tarczycowe czynniki transkrypcyjne (TTF, ang. *thyroid transcription factor*). Czynniki te, wiążąc się w regionie promotorowym genu docelowego ze swoistymi sekwencjami DNA, regulują ekspresję genów, których produkty białkowe mają kluczowy wpływ na poszczególne etapy biosyntezy hormonów tarczycy. Skutkiem wiązania lub braku wiązania tarczycowych czynników transkrypcyjnych z DNA jest zmiana poziomu ekspresji białek i ich aktywności enzymatycznej, co ma istotny wpływ na rozwój, różnicowanie a wreszcie prawidłowe funkcjonowanie komórek gruczołu tarczowego [1, 2]. Biosynteza i mechanizm działania hormonów tarczycy jest aktualnie szeroko badanym zagadnieniem ze względu na udział tych hormonów w regulacji podstawowych funkcji komórki odpowiadających za tkankową i narządową homeostazę organizmu – takich jak proliferacja, różnicowanie lub apoptoza. W sposób zależny od etapu rozwojowego oraz rodzaju tkanki hormony tarczycy są niezbędne zarówno w życiu pre- jak i postnatalnym. Niedobór i nadmiar hormonów tarczycy a także ich nieprawidłowa funkcja prowadzą do poważnych zaburzeń rozwoju płodu i funkcjonowania wielu tkanek i narządów w dorosłych organizmach.

Synteza hormonów tarczycy w gruczole tarczowym zależy od wielu czynników: (1) od zawartości jodu w diecie; (2) aktywnego transportu jodków I przez błonę komórek tarczycy; (3) utleniania jodków (przekształcenie I do I⁰); (4) ekspresji genu tyreoglobuliny (TG) w komórkach pęcherzykowych nabłonka tarczycy; (5) potranslacyjnej modyfikacji produktu białkowego genu TG – tyreoglobuliny (m.in. jodowaniu reszt tyrozylowych tyreoglobuliny i ich sprzęganiu), co prowadzi do syntezy tyroksyny (T4) i trijodotyroniny (T3) na powierzchni tyreoglobuliny; (6) przemieszczania się tyreoglobuliny zmagazynowanej w świetle pęcherzyków (na drodze endocytozy) do komórek pęcherzyków tarczycowych, gdzie pod wpływem enzymów lizosomalnych ulega proteolizie do aktywnych postaci hormonów tarczycy; (7) tarczycowej (pozatyreoglobulinowej) syntezy T3 z T4 (konwersji T4 do T3 – procesu, katalizowanego przez mikrosomalne jodotyroninowe 5'-dejodynazy); (6) wydzielania hormonów tarczycy do krwioobiegu. Wszystkie wymienione wyżej etapy biosyntezy hormonów tarczycy ściśle zależą od stymulującego działania i negatywnych sprzężeń zwrotnych hormonów, wydzielanych przez oś podwzgórze – przysadka – tarczyca [3]. Hormon podwzgórzowy tyreoliberyna (TRH, ang. *thyrotropin-releasing hormone*) jest transportowany do przedniego płata przysadki mózgowej, gdzie wiąże się z receptorami komórek tyreotropowych, powodując wydzielanie tyreotropiny (TSH). Tyreotropina z kolei wiąże się z błonowymi receptorami TSH (TSH-R) w tyreocytach i poprzez kaskadę tyreotropina/cAMP stymuluje m.in. ekspresję genów kodujących podstawowe białka zaangażowane w proces syntezy hormonów tarczycy: tyreoglobuliny, symportera sodowo-jodkowego (NIS), który aktywuje aktyw-

ny transport jonu jodkowego z krwioobiegu do tyreocyty wbrew gradientowi elektrochemicznemu (przeniesieniu 1 jonu jodkowego towarzyszy transport 2 jonów sodu), pendryny (transportera I,Cl), peroksydazy tarczycowej (TPO), układu generującego H₂O₂ oraz jodotyroninowych 5' - dejodynaz [4]. Z kolei hormony tarczycy, na drodze negatywnego sprzężenia zwrotnego, regulują wydzielanie hormonów przez oś podwzgórze - przysadka - tarczyca. Komórki nabłonkowe gruczołu tarczycowego syntetyzują i wydzielają do krwiobiegu dwie fizjologiczne formy hormonu tarczycy: 3,5,3',5'-tetrajodo-L-tyroninę, znaną powszechnie jako tyroksyna, T4 (ok. 120 nmoli /dobę - jest to jedyne źródło tego hormonu) i 3,5,3'-trijodo-L-tyroninę (trijodotyronina, T3), ok. 8 nmoli/dobę, co stanowi ok. 20% ogólnej puli T3. Pozostałe 80% T3 jest produkowane w innych organach przez odjodowanie (dejodynację), tj. odłączenie atomu jodu w pozycji 5' pierścienia fenolowego (zewnętrzznego) tyroksyny. Ponad 70% całkowitej puli T4 wydzielanej na dobę z tarczycy ulega w tkankach obwodowych procesowi dejodynacji do T3. Dlatego też, T4 jest uważana za prohormon dla T3, a enzymatyczny proces dejodynacji (zwany często konwersją albo biotransformacją T4 do T3) za pierwszy etap działania hormonu tarczycy na poziomie molekularnym [5]. Enzymami katalizującymi konwersję T4 do T3 w komórkach docelowych są jodotyroninowe 5' dejodynazy [6].

Fizjologiczna funkcja tarczycowych czynników transkrypcyjnych polega na regulowaniu transkrypcji genów docelowych zawierających w swych częściach regulatorowych swoiste sekwencje DNA, z którymi te czynniki (białka) się wiążą. Tarczycowe czynniki transkrypcyjne są odpowiedzialne za ekspresję takich białek tarczycowych jak: tyreoglobulina, tyreoperoksydaza, receptor tyreotropiny, symporter Na⁺/I⁻ oraz jodotyroninowe 5' dejodynazy: typu 1 i typu 2. Występowanie tarczycowych czynników transkrypcyjnych w gruczole tarczycowym (determinujące ich działanie), ich ekspresja podczas rozwoju i różnicowania tarczycy na bardzo wczesnych etapach organogenezy, ich udział w regulacji poszczególnych etapów biosyntezy hormonów tarczycy a także zaburzona ekspresja w nowotworowych komórkach tarczycy sprawia, że są one przedmiotem intensywnych badań. Niniejsza praca przeglądowa dotyczy głównie tarczycowych czynników transkrypcyjnych, które zostały wykryte w tarczycy człowieka. W pracy nie są omawiane szerzej geny/białka, które są regulowane przez te czynniki. Autorzy cytują jedynie nowsze prace oryginalne i odsyłają do najnowszych prac przeglądowych.

TARCZYCOWO-SWOISTE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Tarczycowo-swoiste czynniki transkrypcyjne (TTF) należą do rodziny białek jądrowych. Fizjologiczna funkcja TTF polega na regulowaniu transkrypcji genów docelowych, zawierających w swych częściach promotorowych miejsce wiązania tarczycowych czynników transkrypcyjnych. Kierują one rozwojem gruczołu tarczycowego i pośredniczą w regulacji transkrypcji genów, których produkty białkowe są niezbędne dla syntezy hormonów tarczycy. Spośród znanych tarczycowych czynników transkrypcyjnych, obecnych zarówno w dojrzałych komórkach tarczycy, jak też w ich prekursorach, najważniejsze wydają się: Titf1/Nkx2-1,

(dawniej zwany TTF1, ang.: thyroid transcription factor 1), Foxe1, (dawniej zwany TTF2, ang. *thyroid transcription factor 2*) i Pax8 (ang. *paired box domain transcription factor 8*). TTF mają podobny ogólny schemat budowy, są polipeptydami o różnej długości. Cechą charakterystyczną tych białek jest obecność kilku ułożonych tandemowo domen, a przede wszystkim 60-aminokwasowej domeny zw. homeodomeną (HD). Homeodomena odgrywa rolę czynnika transkrypcyjnego i odpowiada za wiązanie tarczycowych czynników transkrypcyjnych z specyficzną sekwencją DNA (zw. homeoboxem) genu docelowego. Sekwencje homeodomeny wykazują wysoką homologię, głównie dotyczy to fragmentu, składającego się z 12 aminokwasów, biorących bezpośredni udział w wiązaniu z DNA. Oprócz homeodomeny w obrębie tarczycowych czynników transkrypcyjnych wykazano obecność 2 innych charakterystycznych domen, aktywujących transkrypcję, zlokalizowanych w kierunku C- i N-końca od homeodomeny (odpowiednio domeny C i N) [1]. Domena N-końcowa wykazuje silniejsze działanie - może sama aktywować transkrypcję genu docelowego. Obie domeny aktywujące zbudowane są z dwóch części o odmiennych funkcjach: modułu aktywującego i regulującego [7]. Ten ostatni nie może sam aktywować transkrypcji, modyfikuje jedynie funkcje modułu aktywującego w zależności od budowy promotora docelowego genu. Poza rozpoznawaniem odpowiedniej sekwencji DNA, homeodomena odpowiada także za jądrową lokalizację. Na N-końcu homeodomeny znajduje się podstawowy sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*), drugi taki sygnał znajduje się w centrum homeodomeny [8].

Tarczycowe czynniki transkrypcyjne są niezbędne dla prawidłowego rozwoju i różnicowania gruczołu tarczycowego, na co wskazują badania prowadzone na zwierzętach. Tarczyca rozwija się ze środkowej linii endodermalnego zgrubienia brzusznej ściany pierwotnego gardła między 8 a 9 dniem *post coitum* w rozwoju embrionalnym myszy, co odpowiada okresowi między 20 a 24 dniem rozwoju embrionalnego człowieka [1]. Obecność tyreoglobuliny, tyreoperoksydazy i receptora TSH w tarczycy embrionów mysich stwierdza się dopiero około 15 dnia, zaś synteza hormonów tarczycy rozpoczyna się w 16.5-17 dniu. Obecność mRNA i białka Titf1/Nkx2-1 oraz Pax-8 stwierdza się natomiast znacznie wcześniej, na samym początku tarczycowej organogenezy co sugeruje, że oba czynniki odgrywają ważną rolę w tworzeniu i rozwoju prekursorów komórek tarczycowych (Rys. 1).

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY TITF1/NKX2-1

Titf1/Nkx2-1, (poprzednio zwany TTF-1, ang. *thyroid transcription factor-1*) został zidentyfikowany jako pierwsze białko jądrowe zdolne do wiązania się z specyficznymi sekwencjami DNA obecnymi w promotorze genu tyreoglobuliny (*Tg*). Ekspresja Titf1/Nkx2-1 nie jest ograniczona wyłącznie do tyreocytów. Białko to zidentyfikowano również w płucach i ośrodkowym układzie nerwowym. Gen *TITF1/NKX2-1* człowieka leży w regionie q13 chromosomu 14, składa się z 3 eksonów i dwóch intronów. Pierwszy z eksonów nie ulega translacji. Transkrypcja genu *TITF1/NKX2-1* może rozpoczynać się w kilku miejscach startu transkrypcji, zlokalizowanych około 50 nukleotydów w kierunku 5' od



Rysunek 1. Schemat rozwoju tarczycy w życiu płodowym myszy. Poszczególnym etapom tego procesu w kolejnych dniach embriogenezy towarzyszy stopniowe pojawianie się w rozwijających się komórkach najpierw czynników transkrypcyjnych Titf1/Nkx2-1 i Pax8, potem białek Tg, TSH-R, TPO, NIS, a w końcu rozpoczęcie syntezy hormonów T3 i T4.

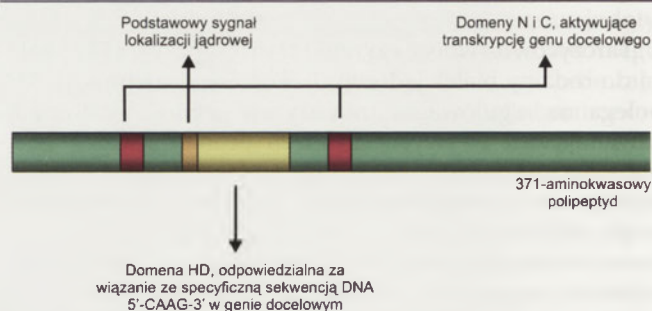
pierwszego eksonu. W obrębie drugiego eksonu znajduje się sekwencja kodująca homeodomenę. Transkrypt genu ma długość 2.1 kpz i koduje proteinę o długości 371 aminokwasów (Rys. 2) [9]. Region Titf1/Nkx2-1 rozpoznający w promotorze genu docelowego specyficzną sekwencję DNA 5'-CAAG-3', (tzw. element odpowiedzi na Titf1/Nkx2-1) zawiera motyw domeny wiążącej typu helisa-zwrot-helisa (ang. *helix-turn-helix*, HTH). Element odpowiedzi na Titf1/Nkx2-1 zidentyfikowano m.in. w promotorach genów: *TSH-R*, *TG*, *TPO*, *NIS*, *DIO2* [1]. W obrębie promotora genu *TSH-R* zidentyfikowano 2 miejsca wiązania Titf1/Nkx2-1, przy czym wydaje się, że wiązanie z miejscem proksymalnym nie ma znaczenia funkcjonalnego. W aktywacji transkrypcji genu *TSH-R* czynnik Titf1/Nkx2-1 działa synergistycznie z białkiem CREB (ang. *cAMP responsive element binding protein*) [1]. W badaniach prowadzonych na tyreocytach FRTL-5 szczura obserwowano istotne obniżenie poziomu Titf1/Nkx2-1 mRNA pod wpływem tyreoglobuliny [10]. Fakt ten, w połączeniu z danymi na temat aktywacji ekspresji Tg przez Titf1/Nkx2-1, wskazuje na szczególną pętlę sprzężenia zwrotnego, działającą między tymi kluczowymi dla rozwoju i funkcji tarczycy białkami [11].

Regulacja aktywności Titf1/Nkx2-1 jest bardzo złożona i zaangażowanych w nią jest wiele czynników. Przede wszystkim gen *TITF1/NKX2-1* jest regulowany przez produkty własnej transkrypcji - na końcu 5' genu *TITF1/NKX2-1* szczura zlokalizowano przypuszczalne miejsce wiązania homodomeny Titf1/Nkx2-1. Zwiększona ekspresja Titf1/Nkx2-1 zwiększa aktywność promotora tego genu, co potwierdza autoregulacyjne właściwości Titf1/Nkx2-1 [12]. Ważnymi czynnikami, regulującymi aktywność Titf1/Nkx2-1 są białka z grupy Hox (w szczególności Hoxb-3), czynnik Oct-1 (ang. *octamer binding protein*), który reguluje podstawową transkrypcję genu *TITF1/NKX2-1* (białko Oct odgrywają istotną rolę w aktywacji promotorów nie mających typowej struktury TATA box, do których należy też promotor *TITF1/NKX2-1*) oraz GATA-6 [1]. Wiązanie Titf1/Nkx2-1 do GATA-6 wymaga obecności homeodomeny oraz jednej z domen aktywujących: N lub C [13]. Silnym stymulatorem promotora genu *TITF1/NKX2-1* jest także HNF-3 (ang. *hepatocyte nuclear factor 3*), wiadomo też, że gli-

kokortykoidy zwiększają ekspresję Titf1/Nkx2-1 [14]. Z kolei, w badaniach z zastosowaniem genów reporterowych dowiedziano, że czynnik martwicy nowotworów (TNF α) zmniejsza zarówno poziom specyficznego mRNA dla Titf1/Nkx2-1, jak i osłabia zdolność wiązania DNA przez ten czynnik [15].

Regulacja działania Titf1/Nkx2-1 dotyczy nie tylko poziomu ekspresji, ale także wpływu na wiązanie homodomeny z DNA genu docelowego [2]. Do najważniejszych mechanizmów działających na tym etapie niewątpliwie należy kaskada kinazy białkowej A zależnej od cAMP (cAMP/PKA). Z jednej strony wskazywano na hamowanie ekspresji Titf1/Nkx2-1 przez TSH via cAMP, z drugiej zaś udowodniono, że dodanie podjednostki katalitycznej PKA do hodowli tyreocytów FRTL-5 szczura zwiększa aktywność wiązania Titf1/Nkx2-1-DNA oraz zależną od Titf1/Nkx2-1 transaktywację genu docelowego. Kluczową rolę odgrywa fosforylacja Titf1/Nkx2-1 na jego N-końcu, warunkująca aktywność transkrypcyjną domeny N. Czynnik Titf1/Nkx2-1, którego fosforylacja była upośledzona wiązał się z promotorem genu *TG* w komórkach FRTL-5, ale nie był zdolny do transaktywacji genu reporterowego [16]. Wynika z tego, że fosforylacja Titf1/Nkx2-1 nie wpływa na samą zdolność wiązania DNA, lecz na aktywowanie promotora docelowego, choć prawdopodobnie rola tego procesu jest odmienna w różnych typach komórek.

Inną drogą regulacji aktywności transkrypcyjnej Titf1/Nkx2-1 w komórkach tarczycowych jest szlak kaskady Raf/MEK/ERK (Raf - kinaza serynowo-treoninowa; MEK - kinaza aktywowana mitogenem (ang. *mitogen activated protein kinase*); ERK - kinaza regulowana pozakomórkowo (ang. *extracellular regulated kinase*) [17]. W procesie tym za pośrednictwem ERK dochodzi do fosforylacji Titf1/Nkx2-1 - trzech reszt serynowych, których zamiana na alaninę całkowicie hamuje zależną od tej kinazy fosforylację, zarówno w układach *in vitro* jak i *in vivo*. Możliwe jest też, że w fosforylacji Titf1/Nkx2-1 w tyreocytach bierze udział kinaza białkowa C, która odwrotnie niż Titf1/Nkx2-1 hamuje różnicowanie komórek tarczycowych. Aktywność wiązania Titf1/Nkx2-1 z DNA jest także zależna od procesów redukcyjno-oksydacyjnych (redox) [18]. Odwracalne przechodzenie cysteiny w łańcuchu białkowym czynnika transkrypcyjnego z formy zredukowanej w utlenioną zmienia aktywność wiązania DNA. Oksydacja zmniejsza zdolność wiązania DNA, co spowodowane jest tworzeniem mostków siarczkowych między dwoma cysteinami zlokalizowanymi poza HD (w pozycjach 87 i 363). Z kolei czynniki redukujące



Rysunek 2. Schemat budowy czynnika transkrypcyjnego Titf1/Nkx2-1 z zaznaczeniem poszczególnych struktur, odpowiedzialnych za jego funkcje.

przywracają właściwą zdolność wiązania czynnika z DNA. Reakcje redox mogą zatem stanowić jedną z dróg regulacji aktywności tarczycowych czynników transkrypcyjnych. Aktywność wiązania DNA przez *Titf1/Nkx2-1* zwiększa się także pod wpływem insuliny [19]. Kolejny mechanizm modyfikacji potranslacyjnych czynnika *Titf1/Nkx2-1* łączy się z działaniem kofaktorów. Jednym z nich jest kalretikulina (białko wiążące wapń, zaangażowane w magazynowanie w komórkach tego pierwiastka oraz tworzenie glikoprotein), która poprzez bezpośrednie oddziaływanie z homeodomeną powoduje zwiększenie aktywności wiązania DNA, a przez to aktywacji transkrypcji [20]. Wykazano też, że *Titf1/Nkx2-1*, będąc czynnikiem transkrypcyjnym zależnym od Ca^{2+} , jest jednocześnie zaangażowany w regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za homeostazę wapniową: zewnątrzkomórkowego receptora Ca^{2+} , kalmoduliny i kalcytoniny. *Titf1/Nkx2-1* wykazuje wreszcie wrażliwość na strukturę docelowego promotora: obie domeny wiążące *Titf1/Nkx2-1* są takie same w promotorach genów *TG* i *TPO*, ale oddzielający je odcinek jest różny, co zapewne jest przyczyną opisywanego silniejszego pobudzenia transkrypcji genu *TG* przez *Titf1/Nkx2-1* [9].

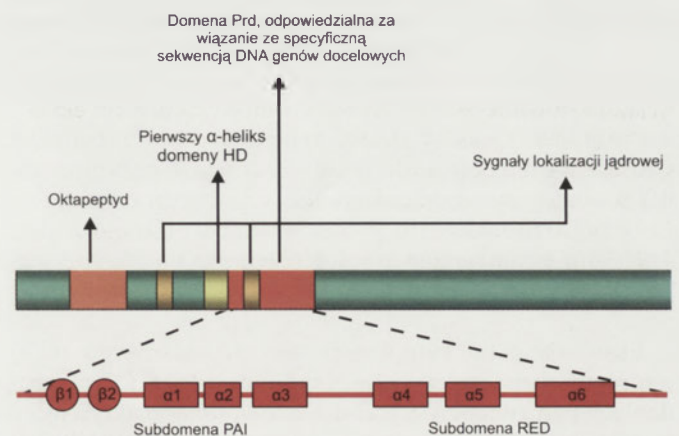
CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY FOXE1

Czynnik *Foxe1* (poprzednio zwany TTF-2, ang. *thyroid transcription factor 2*) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych, zawierających domenę aktywującą *forkhead* (ang. *forkhead protein family*), której obecność decyduje o roli, jaką białka te odgrywają w rozwoju i różnicowaniu komórki [1]. *Foxe1* odpowiedzialny jest za prawidłowy rozwój tarczycy oraz proces migracji dojrzewającego gruczołu tarczowego wzdłuż przewodu tarczowo-językowego w życiu płodowym. Gen *FOXE1* zlokalizowano na ramieniu długim chromosomu 9 w pozycji 9q22.3 [21]. Zbudowany jest z jednego eksonu, a mRNA zawiera 3476 zasad. Koduje białko składające się z 376 aminokwasów. Ekspresja genu stwierdzana jest w tarczycy, przysadce, endodermie jelit, i ektodermie czaszkowogardłowej. W potranskrypcyjnej regulacji na etapie alternatywnego składania mRNA *Foxe1* dochodzi do powstania dwóch odmiennej długości mRNA (2.3 i 2.8 tysięcy par zasad), różniących się na końcu 3' długością ogona poliadenylowego. Cechą charakterystyczną białka *Foxe1* jest obecność dwóch domen o odmiennych właściwościach funkcjonalnych: domeny aktywującej *forkhead* (*fkh*) i hamującej. Domena *fkh*, zbudowana z około 100 aminokwasów, rozpoznaje specyficzną sekwencję DNA genu docelowego i decyduje o wiązaniu się z nią. *Foxe1* reguluje transkrypcję genów w dwóch różnych mechanizmach: aktywacji, opartej na oddziaływaniu domeny *fkh* z nukleosomem oraz hamowaniu przez domenę hamującą koaktywatorów zaangażowanych w procesy transkrypcji [2]. Udowodniono udział czynnika *Foxe1* w regulacji transkrypcji genów *TG* i *TPO* w tarczycy. W obrębie promotorów tych genów zlokalizowano miejsca wiązania czynnika *Foxe1*. Wpływ *Foxe1* 2 na promotory genów *TG* i *TPO* polega prawdopodobnie na hamowaniu ich aktywacji przez czynniki TTF-1 i Pax8, jednak mechanizm ten nie został jeszcze dostatecznie poznany. W komórkach tarczycowych czynnikiem, który wydaje się zmniejszać ekspresję *Foxe1* jest tyreoglobulina. Badania, prowadzone na komórkach FRTL-5 pozwoliły stwierdzić, że ekspresja czynnika *Foxe1* zwiększa się pod wpływem

cAMP, TSH oraz insuliny [2]. Defekt genu *FOXE1* może być przyczyną ektopowej lokalizacji tarczycy w obrębie języka, niekiedy powoduje agenezję tarczycy.

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY PAX8

Pax8 jest odpowiedzialny za dojrzewanie i proliferację prekursorów komórek pęcherzykowych. Ponadto reguluje ekspresję genów *TPO* i *TG*. Defekt *Pax8* powoduje agenezję lub hipoplazję gruczołu tarczowego. *Pax8* należy do czynników transkrypcyjnych, których charakterystyczną cechą jest domena Prd wiążąca DNA (ang. *paired box domain*). Jest to 128-aminokwasowa struktura, która rozpoznaje specyficzne sekwencje DNA genów docelowych. Składa się z dwóch niezależnych domen PAI (od końca N) i RED (od końca C) – Rys. 3 [22]. Zmienny sposób łączenia tych dwóch domen zapewnia możliwość rozpoznawania różnych sekwencji DNA. Domena Prd może wiązać DNA samodzielnie albo wraz z homeodomeną, której pierwsza pętla o strukturze α -helisy wchodzi w skład struktury *Pax8*. Niekiedy, w wyniku alternatywnego składania, zachodzącego podczas transkrypcji genu dochodzi do inaktywacji subdomeny PAI i wtedy sekwencje genów docelowych są rozpoznawane tylko przez RED. Jednak dla w pełni efektywnego działania aktywującego transkrypcję genu docelowego potrzebne jest współdziałanie obu subdomen. W sekwencji *Pax8* zidentyfikowano również specyficzną sekwencję oktapeptyd oraz dwa rejony odpowiedzialne za jądrową lokalizację białka – jeden z nich w obrębie Prd, drugi zaś między oktapeptydem a homodomeną [2]. Gen kodujący *Pax8* zlokalizowany jest u człowieka na chromosomie 2 q12-14 [23]. Składa się co najmniej z 12 eksonów i 11 intronów. W przebiegu transkrypcji genu *PAX8* dochodzi do alternatywnego składania mRNA, czego efektem jest powstawanie kilku izoform, różniących się między sobą budową końca karboksylowego homeodomeny [24]. mRNA składa się z 1372 zasad a produkt białkowy zawiera 398 aminokwasów. Opisano 4 izoformy *Pax8* (a, b, c, d), powstające przez włączenie lub wyłączenie eksonu 7 i/lub 8 [2]. Poszczególne izoformy *Pax8* różnią się między sobą sekwencją odpowiedzialną za regulację transkrypcji, zlokalizowaną na końcu karboksylowym HD. Są to w *Pax8* a – rejon o długości 63 reszt aminokwasowych bogaty w reszty seryny, a w *Pax8* b sekwencja bogata w reszty seryny, treoniny i tyrozyny, zaś w *Pax8* c i d rejon o długości



Rysunek 3. Schemat budowy czynnika transkrypcyjnego Pax8 z zaznaczeniem poszczególnych struktur, charakterystycznych dla rodziny Pax8 jak i wspólnych z czynnikiem *Titf1/Nkx2-1*.

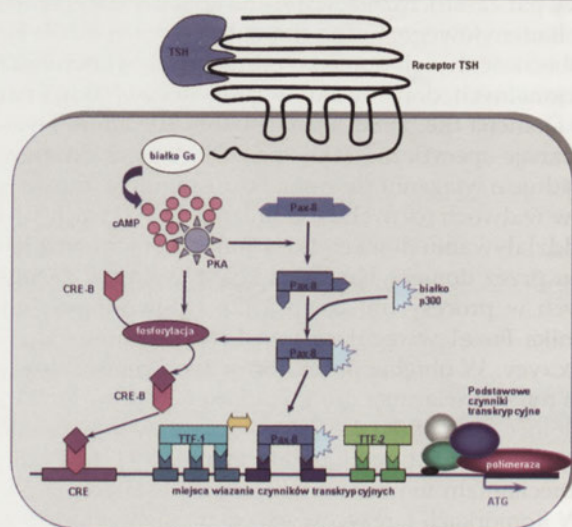
99 reszt aminokwasowych bogaty w reszty proliny. W rozwijającym się łożysku stwierdzono 2 dodatkowe izoformy e i f, nie mające 6 eksonu, których ekspresja zmniejsza się w kolejnych dniach rozwoju. Zidentyfikowano także kilka dodatkowych izoform mRNA Pax8 człowieka w tarczycy, nerkach i łożysku [25]. Powstają one na drodze włączenia lub wykluczenia eksonu 8 i/lub eksonu 9. Produkty białkowe wszystkich izoform mają kompletne domeny Prd, różnią się natomiast budową domeny transaktywującej, co wpływa na ich odmienne właściwości. Domena aktywująca zbudowana jest z dwóch modułów: aktywującego, kodowanego przez ekson 10 i 11 oraz z otaczającego go modułu hamującego, kodowanego przez ekson 9 i 12 [26]. Różnicowe składanie wymienionych modułów prowadzi do uzyskiwania różnej aktywności modułu hamującego w odmiennych typach komórek. Wskazuje to na istotną rolę zjawiska alternatywnego składania, decydującego o uzyskiwaniu funkcji regulacji transkrypcji genów docelowych przez białka z rodziny Pax. Ekspresja Pax8 regulowana jest przez TSH na poziomie transkrypcji, prawdopodobnie za pośrednictwem niezidentyfikowanych jeszcze czynników [27]. Wiązanie DNA przez Pax8 zależy, podobnie jak w przypadku Titf1/Nkx2-1, od reakcji redukcji i utleniania. Udowodniono, że w zależnej od reakcji redox regulacji Pax8 zasadniczą rolę odgrywają modyfikacje cysteiny w pozycjach 45 i 57, wywoływane przez Ref-1 [28].

UDZIAŁ TITF1/NKX2-1 I PAX8 W METABOLIZMIE HORMONU TARCZYCY

W obrębie promotora genu *TG* stwierdzono trzy miejsca wiązania Titf1/Nkx2-1 A, B, C [29]. Miejsce C zachodzi na miejsce wiązania czynnika Pax8, zaś między miejscem B a C zlokalizowano miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxe1. Badania funkcjonalne wskazują, że Titf1/Nkx2-1 i Pax8 aktywują synergistycznie promotor genu *TG* [30]. Pax8 odgrywa szczególną rolę w regulacji ekspresji tyreoglobuliny przez TGFβ1, zaś z drugiej strony, podobnie jak w przypadku Titf1/Nkx2-1 i Foxe1, tyreoglobulina hamuje ekspresję Pax8 [31, 32]. Jednocześnie wiadomo, że ekspresja Pax8 zwiększa się pod wpływem TSH, co może wskazywać na udział tego czynnika w regulacji ekspresji genu *TG* przez TSH (w promotorze tego genu nie zidentyfikowano jak dotąd miejsca CRE). W badaniach *in vitro* udowodniono, że czynnik transkrypcyjny Titf1/Nkx2-1 aktywuje transkrypcję genu *TSH-R* [2]. W obrębie jego promotora zidentyfikowano 2 miejsca wiązania Titf1/Nkx2-1, przy czym wydaje się, że wiązanie z miejscem proksymalnym nie ma znaczenia funkcjonalnego. W aktywacji transkrypcji genu *TSH-R* czynnik Titf1/Nkx2-1 działa synergistycznie z białkiem CREB, choć nie potwierdziły się wcześniejsze przypuszczenia o wzajemnym oddziaływaniu tych dwóch czynników. Dotychczas nie zidentyfikowano w obrębie promotora genu *TSH-R* miejsca wiązania drugiego czynnika transkrypcyjnego – Pax8.

Ekspresja genu symportera sodowo-jodkowego (*NIS*) jest regulowana przez Titf1/Nkx2-1 jak i Pax8 [33]. W badaniach nad genem *NIS* szczura udowodniono aktywujący wpływ na transkrypcję tego genu czynnika Titf1/Nkx2-1, który działa prawdopodobnie zarówno jako element kaskady TSH/cAMP jak i bezpośrednio, a być może przy udziale

jeszcze innych, niezidentyfikowanych dotychczas czynników aktywujących. W obrębie promotora genu *NIS* zidentyfikowano odcinek, nazywany NUE (ang. *NIS 5'-far upstream enhancer*), zawierający dwa miejsca wiążące Pax8 i odcinek aktywowany przez cAMP [34]. Wiązanie Pax8 z elementem NUE genu *NIS* człowieka jest warunkiem koniecznym do uzyskania pełnej aktywności tego białka w tyreocytach człowieka. Co więcej, konieczne jest tutaj współdziałanie z aktywnym CRE [35]. Wydaje się jednak, że, chociaż oba czynniki, Titf1/Nkx2-1 i Pax8, są potrzebne w procesie transkrypcji genu *NIS*, to odgrywają one tutaj mniejszą rolę, niż w przypadku innych genów specyficznych dla tarczycy, co tłumaczyłoby wysoką ekspresją *NIS* w niektórych narządach pozatarczycowych, takich jak sutek [36]. W obrębie promotora genu *TPO* zidentyfikowano trzy miejsca wiązania Titf1/Nkx2-1 oraz jedno miejsce wiązania Pax8 zlokalizowane w obszarze wzmacniającym promotora genu *TPO* [37]. W pracach z wykorzystaniem genów reporterowych potwierdzono aktywujący wpływ Pax8 i Titf1/Nkx2-1 na transkrypcję genu *TPO* [1, 2]. Mechanizm tego oddziaływania nie został jednak jeszcze w pełni poznany. Wydaje się, że oba czynniki mogą wpływać na promotor genu *TPO* zarówno za pośrednictwem cAMP, jak i bezpośrednio. Wiadomo, że ekspresja genu *TPO* jest regulowana przez TSH, za pośrednictwem cAMP, chociaż w promotorze nie udało się zidentyfikować sekwencji CRE. Oznacza to, że w tą regulację zaangażowane mogą być nie tylko Titf1/Nkx2-1 i Pax8, ale także inne czynniki transkrypcyjne. W badaniach, prowadzonych na hodowlach komórkowych HeLa wykazano, że Pax8 wykazuje synergistyczny wpływ na aktywację promotora genu *TPO* z innym czynnikiem transkrypcyjnym p300, który odgrywa rolę koaktywatora [38]. Wykazano, że oba te czynniki tworzą aktywujący kompleks, dzięki łączeniu się białka p300 z domeną transaktywacyjną Pax8 (Rys. 4). Miejsca wiązania dla Titf1/Nkx2-1, Foxe1 i Pax8 posiadają tę samą lokalizację w promotorach genów *TG* i *TPO*. W badaniach *in vitro* wykazano jednak, że Pax8 silniej aktywuje promotor genu *TG*, podczas, gdy Titf1/Nkx2-1 – genu *TPO* [2]. Niemniej, cechą charakterystyczną aktywacji transkrypcji genów specyficznych dla tarczycy jest konieczność jed-



Rysunek 4. Uproszczony model podstawowej regulacji transkrypcji genów kluczowych dla funkcji tarczycy z uwzględnieniem roli tarczycowych czynników transkrypcyjnych Titf1/Nkx2-1, Foxe1 i Pax8, cAMP, kinaz białkowych A (PKA) oraz białka p300.

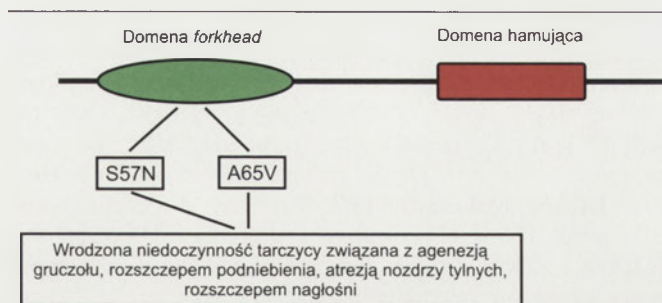
nocznego działania zarówno *Titf1/Nkx2-1* jak i *Pax8*. Jak pokazują najnowsze badania, synergistyczne działanie między *Titf1/Nkx2-1* i *Pax8* decyduje o efektywnej transkrypcji genów docelowych [39, 40].

W ostatnim czasie pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących, że specyficzne dla tarczycy czynniki transkrypcyjne wpływają nie tylko na syntezę, ale także, poprzez regulację jodotyroninowych dejodynaz, na procesy metabolizmu hormonu tarczycy. W gruczole tarczowym zidentyfikowano dotychczas jodotyroninową 5'-dejodynazę typu 1 (D1) i jodotyroninową 5'-dejodynazę typu 2 (D2). Wspólną ich cechą jest obecność podjednostki katalicznej o masie cząsteczkowej 27-30 kDa, w centrum której znajduje się selenocysteina [6]. W badaniach myszy knock-out z wyłączoną funkcją genu *Pax8* (-/-) stwierdzono zmniejszoną aktywność enzymatyczną D1 i obniżony poziom specyficznego mRNA D1, co sugeruje udział *Pax8* w regulacji ekspresji D1 [41]. Z kolei badania raka brodawkowatego tarczycy wykazały istnienie korelacji między poziomem mRNA D1 i mRNA *Pax8*, podobnie, jak między D2 i *Pax8* czy D2 i *Titf1/Nkx2-1* [42]. W badaniach funkcjonalnych promotora genu *DIO2* z zastosowaniem genów reporterowych (CAT - acetylotransferazy chloramfenikolu), przeprowadzonych w hodowlach komórek COS-7 (fibroblastów małpy) stwierdzono, że gen ludzkiej D2 jest stymulowany przez *Titf1/Nkx2-1* [43]. W obrębie promotora genu *DIO2* stwierdzono dwa miejsca wiązania *Titf1/Nkx2-1*. Nie potwierdzono natomiast w tej pracy udziału *Pax8* w aktywacji transkrypcji ani *DIO2* ani *DIO1*. Nie mniej, w chorobie Gravesa-Basedowa stwierdzono znamiennej korelację między D2 i *Pax8*, co może sugerować udział tego czynnika w aktywacji transkrypcji genu dejodynazy typu 2 w tarczycy [44]. Zapewne oddziaływanie takie odbywa się za pośrednictwem lub przy współdziałaniu innych czynników aktywujących. Wydaje się, że ważną rolę może odgrywać tu cAMP.

Badania, prowadzone w hodowlach komórek tarczycy psa wskazują, że ekspresja *Pax8* zwiększa się pod wpływem cAMP [2]. Jednocześnie, w promotorze genu *DIO2* zidentyfikowano sekwencję CRE. Oddziaływanie *Pax8* na D2 przy współdziałaniu cAMP może być więc analogiczne do tego, jakie wykazano w przypadku czynnika *Titf1/Nkx2-1* i genu TSH-R, gdzie dla pełnej aktywacji jego transkrypcji konieczne jest synergistyczne działanie *Titf1/Nkx2-1* i cAMP. Z kolei w badaniach aktywacji promotora genu NIS stwierdzono, że czynnik transkrypcyjny *Pax8*, poprzez działanie na element NRE, aktywuje ekspresję tego genu zarówno w kooperacji z cAMP, jak i niezależnie [34]. Można więc przypuszczać, że podobne mechanizmy działają w przypadku genu *DIO2*. Inna możliwość to udział w tym procesie białka aktywującego p300, analogiczne do regulacji transkrypcji genu *TPO*. Wydaje się więc, że kolejnym, choć jeszcze nie do końca zbadanym obszarem działania tarczycowych czynników transkrypcyjnych jest regulacja wewnątrz-tarczycowego metabolizmu tyroksyny.

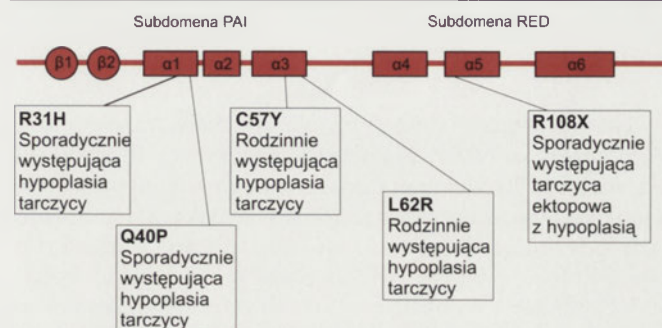
ANOMALIE CHROMOSOMALNE I MUTACJE GENÓW *TITF1/NKX2-1*, *FOXE1*, *PAX8*

Badania przeprowadzone u chorego z wrodzonym wolem i z niedoborem Tg sugerowały, że upośledzenie syntezy



Rysunek 5. Mutacje genu *FOXE1* ze schematycznym zaznaczeniem ich lokalizacji i opisem uwarunkowanej nimi wrodzonej nieprawidłowości.

tego białka spowodowane jest bardzo niską ekspresją *Titf1/Nkx2-1* [45]. Ponieważ jednocześnie stwierdzano prawidłowy poziom ekspresji czynnika *Pax8*, uważano początkowo, że za wrodzone defekty w rozwoju tarczycy odpowiada jedynie czynnik *Titf1/Nkx2-1*. Obecnie przyjmuje się, że właściwe współdziałanie obu tych czynników konieczne jest do uzyskania prawidłowej ekspresji genów docelowych [39]. W badaniach przeprowadzonych w dwóch różnych ośrodkach, u ponad 70 chorych z wrodzoną niedoczynnością tarczycy z różnego stopnia zaburzeniami rozwojowymi gruczołu tarczowego pod postacią agenezji, ektopii i hipoplazji nie stwierdzono obecności mutacji w obrębie części kodującej genu *TITF1/NKX2-1* [46, 47]. Delecję w obrębie tego genu stwierdzono natomiast u jednego noworodka z ciężkim niedorozwojem układu oddechowego, czemu towarzyszyła średniego stopnia dysfunkcja tarczycy (niska jodochwytność, wysoki poziom TSH przy prawidłowym poziomie fT4 i wielkości gruczołu) [48]. Mutacje w obrębie genu *TITF1/NKX2-1* zidentyfikowano także u innego dziecka z wrodzoną wadą układu oddechowego, zaburzeniami neurologicznymi pod postacią dyskinez i z podwyższonym poziomem TSH [49]. W kilku przypadkach rodzinnej wrodzonej niedoczynności tarczycy związanej z niewrażliwością na TSH stwierdzano polimorfizm genu *TITF1/NKX2-1*, jednak nie potwierdzono, by któryś z nich odpowiadał za powyższe schorzenie [1]. U dzieci z wrodzoną niedoczynnością tarczycy, której towarzyszyły wady rozwojowe podniebienia, zidentyfikowano mutację w genie *FOXE1* zlokalizowaną w kodonie 57 domeny wiążącej DNA, powodującą zamianę seryny na asparaginę (Rys. 5) [50]. Mutację tę, podobnie jak inną, opisaną wcześniej również w domenie wiążącej DNA, uważa się za przyczynę tych wad rozwojowych [51]. Nie potwierdziły się natomiast wcześniejsze przypuszczenia, że polimorfizm odcinka poliadenylowego genu *FOXE1*



Rysunek 6. Mutacje genu *PAX8* ze schematycznym przedstawieniem ich lokalizacji oraz spowodowane nimi wrodzone zaburzenia budowy i funkcji gruczołu tarczowego wg. Congdon i wsp. [53].

odpowiada za wady rozwojowe gruczołu tarczowego [52]. Mutacje w genie *PAX8*, prowadzące do upośledzenia zdolności transaktywacyjnych, są dość powszechnie spotykane w różnych postaciach wrodzonej niedoczynności tarczycy, jednak nie wyodrębniono jednej odpowiedzialnej za tą patologię [53, 54]. Wydaje się, że znaczenie mogą mieć tutaj inne defekty strukturalne [55]. Niemniej, zidentyfikowano kilka mutacji w obrębie domeny Prd wiążącej DNA, prowadzących zarówno do sporadycznie jak i rodzinie występujących zaburzeń rozwojowych tarczycy (Rys. 6).

UDZIAŁ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W POWSTAWANIU RAKA TARCZYCY

Ostatnio podkreśla się rolę tarczycowych czynników transkrypcyjnych w neogenezie tarczycy [1]. Ekspresja genów TTF w raku brodawkowatym tarczycy wywodzącym się z wysoko zróżnicowanej komórki pęcherzykowej, zazwyczaj była znacznie niższa niż w odpowiadających im zdrowych kontrolach. Wskazywało to na możliwość wykorzystania *Titf1/Nkx2-1* jako markera stopnia zróżnicowania nowotworu. Zaburzenia ekspresji tarczycowych czynników transkrypcyjnych w nowotworach tarczycy współistnieją z upośledzeniem ekspresji genów docelowych, jak *TG* czy *TPO* [56]. Wskazywano nawet na możliwą rolę zaburzenia koordynacji działania pomiędzy *Titf1/Nkx2-1* i *Pax8* w procesie nowotworzenia w tarczycy. Sam czynnik *Pax8* został zakwalifikowany do grupy onkogenów. Stwierdzono, że czynnik ten indukował karcinogenezę w hodowlach komórkowych [2]. W procesie tym kluczową rolę odgrywa zdolność wiązania DNA przez domenę Prd, która zostaje zaburzona w wyniku punktowej mutacji. Innym zjawiskiem związanym z procesami nowotworzenia w tarczycy jest translokacja chromosomalna $t(2; 3)(q13; p25)$ w wyniku której dochodzi do fuzji domeny wiążącej DNA z *Pax8* do białka *PPAR γ 1* (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) [57]. Stwierdzenie rearanżacji genów *PAX8-PPAR γ 1*, zarówno w rakach pęcherzykowych tarczycy, jak i gruczolakach wyklucza jednak możliwość zastosowania tego okogenu jako markera zróżnicowania nowotworów gruczołu tarczowego w materiale z biopsji cienkoigłowej [58, 59]. Nie stwierdza się natomiast tej rearanżacji w rakach brodawkowatych [60]. Dotychczasowe badania nie tylko wskazują na regulację ekspresji genu *TG* przez *Titf1/Nkx2-1* i *Pax8* w komórkach raka anaplastycznego i pęcherzykowego tarczycy, ale dowodzą także, że nadekspresja jednego z tych czynników transkrypcyjnych przywraca zaburzoną aktywność promotora genu tyreoglobuliny w tych nowotworach [61].

PODSUMOWANIE

Badania ostatniej dekady, dotyczące mechanizmów kontroli syntezy i wydzielania hormonów tarczycy, kluczowych dla rozwoju każdej komórki ludzkiego organizmu coraz wyraźniej wskazują na szczególną rolę, jaką w tych procesach odgrywają tarczycowo-swoiste czynniki transkrypcyjne. Kolejne prace pozwalają coraz lepiej poznać wpływ tych czynników na ekspresję genów odpowiedzialnych za prawidłową funkcję gruczołu tarczowego, stopniowo wyjaśniając mechanizmy molekularne tych oddziaływań. Centralne miejsce, jakie zajmują te czynniki w mechanizmach

regulacji ekspresji takich genów jak *TG*, *NIS*, *TSH-R*, *TPO*, *DIO1* czy *DIO2* wskazuje na ich istotny wpływ na rozwój, różnicowanie a wreszcie prawidłowe funkcjonowanie komórek gruczołu tarczowego. Nie bez znaczenia są doniesienia świadczące, choć w niepełny jeszcze sposób, o udziale zaburzeń działania tarczycowych czynników transkrypcyjnych w patogenezie wrodzonych nieprawidłowości gruczołu tarczowego. Wydaje się również, że zyskują na znaczeniu przesłanki, wskazujące na udział tych czynników w nowotworzeniu, a przez to na możliwości wykorzystania ich w przyszłości w diagnostyce i – być może – terapii nowotworów tarczycy.

PIŚMIENNICTWO

1. De Felice M, Di Lauro R (2004) Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 25: 722-746
2. Damante G, Tell G, Di Lauro R (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 307-356
3. Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Roscia A, Mithbaokar P, Maresca M, Marians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R (2002) Role of thyroid-stimulating receptor signaling development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15462-15467
4. Nauman J, Nauman A (1997) Racjonalna diagnostyka zaburzeń czynności tarczycy. Programy edukacyjne. Abbott Diagnostics
5. Nauman A (1990) Monodejodynacja tyroksyny do trijodotyroniny – specyficzność tkankowa. Regulacyjny wpływ katecholamin. *Endokrynologia Polska* 41, supl. 1.
6. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Rev* 23: 38-89
7. Tell G, Perrone L, Fabbro D, Pellizzari L, Pucillo C, Felice de M, Acquaviva R, Formisano S, Damante G (1998) Structural and functional properties of the N transcriptional activation domain of thyroid transcription factor 1: similarities with the acidic activation domains. *Biochem J* 329: 395-403
8. Christophe-Hoebertus Ch, Duquesne V, Pichon B, Roger PP, Christophe D (1999) Critical residues of the homeodomain involved in contacting DNA bases also specify the nuclear accumulation of thyroid transcription factor-1. *Eur J Biochem* 265: 461-497
9. Scaloni A, Moni M, Acquaviva R, Tell G, Damante G, Formisano S, Pucci P (1999) Topology of the thyroid transcription factor 1 homeodomain – DNA Complex. *Biochem* 38: 64-72
10. Suzuki K, Mori A, Lavaroni S, Miyaga E, Ulianich L, Katoh R, Kawoi A, Kohn LD (1999) In vivo expression of thyroid transcription factor 1 RNA and its relation to thyroid function and follicular heterogeneity: identification of follicular thyroglobuline as a feedback suppressor of thyroid transcription factor 1 RNA levels and thyroglobulin synthesis. *Thyroid* 9: 319-330
11. Nakazato M., Chung HK, Ulianich L, Grassadonia A, Suzuki K, Kohn LD (2000) Thyroglobulin repression of thyroid transcription factor 1 (TTF-1) gene expression is mediated by decreased DNA binding of nuclear factor 1 proteins which control constitutive TTF-1 expression. *Mol and Cell Biology* 20: 84-99
12. Oguchi H, Kimura S (1998) Multiple transcripts encoded by the thyroid specific enhancer-binding protein (T/EBP)/ thyroid transcription factor-1 (TTF-1) gene: evidence of autoregulation. *Endocrinology* 1998 139: 1999-2006
13. Lin C, Glasser SW, Wan H, Whitsett JA (2002) GATA-6 and thyroid transcription factor-1 directly interacts and regulate surfactant protein-C gene expression. *J Biol Chem* 277: 4519-4525
14. Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Prado JA, Santisteban P (2000) Down-regulation of thyroid transcription factor 1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology* 141: 2166-2173

15. Ohmori M., Harii N, Endo T, Onaya T (1999) Tumor necrosis factor- α regulation of thyroid transcription factor 1 and Pax-8 in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140: 4651-4658
16. Velasco JA, Acebron A, Zannini M, Martin-Perez J, Di Lauro R, Santisteban P (1998) Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of thyroid transcription factor-1 phosphorylation. *Endocrinology* 139: 2796-2802
17. Missero C, Piro MT, Di Lauro R (2000) Multiple ras downstream pathways mediate functional repression of the homeobox gene product TTF-1. *Moll and Cell Biol* 20: 2783-2793
18. Tell G, Pines A, Paron I, D'Elia A, Bisca A, Kelly MR, Manzini G, Damante G (2002) Redox effector factor-1 regulates the activity of thyroid transcription factor 1 by controlling the redox state of the N-transcriptional activation domain. *J Biol Chem* 277: 14564-14574
19. Medina DL, Suzuki K, Pietrarello M, Okajima F, Kohn LD, Santisteban P (2000) Role of insulin and serum on thyrotropine regulation of thyroid transcription factor-1 and Pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* 10: 295-303
20. Perrone L, Tell G, Di Lauro R (1999) Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor 1 by binding to its homeodomain. *J Biol Chem* 274: 4640-4645
21. Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G Di Lauro R (1999) Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie* 81: 433-440
22. Pellizari L, Tell G, Damante G (1999) Co-operation between the PAI and RED subdomains of Pax-8 in the interaction with the thyroglobulin promoter. *Biochem J* 337: 253-262
23. Stapleton P, Weith A, Urbanek F, Kozmik Z, Busslinger M (1993) Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, Pax-9. *Nature Genet* 3: 292-298
24. Kozmik Z, Czerny T, Busslinger M (1997) Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *The EMBO J* 16: 6793-6803
25. Poleev A, Wendler F, Fickenscher H, Zannini MS, Yaginuma K, Abbott C, Plachov D (1995) Distinct functional properties of three human paired-box-protein, Pax8, isoforms generated by alternative slicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Eur J Biochem* 228: 899-911
26. Poleev A, Okladnova O, Musti AM, Schneider S, Royer-Pokora B, Plachov D (1997) Determination of functional domains of the human transcription factor Pax8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur J Biochem* 247: 860-869
27. Mascia A, Nitsch L, Lauro R, Zannini M (2002) Hormonal control of the transcription factor Pax-8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. *J Endocrinol* 172: 163-176
28. Cao X, Kambe F, Ohmori S, Seo H (2002) Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired-domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 288-293
29. Fabbro D, Pellizzari L, Mercuri F, Tell G, Damante G (1998) Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *J Mol Endo* 21: 347-354
30. Espinoza CR, Schmitt TL, Loss U (2001) Thyroid transcription factor 1 and Pax-8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* 27: 59-67
31. Kang HCh, Ohmori M, Harii N, Endo T, Onaya T (2001) Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* 142: 267-275
32. Selitti DF, Suzuki K, Doi SQ, LaGrinha C, Machado M, Matos T, Kohn LD (2001) Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 795-809
33. Schmitt TI, Espinoza Cr, Loos U (2001) Transcriptional regulation of the human sodium/iodide symporter gene by Pax8 and TTF-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 27-31
34. Ohno M, Zannini M., Levy O, Carrasco N, Di Lauro R (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 bind to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participate in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Moll and Cell Biol* 19: 2051-2060
35. Taki K, Kogai T, Kanamoto Y, Hershman JM, Brent GA (2002) A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and its differential regulated in normal and thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol* 16: 2266-2282
36. Elisei R, Vivaldi A, Pacini F (2003) Biology and clinical application of the NIS gene. *Tumori* 89: 523-528
37. Esposito C, Miccadei S, Saiardi A, Civitareale D (1998) PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene. *Biochem J* 331: 37-40
38. De Leo R, Miccadei S, Zammarchi E, Civitareale D (2000) Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression. *J Biol Chem* 275: 34100-34105
39. Miccadei S, DE Leo R, Zammarchi E, Natali PG, Civitareale D (2002) The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax-8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol Endocrinol* 16: 837-846
40. Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M (2003) The paired domain-containing factor Pax-8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 278: 3395-3402
41. Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Schafer MK, Mansouri A, Bauer A, Visser TJ (2003) Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax-8/- mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 144: 777-784
42. Ambroziak M, Pachucki J, Chojnowski K, Wiechno W, Stachlewska-Nasfeter E, Nauman J, Nauman A (2001) Type 1 and type 2 5' deiodinases, thyroid transcription factors TTF-1 and Pax-8 gene expression is altered in benign and malignant thyroid nodules. *J Endocrinol Invest* 24 (6 suppl): 107
43. Gereben B, Salvatore D, Harney JW, Tu HM, Larsen PR (2001) The human, but not rat, dio2 gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* 15: 112-124
44. Ambroziak M, Pachucki J, Chojnowski K, Wiechno W, Nauman J, Nauman A (2003) Pax-8 expression correlates with type II 5' deiodinase expression in thyroids from patients with Graves' disease. *Thyroid* 13: 141-148
45. Acebron A, Aza-Blanc P, Rossi DL, Lamas L, Santisteban P (1995) Congenital human thyroglobulin defect due to low expression of the thyroid-specific transcription factor TTF-1. *J Clin Invest* 96: 781-785
46. Lapi P, Macchia PE, Chiovato L, Biffali E, Moschini L, Larizza D, Baseraga M, Pinchera A, Fenzi G, Di Lauro R (1997) Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 7: 383-387
47. Perna MG, Civitareale D, De Filippis V, Sacco M, Cisterino C, Tassi V (1997) Absence of mutations in the gene encoding thyroid transcription factor 1 (TTF-1) in patients with thyroid dysgenesis. *Thyroid* 7: 377-381
48. Devriendet K, Vanchole Ch, Matthijs G, de Zegher F (1998) Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 338: 1317-1318
49. Pohlonez J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberg W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S (2002) Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 109: 469-473
50. Castanet M, Park S-M, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow K, Polak M (2002) A novel mutation loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Gen* 11: 2051-2059
51. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee K (1998) Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate, and choanal atresia. *Nature Gene* 19: 399-401
52. Hishinuma A, Ohayama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatane N, Shibayama K, Arisaka O, Matsuura N, Ieiri T (2001) Polymorphism of

- the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol* 145: 385-389
53. Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P (2001) A novel mutation (Q40P) in Pax-8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3962-3967
 54. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G (2001) Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of Pax-8. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 234-238
 55. Tell G, Pellizzari L, Esposito G, Pucillo C, Macchia PE, Di Lauro R, Damante G (1999) Structural defects of a Pax-8 mutant that give rise to congenital hypothyroidism. *Biochem J* 341: 89-93
 56. Shimura H, Suzuki H, Miyazaki A, Furuya F, Ohta K, Hraguchi K, Endo T, Onaya T (2001) Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by thyroid transcription factor-1 in thyroid cancer cells. *Cancer Research* 61: 3630-3646
 57. Troll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen ChJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher J (2000) Pax-8/PPAR γ 1 fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1360
 58. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Soborinho LG, Leite VJ (2002) Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *Clin Endocrinol Metab* 87: 3947-3952
 59. Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG (2003) Detection of Pax8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 354-7
 60. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudil CM, Kroll TG, Nikiforov Y (2002) Pax8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 26: 1016-1023
 61. Chun YS, Saji M, Zeiger MA (1998) Overexpression of TTF-1 nad Pax-8 restores thyroglobulin gene promoter activity in ARO and WRO cell lines. *Surgery* 124: 1100-1105

Thyroid transcription factors involved in the thyroid hormones biosynthesis

Michał Ambroziak[✉], Alicja Nauman

Department of Biochemistry, Medical Centre for Postgraduate Education, 99 Marymoncka St., 01-813 Warszawa, Poland
[✉] e-mail: ambroz@amwaw.edu.pl

Keywords: thyroid hormones biosynthesis, thyroid transcription factors, Foxe1, Pax8, Ttf1/Nkx2-1

ABSTRACT

The thyroid hormone biosynthesis is dependent on the level of the expression and the correct action of the basic proteins involved in this process: TSH receptor (TSH-R), sodium-iodine symporter (NIS), thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase (TPO) and iodothyronine deiodinases type 1 (D1) and type 2 (D2). Transcription of the genes coding these proteins is regulated by TSH via cAMP cascade. Despite the thyroid-specific transcription factors are necessary for the transcription regulation of *TSH-R*, *NIS*, *TG*, *TPO*, *DIO1* and *DIO2* genes. Three thyroid transcription factors Ttf1/Nkx2-1, Foxe1 and Pax8 seem to be essential for thyroid development, growth and function. Disturbances of the expression of these transcription factors and their co-operation could be responsible for the congenital thyroid gland disorders as well as in thyroid cancerogenesis.

Choroby związane z agregacją białek

STRESZCZENIE

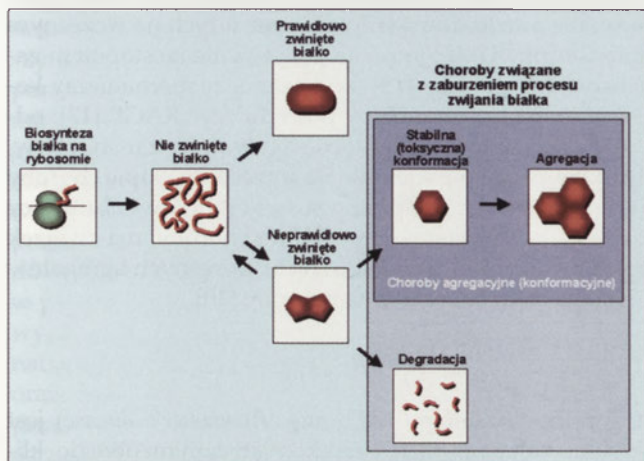
Wśród licznych chorób, u których podstaw leży zaburzenie procesu zwijania się białek, na szczególną uwagę zasługują tzw. choroby agregacyjne (konformacyjne), których patogenezą związana jest z agregacją nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów. Prezentowane opracowanie opisuje szereg przykładów takich chorób oraz podsumowuje stan obecnej wiedzy na temat ich molekularnej patofizjologii i projektowanych strategii terapeutycznych.

WPROWADZENIE

Biosynteza białka o natywnej strukturze przestrzennej, będącej warunkiem koniecznym pełnienia specyficznej funkcji biologicznej, jest procesem złożonym. Na każdym z etapów może zdarzyć się błąd, którego konsekwencją będzie ostateczne przyjęcie przez cząsteczkę niewłaściwej konformacji. Z nieprawidłową strukturą przestrzenną białka, a tym samym utratą jego funkcji, mamy do czynienia w przypadku bardzo dużej liczby chorób człowieka, które w języku angielskim określa się ogólnie, jako *protein folding diseases* [1]. Są wśród nich m.in. mukowiscydoza, zespół Marfana, wrodzona łamliwość kości typu II, czy choroba Taya-Sachsa [1]. Jako specyficzną podgrupę zwykło się traktować choroby, które powstają w wyniku takiej zmiany konstytucji przestrzennej danego białka, że zyskuje ono „nową funkcję” (ang. *gain of function*) – tendencję do tworzenia agregatów. Choroby takie określa się w literaturze anglojęzycznej mianem konformacyjnych (ang. *conformational diseases*) [2]. Termin ten wydaje się być jednak niezbyt precyzyjny, gdyż u podłoża każdej z chorób związanych z nieprawidłowym zwijaniem się białka leży niemożność przyjęcia przez łańcuch polipeptydowy natywnej konformacji. Ta niemożność prawidłowego zwinięcia się prowadzi do powstania agregatów białkowych tylko w przypadku niektórych chorób, które proponujemy nazwać *chorobami agregacyjnymi* (Rys. 1). Choć u części pacjentów odnajduje się mutacje w genach kodujących agregujące białka, to większość przypadków chorób agregacyjnych stanowią postaci sporadyczne – niezwiązane ze znanym defektem molekularnym odpowiedniego genu [3, 4].

RÓŻNORODNOŚĆ CHORÓB AGREGACYJNYCH

Agregaty białka, będące patognomiczną cechą chorób agregacyjnych, mogą występować wewnątrz-, lub zewnątrzkomórkowo. Agregacja zewnątrzkomórkowa jest związana z bardzo dużą grupą chorób, które określa się mianem amyloidoz (ang. *amyloidoses*) [5]. Jest to grupa heterogenna pod względem objawów oraz tkankowego umiejscowienia agregatów (lokalne, lub ogólnoustrojowe).



Rysunek 1. Schemat obrazujący etapy powstawania agregatów białkowych, będących patognomiczną cechą chorób agregacyjnych.

Daniel Bąk✉

Michał Milewski

Pracownia Biologii Komórki, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa-wa

Pracownia Biologii Komórki, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa; e-mail: dbak@imid.med.pl, tel. (22) 327 71 77

Artykuł otrzymano 7 października 2004 r.
Artykuł zaakceptowano 13 stycznia 2005 r.

Słowa kluczowe: agregacja białka, choroby agregacyjne, zwijanie białek

Wykaz skrótów: A β – amyloid β ; APP – białko prekursorowe amyloidu β (ang. *amyloid beta A4 precursor protein*); CuZnSOD – cynkowo-miedziowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. *copper-zinc superoxide dismutase*); PrP – białko prionowe (ang. *prion protein*); RAGE – receptor końcowych produktów glikacji (ang. *receptor for advanced glycation end products*)

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego PBZ-KBN-042/P05/06. Autorzy chcieliby podziękować Profesorowi Jerzemu Balowi i Profesorowi Tadeuszowi Mazurczakowi za cenne uwagi dotyczącej tej pracy

Jednak w każdym przypadku analiza histopatologiczna pozwala stwierdzić obecność tzw. włókien amyloidowych (ang. *amyloid fibrils*). Pomimo biochemicznej różnorodności białek zdolnych do tworzenia agregatów amyloidowych, włókna amyloidowe posiadają pewne charakterystyczne, unikalne cechy. Amyloid barwi się czerwieńią Kongo

(ang. *positive Congophilia*), wykazując dwójłomność (ang. *birefringence*) w świetle spolaryzowanym. Wynika to z wysoce zorganizowanej, symetrycznej budowy amyloidu, w którym dominują struktury drugorzędowe typu β [6]. W zaproponowanym ostatnio systemie klasyfikacji chorób agregacyjnych za istotną cechę amyloidu uznaje się dodatkowo obecność w agregatach charakterystycznych białek: surowiczego amyloidu P (SAP, ang. *serum amyloid P*), apolipoproteiny E (ApoE) oraz perlekanu (proteoglikanu heparanosiarzanowego) [7].

W przypadku chorób, którym towarzyszy wyłącznie wewnątrzkomórkowa agregacja, próba z czerwienią Kongo daje wynik negatywny, a w agregatach nie stwierdza się surowiczego amyloidu P, apolipoproteiny E, lub perlekanu (agregaty te nie mają charakteru amyloidu) [7]. Jest to bardzo niejednorodna grupa schorzeń. Obejmuje ona m.in. stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), tzw. choroby poliglutaminowe związane z patologicznym wydłużeniem ciągów poliglutaminowych w białkowych produktach niektórych genów oraz serpinopatie (ang. *serpin*, *serine protease inhibitor*) – choroby agregacyjne związane z agregacją białek należących do nadrodziny serpin [8]. Rozróżnienie amyloid/nie-amyloid jest częstą przyczyną nieporozumień. Białka nie tworzące amyloidu *in vivo*, mogą w warunkach *in vitro* wykazywać wszystkie cechy amyloidu. Dla takich przypadków zaproponowano termin amylog (ang. *amyloid homolog*, „amyloid-like”). Określenie „amyloid” powinno być stosowane wobec struktur obserwowanych *in vivo* [7].

RODZINNA POLINEUROPATIA AMYLOIDOWA

Rodzinną polineuropatię amyloidową (FAP, ang. *familial amyloid polyneuropathy*) to amyloidoza (agregaty mają cechy amyloidu), należąca do chorób neurodegeneracyjnych. Schorzenie to dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący¹. Objawy choroby (m.in. zaburzenia czucia, ogólne osłabienie, impotencja, zaburzenie pracy układu pokarmowego oraz pęcherza moczowego) związane są z agregacją zmutowanej formy białka transtyretyny (TTR, ang. *transthyretin*) [10]. Transtyretyna jest fizjologicznym przekaźnikiem tyroksyny oraz retinolu (poprzez oddziaływanie z białkiem wiążącym retinol). Głównymi miejscami syntezy transtyretyny są wątroba oraz sploty naczyniówkowe mózgu. Agregaty amyloidowe stwierdza się przede wszystkim w obrębie obwodowego układu nerwowego (agregacja zewnątrzkomórkowa, szczególnie w śródnierwiu: blisko komórek Schwanna oraz włókien kolagenowych), ale nie w mięszu wątroby, czy w mózgu – amyloid nie powstaje w miejscu syntezy transtyretyny [10].

Niezmutowana transtyretyna, podobnie jak prawidłowe formy białek takich jak np. amylina (IAPP, ang. *islet amyloid polypeptide*), przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANF, ang. *atrial natriuretic factor*) oraz apolipoproteina A1 (Apo-A1), wykazuje tendencję do tworzenia amyloidu korelującą pozytywnie z wiekiem pacjenta. Uważa się to za naturalny przejaw procesu starzenia się organizmu [11]. Natomiast

rozwój rodzinnej polineuropatii amyloidowej związany jest z obecnością mutacji w genie *TTR* [12]. Amyloid składający się z nieprawidłowej formy białka powstaje dużo łatwiej, a niektóre mutacje (np. L55P) określane są jako szczególnie „agresywne” [13]. Mechanizm powstawania amyloidu w przebiegu rodzinnej polineuropatii amyloidowej nie został całkowicie wyjaśniony. Wydaje się, że zmutowane białko wykazuje zdolność tworzenia włókien amyloidowych w warunkach, w których prawidłowa forma białka pozostaje stabilna [13]. Monomery różnych wariantów białka transtyretyny posiadają niejednakową stabilność konformacyjną (np. wt>V30M>L55P). Im mniejsza jest owa stabilność, tym łatwiej powstają częściowo rozwinięte (ang. *partially unfolded*) prekursorzy włókien amyloidowych, a tym samym rośnie prawdopodobieństwo powstania amyloidu [14]. Ponadto, próbując wyjaśnić wysoki amyloidogenny potencjał transtyretyny wskazuje się na znaczny udział struktur typu β , tak w białku o natywnej konformacji [14], jak i w prekursorach amyloidu [10].

Jednym z najważniejszych odkryć było określenie formy strukturalnej, w jakiej transtyretyna wykazuje właściwości cytotoksyczne. Okazało się, że dojrzały amyloid nie oddziałuje negatywnie na komórki [15]. To wczesne agregaty transtyretyny (ang. *early nonfibrillar aggregates*), nie barwiące się czerwienią Kongo (nie mające charakteru amyloidu), były toksyczne dla komórek – powodowały *in vitro* aktywację kaspazy-3, kluczowego enzymu efektorowego w przebiegu apoptozy. Ponadto, w materiale z biopsji od pacjentów bezobjawowych, ale posiadających w tkankach wczesne agregaty transtyretyny (tzw. pacjenci FAP0 czyli wczesny etap rodzinnej polineuropatii amyloidowej), stwierdzono podwyższoną ekspresję czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (MCSF, ang. *macrophage colony-stimulating factor*). Mogłoby to sugerować stres komórkowy związany z przebiegiem procesu zapalnego [15]. Opisane powyżej zjawiska to etap efektorowy bardziej ogólnego mechanizmu komórkowego, którego proces inicjacji pozostaje nie wyjaśniony. Wydaje się jednak, że ważną rolę mógłby pełnić receptor komórkowy RAGE (ang. *receptor for advanced glycation end products*), oddziałujący z bogatymi w struktury β agregatami białkowymi. Wykazano, że ligandami receptora RAGE są m.in. surowiczy amyloid P oraz amyloid β (A β) [16]. Poziom ekspresji genu kodującego receptor RAGE jest podwyższony w tkankach pacjentów z rodzinną polineuropatią amyloidową [17] (również u tych na wczesnym etapie choroby [18]) i koreluje pozytywnie ze stopniem zaawansowania choroby [18]. Wykazano, że mechanizmy komórkowe, w których mógłby pośredniczyć RAGE [17], odpowiadające za cytotoksyczność agregatów transtyretyny, były aktywne już u pacjentów na wczesnym etapie choroby [18]. Przyjmuje się, że opisany stres komórkowy, istniejący jeszcze w przedobjawowym stadium choroby, ma związek z powstawaniem nieamyloidowych, wczesnych agregatów oddziałujących toksycznie na neurony [10].

CHOROBA ALZHEIMERA

Choroba Alzheimer'a (AD, ang. *Alzheimer's disease*) jest zespołem otępiennym o charakterystycznym obrazie klinicznym. Proces otępienia prowadzi do całkowitej niepełnosprawności pacjenta, tak psychicznej, jak i fizycznej.

¹ Zmutowana forma transtyretyny jest także składnikiem amyloidu w przebiegu rodzinnej kardiomiopatii amyloidowej (FAC, ang. *familial amyloid cardiomyopathy*) [9].

Bezpośrednim powodem śmierci są zwykle wtórne infekcje (np. zapalenie płuc) [19]. Obecnie brak biochemicznego lub genetycznego testu umożliwiającego wiarygodną diagnozę choroby. Rozpoznanie postawione za życia pacjenta może być potwierdzone w sposób pewny dopiero po jego śmierci (ang. *definite AD*). W badaniu *post mortem* u większości pacjentów wykrywa się tzw. płytki starcze (SP, ang. *senile plaques*) oraz sploty (zwyrodnienia) neurofibrylarne (NFT, ang. *neurofibrillary tangles*). Głównym składnikiem płytek starczych jest amyloid β ($A\beta$) – peptyd powstający z prekursora APP (ang. *amyloid beta A4 precursor protein*), tworzący agregaty z dominacją drugorzędowych struktur typu β [6]. Natomiast kluczowym składnikiem splotów neurofibrylarnych jest hiperfosforylowane białko tau (τ , MAPT, ang. *microtubule associated protein tau*) [20].

Jak wspomniano, cząsteczka $A\beta$ powstaje w wyniku ograniczonej proteolizy prekursora APP. APP jest glikoproteiną [21], białkiem błonowym typu I, którego większa część zlokalizowana jest w świetle organelli komórkowych lub eksponowana na zewnątrz komórki. Amyloid β obejmuje część sekwencji aminokwasowej domeny transbłonowej oraz kilkadziesiąt reszt aminokwasowych zewnątrzkomórkowej części prekursora. Przedziałem komórkowym, który zdaje się dostarczać większość $A\beta$ jest aparat Golgiego (część *trans* – TGN, ang. *trans-Golgi network*) [21]. Powstanie $A\beta$ wymaga aktywności sekretazy β i γ . Aktywność sekretazy β (BACE1, ang. *beta-site amyloid beta A4 precursor protein-cleaving enzyme*), zidentyfikowanej jako proteaza aspartylowa [22], prowadzi do powstania rozpuszczalnej cząsteczki APPs β (ang. *soluble*). Dodatkowe cięcia proteolityczne z udziałem sekretazy γ uwalnia cząsteczki $A\beta$ o długości 40 lub 42 aminokwasów ($A\beta_{40}/A\beta_{42}$; różnica polega na braku/obecno-

wyduje się następować przed, lub niezależnie od śmierci neuronów [5]. Jest to zgodne z wczesnymi doniesieniami o braku lub słabej korelacji między ilością amyloidu a objawami otępienia [29, 30]. Propozycję wyjaśnienia neurotoksycznych właściwości rozpuszczalnej formy $A\beta$ znaleźć można w ostatnich doniesieniach o fizjologicznej roli $A\beta$ [31]. Opisano istnienie neuronalnego mechanizmu homeostaticznego, w którym aktywność komórek nerwowych stymuluje powstawanie $A\beta$, zaś rosnące lokalnie stężenie peptydu obniża pobudzające przekazywanie synaptyczne. Sugeruje się, że zaburzenie opisanej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego ma znaczący udział w patogenezie choroby Alzheimera [31].

Ze względu na obecność splotów neurofibrylarnych w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera, chorobę tę rozpatruje się jako przykład tauopatii. Obecność białka tau w neuronach jest warunkiem koniecznym dla zainicjowania procesu neurodegeneracyjnego w odpowiedzi na $A\beta$ [32]. Komórki pozbawione tau posiadają bardziej dynamiczny cytoskielet mikrotubularny i są niewrażliwe na $A\beta$ [32]. Nadekspresja tau w neuronach prowadzi do zablokowania transportu mikrotubularnego zależnego od kinazy (w kierunku końca „+” mikrotubul, a więc w kierunku wypustek neuronu), w związku z czym przeważyć zaczyna transport zależny od dyneiny (w kierunku perykarionu) [33]. Rezultatem jest zatrzymanie mitochondriów, peroksyosomów i siateczki śródplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) w centrum neuronu. Komórka staje się wrażliwa na stres oksydacyjny, co sprzyja jej degeneracji. W centrum neuronu retencji ulegają także pęcherzyki przenoszące APP. Sprzyjałoby to powstawaniu $A\beta$, z drugiej strony ograniczając jego dostępność w synapsie (porównaj [31]). Ponieważ

W tym celu należy przede wszystkim zwrócić uwagę na rolę splotów neurofibrylarnych w patogenezie choroby Alzheimera. Istotnym elementem badań w tym obszarze jest postać splotów neurofibrylarnych, które w zależności od rodzaju splotów (np. sploty typu 1, 2, 3, 4) różnią się od siebie pod względem struktury i funkcji. Sploty neurofibrylarne typu 1 (NFT1) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 2 (NFT2) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 3 (NFT3) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 4 (NFT4) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Jednym z najważniejszych problemów w badaniach nad chorobą Alzheimera jest określenie roli splotów neurofibrylarnych w patogenezie choroby. Istotnym elementem badań w tym obszarze jest postać splotów neurofibrylarnych, które w zależności od rodzaju splotów (np. sploty typu 1, 2, 3, 4) różnią się od siebie pod względem struktury i funkcji. Sploty neurofibrylarne typu 1 (NFT1) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 2 (NFT2) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 3 (NFT3) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 4 (NFT4) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau.

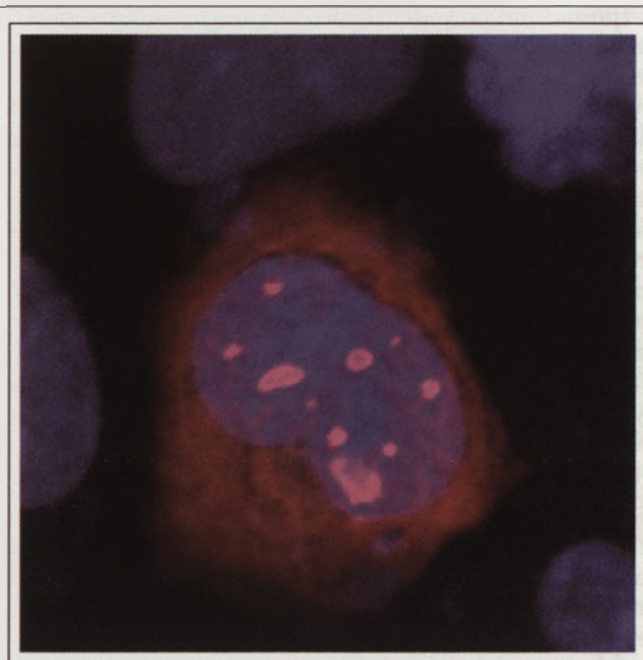
W tym celu należy przede wszystkim zwrócić uwagę na rolę splotów neurofibrylarnych w patogenezie choroby Alzheimera. Istotnym elementem badań w tym obszarze jest postać splotów neurofibrylarnych, które w zależności od rodzaju splotów (np. sploty typu 1, 2, 3, 4) różnią się od siebie pod względem struktury i funkcji. Sploty neurofibrylarne typu 1 (NFT1) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 2 (NFT2) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 3 (NFT3) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 4 (NFT4) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Jednym z najważniejszych problemów w badaniach nad chorobą Alzheimera jest określenie roli splotów neurofibrylarnych w patogenezie choroby. Istotnym elementem badań w tym obszarze jest postać splotów neurofibrylarnych, które w zależności od rodzaju splotów (np. sploty typu 1, 2, 3, 4) różnią się od siebie pod względem struktury i funkcji. Sploty neurofibrylarne typu 1 (NFT1) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 2 (NFT2) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 3 (NFT3) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 4 (NFT4) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau.

Choroba Huntingtona dzieli się na rodzaje, które różnią się od siebie pod względem objawów i przebiegu. Istotnym elementem badań w tym obszarze jest postać splotów neurofibrylarnych, które w zależności od rodzaju splotów (np. sploty typu 1, 2, 3, 4) różnią się od siebie pod względem struktury i funkcji. Sploty neurofibrylarne typu 1 (NFT1) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 2 (NFT2) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 3 (NFT3) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau. Sploty neurofibrylarne typu 4 (NFT4) charakteryzują się obecnością białka tau w postaci splotów, które w tym przypadku powstają w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau.

kadzie życia i charakteryzuje się postępującymi objawami otępiennymi. Zmiany degeneracyjne obserwuje się przede wszystkim w obrębie prążkowiec [35]. „Patogenne” wydłużenie ciągu (CAG)_n dotyczy sekwencji genu *HD*, kodującego białko huntingtynę (*htt*, ang. *huntingtin*) [37]. Huntingtyna jest cytoplazmatycznym białkiem o niezdefiniowanej funkcji [38]. Choć gen *HD* ulega ekspresji w wielu tkankach organizmu, proces degeneracyjny dotyczy centralnego układu nerwowego. W badaniu *post mortem* mózgow pacjentów z chorobą Huntingtona stwierdza się obecność agregatów huntingtyny. W hodowli komórkowej białko pełnej długości nie tworzy agregatów – bez względu na długość ciągu poliglutaminowego [39]. Liczne agregaty – tak cytoplazmatyczne, jak i jądrowe – tworzone są natomiast przez N-końcowe fragmenty huntingtyny [39]. Wewnątrzjądrowe agregaty huntingtyny u pacjentów z chorobą Huntingtona również składają się z N-końcowych fragmentów białka [40] (Rys. 2). Przyjmuje się, że aktywność komórkowych proteaz (kaspaz [41]) prowadzi do powstania krótszych fragmentów białkowych, zdolnych do akumulacji na terenie jądra. Rola agregacji w patogenezie choroby Huntingtona pozostaje niewyjaśniona. Wiadomo, że wiek wystąpienia pierwszych objawów obniża się, zaś objawy ulegają nasileniu wraz ze wzrostem liczby powtórzeń CAG [42]. Z drugiej strony badania *in vitro* peptydów poliglutaminowych (Q_n) pozwalają przypuszczać, że wzrost liczby powtórzeń CAG intensyfikuje proces agregacji białka [42]. Najszerzej dyskutowana hipoteza sekwestracji (ang. *sequestration hypothesis* [43]) zakłada, że agregaty mogłyby działać jako rodzaj „pułapki”, w którą „wpadałyby” m.in. białka zawierające ciągi Q_n (na zasadzie oddziaływań homotypowych [44]) [45]. Wśród białek posiadających ciągi Q_n jest wiele czynników transkrypcyjnych, w tym także związanych z chorobami agregacyjnymi (np. opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni) [42]. Nie było więc zaskoczeniem stwierdzenie zaburzeń ekspresji różnych genów w komórkach ekspresyjnie zmutowane formy huntingtyny [46]. Szczególne znaczenie w patogenezie choroby Huntingtona przypisuje się dwóm szlakom regulacji transkrypcji: zależnemu od elementu (DNA) odpowiedzi na cAMP (CRE; ang. *cAMP-response element*) [47] i zależnemu od białka Sp1 (ang. *specificity protein 1*) [48]. Analiza domenowej struktury białka huntingtyny, zwierzęcych modeli choroby Huntingtona oraz nokautów genu *HD* sugeruje zaangażowanie huntingtyny w wiele procesów komórkowych. Zaproponowano udział huntingtyny m.in. w regulacji ekspresji informacji genetycznej, transporcie pęcherzykowym, apoptozie (jako czynnik antyapoptotyczny), endocytozie, morfogenezie i sygnalizacji komórkowej [38]. Można zakładać, że funkcjonalny deficyt białka, będący skutkiem utworzenia agregatów, prowadzi do zaburzenia funkcji komórkowych, stanowiąc dodatkowy wkład w proces rozwoju objawów choroby.

STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) jest chorobą neurodegeneracyjną, w przebiegu której dochodzi do degeneracji motoneuronów obwodowych i ośrodkowych. Choroba objawia się zanikiem mięśni, osłabieniem oraz drżeniem mięśniowym [49]. 5-10% wszystkich przypadków stwardnienia zanikowego bocznego to przypadki rodzinne (fALS, ang. *familial ALS*). U ok.



Rysunek 2. Wewnątrzjądrowe agregaty N-końcowego fragmentu huntingtyny, zawierającego ciąg 75Q (analiza fluorescencyjna transfekowanych komórek IB3-1).

20% pacjentów z rodzinną postacią stwardnienia zanikowego bocznego identyfikuje się mutację w genie *SOD1*, kodującym cynkowo-miedziową dysmutazę nadlenkową (CuZnSOD, ang. *copper-zinc superoxide dismutase*) – główny komórkowy enzym antyoksydacyjny [49]. W większości przypadków choroba dziedziczy się autosomalnie dominująco [49].

Hipotezy dotyczące molekularnej patogenezy stwardnienia zanikowego bocznego dzielą się na dwie grupy: (1) akcentujące udział aktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [49] oraz (2) kładące nacisk na fakt wewnątrzkomórkowej agregacji białka CuZnSOD [50]. Agregaty CuZnSOD stwierdzano wielokrotnie zarówno u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym [51, 52], jak i w tkankach myszy stanowiących model choroby [53, 54]. U myszy stanowiących model zwierzęcy rodzinnej postaci stwardnienia zanikowego bocznego powstawanie agregatów obserwowano w obrębie tkanek mózgu i rdzenia kręgowego. Nie stwierdzano ich w tkankach innych, niż nerwowa, pomimo porównywalnego poziomu ekspresji zmutowanego białka [54]. Ponadto, znaleziono pozytywną korelację pomiędzy wiekiem myszy a ilością agregatów CuZnSOD obecnych w mózgu i rdzeniu kręgowym [54]. Wydaje się, że CuZnSOD tworzy agregaty specyficznego typu – tzw. agresomy [55]. Okazało się, że proces powstawania agresomów CuZnSOD jest co najmniej dwustopniowy. W pierwszej kolejności powstają mniejsze agregaty, zwane przez Johnston i wsp. IPC (ang. *insoluble protein complexes*) [55], które następnie, dzięki transportowi zależnemu od mikrotubul, skupiają się w większe struktury – właściwe agresomy – w obrębie komórkowego centrum organizacji mikrotubul. Równie typowe dla agresomu CuZnSOD było otoczenie zagregowanego białka „klatką” zbudowaną z filamentów pośrednich cytoszkieletu. Czasami obserwowano w agregatach CuZnSOD obecność prawidłowej formy białka. Wydaje się jednak, że nie był to warunek konieczny powstania agregatu,

a prawidłowy wariant białka nie odgrywał roli w stabilizacji wariantu zmutowanego. Znaczenie opisanego faktu pozostaje nieznane [53]. Jednak agresywny CuZnSOD to nie jedyny rodzaj agregatów znajdujących się w tkankach pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Dodatkowo wyróżnia się m.in. ciała Buniny (BB, ang. *Bunina bodies*), agregaty typu SLI (ang. *skein-like inclusions*; ang. *skein* = kłęb, płatanina) oraz ciała szkliste (HCI, ang. *hyaline conglomerate inclusions, hyaline bodies*) (pełna lista form agregacji białka odnajdywanych w stwardnieniu zanikowym bocznym [49]).

NIEDOBÓR ANTYTRYPSYNY A1

Antytrypsyna $\alpha 1$ (AAT, ang. *$\alpha 1$ -antitrypsin* [56]) jest glikoproteiną ostrej fazy reakcji zapalnej, inhibitorem proteaz serynowych należącym do nadrodziny serpin [8]. Główną funkcją antytrypsyny $\alpha 1$ wydaje się być ochrona tkanek przed aktywnością elastazy neutrofilowej [56]. Mutacje w genie *SERPINA1*, kodującym antytrypsynę $\alpha 1$, mogą być przyczyną niedoboru tego inhibitora. Najsilniejsza manifestacja objawów klinicznych związana jest z obecnością wariantu białka określanego jako PiZ (E342K). Homozygoty PiZ/PiZ zachowują w surowicy jedynie 10-15% ilości antytrypsyny $\alpha 1$, typowej dla osób z prawidłowymi allelami genu [57]. Niedobór antytrypsyny $\alpha 1$ wynika z faktu agregacji wariantu PiZ w świetle szorstkiej siateczki śródplazmatycznej hepatocytów – głównego miejsca syntezy inhibitora [58]. Obecność agregatów sprzyja rozwojowi zapalenia wątroby, marskości wątroby oraz raka wątrobowokomórkowego [56]. Agregaty wariantu PiZ antytrypsyny $\alpha 1$ obserwuje się także w obrębie tkanki płucnej, co wiąże się z powstaniem objawów rozedmy [59]. Pozostaje do wyjaśnienia, w jaki sposób powstawanie agregatów w tkance wątroby związane jest ze śmiercią hepatocytów. Wiadomo, że agregaty płucne sprzyjają powstaniu stanu zapalnego, zaburzając równowagę proteazowo-antyproteazową w tkance płucnej [56]. Ponadto, pełnią one rolę chemoatraktanta względem komórek neutrofilowych [60]. Molekularny mechanizm aktywności inhibitorowej antytrypsyny $\alpha 1$ czyni cząsteczkę wrażliwą na zmiany struktury przestrzennej. W normalnych warunkach cząsteczka proteazy wiąże się z antytrypsyną $\alpha 1$ dzięki ekspozycji przez antytrypsynę $\alpha 1$ reaktywnej, ruchliwej pętli, która stanowi pseudosubstrat – „przynętę” dla proteazy. Następująca po hydrolizie zmiana konformacyjna prowadzi do „scalenia” obu cząsteczek, a powstający kompleks jest usuwany z krwioobiegu. Wariant PiZ jest niestabilny konformacyjnie. Zmiana konformacyjna, wywoływana w normalnych warunkach przez proteazę, może mieć teraz miejsce także podczas oddziaływania wariantu PiZ z drugą cząsteczką serpiny. Efektem jest zainicjowanie agregacji nieprawidłowego wariantu białka [61]. Kilka lat temu zidentyfikowano nową jednostkę chorobową – rodzinną encefalopatię z inkluzjami neuroserpiny (FENIB, ang. *familial encephalopathy with serpin inclusion bodies*) [62]. Cechą charakterystyczną choroby jest obecność tzw. ciał Collinsa w tkankach mózgu. Ciała Collinsa to agregaty białkowe, których głównym składnikiem jest neuroserpina kodowana przez gen *SERPINI1*. Ciała Collinsa są bardzo podobne do agregatów wariantu PiZ cząsteczek antytrypsyny $\alpha 1$ odnajdywanych w hepatocytach [62].

CHOROBA PARKINSONA

Choroba Parkinsona (PD, ang. *Parkinson's disease*) jest kolejnym, spośród opisywanych, schorzeniem neurodegeneracyjnym. Wśród klasycznych objawów klinicznych wymienia się drżenie spoczynkowe, sztywność oraz spowolnienie ruchowe [63]. W badaniu neuropatologicznym stwierdza się utratę dopaminergicznych neuronów części zbitiej istoty czarnej (SNC; *substantia nigra pars compacta*) oraz obecność wewnątrzkomórkowych – cytoplazmatycznych i/lub jądrowych (dyskusyjne, [64-66]) agregatów białkowych, zwanych ciałami Lewy'ego (LB, ang. *Lewy bodies*). Ciała Lewy'ego nie są specyficzne dla choroby Parkinsona. Stwierdza się je m.in. w otępieniu z ciałami Lewy'ego (DLB, ang. *dementia with Lewy bodies*), czystej niewydolności autonomicznej (PAF, ang. *pure autonomic failure*), ale także u niektórych pacjentów z chorobą Alzheimer'a [67, 68]. Głównym składnikiem ciał Lewy'ego jest białko synukleina α (α SYN, ang. *α -synuclein; in synapses and nuclear envelope*) [67]. Podgrupę chorób neurodegeneracyjnych charakteryzujących się obecnością agregatów nierozpuszczalnej formy białka synukleiny α (a więc także choroby, w których obrazie histopatologicznym występują ciała Lewy'ego) nazywa się synukleinopatiami [67]. Przykładem synukleinopatii jest również zanik wieloukładowy (MSA, ang. *multiple system atrophy*). W obrazie neuropatologicznym tej choroby stwierdza się obecność agregatów w cytoplazmie komórek glejowych (GCI, ang. *glial cytoplasmic inclusions*) w wielu obszarach mózgu. Wspomniane agregaty, oprócz synukleiny α , zawierają także białko tau oraz ubikwitynę. W przypadku zaniku wieloukładowego zwykle nie odnajduje się neuropatologii typu ciał Lewy'ego [67]. Białko synukleina α jest członkiem rodziny synuklein [66], którego fizjologiczna funkcja pozostaje niewyjaśniona. Wydaje się, że mogłoby ono odgrywać rolę m.in. w zjawisku plastyczności synaptycznej, metabolizmie lipidów, odpowiedzi immunologicznej oraz w regulowaniu funkcji białka tau [66]. Pewny jest natomiast udział synukleiny α w patomechanizmie powstawania choroby Parkinsona. W kilku przypadkach rodzinnej postaci PD wykryto mutacje w genie *SNCA*, kodującym synukleinę α [63, 69]. Agregacja synukleiny α znajduje się prawdopodobnie na końcu łańcucha zdarzeń prowadzących do rozwoju choroby Parkinsona. Uważa się, że synukleina α to potencjalny, kluczowy regulator metabolizmu dopaminy [70]. Wykazano, że funkcjonalny deficyt synukleiny α , pojawiający się jako rezultat agregacji białka, prowadzić może do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy [71-73], co wywołuje efekt neurotoksyczny związany m.in. z aktywnymi formami tlenu. Tłumaczyłoby to specyficzną utratę neuronów dopaminergicznych części zbitiej istoty czarnej, odpowiedzialną za wiele objawów choroby Parkinsona [74]. Niewyjaśnione pozostają jednak okoliczności, w jakich dochodzi do agregacji synukleiny α . Intuicyjnie oczywiste przypuszczenie, że mutacje w genie *SNCA* zwiększają prawdopodobieństwo agregacji białkowego produktu genu okazało się prawdziwe w badaniach *in vitro* [75]. W badaniach *in vivo* zmutowane formy białka wydają się wykazywać zwiększoną neurotoksyczność [76]. Jednak większość pacjentów z chorobą Parkinsona cierpi na jej postać sporadyczną – nie stwierdza się u nich mutacji w genie *SNCA* [4]. W stanie natywnym synukleina α posiada rozwiniętą, nie zdefiniowaną konformacyjnie strukturu-

rę przestrzenną (ang. *natively or intrinsically unfolded*) [77]. Wydaje się to być kluczem dla zrozumienia łatwości, z jaką różne formy synukleiny α mogą ulegać agregacji. Przyjmuje się, że labilne konformacyjnie białko jest szczególnie wrażliwe na zmiany parametrów opisujących środowisko wewnątrzkomórkowe [66]. Wiele uwagi poświęcono inhibitorom mitochondrialnego kompleksu I [4]. Stresowi oksydacyjnemu, wywołanemu ich zastosowaniem, towarzyszy powstawanie wewnątrzkomórkowych struktur podobnych do ciał Lewy'ego, zawierających synukleinę α [65]. Kolejna z hipotez dotyczy zaburzenia równowagi pomiędzy komórkową pulą synukleiny α a układem proteasomu. Jest ona uwiarygadniana m.in. poprzez fakt zidentyfikowania mutacji w genach *PARK2* oraz *UCHL1* w rodzinnych przypadkach choroby Parkinsona [63]. Produkty białkowe wspomnianych genów to, odpowiednio, parkina – będąca ligazą E3 ubikwityna-białko, oraz UCHL1 – C-terminalna hydrolaza ubikwitynowa L1 [63]. Wykazano ponadto, że zagregowana forma synukleiny α jest silnym inhibitorem funkcji proteasomu [78]. Choć synukleina α nie jest substratem parkiny [79], to wydają się one oddziaływać ze sobą poprzez inne białka, takie jak synfilina1, bez której powstanie agregatów synukleiny α jest niemożliwe [64]. Pozostaje do wyjaśnienia, czy agregaty są główną patogenną formą synukleiny α [4].

CHOROBY PRIONOWE

Definicja prionu (ang. *proteinaceous and infectious*) budzi kontrowersje do dziś. Najczęściej priony określa się jako zakaźne białka lub zakaźne cząstki białkopodobne (ang. *proteinaceous*) nie zawierające kwasu nukleinowego (dyskusja w [80]). Są one przyczyną chorób prionowych, zwanych inaczej pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi (ang. TSE, *transmissible spongiform encephalopathies*). Do encefalopatii gąbczastych występujących u ludzi² zalicza się: kuru, warianty choroby Creutzfeldta-Jakoba (CJD, ang. *Creutzfeldt-Jakob disease*), chorobę Gerstmanna-Sträusslera-Scheinkera (GSS, ang. *Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease*) oraz śmiertelną rodzinną bezsenność (FFI, ang. *fatal familial insomnia*). Ludzkie pasażowalne encefalopatie gąbczaste występują w jednej z trzech postaci: rodzinnej, sporadycznej, lub zakaźnej. Wśród dominujących objawów zawsze wskazuje się na postępujące otępienie oraz ataksję. Na poziomie tkanki stwierdza się zwyrodnienie gąbczaste istoty białej mózgu, któremu towarzyszy rozległy rozrost astrogleju oraz obecność agregatów jednej z izoform białka prionowego PrP (ang. *prion protein*) [82]. Rodzinne postacie choroby Creutzfeldta-Jakoba, choroby Gerstmanna-Sträusslera-Scheinkera oraz śmiertelnej rodzinnej bezsenności związane są z mutacjami w genie *PRNP*, kodującym białko PrP. Białko to jest glikoproteiną błonową, syntetyzowaną nie tylko w tkankach układu nerwowego, ale także w wybranych narządach układów pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego [83]. W fizjologicznych warunkach białko zakotwiczone jest po zewnętrznej stronie plazmalemmy [82]. Natomiast patognomoniczną cechą chorób prionowych jest obecność agregatów białka PrP [80]. Obec-

nie brak przekonujących dowodów na obecność kwasu nukleinowego w cząstkach prionowych – za zakaźny charakter chorób prionowych wydaje się odpowiadać jedynie białko [80]. Agregaty tworzy izoforma PrP określana jako PrP^{res} (res, ang. *resistant*)³ różniąca się od prawidłowej formy białka – określanej jako PrP^c (c, ang. *cellular*) – większą opornością na działanie proteaz oraz obniżoną rozpuszczalnością w łagodnych detergentach. Wszystko to za sprawą zmiany konformacyjnej, która nie musi być związana z jednoczesną zmianą struktury pierwszorzędowej białka PrP (sporadyczne przypadki pasażowalnych encefalopatii gąbczastych nie wynikają z mutacji w genie *PRNP*). Z drugiej strony fakt destabilizacji struktury przestrzennej białka PrP przez mutacje typowe dla rodzinnych postaci pasażowalnych encefalopatii gąbczastych nie został jednoznacznie dowiedziony (dyskusja w [85]). Obecnie przyjmuje się, że właśnie zmiana konformacyjna (konwersja) w strukturze białka PrP leży u podstaw molekularnego mechanizmu patogenezы w chorobach prionowych. W przypadku *scrapie*, czyli encefalopatii gąbczastej owiec, kóz i muflonów, zmiana konformacyjna PrP^c→PrP^{Sc} związana jest ze wzrostem udziału drugorzędowych struktur przestrzennych typu β (3%→43%), kosztem struktur α -helikalnych (42%→30%) [86]. Przyjmuje się, że konwersja wymaga bezpośredniego oddziaływania pomiędzy PrP^{sen} i PrP^{res}, gdzie PrP^{res} „wymusza” zmianę konformacyjną na PrP^{sen}. Tego typu reakcję opisywano wielokrotnie *in vitro* (np. [87]). Dla wyjaśnienia patogenezы pasażowalnych encefalopatii gąbczastych ważne będzie zrozumienie roli biologicznych kofaktorów (np. glikozaaminoglikanów [84], ssRNA [88]), stymulujących przebieg konwersji *in vivo* i wymaganych dla podniesienia efektywności procesu *in vitro*. Mechanizm patogenezы w chorobach prionowych pozostaje niewyjaśniony. Możliwe jest, że agregaty białka prionowego są toksyczne same w sobie, indukując apoptozę neuronów. Z drugiej strony PrP^c wydaje się spełniać wiele funkcji neuroprotektoryjnych. Natywne białko ma właściwości antyapoptotyczne oraz chroni przed skutkami działania aktywnych form tlenu. Utrata tych funkcji na skutek agregacji PrP mogłaby mieć krytyczne znaczenie dla losów komórki [82].

MECHANIZMY PATOGENEZЫ W CHOROBAH AGREGACYJNYCH

Specyficzną cechą chorób agregacyjnych jest obecność agregatów nieprawidłowo zwiniętego białka. Sugeruje to bezpośredni związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy powstawaniem agregatów a rozwojem choroby. Ten sposób wnioskowania ma jednak coraz mniej zwolenników, o czym wspomniano już wcześniej, opisując rodzinną polineuropatię amyloidową oraz chorobę Alzheimera. Wydłuża się lista dowodów wskazujących prekursorów agregatów (opatrzone w literaturze mnóstwem terminów; dla porównania [89]), jako przyczynę choroby. Postawienie hipotez na temat prawdopodobnego mechanizmu patogenezы sprawia najmniej problemów w przypadku tych chorób, w których biologiczna funkcja białka związanego z chorobą jest znana. Tak jest w niedoborze antytrypsyny $\alpha 1$, gdzie objawy

² Spektrum chorób prionowych ulega rozszerzeniu – np. opisano rodzinę stanowiącą przykład fenokopii choroby Huntingtona. U chorych członków tej rodziny zidentyfikowano 192-nt wstawkę w kodującym regionie genu *PRNP*, zaś samo schorzenie określono jako rodzinną postać choroby prionowej [81].

³ Indeks *res* oznacza podwyższoną oporność (ang. *resistance*) na działanie proteaz. Izofornami typu PrP^{res} są np.: PrP^{CD}, PrP^{SS} oraz PrP^{Sc} (ang. *scrapie*). Przeciwnieństwem PrP^{res} jest PrP^{sen}, gdzie *sen* oznacza typową wrażliwość (ang. *sensitivity*) na działanie proteaz. Izofornami typu PrP^{sen} są PrP^c oraz różne rekombinowane formy białka PrP [84].

kliniczne daje się łatwo powiązać z deficytem serpiny [58], a pozostaje jedynie pytanie o dodatkowy udział agregatów białkowych w powstawaniu choroby. Fizjologiczna rola większości białek uznawanych za kluczowe w patogenezie chorób agregacyjnych pozostaje niewyjaśniona. Jednak przynajmniej niektóre z nich (np. APP, huntingtyna) wydają się znaczące dla funkcjonowania komórki. Wynikająca z faktu agregacji utrata aktywności biologicznej tych białek mogłaby okazać się niekorzystna. Szczególny przypadek takiej sytuacji opisano wcześniej dla stwardnienia zanikowego bocznego, gdzie w agregatach zmutowanego białka znajduje się także jego prawidłową formę [53]. Opisując chorobę Huntingtona wspomniano, że agregaty mogą działać na zasadzie „molekularnej pułapki”. Wydaje się, że mogłoby tu chodzić nie tylko o oddziaływania homotypowe, ale także heterotypowe. Specjalny, dodatkowy mechanizm rekrutacji dodatkowych białek reprezentują potencjalnie agregaty w chorobach związanych z ciągami (CAG)_n. Działanie enzymu transglutaminazy mogłoby tu decydować o kowalencyjnym dołączaniu nowych składników. „Repertuar” białek odnajdywanych w komórkach konkretnego typu i określonych tkankach mógłby tłumaczyć specyficzność procesu degeneracyjnego, ograniczającego się często do wybranych tkanek danego organu (np. różne części mózgu objęte degeneracją w różnych chorobach neurodegeneracyjnych) [43].

Agregaty są bezpośrednimi inhibitorami proteasomu [90]. Skutkuje to nie tylko komórkowym nadmiarem białka będącego głównym składnikiem agregatów, ale zahamowaniem degradacji innych substratów proteasomu. Rezultatem jest m.in. zablokowanie postępu cyklu komórkowego [90]. Podjednostki proteasomu od dawna odnajduje się jako składniki agregatów [91]. Proteasomy, nie mogąc ani rozfałdować, ani zdegradować zagregowanego białka, „tkwią” więc uwięzione w agregatach. Obiecujące są także hipotezy koncentrujące się na zmianach metabolizmu ubikwityny w związku z powstawaniem agregatów innych białek. Odkrywa się jej udział w kluczowych procesach komórkowych, niezwiązanych bezpośrednio z degradacją. Zaburzenie każdego z nich mogłoby mieć udział w powstawaniu objawów choroby [92].

Obecność agregatów mogłaby uruchamiać proces apoptozy np. na drodze zależnej od receptora RAGE. Innym przykładem jest autoaktywacja kaspazy-8 po jej włączeniu w obręb agregatów tworzonych przez ataksynę-3 o „patogennym” (ale nie prawidłowym) zakresie powtórzeń glutaminowych⁴ [93]. Ponadto agregaty, jeśli występują w cytoplazmie, mogą stanowić przeszkodę przestrzenną dla pewnych procesów komórkowych. W neuronach skutkuje to zaburzeniem transportu aksonalnego [94]. Długi czas potrzebny do powstania agregatów *in vivo* dobrze tłumaczy późny początek większości chorób agregacyjnych. Należy jednak zauważyć częsty brak silnej, pozytywnej korelacji pomiędzy objawami choroby a oznakami patologii komórkowej (np. [30]). W jaki sposób toksyczne mogą być prekursorzy dojrzałych agregatów? Hipoteza „tworzenia kanałów błonowych” (ang. *channel hypothesis* [95]) zakłada, że częściowo rozwinięte białka, prezentujące „na zewnątrz” hydrofobo-

we łańcuchy boczne aminokwasów, oddziałują z dwuwarstwą lipidową. Rezultatem tych oddziaływań miałyby być powstawanie niespecyficznych kanałów jonowych – proces funkcjonalnie analogiczny do tworzenia porów błonowych przez niektóre toksyny bakteryjne. Zdolność permeabilizacji błon opisano m.in. dla A β , synukleiny α , transtyretyny. Rozproszenie istniejących gradientów jonów byłoby szczególnie brzemienne w skutki w przypadku błony mitochondrialnej i błony neuronów [89]. Ponadto, należy przypuszczać, że w każdej z opisanych chorób rozpuszczalna forma białka związanego z powstaniem objawów może być toksyczna w specyficzny dla siebie sposób. Jako przykład można podać, opisany w jednym z rozdziałów, nowo proponowany mechanizm patogenezы choroby Alzheimerera [31].

STRATEGIE TERAPEUTYCZNE W CHOROBAH AGREGACYJNYCH

Większość prezentowanych tutaj chorób agregacyjnych to choroby nieuleczalne, prowadzące do drastycznego pogorszenia jakości życia pacjentów, a często także do śmierci. Jedną z podstawowych trudności w projektowaniu skutecznej terapii stanowi niedostateczna znajomość molekularnej patofizjologii tych chorób. Istotną przeszkodę stanowi zwłaszcza nasza niepewność co do toksycznych lub ochronnych właściwości poszczególnych form agregatów białkowych. Ponieważ zdecydowana większość chorób agregacyjnych to choroby neurodegeneracyjne, skuteczne ich leczenie opierać się musi na powstrzymaniu śmierci komórek nerwowych, co teoretycznie osiągnąć można stosując zarówno leki o działaniu niespecyficznym (np. przeciwutleniacze, inhibitory szlaków apoptotycznych), jak i leki swoiście oddziałujące z konkretnym, najczęściej pierwotnym, czynnikiem patogennym. Na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza te strategie terapeutyczne, które koncentrują się na opracowywaniu nowych sposobów kontrolowania przebiegu agregacji białek, głównie poprzez stosowanie leków hamujących ten przypuszczalnie patogenny proces. Wydaje się, że największe zainteresowanie badaczy przyciągają obecnie te związki, które zdolne są do swoistego rozpoznawania konkretnego białka i hamowania procesu jego agregacji, lub nawet do inicjowania dysocjacji powstałych wcześniej agregatów. Wysoka swoistość tych oddziaływań zapobiegałaby ewentualnym działaniom ubocznym i zapewniałaby jednocześnie odpowiednią skuteczność leczenia. Główny problem tego podejścia terapeutycznego związany jest jednak z faktem, że tak wysoką swoistość oddziaływania wykazują głównie polipeptydy, a więc związki, których efektywne wprowadzenie do wybranych narządów organizmu nie jest sprawą prostą. Sztucznie syntetyzowane, krótkie, swoiste peptydy, których terapeutyczne możliwości testuje się np. w chorobie Huntingtona, chorobie Alzheimerera lub chorobach prionowych [96-98], ulegają ponadto szybkiej proteolitycznej degradacji w płynie mózgowo-rdzeniowym i wykazują dodatkowo niewielką zdolność do przekraczania bariery krew-mózg. Wspomniane powyżej niedogodności można jednak dość skutecznie ominąć wiążąc kowalencyjnie swoiste peptydy z innymi związkami (np. poliaminami, lipidami).

Szczególną formę terapii przy użyciu specyficznych polipeptydów stanowi hamowanie rozwoju chorób agregacyj-

⁴ Wydluzenie ciągu (CAG)_n w genie *ATXN3* kodującym ataksynę-3 jest przyczyną choroby Machado-Josepha (MJD, ang. *Machado-Joseph Disease*).

nych poprzez immunizację, zarówno czynną, jak i bierną. Wykazano, że obecność w organizmie przeciwciał skierowanych przeciwko A β w znacznym stopniu zapobiega tworzeniu się agregatów A β (lub nawet prowadzi do eliminacji powstałych wcześniej płytek starczych) a ponadto zapobiega rozwojowi objawów typowych dla choroby Alzheimera w mysim modelu tej choroby [99-101]. Korzystny wpływ przeciwciał, tym razem skierowanych przeciwko białku prionowemu, zaobserwowano także w mysim modelu encefalopatii gąbczastej [102]. Niestety badania kliniczne nad tego typu terapią w chorobie Alzheimera musiały zostać niedawno wstrzymane na skutek wystąpienia u części pacjentów groźnych dla ich życia efektów ubocznych (stanów zapalnych przypominających zapalenie opon mózgowych) [103, 104].

Wśród związków hamujących proces agregacji białek są także takie, których swoistość działania jest stosunkowo niewielka. Wymienić tu można np. liczne związki małowczątkowe, wykazujące zwiększone powinowactwo do agregatów amyloidowych lub białek bogatych w drugorzędowe struktury β . Ograniczoną swoistość wykazują też białka opiekuńcze (np. białka szoku termicznego HSP - ang. *heat shock proteins*), oddziałujące z nieprawidłowo zwiniętymi polipeptydami i zapobiegające ich nadmiernej (wręcz toksycznej) reaktywności, obejmującej także skłonność do agregacji. Choć szerokie spektrum oddziaływania wymienionych związków może stanowić potencjalną przyczynę wywołania niepożądanych skutków ubocznych, to dotychczasowe próby zastosowania tego typu terapii (dotychczas głównie na modelach zwierzęcych) wydają się być wielce obiecujące. Przykładem może być chociażby skuteczne zastosowanie dwucukru trehalozy do powstrzymania zmian patologicznych w mysim modelu choroby Huntingtona, co stwarza nadzieję na opracowanie efektywnej formy leczenia nie tylko choroby Huntingtona, ale także wszystkich pozostałych chorób poliglutaminowych [105]. Zaletami trehalozy, jako czynnika terapeutycznego, są jej znikoma toksyczność (nawet w wysokich stężeniach) oraz możliwość doustnego podawania leku. Inny przykład skutecznej terapii, przeprowadzonej również u myszy, może stanowić powstrzymanie zmian chorobowych w wyniku zwiększenia poziomu ekspresji białka opiekuńczego HSP40, znanego ze swych właściwości neuroprotektynowych, pod wpływem działania cystaminy [106]. W tym wypadku trudno jednak odróżnić wpływ działania samego białka opiekuńczego od równoczesnego efektu zahamowania aktywności transglutaminazy (której związek z chorobą omawiano powyżej), wywołanego działaniem tejże samej cystaminy.

PODSUMOWANIE

Obecnie znanych jest kilkadziesiąt chorób, w których patogeniezie przynajmniej częściowy udział będzie miała agregacja białka. Warto jednak zaznaczyć, że agregacja białek może być także elementem niepatogennych procesów fizjologicznych. Ostatnio odkryto na przykład, że przejściowa agregacja białka w postaci struktur określanych jako DALIS (ang. *dendritic cell aggresome-like induced structures*) jest prawidłowym zjawiskiem towarzyszącym dojrzewaniu komórek dendrytycznych układu odpornościowego [107]. Prawdopodobnie okaże się ona kluczowa dla możliwości

prezentowania antygeny w głównym układzie zgodności tkankowej klasy I (MHC I, ang. *major histocompatibility complex class I*) tych komórek. Z jednej strony udaje się znaleźć zastosowanie terapeutyczne (nowotwory) dla „nieprawidłowych” wariantów konformacyjnych niektórych białek [108], z drugiej strony dalecy jesteśmy od możliwości skutecznej terapii chorób agregacyjnych. Leczenie jest głównie objawowe. Wydaje się, że jednym z podstawowych problemów będzie zdefiniowanie toksycznej formy białka, przeciw której skierowane miałyby być działanie farmakologiczne. Ponadto, nie ma podstaw by ostatecznie odrzucać którykolwiek z mechanizmów patogenyzy opisywanych w tym artykule. Skoro jednak każdy z nich mógłby partycypować w powstawaniu objawów, to jaki jest względny udział agregatów i ich prekursorów? Jeśli, jak sugeruje wielu badaczy, agregaty nie są toksyczne, to należy zapytać o ich fizjologiczną funkcję. Paradoksalnie, agregaty mogłyby pełnić rolę neuroprotektyną - skupiałyby w nieaktywnej formie swoje toksyczne prekursory. Pomimo wielu lat badań patogenyza chorób agregacyjnych budzi wciąż wiele kontrowersji. Poznanie mechanizmu powstawania tych chorób pozwoli nie tylko zaproponować skuteczną terapię, ale także uzyskać wgląd w zagadnienia bardziej ogólne np. starzenie się organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci* 20: 456-459
2. Carrell RW, Lomas DA (1997) Conformational disease. *Lancet* 350: 134-138
3. Zekanowski C, Religa D, Graff C, Filipek S, Kuznicki J (2004) Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp* 64: 19-31
4. Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302: 819-822
5. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 1858-1867
6. Gorman PM, Chakrabarty A (2001) Alzheimer beta-amyloid peptides: structures of amyloid fibrils and alternate aggregation products. *Biopolymers* 60: 381-394
7. Buxbaum JN (2003) Diseases of protein conformation: what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases? *Trends Biochem Sci* 28: 585-592
8. Crowther DC (2002) Familial conformational diseases and dementias. *Hum Mutat* 20: 1-14
9. Singer R, Schnabel A, Strasser RH (2003) Images in cardiovascular medicine. Restrictive cardiomyopathy in familial amyloidosis TTR-Arg-50. *Circulation* 107: 643-644
10. Sousa MM, Saraiva MJ (2003) Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. *Prog Neurobiol* 71: 385-400
11. Teng MH, Yin JY, Vidal R, Ghiso J, Kumar A, Rabenou R, Shah A, Jacobson DR, Tague C, Gallo G, Buxbaum J (2001) Amyloid and non-fibrillar deposits in mice transgenic for wild-type human transthyretin: a possible model for senile systemic amyloidosis. *Lab Invest* 81: 385-396
12. Connors LH, Lim A, Prokoeva T, Roskens VA, Costello CE (2003) Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid* 10: 160-184
13. Sebastiao MP, Saraiva MJ, Damas AM (1998) The crystal structure of amyloidogenic Leu55-->Pro transthyretin variant reveals a possible pathway for transthyretin polymerization into amyloid fibrils. *J Biol Chem* 273: 24715-24722

14. Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ, Brito RM (2001) Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J Biol Chem* 276: 27207-27213
15. Sousa MM, Cardoso I, Fernandes R, Guimaraes A, Saraiva MJ (2001) Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am J Pathol* 159: 1993-2000
16. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, Taguchi A, Yan SF, Yan SD, Stern DM, Schmidt AM (2002) RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci* 59: 1117-1128
17. Sousa MM, Yan SD, Stern D, Saraiva MJ (2000) Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) activation. *Lab Invest* 80: 1101-1110
18. Sousa MM, Du YS, Fernandes R, Guimaraes A, Stern D, Saraiva MJ (2001) Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci* 21: 7576-7586
19. Barcikowska M (1998) Alzheimer's disease as an example of neurodegenerative process. *Post Biol Kom* 25: 5-14
20. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261: 6084-6089
21. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 742-747
22. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4: 233-234
23. Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70: 392-401
24. Lai MT, Chen E, Crouthamel MC, DiMuzio-Mower J, Xu M, Huang Q, Price E, Register RB, Shi XP, Donoviel DB, Bernstein A, Hazuda D, Gardell SJ, Li YM (2003) Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities. *J Biol Chem* 278: 22475-22481
25. Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114: 635-645
26. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, . (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327
27. Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120
28. Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414: 643-648
29. Berg L, McKeel DW, Jr., Miller JP, Baty J, Morris JC (1993) Neuropathological indexes of Alzheimer's disease in demented and nondemented persons aged 80 years and older. *Arch Neurol* 50: 349-358
30. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580
31. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37: 925-937
32. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6364-6369
33. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156: 1051-1063
34. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6923-6928
35. Tobin AJ, Signer ER (2000) Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol* 10: 531-536
36. Hackam AS, Singaraja R, Zhang T, Gan L, Hayden MR (1999) In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 8: 25-33
37. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72: 971-983
38. Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28: 425-433
39. Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delaney M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet* 7: 783-790
40. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277: 1990-1993
41. Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kikuzuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273: 9158-9167
42. Chen S, Bertheliev V, Yang W, Wetzel R (2001) Polyglutamine aggregation behavior in vitro supports a recruitment mechanism of cytotoxicity. *J Mol Biol* 311: 173-182
43. Michalik A, Van Broeckhoven C (2003) Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R173-R186
44. Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5355-5358
45. Kim S, Nollen EA, Kitagawa K, Bindokas VP, Morimoto RI (2002) Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol* 4: 826-831
46. Sipione S, Rigamonti D, Valenza M, Zuccato C, Conti L, Pritchard J, Kooperberg C, Olson JM, Cattaneo E (2002) Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet* 11: 1953-1965
47. Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623
48. Freiman RN, Tjian R (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science* 296: 2149-2150
49. Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344: 1688-1700
50. Valentine JS, Hart PJ (2003) Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3617-3622
51. Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M (1996) Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* 18: 492-498
52. Ince PG, Shaw PJ, Slade JY, Jones C, Hudson P (1996) Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. *Acta Neuropathol* 92: 395-403
53. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation

- and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854
54. Wang J, Xu G, Borchelt DR (2002) High molecular weight complexes of mutant superoxide dismutase 1: age-dependent and tissue-specific accumulation. *Neurobiol Dis* 9: 139-148
 55. Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR (2000) Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12571-12576
 56. Lomas DA, Parfrey H (2004) Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 59: 529-535
 57. Lomas DA, Mahadeva R (2002) Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 110: 1585-1590
 58. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW (1992) The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357: 605-607
 59. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA (1998) Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 670-674
 60. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, McElvaney NG (2004) Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 125: 1952-1957
 61. Stein PE, Carrell RW (1995) What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol* 2: 96-113
 62. Davis RL, Holohan PD, Shrimpton AE, Tatum AH, Daucher J, Collins GH, Todd R, Bradshaw C, Kent P, Feiglin D, Rosenbaum A, Yerby MS, Shaw CM, Lacbawan F, Lawrence DA (1999) Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. *Am J Pathol* 155: 1901-1913
 63. Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet* 363: 1783-1793
 64. Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7: 1144-1150
 65. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277: 1641-1644
 66. Hegde ML, Jagannatha Rao KS (2003) Challenges and complexities of alpha-synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Arch Biochem Biophys* 418: 169-178
 67. Marti MJ, Tolosa E, Campdelacreu J (2003) Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord* 18 Suppl 6: S21-S27
 68. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11282-11286
 69. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841
 70. Perez RG, Hastings TG (2004) Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem* 89: 1318-1324
 71. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmund MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22: 3090-3099
 72. Wersinger C, Sidhu A (2003) Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 340: 189-192
 73. Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB (2001) Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15: 916-926
 74. Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004) alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 565: 1-5
 75. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr. (2000) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39: 2552-2563
 76. Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8968-8973
 77. Uversky VN (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* 11: 739-756
 78. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B (2003) Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* 278: 11753-11759
 79. Cookson MR (2003) Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease? *Curr Biol* 13: R522-R524
 80. Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13363-13383
 81. Moore RC, Xiang F, Monaghan J, Han D, Zhang Z, Edstrom L, Anvret M, Prusiner SB (2001) Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am J Hum Genet* 69: 1385-1388
 82. Hetz C, Soto C (2003) Protein misfolding and disease: the case of prion disorders. *Cell Mol Life Sci* 60: 133-143
 83. Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM (2002) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113: 177-192
 84. Caughey B (2003) Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br Med Bull* 66: 109-120
 85. Horiuchi M, Caughey B (1999) Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure Fold Des* 7: R231-R240
 86. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, . (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10962-10966
 87. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP^{Sc}) into contiguous membranes. *EMBO J* 21: 1031-1040
 88. Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-720
 89. Stefani M, Dobson CM (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 81: 678-699
 90. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-1555
 91. Masaki T, Ishiura S, Sugita H, Kwak S (1994) Multicatalytic proteinase is associated with characteristic oval structures in cortical Lewy bodies: an immunocytochemical study with light and electron microscopy. *J Neurol Sci* 122: 127-134
 92. Berke SJ, Paulson HL (2003) Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration. *Curr Opin Genet Dev* 13: 253-261
 93. Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22: 623-633
 94. Piccioni F, Pinton P, Simeoni S, Pozzi P, Fascio U, Vismara G, Martini L, Rizzuto R, Poletti A (2002) Androgen receptor with elongated polyglutamine tract forms aggregates that alter axonal trafficking and mitochondrial distribution in motor neuronal processes. *FASEB J* 16: 1418-1420
 95. Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 567-571

96. Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T (2003) Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12: 1253-1259
97. Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B (1998) Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4: 822-826
98. Soto C, Kacsak RJ, Saborio GP, Aucouturier P, Wisniewski T, Prelli F, Kacsak R, Mendez E, Harris DA, Ironside J, Tagliavini F, Carp RI, Frangione B (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* 355: 192-197
99. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo C, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985
100. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, George-Hyslop P, Westaway D (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979-982
101. McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MH, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HT, Przybylski M, George-Hyslop P (2002) Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8: 1263-1269
102. White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 422: 80-83
103. Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298: 1379
104. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9: 448-452
105. Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10: 148-154
106. Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L (2002) Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 8: 143-149
107. Lelouard H, Ferrand V, Marguet D, Bania J, Camosseto V, David A, Gatti E, Pierre P (2004) Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J Cell Biol* 164: 667-675
108. Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C (2000) Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4221-4226

Diseases associated with protein aggregation

Daniel Bąk[✉], Michał Milewski

Cell Biology Laboratory, Medical Genetics Department, Institute of Mother and Child, 17A Kasprzaka St., 01-211 Warsaw, Poland
[✉]e-mail: dbak@imid.med.pl;

Key words: protein aggregation, conformational diseases, protein folding

ABSTRACT

The so-called conformational diseases constitute a specific subtype of protein folding diseases that is characterized by abnormal aggregation of improperly folded polypeptides. This review describes a series of examples of such disorders and summarizes the present knowledge on their molecular pathophysiology and new therapeutic strategies.

Urszula Kralisz

Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: ulakr@yahoo.com, tel. (42) 678 33 93, faks: (42) 678 94 33

Artykuł otrzymano 22 października 2004 r.
Artykuł zaakceptowano 11 lutego 2005 r.

Słowa kluczowe: płytki krwi, białka adaptorowe, przewodzenie sygnału

Wykaz skrótów: CD – antygeny różnicowania leukocytów (ang. *cluster of differentiation*); Crk – białko adaptorowe regulujące kinazę (ang. *Crk10 regulator of kinase*); Crkl – białko adaptorowe podobne do Crk; Dab-2 – fosfoproteina wrażliwa na mitogen; domena SH – domena homologiczna do obecnej w białku src (ang. *src homology domain*); Fak – kinaza ognisk kontaktowych (ang. *focal adhesion kinase*); FcγR – łańcuch γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE; FcγRIIA – receptor o niskim powinowactwie do IgG; Gads – białko adaptorowe podobne do Grb2 zależne od Shc (ang. *Grb2-related adaptor downstream of Shc*); GEM – mikrodomena błony plazmatycznej wzbogacona w glikolipidy (ang. *glycolipid-enriched membrane domain*); GP – glikoproteina; Grb2 – białko adaptorowe wiążące się z receptorem czynnika wzrostu (ang. *growth factor receptor bound 2*); IP3 – 1,4,5-trisfosforan inozytolu; LAT – łącznik aktywacji limfocytów T (ang. *linker for activation of T cells*); MAP – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. *mitogen activated protein*); PAG – fosfoproteina związana z GEM; PH – domena homologiczna do domeny plekstrynowej (ang. *plextrin homology domain*); PI3-K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PKC – kinaza białkowa C; PLCγ2-fosfolipaza Cγ2; PTB – domeny wiążące reszty fosfotyrozyny; Shc – białko zawierające domenę SH2; SH2 i SH3 – domeny homologiczne do domeny 2 i domeny 3 kinaz rodziny src; SKAP 55 – fosfoproteina o m. cz. 55 kDa łącząca się z kinazą Src; SKAP-HOM – białko adaptorowe homologiczne do SKAP; SLAP – białko o m. cz. 130 kDa oddziałujące z SLP-76 (ang. *SLP-associated protein*); SLP-76 – białko leukocytów o m. cz. 76 kDa zawierające domenę homologiczną do domeny SH2 kinaz rodziny src; src – mięsak (ang. *sarcoma*); SOS – ang. *son of sevenless* (nie ma polskiego odpowiednika); TCR – receptor antygenów limfocytów T; TxA2 – tromboksan A2

Artykuł ten dedykuję mojemu synowi, Piotrowi

STRESZCZENIE

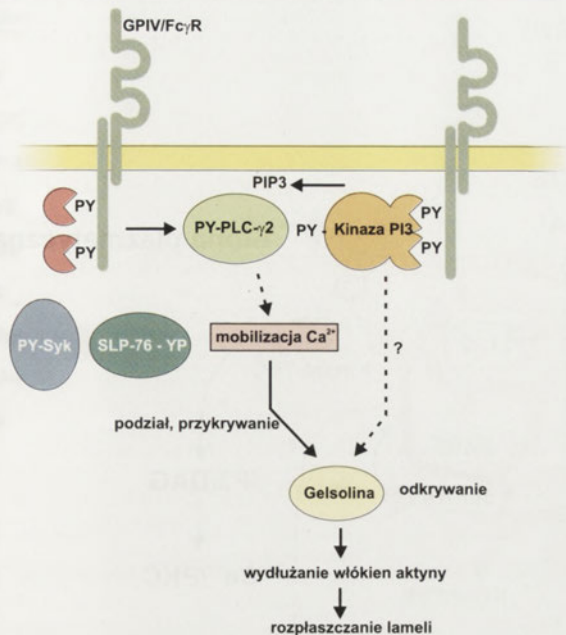
Białka adaptorowe pełnią ważną funkcję w regulacji przekazywania sygnałów od receptorów błony komórkowej do nośników sygnału w cytoplazmie. Płytki krwi zawierają szereg typów receptorów, np. kolagenu, czynnika von Willebranda i fibrynogenu oraz receptorów połączonych z białkami G, np. trombiny i ADP. Receptory te wiążą ligand, przenoszą informację od ligandu do wnętrza płytki i umożliwiają funkcjonalną odpowiedź płytki prowadzącą do hemostazy fizjologicznej, której końcowym efektem jest zahamowanie krwawienia w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego. W płytkach krwi opisano występowanie różnorodnych szlaków przekazywania sygnałów, w których uczestniczą kinazy tyrozynowe, fosfatazy, białka G, białka adaptorowe, fosforany fosfatydyloinozytolu, cykliczny AMP i GMP. Białka adaptorowe nie wykazują aktywności enzymatycznej. Zawierają szereg charakterystycznych domen, które umożliwiają ich oddziaływanie z innymi białkami i lipidami. Białka adaptorowe pełnią funkcję rusztowania, na którym enzymy łączą się z substratami tworząc trójwymiarowe kompleksy umożliwiające przenoszenie sygnału. Funkcja białek adaptorowych jest dobrze poznana w komórkach układu immunologicznego; mniej wiadomo na temat ich funkcji podczas aktywacji płytek krwi. W ostatnim dziesięcioleciu zidentyfikowano w płytkach krwi wiele białek adaptorowych i wykazano ich udział w tworzeniu ognisk przenoszących sygnał. Indukowane kolagenem przenoszenie sygnału, z udziałem glikoproteiny VI jest bardzo podobne do procesu zachodzącego w limfocytach T i B. Celem niniejszego artykułu jest zapoznanie czytelnika z budową i funkcją niektórych białek adaptorowych biorących udział w aktywacji płytek krwi.

WPROWADZENIE

W organizmach wielokomórkowych odpowiedź komórki na zewnętrznie działający ligand zależy od złożonej z wielu czynników kaskady przekazywania sygnału. W skład tych czynników należy zaliczyć m.in. receptory integralne błony, kontaktujące się z ligandem oraz szereg wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału. W tworzeniu tych kompleksów dużą rolę przypisuje się białkom adaptorowym. Wiele białek adaptorowych wykryto w ostatnim dziesięcioleciu w płytkach krwi i udowodniono ich udział w tworzeniu kompleksów przenoszących sygnał od receptorów fibrynogenu, glikoproteiny $\alpha_{IIb}\beta_3$, kolagenu, glikoproteiny VI (GPVI), czy czynnika von Willebranda (vWF), kompleksu glikoprotein GPIb/V/IX. Szlak przenoszenia sygnału z udziałem białek adaptorowych od GPVI, receptora kolagenu aktywującego płytki krwi, jest najlepiej poznany w porównaniu ze szlakami przenoszenia sygnału od innych receptorów płytek. Szlak ten jest bardzo podobny do szlaków przekazujących sygnał od receptorów antygenów limfocytów T (TCR) i biorą w nim udział podobne białka adaptorowe [1].

DOMENY BIAŁEK ADAPTOROWYCH

Białka adaptorowe nie wykazują aktywności enzymatycznej, ale zawierają charakterystyczne domeny umożliwiające ich wiązanie się z innymi białkami i lipidami, co umożliwia im tworzenie kompleksów przenoszących sygnał. Białka adaptorowe wiążąc się z wewnątrzkomórkowymi nośnikami informacji, w tym m.in. z kinazami tyrozynowymi, porządkują kolejność oddziaływań pomiędzy nimi i przyspieszają przenoszenie informacji, co w końcowym efekcie doprowadza do prawidłowej aktywacji komórki. Udział białek adaptorowych w przenoszeniu sygnału od receptora kolagenu, glikoproteiny VI, przedstawiono na rysunku 1. Najczęściej występujące domeny w białkach adaptorowych to domeny SH2 (homologiczne do domeny 2 kinaz rodziny src), domeny wiążące reszty fosfotyrozynowe (PTB) partnerów białkowych oraz domeny SH3 (homologiczne do domeny 3 kinaz rodziny src) wiążące się z sekwencjami bogatymi w prolinę. Mniej licznie występują domeny plekstrynowe, pierścieniowe i koliste, o których specyficzności działania niewiele wiadomo. Domeny SH2 zidentyfikowano początkowo w kinazach tyrozynowych rodziny src (nie wchodzące w skład receptorów), a następnie w innych białkach biorących udział w przekazywaniu



Rysunek 1. Udział białek adaptorowych w przekazywaniu sygnału od receptora kolagenu, glikoproteiny VI. Strzałki ciągle pokazują procesy fosforylacji, a strzałki przerywane połączenie kompleksu LAT/Gads/SLP-76/Grb2/Sos z cytoszkieletem płytki, szlakiem kinazy MAP, aktywacją fosfolipazy PLC γ 2 i powstawaniem drugorzędowych przekaźników informacji takich jak 1,4,5- trisfosforan inozytolu (IP3), diacyloglicerol (DAG), jony wapnia oraz aktywację białkowej kinazy C (PKC) [8].

informacji [2]. Domeny SH2 zbudowane są z około 100 reszt aminokwasowych, które tworzą centralnie położone antyrównoległe struktury β otoczone przez struktury α -helikalne. Domeny SH2 przybierają kształt kieszeni, do której dopasowują się odpowiednie sekwencje ligandu. Sekwencje te, nazywane motywami sygnalizującymi, są utworzone przez resztę tyrozyny i trzy do pięciu (rzadziej siedem) otaczających ją reszt aminokwasowych. O specyficzności wiązania domeny SH2 decydują reszty aminokwasowe występujące od C-końca tej domeny. Z pewnymi wyjątkami, do wiązania domeny SH2 z motywem sygnalizującym niezbędna jest fosforylacja reszty tyrozyny. Domeny PTB wiążą również ufosforylowane motywy ligandu, ale w odróżnieniu od domen SH2, o specyficzności wiązania decydują reszty aminokwasowe N-końca motywu sygnalizującego ligandu [3-4]. Domeny SH3 wiążą krótkie sekwencje ligandu bogate w reszty proliny, klasa I (RXXPPXXP) i klasa II (PXXPXR) [5-7].

KLASYFIKACJA BIAŁEK ADAPTOROWYCH

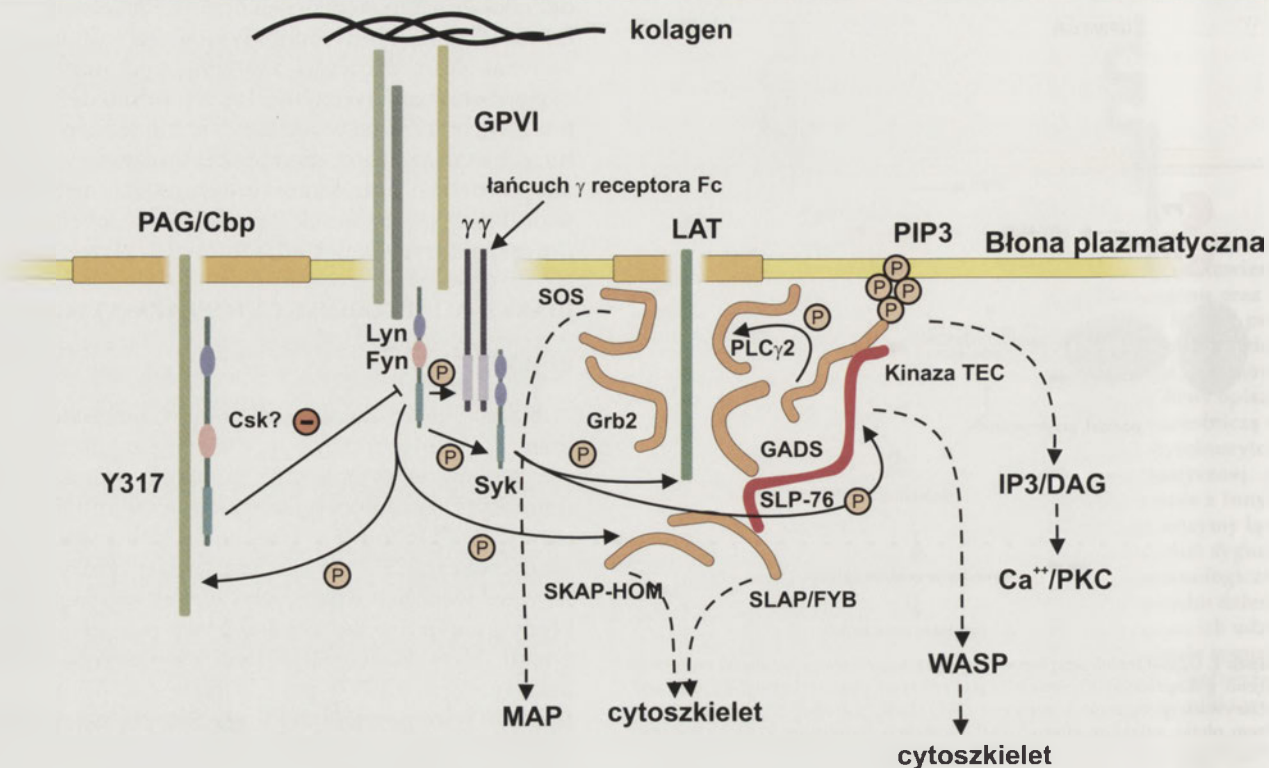
Ze względu na występowanie białka adaptorowe dzieli się na białka cytoplazmatyczne oraz białka integralne błony komórkowej. Większość zidentyfikowanych białek adaptorowych występuje w cytoplazmie. Cechują się one dużą różnorodnością budowy. Jak dotychczas zidentyfikowano pięć białek integralnych adaptorowych w limfocytach T, a obecność czterech z nich tj. łącznika aktywacji limfocytów T (LAT), fosfoproteiny związanej z GEMs (PAG), łańcucha γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE (łańcuch Fc γ R) oraz receptora o niskim powinowactwie do IgG (Fc γ RIIA) stwierdzono w płytkach krwi. Białka integralne adaptorowe charakteryzują się występowaniem krótkiego

odcinka zewnątrzkomórkowego zbudowanego z czterech do osiemnastu reszt aminokwasowych i długiego odcinka wewnątrzkomórkowego zawierającego motywy sekwencyjne z resztami tyrozyny. Reszty tyrozyny, po ufosforylowaniu przez kinazy rodziny *src* lub kinazę Syk, stają się miejscem wiązania domen SH2 cytoplazmatycznych białek adaptorowych oraz kinaz tyrozynowych, przytwierdzając je do błony [8]. Rysunek 2 przedstawia schematycznie budowę niektórych białek adaptorowych płytek krwi.

BIAŁKA ADAPTOROWE CYTOPLAZMATYCZNE

BIAŁKO SLP-76

Białko SLP-76 zawierające domenę homologiczną do domeny SH2 kinaz rodziny *src* ma masę cząsteczkową 76 kDa i występuje w cytoplazmie komórek hematopoetycznych (monocyty, granulocyty, megakariocyty, płytki krwi i limfocyty T). SLP-76 nie występuje w limfocytach B [8-9]. N-końcowa część SLP-76 zawiera 3 reszty tyrozyny, ulokowane w sekwencjach wiążących czynnik wymieniający nukleotydy guaninowe, kodowany przez onkogen wirusa artretyzmu (Vav). Fosforylacja dwóch z trzech N-terminalnych reszt tyrozyny SLP-76 przez kinazę ZAP-70 w limfocytach (ZAP-70 to odpowiednik kinazy Syk płytek), po związaniu antygeny z jego receptorem, prowadzi do wiązania się SLP-76 z czynnikiem Vav. C-końcowa część SLP-76 zawiera domenę SH2, która wiąże się z wieloma fosforylowanymi białkami w tym z białkiem SLAP o m. cz. 130 kDa wiążącym się z SLP-76, a region centralny cząsteczki SLP-76, który jest bogaty w reszty proliny, wiąże się konstytutywnie z domeną SH3 białka adaptorowego Grb2 połączonego z receptorem czynnika wzrostu [10-13]. Zwiększona zawartość SLP-76 w limfocytach wzmacnia stopień ich aktywacji. Niedobór SLP-76 prowadzi do zahamowania przekazywania sygnału przez receptory TCR. Myszy z niedoborem SLP-76 (SLP-76-) charakteryzują się blokadą dojrzewania limfocytów występującą we wczesnym okresie tymocytów. Ponadto myszy te, podobnie do myszy Syk-, cechują się dużą śmiertelnością spowodowaną krwawieniem w narządach wewnętrznych, wskazującym na defekty funkcjonalne płytek krwi [12, 14]. Dojrzewanie płytek krwi SLP-76-, w odróżnieniu od limfocytów SLP-76-, przebiega w sposób prawidłowy [14]. Płytki krwi SLP-76- wykazują kompletny brak fosforylacji fosfolipazy C γ 2 (PLC γ 2), co powoduje bardzo obniżoną agregację i reakcję uwalniania w odpowiedzi na kolagen, podczas gdy odpowiedź funkcjonalna wywołana trombiną jest niezmienną. Wyniki te wskazują na to, że SLP-76 jest niezbędne dla prawidłowego przesyłania sygnału przez receptor kolagenu, kompleks glikoproteiny VI z łańcuchem γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE (GPIV/Fc γ R) płytek krwi oraz przez receptory TCR [15-18]. Badania ostatnich lat wykazały, że ufosforylowane reszty tyrozyny SLP-76 są niezbędne dla aktywacji płytek krwi i dojrzewania limfocytów T. Rejon SLP-76 wiążący białko adaptorowe Gads podobne do Grb2 zależne od Shc odgrywa ważną rolę w uwalnianiu zawartości z ziarnistości płytkowych w rozwoju limfocytów T, natomiast nie jest niezbędny dla rozplaszczania się płytek krwi na włóknach fibrynogeny [19]. Inną ważną funkcją SLP-76 w płytkach krwi jest regulowanie reorganizacji struktury cytoszkieletu niezbędnej dla zmiany kształtu płytek z dyskoidalnego na kulisty, w tym m.in. dla wytwo-



Rysunek 2. Schemat budowy wybranych białek adaptorowych płytek krwi [8].

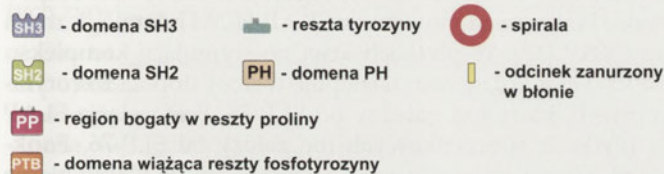
rzenia lamelli i filopodiów, zwiększających powierzchnię przyczepną płytek, umożliwiającą im rozplaszczanie się na włóknach kolagenowych. Filopodia płytkowe to grube wydłużenia zbudowane z ciasno upakowanych, długich włókien aktyny. Lamelle, zbudowane z krótkich włókien aktyny, są cieńsze od filopodiów i wypełniają miejsca między nimi tworząc sieć ortogonalną. Płytki krwi SLP-76- podczas adhezji zachowują kształt kulisty, nie są zdolne do rozplaszczania się i wytwarzają nieliczne filopodia. Tworzenie włókien F-aktyny w tych płytkach jest obniżone. Cytoskielet płytek krwi zawierających SLP-76 oraz z deficytem tego białka przedstawiono na rysunku 3. Płytki SLP-76- nie wykazywały wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. Wortmanina, inhibitor kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K), opóźniała wzrost stężenia jonów wapniowych w płytkach SLP-76- i hamowała tworzenie lamelli, ale nie wzrostu filopodiów. Wortmanina obniżała również o 80% przejściową ekspozycję tzw. ostro zakończonych (ang. *barbed-ends*) włókien aktyny, które są miejscami nukleacji monomerów aktyny. Płytki krwi z deficytem żelzoliny również nie wykazywały wzrostu lamelli, podczas gdy wydłużanie filopodiów przebiegało normalnie. Wyniki tych badań sugerują następujący mechanizm reorganizacji struktury cytoskieletu płytkowego zachodzący z udziałem białka SLP-76, którego fosforylacja zależy od kompleksu GPVI/FcγR (Rys. 4). Fosforylacja SLP-76 przez kinazę Syk doprowadza do aktywacji PLCγ2. Aktywna PLCγ2 wywołuje mobilizację jonów wapniowych, które z kolei aktywują żelzolinę. Żelzolina dzieli filamenty aktyny i przykrywa ostre ich zakończenia, co powoduje podwojenie ilości włókien aktyny i w konsekwencji wydłużanie lamelli. Aktywacja PI3-K przez kompleks GPVI/FcγR wywołuje z kolei odkrywanie ostro zakończonych końcówek aktyny. Biorąc w tym najprawdopodobniej udział wytworzone fosforany inozytolu

oraz białko G Rac [20]. Zakrywanie i odkrywanie końcówek włókien aktyny to przejściowe procesy niezbędne dla ich wydłużania. Zjawiska związane ze zmianą kształtu płytek SLP-76-, w tym tworzenie lamelli, rozplaszczanie płytek oraz wzrost stężenia jonów wapniowych, były niezmiennie w płytkach stymulowanych trombiną, wskazując, że SLP-76 jest niezbędne dla prawidłowego przesyłania sygnału po aktywacji kompleksu GPVI/FcγR. Aktywacja receptorów TCR wywołuje również zależną od SLP-76 reorganizację cytoskieletu limfocytów [21]. SLP-76 należy do nielicznych białek adaptorowych o poznanej częściowo mechanizmie regulacji ekspresji genu kodującego to białko. Zlokalizowano szereg miejsc specyficznych dla DNazy-I w locus SLP-76. Najważniejsze z nich występuje w rejonie promotorowym. Ekspresja genu SLP-76 jest kontrolowana przez czynniki transkrypcyjne Ets, NFAT i c-Rel [9]. W odróżnieniu od limfocytów i płytek krwi białko SLP-76 oraz jego izoforma SLP-65 nie są potrzebne do zależnego od FcγR przekazywania sygnału w makrofagach i do normalnego funkcjonowania makrofagów [22].

BIAŁKA GRB2 I GADS

Grb2 jest pierwszym zidentyfikowanym w 2002 roku białkiem adaptorowym. Białko to zawiera dwie domeny SH3 zlokalizowane na C- i N-końcu cząsteczki oraz jedną domenę SH2 położoną w centrum cząsteczki. Początkowo stwierdzono, że domena SH3 Grb2 łączy się z domeną bogatą w reszty proliny białka SOS, co umożliwia z kolei aktywację przez unieruchomione białko SOS szlaku informacyjnego białko G Ras-kinaza Raf-kinaza MAP [23-24]. Później odkryto, że białko Grb2 łączy się z wieloma innymi białkami, w tym z łącznikiem aktywacji limfocytów T, białkiem leukocytów zawierającym domenę homologiczną do dome-

Nazwa	Struktura	Wielkość	Partnerzy
LAT		36-3	Grb2, Gads, SLP-76, PLC 1/2, PI3K
PAG/Cbp		75-5	Csk, Fyn
SLP-76		76	Gads, SLAP, Vav
Grb2		2	SOS, LAT, SLP-76, Shc, SHP-2, WASP
Gads		4	LAT, SLP-76, Shc
Shc		46-66	Grb2
SKAPHOM		55	SLAP, Fyn
Crkl		3	Cbl, Cas
Cas		13	Crkl, FAK

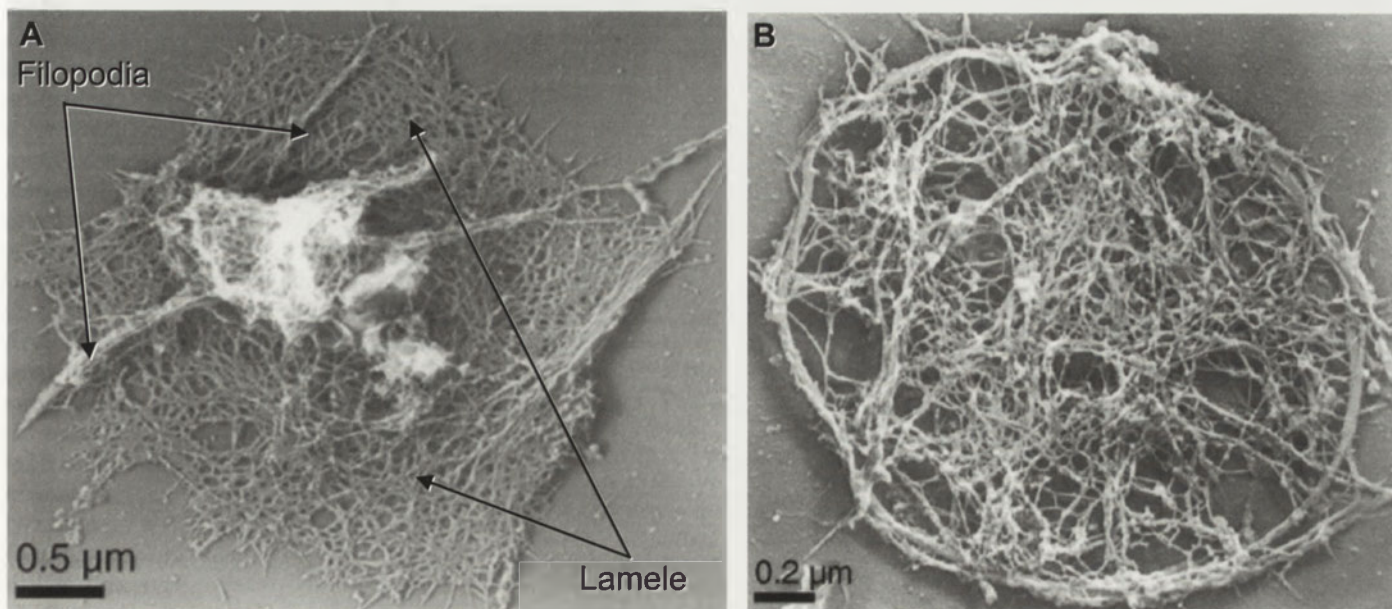


Rysunek 3. Wpływ SLP-76 na zmiany reorganizacji cytoszkieletu płytek krwi podczas ich aktywacji na powierzchni pokrytej włóknami kolagenowymi. Płytki krwi przyległe do włókien kolagenowych permebilizowano, zamrażano i cytoszkielet po wybarwieniu metalem fotografowano z użyciem mikroskopu elektronowego. A. Cytoszkielet płytek krwi zawierających SLP-76 ma centralnie zgrupowane włókna aktyny od których na boki rozpościerają się długie filopodia pomiędzy którymi występuje ortogonalna sieć lameli. Płytki krwi mają zmieniony kształt i są rozpostarte na kolagenie. B. Cytoszkielet płytek krwi z deficytem SLP-76 nie zawiera centralnie zgrupowanych włókien aktyny, filopodiów, a kształt płytek jest niezmienny [20]. Rysunek wykorzystano za zgodą pierwszego autora i wydawcy czasopisma.

ny SH2 kinaz rodziny *src*, czynnikiem wymieniającym nukleotydy guaninowe Vav, białkiem zespołu Wiscott-Aldrich (WASP) i fosfoproteiną czułą na mitogen zwaną Disabled-2, będącą homologiem białka występującego u muszki owocowej (Dab) [8, 25]. W płytkach aktywowanych trombiną domena SH2 Grb2 łączy się z łańcuchem β_3 integraliny $\alpha_{IIb}\beta_3$,

białkiem Shc zawierającym domenę SH2, kinazą Src i fosfatazą fosfotyrozynową SHP-1 zawierającą domenę SH2. Połączenia te nie występują w płytkach spoczynkowych oraz aktywowanych przez receptor o niskim powinowactwie dla IgG (Fc γ RIIA). Wiązanie się domeny SH2 Grb2 z wyżej wymienionymi białkami nie ulega zerwaniu podczas hamowania wiązania się fibrynogenu z płytkami i agregacji płytek przez peptyd RGDS sugerując, że wiązanie to ma miejsce podczas indukowanego trombiną przesyłania sygnału mechanizmem „inside-out”. Domena SH3 Grb2 wiąże się z białkiem adaptorowym SOS i białkiem adaptorowym c-Cbl chłoniaকা Casitas zarówno w płytkach spoczynkowych jak i aktywowanych. Hamowanie tych połączeń powoduje obniżenie agregacji płytek, uwalniania serotoniny z ziarnistości płytek i tworzenia tromboksanu A2 (TxA2) w płytkach stymulowanych trombiną. Natomiast agregacja płytek indukowana bezpośrednią aktywacją integraliny $\alpha_{IIb}\beta_3$ ulega zwiększeniu po przerwaniu połączenia się domeny SH3 Grb2 z jej partnerami. Sugeruje to udział domeny SH3 Grb2 w hamowaniu aktywacji płytek trombiną i zwiększaniu aktywacji zależnej od integraliny $\alpha_{IIb}\beta_3$ [26]. Białko adaptorowe c-Cbl, łączące się z Grb2 i odgrywające ważną funkcję w degradacji receptorów błon komórkowych, najprawdopodobniej obniża aktywację płytek kolagenem z udziałem kompleksu GPVI/Fc γ R i zapobiega niepożądaną aktywacją płytek *in vivo* [27].

Disabled-2 (Dab-2) wpływa na obniżenie wzrostu i różnicowania wielu komórek ponieważ hamuje kompetycyjnie wiązanie się Grb2 z SOS [25, 28]. Fosforylacja reszty seryny w pozycji 24 Dab-2 płytek krwi jest odpowiedzialna za łączenie się Dab-2 z integraliną $\alpha_{IIb}\beta_3$ i hamowanie przesyłania sygnału przez tę integralinę mechanizmem „inside-out”. Fosforylacja reszty serynowej 24 Dab-2 hamuje także różnicowanie się megakariocytów [29]. N-terminalna domena SH3 białka Grb2 łączy się również z domeną bogatą w reszty proliny kinazy Fak i kinazy tyrozynowej Pyk-2 bogatej w reszty proliny, występujące w ogniskach kontaktowych płytek krwi stymulowanych trombiną, co umożliwia akty-



Rysunek 4. Schemat udziału białka SLP-76 w reorganizacji cytoszkieletu płytek krwi podczas ich aktywacji [20]. Rysunek wykorzystano za zgodą pierwszego autora i wydawcy czasopisma.

wację tych kinaz. Aktywacja kinaz Fak i Pyk-2 jest niezbędna dla powstania nieodwracalnych agregatów płytkowych [30]. Grb2 bierze również udział w przewodzeniu informacji od białek Ras do kinazy Erk regulowanej sygnałami zewnątrzkomórkowymi w płytkach stymulowanych trombiną, konwulksyną i trombopoetyną. Szlaki przekazywania sygnału od Ras do Erk z udziałem białek adaptorowych są różne i mało poznane [31].

Białko Gads występuje w wielu rodzajach komórek, w odróżnieniu od białka Grb2, które znajduje się wyłącznie w komórkach hematopoetycznych. Gads jest zbudowane podobnie do białka Grb2 i zawiera dwie domeny SH3 i jedną domenę SH2. Białka adaptorowe Grb2 i Gads to białka cytoplazmatyczne zawierające konstytutywnie ufosforylowane reszty tyrozyny. Fosforylacja tych białek nie zwiększa się w płytkach po aktywacji kompleksu GPVI/FcγR. Grb2 i Gads wiążą się z z LAT i łańcuchem γ FcR w płytkach krwi. Wiązanie się Grb2 i Gads z LAT jest bezpośrednie dzięki pięciu ufosforylowanym resztom tyrozyny białka LAT, które znajdują się w sekwencjach wiążących domeny SH2 tych białek. Ponieważ łańcuch γ FcR nie zawiera sekwencji wiążących domeny SH2 białek Grb2 i Gads oraz nie ma regionu bogatego w reszty proliny, który mógłby wiązać domeny SH3 tych białek, wydaje się, że białka te nie mogą wiązać się bezpośrednio z łańcuchem γ FcR. Domena SH3 białka Gads łączy się z regionem bogatym w reszty proliny SLP-76, a domena SH2 z LAT, zatem białko Gads jest łącznikiem pomiędzy LAT i SLP-76. Białko Grb2 nie wiąże się bezpośrednio z SLP-76, a białko Gads nie wiąże się bezpośrednio z białkiem SOS [8, 32-33].

Synteza białka Gads w różnych komórkach zależy od dwóch transkryptów, nazwanych 1-A i 1-B, różniących się rejonem 5'UTR. Płytki krwi i komórki linii megakariocytycznych K-562 i HEL posiadają mRNA 1-B, a monocyty i limfocyty T mRNA 1-A. Czynniki transkrypcyjne typowe dla megakariocytycznych promotorów, takie jak GATA-1 i E-26, są potrzebne do aktywności promotora 1-B. Komórki spoczynkowe zawierające mRNA 1-B nie syntetyzują białka Gads. Natomiast komórki spoczynkowe zawierające mRNA 1-A syntetyzują białko Gads. Tak więc, białko Gads jest niewykrywalne w spoczynkowych płytkach krwi. Aktywacja płytek trombiną powoduje szybkie wytwarzanie Gads sugerując, że aktywacja powoduje odblokowanie hamowania translacji 1B mRNA [34-36].

BIAŁKA ADAPTOROWE SHC, SKAP-HOM, CRKL, SLAP I CAS

Shc jest białkiem adaptorowym występującym w różnych typach komórek. Zawiera ono domenę SH2, PTB oraz centralnie położoną domenę bogatą w reszty proliny. Opisano trzy izoformy białka Shc masach cząsteczkowych 46, 52 i 66 kDa. W płytkach krwi występuje tylko izoforma 52Shc [37]. Białko Shc bierze udział w przekazywaniu sygnału od receptora trombopoetyny, receptora vWF oraz od receptora fibrynogenu. Stymulacja tych receptorów powoduje wzrost fosforylacji Shc [32]. Domeny PTB białek Shc wiążą się bezpośrednio z ufosforylowanymi motywami sekwencyjnymi NXXY C-końcowego odcinka łańcucha β_3 integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ podczas przekazywania sygnału na drodze "outside-in" przez integrynę. Połączenie Shc z $\alpha_{IIb}\beta_3$ jest ważne dla

powstania nieodwracalnych agregatów płytek krwi. Najprawdopodobniej ufosforylowane Shc połączone z $\alpha_{IIb}\beta_3$ aktywuje szlak informacyjny białko Ras-kinaza MAP-kinaza Erk1/2- fosfolipaza A2, zwiększając ilość uwalnianego kwasu arachidonowego z fosfolipidów błony plazmatycznej płytek krwi podczas ich aktywacji [37]. Wiązanie się Shc z integryną $\alpha_{IIb}\beta_3$ jest też niezbędne dla zależnej od jonów wapniowych agregacji płytek krwi [38]. Shc łączy też kompleks Grb2-SOS ze szlakiem kinazy MAP dzięki wiązaniu się Shc z kinazą Fak podczas stymulacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$. Funkcja białka Shc podczas oddziaływania kolagenu z jego receptorem, kompleksem GPVI/FcγR, nie jest poznana.

Białko SLAP zawiera segment bogaty w reszty proliny zlokalizowany na N-końcu cząsteczki, domenę SH3 przy C-końcu cząsteczki oraz kilka reszt tyrozyny w regionie centralnym. W płytkach spoczynkowych białko SLAP jest konstytutywnie fosforylowane i reaguje z domeną SH2 SLP-76 oraz z białkiem adaptorowym SKAP-HOM homologicznym do SKAP [17]. W płytkach krwi po stymulacji kompleksu GPVI/FcγR kolagenem następuje wzrost stopnia fosforylacji SLAP, który jest zależny od SLP-76. Fosforylacja SLAP w płytkach spoczynkowych nie zależy od SLP-76. Funkcja SLAP jest słabo poznana. Sugeruje się, że białko bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu, ponieważ jest zlokalizowane wyłącznie w lamellach rozplaszczonych płytek krwi [33]. Białko SKAP-HOM zawiera centralnie położoną domenę plekstrynową, domenę SH3 od C-końca, kilka reszt tyrozyny będących potencjalnymi miejscami fosforylacji oraz domenę zwiniętej spirali od N-końca cząsteczki. SKAP-HOM jest konstytutywnie ufosforylowane w płytkach spoczynkowych i jego fosforylacja nie zwiększa się po stymulacji płytek kolagenem [8]. SKAP-HOM wraz z SLAP należą do kompleksu przez inne białka, między innymi kinazę Fyn i białko PAG. Przypuszcza się, że kompleks ten odpowiada za hamowanie aktywacji płytek krwi.

Białko adaptorowe Crkl podobne do białka Crk, o m. cz. 39 kDa, zawiera jedną domenę SH2, dwie domeny SH3 i jedną resztę tyrozyny występującą pomiędzy domenami SH3. Białko Crkl bierze udział w przekazywaniu sygnału od receptorów trombopoetyny, kolagenu, fibrynogenu i trombin. Fosforylacja tego białka zwiększa się po aktywacji tych receptorów [39-42]. Domena SH2 Crkl wiąże się z paksyliną i białkiem Cas występującymi w ogniskach kontaktowych razem z α -aktyniną i innymi białkami adaptorowymi, w tym zykliną, białkiem VASP i białkiem WASP [43]. N-końcowa domena SH3 Crkl wiąże się z białkiem C3G (czynnikiem wymieniającym nukleotydy guaninowe), kierując je do miejsc adhezyjnych. C3G aktywuje małą GTPazę Rap 1 i reguluje adhezję i rozplaszczanie komórek. Białka ARF (czynniki rybozylujące ADPs) należące do zależnych od Ras małych GTPaz regulują również translokację białek i reorganizację cytoszkieletu podczas adhezji i agregacji płytek krwi. Aktywność ARF jest zwiększana przez białka GEF, a hamowana przez białka GAP aktywujące GTPazy. Płytki krwi zawierają białko GAP specyficzne dla Arf (ASAP 1). Domena SH3 Crkl wiąże się z ASAP1 podczas agregacji płytek krwi i kompleks ASAP1-Crkl ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do cytoszkieletu, sugerując udział tego kompleksu w reorganizacji cytoszkieletu w agregujących płytkach. Kompleks Crkl-ASAP1 lokalizuje się w ogniskach kontak-

towych razem z kompleksami kinazy Fak z ASAP1 i Crkl z C3G podczas adhezji płytek krwi, biorąc udział w reorganizacji cytoszkieletu. Crkl jest najważniejszym łącznikiem pomiędzy ASAP1 a ogniskami kontaktowymi [40]. Udział Crkl w reorganizacji cytoszkieletu podczas aktywacji płytek krwi wiąże się również z tym, że domena SH3 Crkl łączy się z białkiem WASP, a domeny SH3 i SH2 Crkl łączą się z kinazą Syk, odgrywającą centralną funkcję podczas przenoszenia sygnału przez kompleks GPVI/FcγR. Dzięki tym połączeniom kinaza Syk i białko WASP są przenoszone do cytoszkieletu płytek [41]. Na uwagę zasługuje fakt, że białko Crkl jest konstytutywnie ufosforylowane w płytkach chorych na przewlekłe białaczki szpikowe, u których nie obserwowano również wzrostu fosforylacji Crkl po stymulacji receptora kolagenu, kompleksu GPVI/FcγR. Natomiast wiązanie się Crkl z Cbl jest silniejsze w płytkach osób z wyżej wymienionymi chorobami. Konsekwencje funkcjonalne tych zjawisk nie są poznane [42].

Cas to białko adaptorowe o m. cz. 130 kDa zawierające od N-końca domenę SH3, po której występuje 15 motywów zawierających reszty tyrozyny, domena prolinowa, a od C-końca występują dodatkowo dwa motywy wzbogacone w reszty tyrozyny. Białko Cas ulega fosforylacji podczas aktywacji płytek krwi w obecności kolagenu, jonoforu wapniowego i aktywatorów kinazy białkowej C (PKC) [44-45]. Przypuszcza się, że białko Cas bierze udział w przekazywaniu sygnału w trakcie aktywacji komórek i ich migracji, w którym uczestniczą integryny. W odróżnieniu od wielu typów komórek, w których aktywacja przy udziale integrzyn powoduje długotrwałą fosforylację Cas, fosforylacja Cas w płytkach krwi jest krótkotrwała. Białko Cas jest fosforylowane w płytkach podczas początkowego oddziaływania kolagenu i trombiny z ich receptorami i ulega defosforylacji po aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ i agregacji płytek krwi. Funkcja Crkl i Cas jest bardzo słabo poznana.

BIAŁKO 14-3-3 ZETA

14-3-3ζ jest białkiem adaptorowym płytek krwi o m.c. 29 kDa. Należy do rodziny białek 14-3-3 o m. cz. 27-30 kDa [46]. Opisano występowanie dziesięciu izoform tego białka u ssaków. Białka 14-3-3 nie zawierają domen charakterystycznych dla białek adaptorowych, np. domen SH2, SH3, PTB i PH. Zbudowane są z N-końcowej domeny dimeryzacyjnej, C-końcowej domeny hamującej aktywność PKC oraz domeny homologicznej do występującej w aneksynach, znajdującej się pośrodku cząsteczki. Białka 14-3-3 biorą udział w regulowaniu przekazywania sygnału w wielu typach komórek dzięki oddziaływaniom z kinazami tyrozynowymi, PKC, PI3-K, białkami Ras i Raf [47]. W płytkach krwi 14-3-3ζ oddziałuje również ze skierowanymi do cytoplazmy rejonami łańcuchów Iba i Ibβ kompleksu glikoprotein Ib/IX/V i bierze udział w przekazywaniu sygnału od tego kompleksu prowadzącego do aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ adhezji płytek do vWF i agregacji płytek. GP Ib/IX/V jest receptorem vWF, trombiny, P-selektyny, kininogenu i czynnika XII. Połączenie się trombiny lub vWF z GP Ib/IX/V uruchamia kaskadę przenoszenia sygnału, podobną do uruchamianej przez połączenie się kolagenu z GPVI/FcγR [1, 47-49]. Dwa miejsca o sekwencjach GHSL i LVA-GRRPSALS C-końcowego odcinka łańcucha Iba wiążą się

z 14-3-3ζ. Fosforylacja przez nieznaną dotychczas kinazę reszt seryny tych dwóch miejsc wiążących jest niezbędna dla łączenia się tych białek [48, 50]. 14-3-3ζ łączy się z jednym miejscem o sekwencji RLSLTDP C-końcowego odcinka Ibβ [48]. Fosforylacja przez kinazę A reszty seryny tego odcinka jest niezbędna do wiązania się 14-3-3ζ z Ibβ [47-48]. W przenoszeniu sygnału od GP Ib/IX/V biorą również udział białka adaptorowe FcγRIIA i FcγR [48, 51-52]. Na uwagę zasługuje fakt, że białko 14-3-3ζ wiąże się również z łańcuchem β_1 integrzyn w sposób niezależny od fosforylacji reszt seryny i bierze udział w przewodzeniu sygnału od integrzyn posiadających łańcuch β_1 [53]. W płytkach krwi występuje integryna $\alpha_2\beta_1$ która jest receptorem kolagenu, lamininy i fibronektyny, ale udział białka 14-3-3ζ w przewodzeniu sygnału od $\alpha_2\beta_1$ jest nieznan.

BIAŁKA ADAPTOROWE - INTEGRALNE BIAŁKA BŁONY PLAZMATYCZNEJ

BIAŁKO LAT

Białko LAT o m. cz. 36-38 kDa jest białkiem integralnym błony plazmatycznej płytek krwi, limfocytów T, komórek NK i komórek tucznych. LAT jest zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego, którego N-końcowy odcinek zbudowany z czterech reszt aminokwasowych zlokalizowany jest na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Rejon przechodzący przez błonę zbudowany jest z 21 reszt aminokwasowych, a odcinek cytoplazmatyczny jest zbudowany z 228 reszt aminokwasowych. Odcinek cytoplazmatyczny zawiera 10 reszt tyrozyny, z których 5 znajduje się w sekwencjach wiążących domeny SH2 białek Grb2 i Gads, a jedna reszta tyrozyny znajduje się w sekwencji odpowiedzialnej za wiązanie domeny SH2 fosfolipaz PLCγ1 i PLCγ2 [8, 54-55]. Dwie reszty cysteiny, występujące w części cytoplazmatycznej blisko odcinka przechodzącego przez błonę są palmitylowane, co ułatwia połączenie się LAT z mikrodomenami błony wzbogaconymi w glikolipidy (tzw. GEM) [56-58]. Lokalizacja LAT w mikrodomenach GEM nie jest niezbędna dla prawidłowego dojrzewania i funkcjonowania limfocytów T [59]. LAT zajmuje centralną pozycję w kaskadzie przesyłania sygnału od kompleksu GPVI/FcγR i od receptorów TCR. W formie ufosforylowanej LAT jest białkiem skupiającym wiele kinaz tyrozynowych, substratów kinaz i wiele białek adaptorowych, w tym Gads/SLP-76, PLCγ2, PI3-K, Grb2, SLAP-130, SKAP-HOM i Cbl [8, 10, 60-61]. W limfocytach T LAT jest niezbędnym łącznikiem pomiędzy receptorami TCR a szlakami kalcynerynowo-czynnik transkrypcyjny NF-AT oraz Ras-kinaza MAP-czynnik transkrypcyjny AP-1. W limfocytach z obniżoną zawartością LAT nie zachodzi aktywacja wymienionych czynników transkrypcyjnych i w konsekwencji nie dochodzi do prawidłowej aktywacji limfocytów [62-64]. W komórkach NK brak LAT powoduje obniżenie ich naturalnej i zależnej od przeciwciał cytotoxyczności [65-66]. W limfocytach B odpowiednikiem LAT jest białko BLNK, który tworzy kompleks z izoformą SLP-76 o m. cz. 65 kDa. Kompleks BLNK/SLP-76 jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju i funkcji limfocytów B [67-68]. W płytkach krwi LAT ulega fosforylacji po połączeniu się kolagenu z kompleksem GPVI/FcγR, czynnika vWf z kompleksem GPIb-V-IX i przeciwciał z receptorem FcγRIIA. W formie ufosforylowanej LAT łączy

się z kinazami Syk i Lyn, PLC γ 2 i podjednostką 85 kinazy PI3-K. Płytki krwi z obniżoną zawartością LAT wykazują znaczne obniżenie fosforylacji PLC γ 2, co powoduje spadek aktywacji tych komórek, m.in. obniżoną aktywację receptora fibrynogenu, glikoproteiny $\alpha_{IIb}\beta_3$, i obniżoną ekspresję P-selektyny – wskaźnika aktywacji płytek [69]. LAT bierze udział w aktywacji kinazy PI3-K, która dostarcza drugorzędowych przekaźników informacji, w tym 3,4,5- trisfosfodyloinozytolu (PIP $_3$), który również uczestniczy w przyłączeniu do błony plazmatycznej białek zawierających domeny PH, w tym kinaz z rodziny Tec oraz PLC γ . Obniżenie zawartości LAT powoduje w limfocytach T brak fosforylacji SLP-76, podczas gdy w płytkach krwi jest ona tylko nieznacznie obniżona. W dodatku, myszy z zahamowaną syntezą LAT w płytkach krwi nie wykazują zaburzeń hemostazy, podczas gdy brak LAT powoduje upośledzenie rozwoju i funkcji limfocytów T [16]. Wydaje się, że brak LAT w płytkach krwi jest kompensowany innymi mechanizmami przekazywania sygnału. Mechanizmy te umożliwiają prawidłowe rozplaszczanie się płytek stymulowanych kolagenem na powierzchniach pokrytych unieruchomionym fibrynogenu oraz prawidłową agregację płytek pod wpływem aktywatorów kompleksu GPVI/Fc γ R, takich jak konwulsyna i kolagen, który w wysokich stężeniach wywołuje agregację płytek niezależną od ADP i TxA2. Płytki krwi z zahamowaną syntezą LAT nie wytwarzają TxA2 i uwalniają znacznie mniej ADP, co jest przyczyną ich obniżonej agregacji pod wpływem kolagenu w niskich stężeniach [70]. LAT bierze również udział w niezależnej od integriny $\alpha_{IIb}\beta_3$ fibrynogenu, ADP i TxA2 agregacji płytek pod wpływem peptydu RFYVVMWK o sekwencji C-końca trombospondyny, która odgrywa ważną funkcję w powstawaniu nieodwracalnych agregatów płytek krwi [71]. Białko LAT w odróżnieniu od białka SLP-76, kinaz rodziny *src*, kinazy Fak i Btk nie ulega fosforylacji po związaniu się fibrynogenu z integriną $\alpha_{IIb}\beta_3$ i aktywacji PLC γ 2 zależnej od tej integriny podczas rozplaszczania się płytek na włóknach fibrynogenu [19, 72]. Na uwagę zasługuje fakt, że LAT jest lepszym markerem rozwijających się megakariocytów w porównaniu z czynnikiem vWF, białkami CD31 i CD61. Badania immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko LAT pozwalają na wykrycie nieprawidłowo rozwijających się megakariocytów w ostrych białaczkach megakariocytycznych, przewlekłych chorobach mieloproliferacyjnych i anomaliach rozwoju rdzenia kręgowego [73]. Najnowsze badania wykazały, że czynnik wirulentny pałeczki *Yersinia pseudotuberculosis* przenika do limfocytów T, łączy się z LAT i SLP-76 powodując hamowanie aktywacji limfocytów T. Jest to pierwszy opisany przypadek obniżania odpowiedzi immunologicznej spowodowany oddziaływaniem patogenu z białkami adaptorowymi [74].

BIAŁKO PAG

Białko PAG jest zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego. N-koniec PAG składa się z 16 reszt aminokwasowych i zlokalizowany jest po zewnętrznej stronie błony komórkowej, a C-koniec składa się z 397 reszt aminokwasowych i zorientowany jest do cytoplazmy. Odcinek cytoplazmatyczny PAG zawiera 10 reszt tyrozyny, z których 9 znajduje się w sekwencjach wiążących domeny SH2 innych białek, oraz dwa segmenty bogate w reszty proliny, które

mogą łączyć się z domenami SH3. Białko PAG występuje w różnych typach komórek i podobnie do LAT zlokalizowane jest w mikrodomenach GEM błony plazmatycznej [8, 75-76]. PAG ulega konstytutywnej fosforylacji, a także wiąże się z kinazą Csk, która katalizuje reakcję fosforylacji reszty tyrozyny 516 kinaz *src* zlokalizowaną w C-końcu tych białek. Fosforylacja tej reszty powoduje zahamowanie aktywności kinaz *src*. W rezultacie aktywacji limfocytów T kinaza Csk odłącza się od kinazy *src*, tyrozyna 516 ulega defosforylacji, centrum katalityczne kinazy zostaje odblokowane i kinaza *src* ulega aktywacji. Funkcja PAG w płytkach krwi jest bardzo mało poznana. Wiadomo, że ulega ono fosforylacji po stymulacji płytek kolagenem i trombina, ale nie wiadomo czy łączy się z kinazami *src* [8].

W niniejszym artykule nie opisano budowy i mechanizmu działania integralnych białek błony pełniących funkcję białek adaptorowych, tj. Fc γ R i Fc γ RIIA, opisanych we wcześniejszym artykule opublikowanym w Postęпах Biochemii [1]. Na uwagę zasługuje fakt, że Fc γ R w odróżnieniu od konstytutywnie połączonych z domenami GEM białek LAT i PAG, ulega przejściowemu połączeniu się z tymi domenami dopiero po aktywacji kolagenem kompleksu GPVI/Fc γ R. Przemieszczenie się tego kompleksu na teren GEM jest bardzo szybkie i trwa kilka sekund, co zapewnia natychmiastową aktywację płytek w miejscu uszkodzonego naczynia krwionośnego. Przekazywanie sygnału z udziałem białek i lipidów domen GEM limfocytów T jest dużo wolniejsze i może trwać godziny [77].

PODSUMOWANIE

Aktywatory płytek krwi, takie jak trombina, kolagen lub ADP, łączą się ze swoimi receptorami na powierzchni tych komórek, powodując przekazywanie informacji do wnętrza komórki. Umożliwia to aktywację kinaz tyrozynowych, białek G, fosfataz, które z kolei są niezbędne do zmiany kształtu płytek krwi, ich adhezji i agregacji, a w końcowym efekcie do zatamowania krwawienia w miejscu przerwania ciągłości naczynia krwionośnego. W przekazywaniu informacji do wnętrza płytki krwi biorą również udział białka adaptorowe, które są odpowiedzialne za tworzenie szkieletu wielokładnikowych centrów przekazywania sygnału, w skład których wchodzi m.in. kinazy tyrozynowe. Dzięki temu białka adaptorowe umożliwiają oddziaływania pomiędzy kinazami i ich substratami oraz ich szybko i następującą w odpowiedniej kolejności aktywację. Występowanie wielu białek adaptorowych opisano początkowo w limfocytach, gdzie ich funkcja jest dobrze poznana. Wiele z tych białek występuje też w płytkach krwi, ale ich funkcja jest znacznie mniej poznana w porównaniu z limfocytami. Wynika to m.in. z faktu, że zainteresowanie białkami adaptorowymi w płytkach krwi rozpoczęło się zaledwie kilka lat temu oraz z trudności stosowania technik genetycznych w przypadku płytek krwi, które są pozbawione jądra. Zastosowanie w badaniach megakariocytów, jądrzastych prekursorów płytek krwi oraz megakariocytycznych linii komórkowych powinno znacznie przyspieszyć postęp wiedzy o białkach adaptorowych w płytkach krwi.

PIŚMIENICTWO

1. Kralisz U (2003) Glikoproteina VI- receptor kolagenu aktywujący płytki krwi. *Postępy Biochem* 49: 26-38
2. Sadowski I, Stone JC, Pawson T (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami virus P130 gag-fps. *Mol Cell Biol* 6: 4396-4408
3. Kavanaugh WM, Williams LT (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266: 1862-1865
4. Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF (1995) PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* 270: 27407-27410
5. Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, Baltimore D (1992) Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and Gap-rho. *Science* 257: 803-806
6. Ladbury JE, Arold S (2000) Searching for specificity in SH domains. *Chem Biol* 7: R3-8
7. Mayer BJ, Gupta R (1998) Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol* 228: 1-22
8. Leo A, Schraven B (2000) Networks in signal transduction: the role of adaptor proteins in platelet activation. *Platelets* 11: 429-445
9. Zhong XP, Maltzman JS, Hainey EA, Koretzky G A (2003) Transcriptional regulation of Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa: dissection of key promoter elements. *J Immunol* 15: 6621-6629
10. Jackman JK, Motto DG, Sun Q, Tanemoto M, Turck CW, Peltz GA, Koretzky GA, Findell PR (1995) Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* 270: 7029-703
11. Robinson A, Gibbins J, Rodriguez-Linares B, Finan PM, Wilson L, Kellie S, Findell P, Watson SP (1996) Characterization of Grb2-binding proteins in human platelets activated by Fc gamma RIIIA cross-linking. *Blood* 88: 522-530
12. Clements JL, Yang B, Ross-Barta SE, Eliason SL, Hrstka RF, Williamson RA, Koretzky GA (1998) Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281: 416-419
13. Wardenburg JB, Fu C, Jackman JK, Flotow H, Wilkinson SE, Williams DH, Johnson R, Kong G, Chan AC, Findell P (1996) Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* 271: 19641-19644
14. Clements JL, Lee JR, Gross B, Yang B, Olson JD, Sandra A, Watson SP, Lentz SR, Koretzky GA (1999) Fatal hemorrhage and platelet dysfunction in SLP-76 deficient mice. *J Clin Invest* 103: 19-25
15. Gross BS, Melford SK, Watson SP (1999) Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, Lat, and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen glycoprotein VI in human platelets. *Eur J Biochem* 263: 612-623
16. Zang W, Somers CL, Burshtyn DN, Stebbins CC, DeJarnette JB, Tribble RP (1999) Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* 10: 323-332
17. Gross BS, Lee JR, Clements JL, Turner M, Tybulewicz VL, Findell PR (1999) Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. *J Biol Chem* 274: 5963-5971
18. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP (1995) Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378: 298-302
19. Judd BA, Myung PS, Obergfell A, Myers EE, Cheng AM, Watson SP, Pear WS, Allman DE, Shattil SJ, Koretzky GA (2002) Differential requirement for LAT and SLP-76 in GPVI versus T cell receptor signaling. *J Exp Med* 195: 705-717
20. Falet H, Barkalow KL, Pivniouk I, Barnes MJ, Geha RS, Hartwig JH (2000) Roles of SLP-76, phosphoinositide 3-kinase, and gelsolin in the platelet shape changes induced by the collagen receptor GPVI/FcRγ-chain complex. *Blood* 96: 3786-3792
21. Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J (2000) Fyn-binding protein(Fyb)/SLP-76 associated protein (SLAP), Ena-vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149: 181-194
22. Nichols KE, Haines K, Newbrough S, Myers E, Jumaa H, Shedlock DJ, Shen H, Koretzky GA (2004) Macrophage activation and Fcγma receptor-mediated signaling do not require expression of the SLP-76 and SLP-65 adaptors. *J Leukoc Biol* 75: 541-552
23. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70: 431-442
24. Downward J (1994) The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett* 338: 113-117
25. Xu XX, Tang B, Lambeth JD (1998) Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene* 12: 1561-1569
26. Saci A, Liu WQ, Vidal M, Garbay C, Rendu F, Bachelot-Loza C (2002) Differential effect of the inhibition of Grb2-SH3 interactions in platelet activation induced by thrombin and by Fc receptor engagement. *Biochem J* 363: 717-725
27. Auger JM, Best D, Snell DC, Wilde JJ, Watson SP (2003) c-Cbl negatively regulates platelet activation by glycoprotein VI. *J Thromb Haemost* 11: 2419-2426
28. He J, Xu XX, Hall RA (2003) Cell cycle-dependent phosphorylation of Disabled-2 by cdc2. *Oncogene* 29: 4524-4530
29. Huang CL, Cheng JC, Liao CH, Ster A, Hsieh JT, Wang CH, Hsu HL, Tseng CP (2004) Disabled-2 is a negative regulator of integrin alpha IIb beta3-mediated fibrinogen adhesion and cell signaling. *J Biol Chem* 279: 42279-42289
30. Ohmori T, Yatomi Y, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y (2000) Involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in platelet activation: tyrosine phosphorylation mostly dependent on alpha IIb beta3 integrin and protein kinase C, translocation to the cytoskeleton and association with Shc through Grb2. *Biochem J* 347: 561-569
31. Tulasne D, Bori T, Watson SP (2002) Regulation of RAS in human platelets. Evidence that activation of RAS is not sufficient to lead to ERK1-2 phosphorylation. *Eur J Biochem* 269: 1511-1517
32. Asazuma N, Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Handa M, Fujimura Y (1997) Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. *Blood* 90: 4789-4799
33. Asada H, Ishii N, Sasaki Y, Endo K, Kasai H, Tanaka N (1999) Grf40, a novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J Exp Med* 189: 1383-1390
34. Guyot B, Mouchiroud G (2002) Characterization of the promoter controlling *Mona/Gads* expression in the megakaryocytic lineage. *Gene* 296: 151-159
35. Guyot B, Arnaud S, Pothirath P, Bourette RP, Grasset MF, Rigal D, Mouchiroud G (2002) Genomic organization and restricted expression of the human *Mona/Gads* gene suggests regulation by two specific promoters. *Gene* 290: 173-179
36. Guyot B, Arnaud S, Pothirath P, Rigal D, Mouchiroud G (2002) Upstream open reading frames regulate translation of *Mona/Gads* adapter mRNA in the megakaryocytic lineage. *Platelets* 8: 459-464
37. Cowan KJ, Law DA, Philips DR (2000) Identification of shc as the primary protein binding to the tyrosine-phosphorylated beta 3 subunit of alpha IIb beta 3 during outside-in integrin platelet signaling. *J Biol Chem* 275: 36423-36429
38. Higashi T, Yoshioka A, Shirakawa R, Tabuchi A, Kita T, Horiuchi H (2004) Direct demonstration of involvement of the adaptor prote-

- in ShcA in the regulation of Ca²⁺-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 700-704
39. Oda A, Miyakawa Y, Druker BJ, Ishida A, Ozaki K, Ohashi H (1996) Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin. *Blood* 88: 4304-4313
 40. Oda A, Wada I, Miura K, Okawa K, Kadoya T, Kato T, Nishihara H, Maeda M, Tanaka S, Nagashima K, Nishitani C, Matsuno K, Ishino M, Machesky LM, Fujita H, Randazzo P (2003) CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions. *J Biol Chem* 278: 6456-6460
 41. Oda A, Ochs HD, Lasky LA, Spencer S, Ozaki K, Fujihara M, Handa M, Ikebuchi K, Ikeda H (2001) CrkL is an adapter for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood* 97: 2633-2639
 42. Best D, Pasquet S, Littlewood TJ, Brunskill SJ, Pallister CJ, Watson SP (2001) Platelet activation via the collagen receptor GPVI is not altered in platelets from chronic myeloid leukaemia patients despite the presence of the constitutively phosphorylated adapter protein CrkL. *Br J Haematol* 112: 609-615
 43. Hoffman LM, Nix DA, Benson B, Boot-Hanford R, Gustafsson E, Jamora C, Menzies AS, Goh KL, Jensen CC, Gertler FB, Fuchs E, Fessler R, Beckerle MC (2002) Targeted disruption of the murine zyxin gene. *Mol Cell Biol* 23: 70-79
 44. Ohmori T, Yatomi Y, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y (1995) Involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in platelet activation: tyrosine phosphorylation mostly dependent on alphaIIb beta3 integrin and protein kinase C, translocation to the cytoskeleton and association with Shc through Grb2. *Thromb Res* 93: 291-298
 45. Ohmori T, Yatomi Y, Inoue K, Ozaki Y (2000) Tyrosine dephosphorylation, but not phosphorylation, of p130Cas is dependent on integrin alpha IIb beta 3-mediated aggregation in platelets: implication of p130Cas involvement in pathways unrelated to cytoskeletal reorganization. *Biochemistry* 39: 5797-5807
 46. Grasso A, Roda G, Hoque-Angeletti RA, Moore B W, Perez VJ (1977) Preparation and properties of the brain specific protein 14-3-2. *Brain Res* 124: 497-507
 47. Calvarley DC, Kavanagh TJ, Roth GJ (1998) Human signaling protein 14-3-3zeta interacts with platelet glycoprotein Ib subunits Ibalpha and Ibbeta. *Blood* 91: 1295-1303
 48. Berndt MC, Shen Y, Doppeide SM, Gardiner EE (2001) The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 86: 178-188
 49. Marshall SJ, Asazuma N, Best D, Wonerow P, Salmon G, Andrews RK, Watson SP (2002) Glycoprotein IIb-IIIa-dependent aggregation by glycoprotein Ibalpha is reinforced by a Src family kinase inhibitor (PP1)-sensitive signaling pathway. *Biochem J* 361: 297-305
 50. Mangin P, David T, Lavaud V, Cranmer SL, Pikovski I, Jackson SP, Berndt MC, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F (2004) Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood* 104: 420-427
 51. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, Ozaki Y (2001) Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood* 97: 3836-3845
 52. Gibbins JM (2004) Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 117: 3415-3425
 53. Han DC, Rodriguez LG, Guan JL (2001) Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3zeta. *Oncogene* 20: 346-357
 54. Zhang W, Sloan -Lancaster J, Kitchen J, Triple RP, Samelson L (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92: 83-92
 55. Facchetti F, Chan JK, Zhang W, Tironi A, Chilosi M, Parolini S, Natarangelo LD, Samelson LE (1999) Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 154: 1037-1046
 56. Xavier R, Seed B (1999) Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* 11: 265-269
 57. Zhang W, Triple RP, Samelson LE (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9: 239-246
 58. Wonerow P, Watson SP (2001) The transmembrane adapter LAT plays a central role in immune receptor signalling. *Oncogene* 44: 6273-6283
 59. Zhu M, Shen S, Liu Y, Granillo O, Zhang W (2005) Cutting edge: localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol* 174: 31-35
 60. Watson SP, 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) The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemostas* 86: 276-288
 61. Asazuma N, Wilde JI, Berlanga O, Leduc M, Leo A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Bon C, Liu SK, McGlade J, Schraven B, Watson SP (2000) Interaction of linker for activation of T cells with multiple adapter proteins in platelets activated by the glycoprotein VI-selective ligand, convulxin. *J Biol Chem* 275: 33427-33434
 62. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchin J, Triple RP, Samelson LE (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92: 83-92
 63. Liu SK, Fang N, Koretzky GA, McGlade CJ (1999) The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* 9: 67-75
 64. Finco TS, Kadlec T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A (1998) LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9: 617-626
 65. Jevremovic D, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Irvin BJ, Zhang W (1999) Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 161: 2453-2456
 66. Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers C, Love PE, Rivera J, Samelson LE (2000) LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 12: 525-535
 67. Wong J, Ishiai M, Kurosaki T, Chan AC (2000) Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins. *J Biol Chem* 275: 33116-33122
 68. Yablonski D, Weiss A (2001) Mechanisms of signaling by the hematopoietic-specific adaptor proteins, SLP-76 and LAT and their B cell counterpart, BLNK/SLP-65. *Adv Immunol* 79: 93-128
 69. Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP (1999) LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase Cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol* 19: 8326-8334
 70. Cho MJ, Pestina TI, Steward SA, Jackson CW, Kent Gartner T (2002) The roles of LAT in platelet signaling induced by collagen, TxA2, or ADP. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 916-921
 71. Trumel C, Plantavid M, Levy -Toledano S, Ragab A, Caen JP, Aguado E, Malissen B, Payrastre B (2003) Platelet aggregation induced by the C-terminal peptide of thrombospondin-1 requires the docking protein LAT but is largely independent of alphaIIb/beta3. *J Thromb Haemost* 2: 320-329
 72. Wonerow P, Pearce AC, Vaux DJ, Watson SP (2003) A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIb beta3-mediated platelet spreading. *J Biol Chem* 278: 37520-37529
 73. Ungari M, Pellegrini W, Borlenghi E, Marocolo D, Ubiali A, Aggazzi D, Pich A, Franco V, Facchetti F (2002) LAT (linker for activation of T cells): a useful marker for megakaryocyte evaluation on bone marrow biopsies. *Pathologica* 94: 325-330

74. Gerke C, Falkow S, Chien YH (2005) The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. *J Exp Med* 201: 361-367
75. Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, Tarkhovskiy A, Okada M (2000) Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 404: 999-1003
76. Brdicka T, Pavlistova D, Leo A, Bruyns E, Korinek V, Angelisova P, Sherer J, Shevchenko A, Hilgert L, Cerny J, Drbal K, Kuramitsu Y, Kornacker B, Horejsi V, Shraven B (2000) Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 191: 1591-1604
77. Locke D, Chen H, Liu Y, Changdong L, Kahn ML (2002) Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* 277: 1881-1889

Adaptor proteins of blood platelets

Urszula Kralisz✉

Department of Molecular and Medical Biophysics, Institute of Physiology and Biochemistry, Medical University in Łódź, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Łódź, Poland

✉e-mail:ulakr@yahoo.com

Key words: blood platelets, adaptor proteins, signal transduction

ABSTRACT

Adaptor proteins play a pivotal role in the regulation of signal transduction events elicited after the engagement of cell surface receptors. Platelets exhibit a number of integral membrane receptors capable of initiating a cellular response. These include collagen receptors, von Willebrand factor receptors, the fibrinogen receptor, and a number of G-protein coupled receptors, such as those for thrombin and ADP. The primary function of platelet receptors is the translation of externally applied signals into appropriate responses leading to platelet activation being a prerequisite for normal hemostasis. Multitude of signalling pathways described in platelets is based on the interaction of compounds of many different categories, such as transmembrane receptors, protein kinases, protein phosphatases, G-proteins, transmembrane and cytosolic adaptor proteins, phosphoinositides, cyclic AMP or GMP. Adaptor proteins lack intrinsic effector function, but contain distinct molecular domains, which mediate protein-protein and protein-lipid interactions. These molecules thus serve as a scaffolding, around which effectors and their substrates are assembled into three-dimensional signaling complexes. Adaptor proteins integrate receptor-mediated signals at intracellular levels and couple signaling receptors to cytosolic signaling pathways. While the function of adaptor proteins is well established in immune cells, the knowledge about their role in platelet activation is still at the onset. Over the last decade numerous adaptor proteins have been identified in platelets and shown to be involved in accurate assembly of intracellular signaling complexes. Collagen-induced platelet intracellular signaling through GPVI resembles the functional response of B- and T-cell antigen receptors and is the best described in the literature. This review focuses on the structure and functional role of the most extensively studied adaptor proteins during platelet activation induced by physiological agonists.

Cystatyny, tyropiny i inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych

Katarzyna Gawlik[✉]

Wojciech Poręba

Jan Gutowicz

Zakład Fizykochemii Drobnoustrojów, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

[✉] Zakład Fizykochemii Drobnoustrojów, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław; e-mail: katgaw@microb.uni.wroc.pl, tel. (71) 375 62 79

Artykuł otrzymano 25 listopada 2004 r.
Artykuł zaakceptowano 20 stycznia 2005 r.

Słowa kluczowe: proteazy cysteinowe CA1, rodzina papainy, inhibitory, cystatyny, tyropiny, propeptyd

Wykaz skrótów: BCPI – inhibitor proteaz cysteinowych motyla jedwabnika *Bombyx mori* (ang. *Bombyx cysteine proteinase inhibitor*); CEW – cystatyna białka jaja kurzego (ang. *chicken egg white cystatin*); CTLA – antygen cytotoksycznych limfocytów T (ang. *cytotoxic T-lymphocyte antigen*); ECI – inhibitor proteaz cysteinowych łososia (ang. *chum salmon egg cysteine proteinase inhibitor*); MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*); PMC – multicystatyna ziemniaka (ang. *potato multicystatin*); P1, P1' – reszty aminokwasowe substratu połączone wiązaniem peptydowym hydrolizowanym przez proteazę; S1', S2', S1, S2, S3 – proteazowe miejsca wiążące substrat według nomenklatury Schechtera i Bergera

STRESZCZENIE

Białkowe inhibitory enzymów proteolitycznych odgrywają ważną rolę w regulacji aktywności endogennych proteaz i w mechanizmach obronnych organizmu przed patogenami, przeciwdziałając szkodliwej aktywności egzogennych proteaz. Znaczny wzrost zainteresowania w ostatnich latach białkowymi inhibitorami proteaz cysteinowych jest spowodowany, z jednej strony, stale poszerzającą się wiedzą dotyczącą udziału ich docelowych enzymów w procesach patologicznych, leżących u podstaw wielu chorób człowieka, z drugiej strony, perspektywą wykorzystania wiedzy na temat mechanizmów ich działania w leczeniu tych schorzeń. Artykuł jest przeglądem najważniejszych wiadomości na temat trzech rodzin inhibitorów proteaz cysteinowych: cystatyn, tyropin i inhibitorów homologicznych do propeptydów proteaz cysteinowych. Szczególna uwaga jest poświęcona strukturalnym podstawom mechanizmów interakcji tych inhibitorów z ich docelowymi enzymami. Praca przedstawia ogólną charakterystykę tych rodzin zgodnie z klasyfikacją inhibitorów proteaz przeprowadzoną przez bazę danych MEROPS, wskazując na nowe niedawno odkryte inhibitory.

WPROWADZENIE

Enzymy proteolityczne (proteazy, peptydazy) tworzą dużą grupę białek, kodowaną przez około 2% wszystkich znanych genów, bez których organizmy żywe nie byłyby w stanie funkcjonować [1]. Chociaż są tak niezastąpione, to właśnie z powodu istotnej funkcji jaką pełnią (zewnątrz- i wewnątrzkomórkowa degradacja białek) stanowią potencjalne niebezpieczeństwo dla swojego środowiska i dlatego powinny znajdować się pod ścisłą kontrolą. Endogenne inhibitory proteaz są ważnym narzędziem wykorzystywanym przez organizmy żywe do regulacji aktywności proteolitycznej ich docelowych enzymów. Naturalnie występujące inhibitory proteaz są w głównej mierze inhibitorami białkowymi. Tylko niektóre mikroorganizmy produkują niebiałkowe inhibitory osłabiające aktywność proteolityczną peptydaz gospodarza [2]. Siłą napędową badań zajmujących się inhibitorami proteaz jest możliwość wykorzystania uzyskanej wiedzy na ich temat w medycynie i biotechnologii [3]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej trzech strukturalnie odrębnych grup inhibitorów proteaz cysteinowych: cystatyn, tyropin i inhibitorów homologicznych do propeptydów proteaz cysteinowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na budowę i mechanizm ich działania. Zgodnie z klasyfikacją bazy danych MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), inhibitory te stanowią oddzielne rodziny oznaczone kolejno jako I25, I31 i I29 (Tabela 1). Cystatyny (I25) są najliczniejszą i najlepiej scharakteryzowaną rodziną inhibitorów regulujących aktywność katepsyn cysteinowych człowieka, ważnych z medycznego punktu widzenia. Zdolność hamowania aktywności katepsyn cysteinowych mają również tyropiny (I31) i inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych (I29), które są obecnie intensywnie badane. Warto zwrócić uwagę, że białka wymienionych rodzin nie są jedynymi znanymi inhibitorami proteaz cysteinowych. W ciągu ostatnich kilku lat opisano nowe inhibitory tej klasy enzymów proteolitycznych, które nie wykazywały znaczącego podobieństwa sekwencji aminokwasowej do białek wcześniej opisanych rodzin inhibitorów. Przykładem takich inhibitorów są klitocypina (I48) izolowana z owocnika jadalnego grzyba *Clitocybe nebularis* [4, 5] i chagasyina (I42) izolowana z *Trypanosoma cruzi* [6, 7]. Ponadto okazało się, że niektóre białka należące do rodzin inhibitorów proteaz serynowych (I4, I3A, I12) mogą hamować aktywność proteaz cysteinowych. Najczęściej podawanymi przykładami takich inhibitorów są: antygen raka płaskonabłonkowego SCCA1 (I4) [8] i jego homolog SQN-5 występujący u myszy [9], roślinne inhibitory typu Kunitza (I3A) izolowane z *Prosopis juliflora* [10] i *Bauhinia bauhinioides* [11], oraz inhibitor VI bromelainy z ananasa (I12) [12]. Wszystkie wspomniane powyżej inhibitory łączy jedna wspólna cecha, są to inhibitory proteaz cysteinowych rodziny C1 (rodziny papainy) (Tabela 1). Badania inhibitorów hamujących aktywność proteaz cysteinowych nie należących do rodziny papainy również są intensywnie prowadzone [3, 13], czego dowodem

Tabela 1. Rodziny inhibitorów proteaz cysteinowych CA1 według bazy danych MEROPS.

Rodzina inhibitorów	Rodzina lub podrodzina	Typowy przykład jednostki inhibitorowej	Rodziny hamowanych proteaz *
cystatyny (ang. <i>cystatins</i>)	I25A	cystatyna A (ang. <i>cystatin A</i> ; <i>Homo sapiens</i>)	C1
	I25B	owocystatyna (ang. <i>ovocystatin</i> ; <i>Gallus gallus</i>)	C1, C13
tyropiny (ang. <i>thyropins</i>)	I31	ekwistatyna (ang. <i>equistatin</i> ; <i>Actinia equina</i>)	C1, A1
inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych	I29	CTLA (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>), antygen cytotoksycznych limfocytów T	C1
inhibitory roślinne typu Kunitza	I3A	inhibitor trypsyny z nasion soi typu Kunitza (ang. <i>soybean Kunitz trypsin inhibitor</i> ; <i>Glycine max</i>)	S1, C1, A1
inhibitory typu Bowmana-Birka	I12	inhibitor typu Bowmana-Birka (ang. <i>Bowman-Birk inhibitor</i> ; <i>Glycine max</i>)	S1, C1
serpiny (ang. <i>serpins</i>)	I4	α_1 -inhibitor proteaz (ang. <i>α_1-proteinase inhibitor</i> ; <i>Homo sapiens</i>)	S1, S8, C1, C14
	I42	chagasyna (ang. <i>chagasin</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>)	C1
	I48	klitocypina (ang. <i>clitocypin</i> , <i>Lepista nebularis</i>)	C1
makroglobuliny (α_2 M)	I39	α_2 - makroglobulina (ang. <i>α_2 - macroglobulin</i> ; <i>Homo sapiens</i>)	proteazy aspartylowe, cysteinowe, serynowe i metaloproteazy

*Rodziny proteaz cysteinowych (C1 – papainy, C13 – legumainy, C14 – kaspazy), serynowych (S1 – chymotrypsyny, S8 – subtylizyny), aspartylowych (A1 – katepsyny D), dla których opisany został przykład hamowania aktywności peptydazowej przez jedno lub więcej białek należących do określonej rodziny / podrodziny inhibitorowej. Rodziny te odnoszą się do rodzin inhibitorów (kolumna 1 i 2), a nie do typowych przykładów jednostek inhibitorowych (kolumna 3).

może być pojawienie się nowych rodzin stafostatyn (ang. *staphostatins*) izolowanych z *Staphylococcus sp.* w bazie MEROPS: I57 i I58 [3, 14, 15]. Omówienie wszystkich inhibitorów proteaz cysteinowych znacznie wykracza jednak poza planowany zakres niniejszej pracy.

PROTEAZY CYSTEINOWE CA1

Proteazy cysteinowe, nazywane również proteazami tiolowymi lub sulfhydrylowymi, stanowią klasę enzymów proteolitycznych katalizujących reakcję hydrolizy wiązania peptydowego, w której bierze udział reszta cysteiny centrum aktywnego białka. Proteazy tiolowe traktowane były często jako grupa białek spokrewnionych ze sobą, niekiedy nawet określanych terminem „rodzina proteaz cysteinowych”, chociaż prawdą jest, że wywodzą się one z kilku odrębnych linii ewolucyjnych [16]. W bazie danych MEROPS proteazy cysteinowe zostały umieszczone w ośmiu klanach: CA, CD, CE, CF, CH, PA, PB i PC, tworząc ponad czterdzieści rodzin. Najlepiej poznaną rodziną proteaz cysteinowych jest rodzina papainy, czyli rodzina C1 klanu CA (proteazy cysteinowe CA1). Obok papainy traktowanej jako archetyp opisywanej grupy białek, do rodziny C1 należą proteazy roślinne, takie jak: chymopapaina, karikaina, bromelaina, aktinidyna, ficyna, aleuraina, oryzaina, a także kruzypaina (*Trypanosoma cruzi*) i proteazy innych pasożytów, hydrolaza bleomycyny i grupa lizosomalnych proteaz cysteinowych ssaków (katepsyn cysteinowych: B, H, L, S, C, K, O, F, V, X, W). Nieprawidłowa, destrukcyjna aktywność lizosomalnych proteaz cysteinowych została zaobserwowana w patomechanizmie wielu chorób człowieka, takich jak: nowotwory złośliwe (proces inwazji i przerzutowania nowotworów), reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie kości i stawów,

osteoporoza, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, dystrofia mięśni, zapalenie przyzębia [17-22].

KLASYFIKACJA I MECHANIZM DZIAŁANIA INHIBITORÓW PROTEAZ CYSTEINOWYCH CA1

System klasyfikacji inhibitorów peptydaz utworzony na podstawie podobieństwa ocenianego na poziomie sekwencji aminokwasowej został zaproponowany przez twórców bazy danych MEROPS [23]. Spośród ponad czterdziestu rodzin inhibitorów peptydaz, czternaście rodzin zawiera inhibitory proteaz cysteinowych (I3, I4, I12, I25, I27, I29, I31, I32, I39, I42, I48, I57, I58, I50). Wśród pięciu rodzin (I25, I27, I29, I31 i I12) znajdują się złożone inhibitory homotypowe (zbudowane z jednostek inhibitorowych tej samej rodziny). Osem rodzin (I3, I4, I12, I25, I39, I50, I32, I31) tworzy osiem oddzielnych klanów, co świadczy o przynajmniej ośmiu liniach ewolucyjnych tej grupy białek. Aktywność proteaz cysteinowych CA1 mogą regulować białka dziewięciu różnych rodzin inhibitorowych (Tabela 1). Nowe podejście do klasyfikacji inhibitorów peptydaz zastosowane w bazie danych MEROPS nie pokrywa się z wcześniej używaną i zalecaną klasyfikacją opartą na typie katalitycznym hamowanej peptydazy [23]. Wśród kilku rodzin znane są inhibitory, które hamują peptydazy różnych typów katalitycznych. Można to wytłumaczyć w dwojaki sposób: albo aktywność strukturalnie różnych peptydaz jest regulowana poprzez ten sam mechanizm, albo strukturalnie podobne inhibitory hamują aktywność proteaz wykorzystując różne mechanizmy. Przedstawiona klasyfikacja inhibitorów proteaz cysteinowych CA1 dowodzi istnienia wielu różnych mechanizmów interakcji tych inhibitorów z enzymami. Z tej różnorodności obecnie znanych sposobów, które pozwalają inhibitorom hamować aktywność docelowych peptydaz,

wylaniają się dwa ogólne typy inhibicji: 1) odwracalne wiązanie inhibitorów o wysokim powinowactwie do enzymu (ang. *tight-binding inhibitors*, I25, I31, I29, I3A, I12); 2) nieodwracalne wiązanie inhibitorów „pułapek” (ang. *'trapping' inhibitors*, I4, I39) [14, 23].

CYSTATYNY

Cystatyny są odwracalnymi, kompetycyjnymi, silnie wiążącymi się inhibitorami proteaz cysteinowych rodziny C1 [24-26]. Niektóre cystatyny mają również zdolność hamowania aktywności legumainy, proteazy cysteinowej rodziny C13 klanu CD, wykorzystując drugie niezależne miejsce reaktywne [3, 27]. Nazwa „cystatyna” (CEW, ang. *chicken egg white cystatin*) została po raz pierwszy zastosowana przez Barretta w celu określenia inhibitora cysteinowych endopeptydaz, wyizolowanego i częściowo scharakteryzowanego z białka jaja kurzego [24]. Od tego czasu udało się zidentyfikować wiele inhibitorowych białek wykazujących znaczące podobieństwo sekwencji do sekwencji aminokwasowej cystatyny białka jaja kurzego, które obecnie tworzą jedną rodzinę I25 w bazie danych *MEROPS*. Do końca lat osiemdziesiątych cystatyny stanowiły superrodzinę złożoną z trzech rodzin (rodzina 1: stefiny, rodzina 2: cystatyny, rodzina 3: kininogeny). W kolejnych latach, znaczny wzrost liczby nowo identyfikowanych cystatyn, zarówno poprzez izolację białek inhibitorowych z różnych źródeł, jak również klonowanie genów zawierających sekwencje cystatynowe, przysporzył wiele problemów dotyczących klasyfikacji i nomenklatury tej grupy białek. Wśród nowych białek, które zostały włączone w skład superrodziny cystatyn, znajdowały się białka bez aktywności inhibitorowej (fetuiny, glikoproteiny bogate w histydyne i inne białka spokrewnione z cystatynami), które utraciły bądź nigdy nie nabyły tej aktywności, oraz inhibitorowe białka cystatynowe niższych organizmów, między innymi: cystatyna jadu żmii *Bitis arietans*, sarkocystatyny larwy muchy *Sarcophaga peregrina*, cystatyna muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [28]. Pomysł utworzenia nowej rodziny o nazwie „fitocystatyny”, która obejmowałaby wszystkie cystatyny pochodzenia roślinnego, nie doczekał się realizacji [29, 30]. Podział superrodziny cystatyn nie pokrywa się z podziałem rodziny I25 na podrodziny, czego główną przyczyną jest przyjęty w bazie *MEROPS* system klasyfikacji oparty na jednostkach inhibitorowych, a wśród cystatyn znajduje się wiele złożonych inhibitorów homotypowych. W podrodzynie I25A znalazły się białka należące wcześniej do stefin i fitocystatyn, podrodzina I25B objęła inhibitory rodziny 2, a także inhibitorową jednostkę 2 i 3 kininogenów. Białka podrodziny I25C nie są inhibitorami proteaz cysteinowych, większość nie wykazuje w ogóle aktywności inhibitorów peptydaz (alfa₂-HS-glikoproteina, glikoproteina bogata w histydyne, jednostka 1 kininogenów). Podrodzina ta obejmuje również inhibitor metaloproteaz rodziny M12 izolowany z jadu węża *Bothrops jararaca*. Do podrodziny I25D należą jedynie sarkocystatyny.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA CYSTATYN

Tradycyjny podział superrodziny cystatyn na stefiny, cystatyny i kininogeny [28], rodziny początkowo obejmujące białka różniące się mniej niż połową reszt aminokwasowych, stał się w rezultacie systemem opartym na dwóch

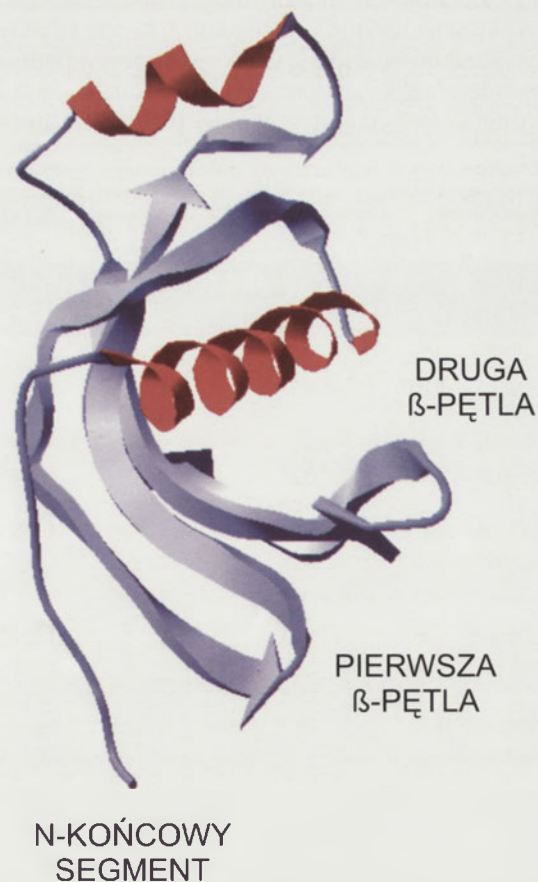
kryteriach: wielkości łańcucha polipeptydowego oraz obecności lub braku mostków disiarczkowych. Stefiny są białkami zbudowanymi z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o długości około 100 reszt aminokwasowych (~ 11 kDa), które nie posiadają części cukrowej ani mostków disiarczkowych [24]. Do tej grupy białek należą dwa typy cystatyn, stefina A i B, izolowane z tkanek różnych gatunków ssaków (znane są między innymi stefiny A i B człowieka, szczura, wołu, myszy), oraz stefina C wołu i stefina D świni [13, 25]. W pozycji 3 łańcucha polipeptydowego stefiny B znajduje się reszta cysteiny, która jest odpowiedzialna za tworzenie mostka disiarczkowego pomiędzy dwoma cząsteczkami. Utworzony w ten sposób dimer stefiny B jest nieaktywny [24]. Stefiny są głównie białkami cytosolowymi, chociaż w małych stężeniach mogą też występować w płynach zewnątrzkomórkowych [13, 25]. Stefina A człowieka została początkowo wykryta w komórkach nabłonkowych i leukocytach polimorfonuklearnych, sugerując jej funkcję obronną przeciwko proteazom cysteinowym produkowanym przez atakujące organizm patogeny. Białko to znaleziono również w wątrobie, śledzionie, łożysku, błonie śluzowej jamy ustnej i macicy, oraz w płynach ustrojowych. Stefina B człowieka jest bardziej rozpowszechniona wśród różnych komórek i tkanek, co wskazuje na jej ogólną rolę ochronną przeciwko niekontrolowanej proteolizie przeprowadzanej przez lizosomalne proteazy cysteinowe [3, 31]. Grupa roślinnych cystatyn (fitocystatyn) znajduje się w podrodzynie I25A według klasyfikacji przyjętej w bazie *MEROPS*. Fitocystatyny podobnie jak stefiny nie posiadają mostków disiarczkowych i reszt cysteinowych [29]. Cystatyny roślinne są dużo słabszymi inhibitorami proteaz papainowych niż cystatyny zwierzęce. Przykładowo wartość stałej inhibicji cystatyny PMC (ang. *potato multicystatin*), jednej z najsilniejszych fitocystatyn, wynosi 0,1 nM dla papainy [30]. Badania nad cystatynami roślinnymi prowadzone są głównie ze względu na zdolność tych inhibitorów do hamowania aktywności peptydazowej soków trawiennych niektórych szkodników roślin. Do chwili obecnej wyizolowano i scharakteryzowano między innymi cystatyny z nasion ryżu – oryzacystatyny, kukurydzy, nasion soi, nasion słonecznika, nasion fasoli, *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*, *Chelidonium majus*, multicystatynę PMC z bulw ziemniaka [29, 30]. Rodzina cystatyn obejmowała początkowo owocystatynę (CEW) oraz cystatyny człowieka: C, D, S, SN i SA, a także ich homologi znalezione wśród innych gatunków ssaków [13, 24, 25, 32]. W drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych do grupy tej dołączyły nowe cystatyny: cystatyna E/M [33, 34] i cystatyna F/leukocystatyna [35, 36], wykazujące odpowiednio 26 – 34% i 30 – 34% identyczność sekwencji aminokwasowej z pozostałymi białkami rodziny 2. Wymienione białka należące do rodziny cystatyn są jednołańcuchowymi polipeptydami zbudowanymi ze 120 – 126 reszt aminokwasów, których masa cząsteczkowa waha się w granicach 14 – 20 kDa. Charakteryzuje je obecność dwóch mostków disiarczkowych zlokalizowanych przy końcu C białka. Wyjątek stanowi cystatyna F mająca dodatkowo trzeci mostek disiarczkowy stabilizujący N-końcową część białka. Większość opisywanych cystatyn nie jest glikozylowana, ale reszty węglowodanowe zawierają: cystatyna E/M, F [33, 35] i cystatyna C szczura [13]. Białka rodziny cystatyn są syntetyzowane jako preproteiny z sygnałnym N-końcowym peptydem

(około 20 reszt), co sugeruje ich aktywność zewnątrzkomórkową. Największe stężenie cystatyny C człowieka zanotowano w płynie mózgowo-rdzeniowym i płynie nasiennym, w mniejszym stężeniu występuje ona również w osoczu, ślinie, łzach, płynie maziówkowym i płynie owodniowym [24, 32]. Z powodu tak szerokiej zewnątrzkomórkowej lokalizacji, zasugerowano, że cystatyna C pełni funkcję regulacyjną i obronną przeciwko endo- i egzogennym proteazom cysteinowym obecnym w płynach ustrojowych [31]. Badania cystatyny C wykazały, że ze względu na stałe stężenie w surowicy krwi niezależne od wieku, płci, wzrostu czy masy mięśniowej, jest ona doskonałym markerem służącym do oceny funkcji nerek. Kliniczne wykorzystanie cystatyny C w pomiarach wskaźnika filtracji kłębuszkowej GFR (ang. *glomerular filtration rate*) jest obecnie szeroko dyskutowane [37]. Cystatyny S, SA i SN, wykazujące 54% podobieństwo sekwencji z cystatyną C, wyizolowano ze śliny, ale występują one również we łzach, a cystatyny S i SA dodatkowo w płynie nasiennym. Cystatynę D wykryto głównie w tkankach ślinianki przyusznej i łzach [31]. Analiza dystrybucji przeprowadzona metodą Northern wykazała, że gen cystatyny E/M ulega najsilniejszej ekspresji w tkankach macicy i wątroby [33], a gen cystatyny F – w śledzionie i leukocytach krwi obwodowej [35]. Kininogeny są dużymi, wielofunkcyjnymi glikoproteinami, występującymi w surowicy krwi ssaków [13, 24, 25]. Przez długi czas znane były tylko jako białkowe prekursorzy wazoaktywnych kinin i jako białka biorące udział w kaskadzie krzepnięcia krwi. Istnieją trzy odmienne typy kininogenów: wysokocząsteczkowy (H-kininogen, ~ 120 kDa), niskocząsteczkowy (L-kininogen, ~ 68 kDa) i kininogen szczura (T-kininogen, ~ 68 kDa). Kininogeny mają osiem mostków disiarczkowych i trzy domeny (D1, D2, D3), wykazujące znaczące podobieństwo sekwencji do sekwencji cystatyn rodziny 2. Tylko domeny 2 i 3 kininogenów wykazują aktywność inhibitorową wobec cysteinowych proteaz papainowych, a domena 2 – również wobec kalpain. Zarówno L- jak i H-kininogen są w stanie wiązać dwie cząsteczki cysteinowych peptydaz jednocześnie [13]. Białka opisanych trzech rodzin cystatynowych zyskały ostatnio nową ogólną nazwę „klasyczne cystatyny”, aby podkreślić ich odmienność od stale poszerzającej się grupy białek posiadających wprawdzie sekwencje cystatynopodobne, ale nie wykazujących aktywności inhibitorowej wobec proteaz papainowych [38].

STRUKTURA PRZESTRZENNA I MECHANIZM HAMOWANIA AKTYWNOŚCI PROTEAZ CYSTEINOWYCH CA1 PRZEZ CYSTATYNY

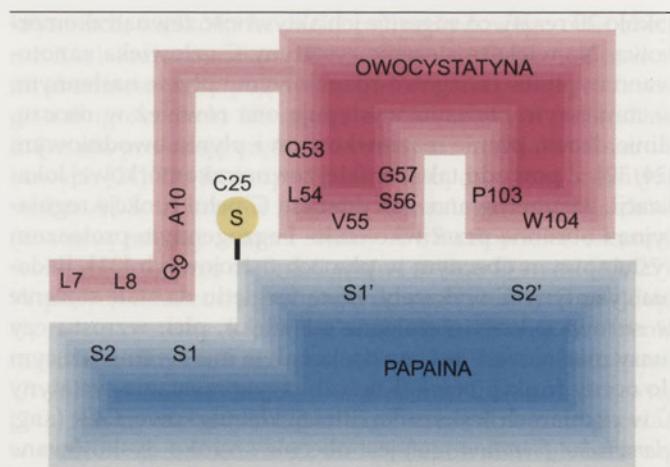
Liczne badania kinetyczne i strukturalne ujawniły, że cystatyny wiążą się z docelowym enzymem w stosunku stechiometrycznym 1:1, z wysokim powinowactwem w reakcji odwracalnej. Poznanie struktury przestrzennej cystatyny jaja kurzego [39], oznaczonej za pomocą krystalografii rentgenowskiej przyczyniło się do zaproponowania modelu hamowania cysteinowych proteaz przez cystatyny na podstawie komputerowego modelowania molekularnego [24]. Model ten został następnie zweryfikowany przez określenie struktury krystalograficznej kompleksu stefiny B człowieka z papainą [40]. Cząsteczkę cystatyny białka jaja kurzego buduje pięciopasmowa antyrównoległa struktura harmonijkowa β -kartki, która jest częściowo owinięta wokół pięciowzo-

jowej struktury α -helisy (Rys. 1). Wysoce konserwatywny dla wszystkich cystatyn region (motyw QXVXG) obejmujący reszty Gln53 – Gly57 (zgodnie z numeracją łańcucha aminokwasowego CEW) zlokalizowany jest na pierwszym zagięciu „spinki do włosów” łączącym antyrównoległe nici β , który został nazwany pierwszą β -pętlą. W sąsiedztwie pierwszej β -pętli znajduje się segment N-końcowy w zachowaną w ewolucji resztą Gly9 i druga β -pętla z resztami Pro103 – Trp104. Te trzy elementy tworzą strukturę znaną jako „krawędź w kształcie klina” (ang. *wedge-shaped 'edge'*) [39]. Przedstawiony sposób sfałdowania cystatyn został potwierdzony przez określenie struktury przestrzennej za pomocą spektroskopii NMR dla cystatyny jaja kurzego [41], cystatyny A człowieka [42-44], oryzacystatyny-I [45] i częściowo dla cystatyny C człowieka [46]. Mimo ogólnego podobieństwa strukturalnego tych białek, zauważono również kilka znaczących różnic. Najbardziej widoczna różnica dotyczy odcinka 23 aminokwasów pomiędzy resztami w pozycjach 69 i 91 cystatyny jaja kurzego, którego stefiny nie posiadają. W strukturze krystalograficznej białka CEW (Rys. 1) odcinek ten przyjmuje konformację dodatkowej α -helisy, obecności której nie wykazała analiza struktury cystatyny jaja kurzego w roztworze. Prawdopodobnie więc obecność dodatkowej struktury α -helisy jest skutkiem zastosowanej metody krystalograficznej [41]. Pozostałe obserwowane różnice dotyczą budowy cystatyny jaja kurzego i cystatyny A [42]. Druga β -pętla cystatyny A jest dłuższa o dwie reszty aminokwasowe, przez co jest znacznie szersza, bardziej ruchoma i elastyczna. Koniec karboksylowy cystatyny A jest również dłuższy od



Rysunek 1. Struktura cystatyny jaja kurzego (1CEW, baza danych PDB) oznaczona za pomocą krystalografii rentgenowskiej. Opis w tekście

C-końca cystatyny jaja kurzego o dziewięć reszt aminokwasowych, które układają się wzdłuż wypukłej powierzchni β -kartki. Ponadto istnieją drobne różnice w orientacji przestrzennej struktury α -helisy, która w cząsteczce cystatyny A jest prawie prostopadła w stosunku do pasm β -kartki i lekko zgięta. Ostatnie strukturalne badania cystatyn były w dużym stopniu poświęcone wyjaśnieniu dimeryzacji i polimeryzacji tych białek, gdzie znaczną rolę odgrywa proces wymiany domen (ang. *3D domain swapping*). Badania te mają szczególne znaczenie dla zrozumienia procesów odkładania się złogów amyloidowych cystatyny C w świetle naczyń krwionośnych mózgu u osób cierpiących na mózgową angiopatię amyloidową lub jej wrodzoną postać HCCAA (ang. *hereditary cystatin C amyloid angiopathy*) [47, 48]. Zgodnie z zaproponowanym modelem (ang. *'trunk model'*) hamowania aktywności proteaz cysteinowych przez cystatyny (Rys. 2), trzyczęściowa, hydrofobowa krawędź złożona z dwóch β -pętli i segmentu N-końcowego określonego jako „trąba słonia” (ang. *'elephant trunk'*) stanowi miejsce kontaktu cystatyny z enzymem [24, 39]. Krawędź ta doskonale przestrzennie pasuje do szczeliny miejsca aktywnego papainy. Obydwie β -pętle cystatyny jaja kurzego mają odpowiedni kształt i wielkość by wypełnić szerszą i płytszą część szczeliny miejsca aktywnego papainy oddziałując z pozycjami S1' – S2'. Z kolei segment N-końcowy jest kierowany do głębszej i węższej części tej szczeliny obejmującej miejsca wiążące substrat S1 – S3. Reszty odcinka aminowego Leu7 – Leu8 – Gly9 – Ala10 układają się tworząc wyraźne zgięcie, dzięki któremu wiązanie peptydowe pomiędzy Gly9 i Ala10, formalnie reprezentujące hydrolizowane wiązanie substratu P1 – P1', znajduje się za daleko by zostać zaatakowanym przez reaktywną resztę Cys25 papainy. Reszta Gly9 tworzy wiązanie wodorowe z resztą Gln53 pierwszej β -pętli. Zatem w kompleksie owocystatyna – papaina, katalityczna reszta Cys25 umiejscowiona jest w wolnej przestrzeni pomiędzy



Rysunek 2. Schemat modelu oddziaływania owocystatyny z papainą (ang. *'trunk model'*) za Turk i Bode [24] z modyfikacjami. S2, S1, S1', S2' – miejsca wiążące substrat papainy według nomenklatury Schechtera i Bergergera; C25 – katalityczna reszta cysteiny miejsca aktywnego papainy; L7, L8, G9, A10 – reszty aminokwasowe segmentu N-końcowego; Q53, L54, V55, S56, G57 – reszty aminokwasowe pierwszej β -pętli; P103, W104 – reszty aminokwasowe drugiej β -pętli.

Tabela 2. Wartości stałych inhibicji K (nM) reakcji hamowania proteaz cysteinowych przez cystatyny [26, 32], tyropiny [54, 59, 60], inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych [71, 72, 74]; CatB – katepsynaB, CatH – katepsyna H, CatL – katepsynaL.

Inhibitor	Proteaza cysteinowa			
	Papaina	CatB	CatH	CatL
I25:				
stefina A	0,019	8,2	0,31	1,3
stefina B	0,12	73	0,58	0,23
CEW	0,12	1,7	0,064	0,019
cystatyna C	0,000011	0,25	0,28	<0,005
cystatyna D	1,2	>1000	8,5	25
H-kininogen	0,02	400	1,1	0,109
L-kininogen	0,015	600	0,72	0,017
I31:				
fragment p41	1,4	>100	5,3	0,0017
ekwistatyna	0,57	1,4	-	0,051
ECl	0,35	15,8	-	0,14
saksyfilina	1,72	1,67	-	0,02
testikan-1	-	-	-	0,7
I29:				
CTLA-2 β	25	>1000	67 (IC ₅₀)	24
CTLA-2 α	560	>1000	86	0,38
BCPI β	>1000	>4000	82	0,036

* W tabeli zrezygnowano z podania wartości odchyżeń standardowych.

segmentem N-końcowym a pierwszą β -pętlą cystatyny [39]. Przedstawiony model interakcji cystatyn z proteazami cysteinowymi tłumaczy wcześniejsze obserwacje, że nawet nieaktywny enzym ze zmienioną chemicznie grupą cysteinową może wiązać inhibitor cystatynowy [25]. Struktura krystalograficzna kompleksu stefiny B człowieka z karboksymetylowaną papainą [40] potwierdza, że inhibitor rzeczywiście wiąże się z enzymem poprzez krawędź w kształcie klina. Większość interakcji pomiędzy stefiną B i papainą pochodzi od segmentu N-końcowego i pierwszej β -pętli z wysoce konserwatywną sekwencją QVVAG. Natomiast udział drugiej β -pętli jest mniejszy i obejmuje głównie reszty Leu102 i His104 (numeracja zgodna z CEW). Koniec karboksylowy stefiny B również oddziałuje z enzymem. Reszty Met7 – Ala10 regionu N-końcowego tworzą raczej otwartą strukturę β -zgięcia typu II, co jest zgodne z przewidywaną konformacją tego odcinka w proponowanym modelu hamowania aktywności papainy przez kurzą cystatynę. Ponieważ jednak takie ułożenie przestrzenne segmentu N-końcowego nie zostało zaobserwowane w strukturach cystatyn wyznaczonych przez spektroskopię NMR, wydaje się, że jest ono indukowane interakcją z papainą. Oddziaływania w kompleksie stefina B – papaina mają głównie charakter hydrofobowy.

Rola i znaczenie poszczególnych regionów odpowiedzialnych za wiązanie się cystatyn z proteazami cysteinowymi, jak również udział w tym procesie konserwatywnych reszt tworzących hydrofobową krawędź, były i są nadal przedmiotem intensywnych badań. Analiza kinetyczna reakcji przeprowadzanych przez różne cystatyny, wraz z badaniami porównującymi naturalne inhibitory z ich zmutowanymi (najczęściej uzyskanymi przez mutagenезę ukierunkowaną) odmianami, dostarczają licznych dowodów potwierdzających słuszność ogólnego modelu interakcji cystatyny jaja kurzego z papainą, oraz pomagają wyjaśnić mechanizm tego oddziaływania i jego specyficzność [25, 32]. Pomimo strukturalnej homologii cystatyn i podobnego mechanizmu hamowania aktywności cysteinowych proteaz, inhibitory te wykazują znaczące różnice powinowactwa dla poszczególnych enzymów (Tabela 2). Zasugerowano, że różnice w stałych inhibicji jednego inhibitora z różnymi proteazami są

przede wszystkim skutkiem odmiennej budowy szczeliny miejsc aktywnych peptydaz cysteinowych [25]. Dotyczy to zwłaszcza wiązania się cystatyn z egzo-peptydazami, takimi jak katepsyna H, C, B i X, których szczeliny miejsc aktywnych są częściowo zablokowane, co znacznie przeszkadza w interakcji z inhibitorem [13, 19]. Opisana ostatnio struktura krystalograficzna kompleksu stefiny A człowieka z aminopeptydazą, katepsyną H [49] dowodzi, że wiązanie się cystatyn z egzo-peptydazami wymusza bardziej dramatyczne zmiany w strukturze białek niż ich wiązanie się z endopeptydazami. Przede wszystkim w omawianym kompleksie mini-łańcuch katepsyny H zostaje wypchnięty ze swojej zajmowanej pozycji przyjmując kształt litery „S”. Z kolei reszty segmentu N-końcowego stefiny A, nie będąc w stanie wiązać się wzdłuż szczeliny miejsca aktywnego enzymu, tworzą krótkie zagięcie w formie haka i ostatecznie zajmują dwie pozycje wcześniej okupowane przez reszty C-końcowe mini-łańcucha Ala82 i Thr83. W przypadku karboksypeptydazy, katepsyny B, analiza komputerowego modelowania molekularnego wykazała, że druga β -pętla cystatyny mogłaby kolidować z segmentem His111 – Val112 – Asn113 zamykającej pętli [50]. Badania kinetyczne katepsyny B i jej zmutowanych odmian pokazały, że zamykająca pętla zmienia swoje położenie podczas wiązania cystatyny [51-53].

TYROPINY

Strukturalnie odmienną od cystatyn grupę inhibitorów proteaz cysteinowych CA1 stanowią tyropiny (ang. *thyropins*, *thyroglobulin type-1 domain proteinase inhibitors*), białka zawierające domenę typu 1 tyroglobuliny, która jest powtarzającą się jednostką bogatą w cysteinę. Tyroglobulina, duża glikoproteina będąca prekursorem hormonów tarczycy, zawiera aż jedenaście tego typu powtórzeń [54]. Do chwili obecnej scharakteryzowano pięć białek z domeną typu 1 tyroglobuliny, które są odwracalnymi, kompetycyjnymi i silnie wiążącymi się inhibitorami proteaz rodziny C1 (Tabela 2): fragment łańcucha niezmiennego p41 [55], ekwistatyna [56, 57], inhibitor izolowany z łososia *Oncorhynchus keta* (ECI, ang. *the chum salmon egg cysteine proteinase inhibitor*) [58], saksyfilina (ang. *saxiphilin*) izolowana z północnoamerykańskiej żaby *Rana catesbiana* [59] i proteoglikan człowieka o nazwie testikan-1 (ang. *testican-1*) [60]. Izolacja katepsyny L niekowalencyjnie połączonej z unikalnym fragmentem niezmiennego łańcucha p41 z nerki człowieka była jednym z pierwszych doniesień dotyczących tyropin jako nowo wyłaniającej się grupy inhibitorów cysteinowych proteaz, jak również pierwszym przykładem występowania łańcucha niezmiennego w kompleksie z białkiem innym niż cząsteczka MHC klasy II [54]. Badania te pokazały, że fragment p41 jest nie tylko inhibitorem katepsyny L, ale również stabilizuje enzym w szerokim zakresie pH. Komórki prezentujące antygen w organizmie człowieka mogą produkować dwie formy łańcucha niezmiennego, p31 i p41, które są rezultatem alternatywnego splicingu RNA. Warianty te różnią się tym, że łańcuch p41 posiada dodatkową sekwencję 64 aminokwasów o znaczącej homologii do sekwencji domeny typu 1 tyroglobuliny [55]. Mechanizm oddziaływania domeny typu 1 tyroglobuliny z proteazą cysteinową został opisany na podstawie struktury krystalograficznej fragmentu łańcucha p41 w kompleksie z katepsyną L [61]. Sposób, w jaki fragment łańcucha niezmiennego p41 od-

działa ze szczeliną miejsca aktywnego katepsyny L przypomina model inhibicji wykorzystywany przez cystatyny, stanowiąc przykład ewolucji konwergentnej, gdyż inhibitory te prezentują odmienny wzór sfałdowania. Wielkość fragmentu łańcucha niezmiennego p41 wynosi około dwie trzecie wielkości stefiny B. Obydwa białka charakteryzują się zupełnie inną topologią w tej części, która nie jest bezpośrednio zaangażowana w wiązanie się z proteazą. Jednak zarówno stefina B, jak również domena tyroglobuliny typu 1 łańcucha niezmiennego p41 są cząsteczkami tworzącymi strukturę w kształcie klina, która przestrzennie pasuje do szczeliny miejsca aktywnego cysteinowych peptydaz. Cząsteczka fragmentu łańcucha niezmiennego p41 złożona jest z dwóch subdomen, z których każda stabilizowana jest wiązaniami disiarczkowymi. Pierwszą subdomenę buduje krótka struktura α -helisy i struktura β , natomiast drugą subdomenę stanowi trójpaszowa antyrównoległa struktura β -kartki. Za kontakt z enzymem odpowiedzialna jest hydrofobowa krawędź utworzona z trzech pęli. Najszerza pętla N-końca leży w obrębie pierwszej subdomeny, podczas gdy pozostałe dwie tworzą β -zgięcia w obszarze drugiej subdomeny [61]. W przeciwieństwie do nieselektywnie działających cystatyn, fragment łańcucha niezmiennego p41 jest w stanie hamować aktywność katepsyny L, podczas gdy w stosunku do bardzo podobnej endopeptydazy, katepsyny S, nie wykazuje aktywności inhibitorowej. Specyficzność działania fragmentu p41 została wytłumaczona utworzeniem dodatkowych kontaktów, szczególnie z resztami domeny R enzymu, które współtworzą miejsca wiążące S2 i S1' odpowiedzialne przeciwieście za specyficzność substratową proteaz papainowych. Warto wspomnieć, że fragment łańcucha p41 jest również silnym inhibitorem kruczypainy ($K_i = 0,0058$ nM) [54].

Ekwistatyna, białko o masie cząsteczkowej 22 kDa wyizolowane z morskiego ukwiału *Actinia equina*, jest nietypową tyropiną złożoną z trzech domen typu 1 tyroglobuliny [56, 57, 62]. Wyjątkowość ekwistatyny dotyczy jej zdolności hamowania aktywności proteaz dwóch typów katalitycznych, peptydaz cysteinowych i proteazy aspartylowej [63]. Papaina i katepsyna D mogą być związane i hamowane jednocześnie przez ekwistatynę, co sugeruje, że miejsca wiążące dla tych enzymów są fizycznie rozdzielone. W celu określenia strukturalnych podstaw mechanizmu inhibicji wykorzystywanego przez ekwistatynę, jej trzy domeny zostały oddzielnie sklonowane i produkowane przez komórki drożdży *Pichia pastoris* [64, 65]. Badania te potwierdziły, że za aktywność hamowania papainy odpowiedzialna jest pierwsza domena, za aktywność hamowania katepsyny D – druga domena, a stałe kinetyczne otrzymane dla poszczególnych domen są porównywalne z wartościami tych stałych wyznaczonych dla całej cząsteczki ekwistatyny [66]. Jak dotąd docelowy enzym dla domeny trzeciej nie jest znany. Analiza strukturalna domen za pomocą dichroizmu kołowego ujawniła, że interakcja drugiej domeny z katepsyną D prowadzi do zmian konformacyjnych, które nie są obserwowane podczas oddziaływania domeny pierwszej z papainą.

Niewiele wiadomo jest o budowie, mechanizmie hamowania aktywności i funkcjach trzech pozostałych białek należących do tyropin, czyli ECI, saksyfiliny i testikanu-1. ECI jest niewielkim białkiem o masie molekularnej około

9 kDa, mającym jedną domenę typu 1 tyroglobuliny [58]. Aktywność inhibicyjna proteoglikanu testikanu-1 jest niezależna od jego łańcuchów chondroitynosiarczanowych. Wykazano również, że testikan-1 może stabilizować aktywność katepsyny L w neutralnym pH [60]. Z kolei saksyfilina jest białkiem o masie molekularnej 91 kDa, zawierającym dwie domeny typu 1 tyroglobuliny, posiadającym zdolność wiązania neurotoksyny o nazwie saksytoksyna [59].

INHIBITORY HOMOLOGICZNE DO PROPEPTYDÓW PROTEAZ CYSTEINOWYCH

Peptydazy cysteinowe rodziny papainowej są syntetyzowane jako nieaktywne prekursorzy, których aktywacja następuje poprzez proteolityczne usunięcie N-końcowego propeptydu, nazywanego też często prosegmentem, proregionem, czy prodomeną [17-19]. Proces aktywacji prokatepsyn cysteinowych ma miejsce w późnych endosomach i lizosomach, gdzie kluczową rolę odgrywa niskie pH, a funkcję pomocniczą pełnią prawdopodobnie glikozaminoglikany, razem znacząco osłabiające oddziaływanie pomiędzy propeptydem i częścią katalityczną enzymu [17]. Główną funkcją propeptydu jest kontrola aktywności proteazy, z którą jest połączony od momentu syntezy, ale jest on również odpowiedzialny za stabilizację i prawidłowe sfałdowanie cząsteczki enzymu [17]. Wykazano, że *in vitro* propeptydy zachowują się rzeczywiście jak inhibitory dla swoich rodzicielskich proteaz, charakteryzując się przy tym wysoką selektywnością w stosunku do nich [67, 68]. Niestety nie istnieje żaden dowód, który potwierdziłby hipotezę, że *in vivo* po aktywacji proenzymów, proregiony mogą nadal pełnić swoje funkcje inhibitorowe [17]. Ponieważ początkowe badania przedstawiały propeptydy jako niekowalencyjne, odwracalne i wysoce selektywne inhibitory katepsyn cysteinowych uczestniczących w patomechanizmie wielu chorób człowieka, stały się przedmiotem intensywnych badań z przeznaczeniem terapeutycznym. Przeprowadzone ponownie kinetyczne analizy potwierdziły wybiórczość działania propeptydów katepsyn S, L i K między papainą i katepsyną B z jednej strony, a katepsynami L, S i K z drugiej strony. Badania te dowodzą jednak, że nie istnieje wysoka selektywność wśród propeptydów katepsyn S, L i K w stosunku do ich rodzicielskich enzymów [69]. Wyjątek stanowi propeptyd katepsyny L, który jest 550 razy silniejszym inhibitorem katepsyny L niż katepsyny S. Zaskakujący jest natomiast fakt, że propeptyd katepsyny S jest silniejszym inhibitorem dla katepsyny L niż dla samej katepsyny S. Za specyficzność propeptydów katepsyn L i S odpowiedzialna jest prawdopodobnie część N-końcowa tych proregionów [70].

W skład rodziny I29, oprócz propeptydów katepsyn cysteinowych, wchodzi również dwa antygeny cytotoksycznych limfocytów T myszy: CTLA-2 α i CTLA-2 β [71, 72]; dwa inhibitory izolowane z hemolimfy motyla jedwabnika *Bombyx mori*: BCPI α i BCPI β (ang. *Bombyx cysteine proteinase inhibitor*) [73, 74]; oraz salaryna (ang. *salarin*) izolowana z łososia *Salmo salar* [75, 76]. Odkrycie inhibitorów, których sekwencja jest homologiczna do sekwencji znanych propeptydów proteaz cysteinowych, dowodzi, że niektóre z tych proregionów mogły ewoluować jako autonomiczne cząsteczki. Wartości stałych inhibicji wymienionych inhibito-

rów zostały zebrane w Tabeli 2. Nie jest znany mechanizm działania opisanych inhibitorów – homologów propeptydów proteaz cysteinowych, można jedynie domyślać się, że sposób ich wiązania się z proteazami będzie podobny do sposobu interakcji propeptydów z enzymami rodzicielskimi. Na podstawie sekwencji aminokwasowej i długości proregionów proteazy papainowe podzielono na dwie podrodziny [77, 78]. Typowym przykładem podrodziny zawierającej krótszy propeptyd jest katepsyna B (~ 60 reszt aminokwasowych), a podrodziny z dłuższym propeptydem – katepsyna L i papaina (~ 100 reszt aminokwasowych). Określenie struktury przestrzennej kilku enzymów należących do tych podrodzin, pozwoliło stwierdzić, że pomimo braku znaczącego podobieństwa sekwencji aminokwasowej wszystkie propeptydy wykazują podobny typ sfałdowania i tym samym podobny mechanizm inhibicji. Proregion katepsyny L zbudowany jest z dwóch odrębnych części. Fragment N-końcowy tworzy mini-domenę, złożoną z dwóch α -helis i pasma struktury β biegnącego antyrównoległe do drugiej helisy [77]. Mini-domena znajduje się po przeciwnej stronie końca aminowego dojrzałego enzymu i wiąże się z jedną z pętli powierzchni katepsyny L, którą nazwano „pętlą wiążącą proregion” (PBL, ang. *proregion binding loop*). Łańcuch polipeptydowy części C-końcowej propeptydu biegnie wzdłuż szczeliny miejsca aktywnego katepsyny L blokując do niego dostęp. Propeptyd wiąże się więc do szczeliny miejsca aktywnego w przeciwnym kierunku niż substrat. Ten odwrócony kierunek powoduje, że wiązanie peptydowe znajdujące się blisko katalitycznej cysteiny jest nieprawidłowo ustawione, zapobiegając w ten sposób hydrolizie. Prowadzone są intensywne badania mające na celu konstruowanie syntetycznych propeptydów charakteryzujących się wysoką specyficznością dla poszczególnych katepsyn cysteinowych [79, 80].

PODSUMOWANIE

Wszystkie białkowe inhibitory proteaz, w tym proteaz cysteinowych, uniemożliwiają dostęp substratu do miejsca aktywnego enzymu poprzez utworzenie przeszkody przestrzennej [2, 14]. Cystatyny pośrednio blokują miejsce aktywne proteaz CA1, gdyż nie dochodzi do interakcji z katalityczną resztą cysteiny. Trzy konserwatywne, oddalone od siebie w sekwencji aminokwasowej, regiony cystatyn kontaktują się ze szczeliną miejsca aktywnego docelowego enzymu: dwie β -pętle i segment N-końcowy, który wiąże się w sposób podobny do substratu, ale w pozycji P1 odwraca się od reszty cysteiny nie dopuszczając do nukleofilowego ataku. Te trzy fragmenty tworzą hydrofobową krawędź w kształcie klina komplementarną do szczeliny miejsca aktywnego proteazy [39, 40]. Podobną strukturę hydrofobowej krawędzi, ale utworzoną z trzech pętli, mają tyropiny. Struktura krystalograficzna fragmentu łańcucha niezmiennego p41 należącego do tej rodziny w kompleksie z katepsyną L potwierdziła, że te trzy pętle wiążą się z miejscem aktywnym enzymu w sposób podobny do cystatyn, ale wykorzystują dodatkowe miejsca kontaktu, przez co wykazują większą specyficzność proteazową [61]. Inhibitory homologiczne do propeptydów proteaz cysteinowych stosują inną niż cystatyny i tyropiny strategię blokowania aktywności enzymu, opisaną na podstawie struktury krystalograficznej proenzymów katepsynowych. Propeptyd

wiąże się do szczeliny miejsca aktywnego w przeciwnym kierunku niż substrat, utrzymując katalitycznie nieaktywny stan proenzymu [77, 78]. Wiązanie zarówno cystatyn, tyropin jak i propeptydów z proteazami cysteinowymi CA1 ma charakter niekowalencyjny [13, 14]. Niekowalencyjne kompleksy z proteazami tworzą również chagasyne i klitocypina. Do chwili obecnej nie została poznana struktura przestrzenna tych inhibitorów, zasugerowano jednak, że mechanizm inhibicji proteaz papainowych przez chagasyne przypomina prawdopodobnie strategię krawędzi wykorzystywaną przez cystatyny i tyropiny [7, 14]. Niewiele również wiadomo o strukturalnych podstawach mechanizmów hamowania aktywności proteaz CA1 przez roślinne inhibitory typu Kunitza i Bowmana-Birka [10-12, 23]. Inhibitory „pułapki” (I4, I39) mogą hamować aktywność tylko endopeptydaz, gdyż mechanizm ich działania wymaga rozcięcia wewnętrznego wiązania peptydowego inhibitora, co powoduje zmianę konformacyjną jego cząsteczki, dzięki której enzym zostaje złapany w pułapkę. Uważa się, że serpiny hamują aktywność proteaz cysteinowych w sposób podobny do tego, który wykorzystują podczas inhibicji proteaz serynowych, chociaż i w tym przypadku brak jest danych strukturalnych ostatecznie potwierdzających to założenie. Serpiny wiążą się z docelowym enzymem w sposób podobny do substratu, kowalencyjnie oddziałując z katalityczną resztą cysteiny bądź seryny [8, 9, 14]. Poznanie sposobów interakcji niedawno odkrytych białkowych inhibitorów z ich docelową proteazą cysteinową może dostarczyć nowych pomysłów na projektowanie syntetycznych inhibitorów z myślą o ich terapeutycznym zastosowaniu.

PIŚMIENNICTWO

- Rawlings ND, Barrett AJ (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 27: 325-331
- Bode W, Huber R (2000) Structural basis of the endoprotease - protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* 1477: 241-252
- Dubin G (2005) Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 62: 1-17
- Brzin J, Rogelj B, Popović T, Štrukelj B, Ritonja A (2000) Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J Biol Chem* 275: 20104-20109
- Kidrič M, Fabian H, Brzin J, Popović T, Pain RH (2002) Folding, stability and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 962-967
- Monteiro ACS, Abrahamson M, Lima APCA, Vannier-Santos MA, Scharfstein J (2001) Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 114: 3933-3942
- Rigden DJ, Mosolov VV, Galperin MY (2002) Sequence conservation in the chagasin family suggests a common trend in cysteine proteinase binding by unrelated protein inhibitors. *Protein Sci* 11: 1971-1977
- Schick C, Brömme D, Bartuski AJ, Uemura Y, Schechter NM, Silverman GA (1998) The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13465-13470
- Al-Khunaizi M, Luke CJ, Askew YS, Pak SC, Askew DJ, Cataltepe S, Miller D, Mills DR, Tsu C, Brömme D, Irving JA, Whisstock JC, Silverman GA (2002) The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry* 41: 3189-3199
- Franco OL, Grossi DS, Sales MP, Mello LV, Oliveira AS, Rigden DJ (2002) Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins* 49: 335-341
- Oliveira C, Santana LA, Carmona AK, Cezari MH, Sampaio MU, Sampaio CAM, Oliva MLV (2001) Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. *Biol Chem* 382: 847-852
- Hatano K, Kojima M, Tanokura M, Takahashi K (1996) Solution structure of bromelain inhibitor VI from pineapple stem: structural similarity with Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor from soybean. *Biochemistry* 35: 5379-5384
- Turk B, Turk D, Salvesen GS (2002) Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* 8: 1623-1637
- Rzychon M, Chmiel D, Stec-Niemczyk J (2004) Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 51: 861-873
- Dubin G (2003) Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* 50: 715-724
- Barrett A J, Rawlings N D (2001) Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem* 382: 727-733
- Turk B, Turk D, Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477: 98-111
- Turk V, Turk B, Turk D (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 20: 4629-4633
- Turk V, Turk B, Gunčar G, Turk D, Kos, J (2002) Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Advan Enzyme Regul* 42: 285-303
- Berdowska I (2004) Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 342: 41-69
- Berdowska I, Siewiński M (2000) Rola katepsyn cysteinowych oraz ich inhibitorów w procesach fizjologicznych i nowotworowych. *Postępy Biochem* 46: 73-84
- Poręba W, Gawlik K, Gutowicz J (2002) Katepsyna B a proces inwazji nowotworowej. *Postępy Biochemii* 48: 111-120
- Rawlings N D, Tolle D P, Barrett A J (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378: 705-716
- Turk V, Bode W (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285: 213-219
- Turk B, Turk V, Turk D (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 378: 141-150
- Katunuma N, Kominami E (1995) Structure, properties, mechanisms and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol* 251: 382-397
- Alvarez-Fernandez M, Barrett AJ, Gerhartz B, Dando PM, Ni J, Abrahamson M (1999) Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *J Biol Chem* 274: 19195-19203
- Brown W M, Dziegielewska K M (1997) Friends and relations of the cystatin superfamily - new members and their evolution. *Protein Sci* 6: 5-12
- Margis R, Reis EM, Villeret V (1998) Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys* 359:24-30
- Gburek J, Gołąb K (1996) Cystatyny pochodzenia roślinnego. *Post Biol Kom* 23: 385-398
- Henskens YMC, Veerman ECI, Amerongen AVN (1996) Cystatins in health and diseases. *Biol Chem* 377: 71-86
- Grzonka Z, Janowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Łankiewicz L, Wiczek W, Wiczerek E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskólski M, Grubb A (2001) Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* 48: 1-20
- Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Alvarez-Fernandez M, Grubb A, Su J, Yu G, Li Y, Parmelee D, Xing L, Coleman T A, Gentz S, Thotakura R, Nguyen N, Hesselberg M, Gentz R (1997) Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 272: 10853-10858

34. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R (1997) Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 272: 903-910
35. Ni J, Alvarez-Fernandez M, Danielsson L, Chillakuru R A, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M (1998) Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 273: 24797-24804
36. Halfon S, Ford J, Foster J, Dowling J, Lucian L, Sterling M, Xu Y, Weiss M, Ikeda M, Liggett D, Helms A, Caux C, Lebecque S, Hannum C, Menon S, McClanahan T, Gorman D, Zurawski G (1998) Leukocystatin, a new class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *J Biol Chem* 273: 16400-16408
37. Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Bricon T, Martinez-Bru C, Grubb A (2005) Cystatin C as a marker of GFR – history, indications, and future research. *Clin Biochem* 38: 1-8
38. Cornwall GA, Hsia N (2003) A new subgroup of the family 2 cystatin. *Mol Cell Endocrinol* 200: 1-8
39. Bode W, Engh R, Musil D, Thiele U, Huber R, Karshikov A, Brzin J, Kos J, Turk V (1988) The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J* 7: 2593-2599
40. Stubbs MT, Laber B, Bode W, Huber R, Jerala R, Lenarčič B, Turk V (1990) The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J* 9: 1939-1947
41. Dieckmann T, Mitschang L, Hofmann M, Kos J, Turk V, Auerswald EA, Jaenicke R, Oschkinat H (1993) A structures of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. *J Mol Biol* 234: 1048-1059
42. Martin JR, Craven J, Jerala R, Kroon-Žitko L, Žerovnik E, Turk V, Waltho J P (1995) The three-dimensional solution structures of human stefin A. *J Mol Biol* 246: 331-343
43. Tate S, Ushioda T, Utsunomiya-Tate N, Shibuya K, Ohyama Y, Nakano Y, Kaji H, Inagaki F, Samejima T, Kainosho M (1995) Solution structure of a human cystatin A variant, cystatin A²⁻⁹⁸ M65L, by NMR spectroscopy. A possible role of the interactions between the N- and C-termini to maintain the inhibitory active form of cystatin A. *Biochemistry* 34: 14637-14648
44. Craven CJ, Baxter NJ, Murray EH, Hill NJ, Martin JR, Ylinenjärvi K, Björk I, Waltho JP, Murray IA (2000) Wild-type and Met-65 → Leu variants of human cystatin A are functionally and structurally identical. *Biochemistry* 39: 15783-15790
45. Nagata K, Kudo N, Abe K, Arai S, Tanokura M (2000) Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Biochemistry* 39: 14753-14760
46. Ekiel I, Abrahamson M, Fulton DB, Lindahl P, Storer AC, Levadoux W, Lafrance M, Labelle S, Pomerleau Y, Groleau D, LeSauter L, Gehring K (1997) NMR structural studies of human cystatin C dimers and monomers. *J Mol Biol* 271: 266-277
47. Jaskólski M (2001) 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol* 48: 807-827
48. Sanders A, Craven CJ, Higgins LD, Giannini S, Conroy MJ, Hounslow AM, Waltho JP, Staniforth RA (2004) Cystatin forms a tetramer through structural rearrangement of domain-swapped dimers prior to amyloidogenesis. *J Mol Biol* 336: 165-178
49. Jenko S, Dolenc I, Gunčar G, Doberšek A, Podobnik M, Turk D (2003) Crystal structure of stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *J Mol Biol* 326: 875-885
50. Musil D, Zucic D, Turk D, Engh R A, Mayr I, Huber R, Popovic T, Turk V, Towatari T, Katunuma N, Bode W (1991) The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* 10: 2321-2330
51. Illy Ch, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* 272: 1197-1202
52. Nycander M, Estrada S, Mort JS, Abrahamson M, Björk I (1998) Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett* 422: 61-64
53. Pavlova A, Krupa JC, Mort JS, Abrahamson M, Björk I (2000) Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. *FEBS Lett* 487: 156-160
54. Lenarčič B, Bevec T (1998) Thyropins – new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem* 379: 105-111
55. Bevec T, Stoka V, Pugerčič G, Dolenc I, Turk V (1996) Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med* 183: 1331-1338
56. Lenarčič B, Ritonja A, Štrukelj B, Turk B, Turk V (1997) Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J Biol Chem* 272: 13899-13903
57. Lenarčič B, Ritonja A, Štrukelj B, Turk B, Turk V (1998) *J Biol Chem* 272: 13899-13903, Additions and Corrections. *J Biol Chem* 273: 12682-12683
58. Yamashita M, Konagaya S (1996) A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J Biol Chem* 271: 1282-1284
59. Lenarčič B, Krishnan G, Borukhovich R, Ruck B, Turk V, Moczydlowski E (2000) Saxiphilin, a saxitoxin-binding protein with two thyroglobulin type 1 domains, is an inhibitor of papain-like cysteine proteinases. *J Biol Chem* 275: 15572-15577
60. Bocock JP, Edgell CS, Marr HS, Erickson A H (2003) Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Eur J Biochem* 270: 4008-4015
61. Gunčar G, Pungerčič G, Klemenčič I, Turk V, Turk D (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J* 18: 793-803
62. Štrukelj B, Lenarčič B, Gruden K, Pungerčar J, Rogelj B, Turk V, Bosch D, Jongsma MA (2000) Equistatin, a protease inhibitor from the sea anemone *Actinia equina*, is composed of three structural and functional domains. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 732-736
63. Lenarčič B, Turk V (1999) Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. *J Biol Chem* 274: 563-566
64. Rogelj B, Štrukelj B, Bosch D, Jongsma MA (2000) Expression, purification, and characterization of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 19: 329-334
65. Outchkourov NS, Stiekema WJ, Jongsma MA (2002) Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 24: 18-24
66. Galeša K, Pain R, Jongsma MA, Turk V, Lenarčič B (2003) Structural characterization of thyroglobulin type-1 domains of equistatin. *FEBS Lett* 539: 120-124
67. Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS, Ménard R (1996) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* 35: 8149-8157
68. Billington CJ, Mason P, Magny M-C, Mort JS (2000) The slow-binding inhibition of cathepsin K by its propeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 924-929
69. Guay J, Falgoutyret J-P, Ducret A, Percival MD, Mancini JA (2000) Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem* 267: 6311-6318
70. Guo YL, Kurz U, Schultz JE, Lim CC, Wiederanders B (2000) The α 1/2 helical backbone of the prodomains defines the intrinsic inhibitory specificity in the cathepsin L-like cysteine protease subfamily. *FEBS Lett* 469: 203-207
71. Delaria K, Fiorentino L, Wallace L, Tamburini E, Brownell E, Muller D (1994) Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 β . *J Biol Chem* 269: 25172-25177

72. Kurata M, Hirata M, Watabe S, Miyake M, Takahashi SY, Yamamoto Y (2003) Expression, purification, and inhibitory activities of mouse cytotoxic T-lymphocyte antigen-2a. *Protein Express Purif* 32: 119-125
73. Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY (1999) A novel inhibitor protein for Bombyx cysteine proteinase is homologous to propeptide regions of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 448: 257-260
74. Kurata M, Yamamoto Y, Watabe S, Makino Y, Ogawa K, Takahashi SY (2001) Bombyx cysteine proteinase inhibitor homologous to propeptide regions of cysteine proteinases is a strong, selective inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteinases. *J Biochem* 130: 857-863
75. Ylönen A, Rinne A, Herttuainen J, Bogwald J, Järvinen M, Kalkkinen N (1999) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin contains a novel kinninogen and another cysteine proteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 266: 1066-1072
76. Olonen A, Kalkkinen N, Paulin L (2003) A new type of cysteine proteinase inhibitor - the salarin from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Biochimie* 85: 677-681
77. Cygler M, Mort JS (1997) Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79: 645-652
78. Groves MR, Coulombe R, Jenkins J, Cygler M (1998) Structural basis for specificity of papain-like cysteine proteases proregions toward their cognate enzymes. *Proteins* 32: 504-514
79. Chowdhury SF, Sivaraman J, Wang J, Devanathan G, Lachance P, Qi H, Ménard R, Lefebvre J, Konishi Y, Cygler M, Sulea T, Purisima EO (2002) Design of noncovalent inhibitors of human cathepsin L from the 96-residue proregion to optimized tripeptides. *J Med Chem* 45: 5321-5329
80. Wiederanders B (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol* 50: 691-713

Cystatins, thyropins and inhibitors homologous to propeptides of cysteine proteases.

Katarzyna Gawlik[✉], Wojciech Poręba, Jan Gutowicz

Department of Physical Chemistry of Microorganisms, Institute of Genetics and Microbiology, University of Wrocław, 63 Przybyszewskiego St., 51-148 Wrocław, Poland

*e-mail: katgaw@microb.uni.wroc.pl

Key words: CA1 cysteine proteases, papain family, inhibitors, cystatins, thyropins, propeptide

ABSTRACT

Protein inhibitors of proteolytic enzymes play an important role in regulating the activity of endogenous proteases and in host defense mechanisms against pathogens preventing the deleterious effects of exogenous proteases. In recent years a great interest in protein inhibitors of cysteine proteases has increased due to the extensive growth of knowledge about the contribution of cysteine proteases to pathological processes associated with many human diseases, as well as due to prospects for treatment of these disorders which may arise from the thorough understanding of their inhibitory mechanisms. This paper reviews the most important aspects of three families of cysteine protease inhibitors: cystatins, thyropins and inhibitors homologous to propeptides of cysteine proteases. Special attention is given to structural bases of the interactions between the inhibitors and their target enzymes. The paper presents a general characterization of the families according to the MEROPS classification of protease inhibitors, pointing out new members.

Tomasz Popławski

Janusz Błasiak

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: janusz@biol.uni.lodz.pl, tel. (42) 635 43 34, faks: (42) 635 44 84

Artykuł otrzymano 14 stycznia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 4 marca 2005 r.

Słowa kluczowe: Pęknięcia dwuniciowe DNA, system NHEJ

Wykaz skrótów: 3' ss – jednoniciowe fragmenty DNA z końcową grupą 3'-OH; 5' ss – jednoniciowe fragmenty DNA z końcową grupą 5'-P; ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) – białko zespołu *ataxia-telangiectasia*; ATR (ang. *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) – białko związane z zespołem *Ataxia-telangiectasia*; BLM (ang. *Bloom syndrome protein*) – białko związane z występowaniem zespołu Bloom; DNA-PK (ang. *DNA-dependent protein kinase*) – białkowa kinaza zależna od DNA; DNA-PKcs (ang. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) – podjednostka katalityczna białkowej kinazy zależnej od DNA; HR (ang. *homologous recombination repair*) – system naprawy przez rekombinację homologiczną; Ku70, Ku80 – podjednostki autoantygeny Ku; NHEJ (ang. *nonhomologous DNA end-joining*) – system naprawy przez niehomologiczne łączenie końców DNA; nt – nukleotyd; RAG1, RAG2 (ang. *recombination activating genes*) – geny aktywujące rekombinację; SCID (ang. *severe combined immunodeficiency syndrome*) – ciężki złożony niedobór immunologiczny; SSA (ang. *single strand annealing*) – naprawa przez dopasowywanie pojedynczych nici; TDT (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*) – terminalna transferaza; deoksyrybonukleotydoma; V(D)J (ang. *variable [diversity] joining*) – segmenty genowe kodujące przeciwciała

STRESZCZENIE

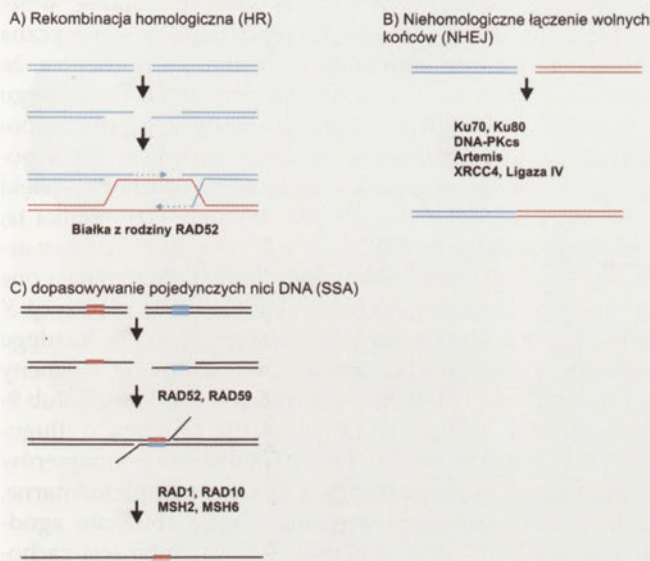
Pęknięcia dwuniciowe DNA (DSB) są uszkodzeniami szczególnie niebezpiecznymi dla komórek. Naprawa tych uszkodzeń zapobiega fragmentacji chromosomów, translokacji fragmentów chromosomów oraz ich delecji. W komórkach człowieka system NHEJ jest głównym systemem naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. Naprawa DSB za pomocą szlaku NHEJ polega na bezpośrednim połączeniu dwóch końców DNA. Proces ten jest procesem niedokładnym, który bardzo często powoduje zmiany w sekwencji DNA. Zjawisko to jest spowodowane poprzez przekształcenie nieligowalnych końców DNA w końce mogące podlegać łączeniu (ligacji). Główne składniki białkowe systemu NHEJ to podjednostka katalityczna kinazy zależnej od DNA (DNA-PKcs), białka Ku, ligaza IV, XRCC4 i Artemis. W tej publikacji przedstawiono aktualną wiedzę o mechanizmach naprawy dwuniciowych pęknięć DNA za pomocą systemu NHEJ w komórkach człowieka.

WPROWADZENIE

Integralność genomowego DNA jest zagrożona poprzez działanie czynników endo- i egzogennych. Uszkodzenia DNA mają różnorodny charakter, dlatego też komórki wytworzyły szereg mechanizmów ich naprawy. Znaczenie systemów naprawy uszkodzeń DNA dla prawidłowego działania organizmu widać na przykładzie fenotypów osób chorych na zespół Cockayne'a, Taya (Trichotiodystrofia), *Xeroderma pigmentosum*, oraz z niepolipowatym dziedzicznym rakiem jelita grubego. Choroby te są przykładami chorób, które są spowodowane mutacjami w genach kodujących białka systemów naprawy uszkodzeń DNA [1-3]. Defekty w naprawie uszkodzeń DNA będące konsekwencją tych mutacji predisponują ich nosicieli do wystąpienia chorób nowotworowych i/lub zaburzeń neurologicznych. Utrzymanie integralności genomu wymaga oprócz sprawnego systemu naprawy uszkodzeń DNA również odpowiedniej regulacji kolejnych faz cyklu komórkowego poprzez system punktów kontrolnych [4]. Zatrzymanie cyklu komórkowego daje komórce czas na naprawę uszkodzeń DNA przed rozdziałem materiału genetycznego do komórek potomnych. Choroby związane z nieprawidłowo działającym systemem kontroli cyklu komórkowego to min. *ataxia telangiectasia* i zespół Nijmegen, w których chorzy wykazują nadwrażliwość na czynniki uszkadzające DNA oraz niestabilność genomu [5-7].

PĘKNIĘCIA DWUNICIOWE DNA I ICH NAPRAWA

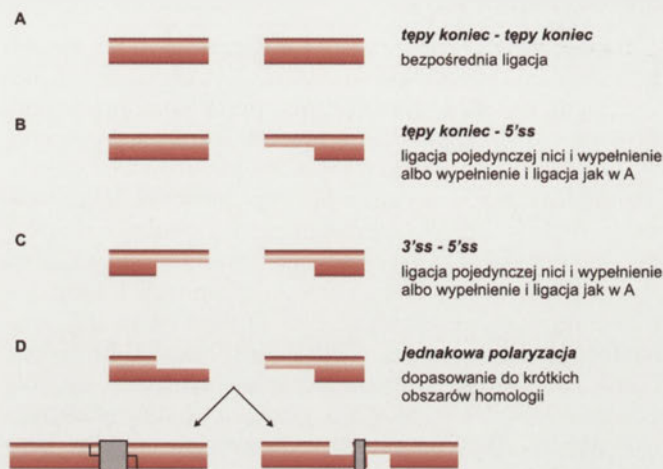
Pęknięcia dwuniciowe DNA (ang. *double strand breaks*, DSB) są uszkodzeniami szczególnie niebezpiecznymi dla komórek. Powstają one w wyniku ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące i wolne rodniki, podczas replikacji nici zawierającej pojedyncze pęknięcie DNA, w wyniku działania topoizomera DNA typu II oraz systemów naprawy DNA przez wycinanie i naprawy międzyniciowych wiązań krzyżowych DNA-DNA a także podczas formowania na obu niciach helisy DNA blisko siebie położonych pęknięć jednoniciowych. W komórkach człowieka w wyniku procesów endogennych pęknięcia dwuniciowe powstają w tempie jednego na 10^6 pz na cykl komórkowy. Nienaprawione mogą powodować śmierć komórki lub transformację nowotworową poprzez inaktywację genów kodujących supresory nowotworów (np. w wyniku delecji) lub aktywację onkogenów (np. poprzez translokację) [8, 9]. Naprawa DSB w komórkach ssaków oraz drożdży może odbywać się poprzez trzy szlaki naprawy: rekombinacji homologicznej (ang. *homologous recombination repair*, HR), niehomologiczne łączenie końców DNA (ang. *nonhomologous end-joining*, NHEJ) i dopasowywanie pojedynczych nici DNA (ang. *single strand annealing*, SSA) [10-13] (Rys. 1). Rekombinacja homologiczna polega na odtworzeniu pierwotnej struktury chromosomu przy udziale jego nieuszkodzonego homologu. Naprawa przez dopasowywanie pojedynczych nici DNA uważana jest za szczególną klasę naprawy przez rekombinację homologiczną, w której jako homologii wykorzystywane są krótkie sekwencje powtórzone znajdujące się w pobliżu



Rysunek 1. Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA u eukariontów. A) Pierwszym etapem w rekombinacji homologicznej jest utworzenie jednoniciowych końców 3'. Następnie jedna z nici 3' dokonuje inwazji na homologiczne DNA dawcy, wytwarzając pętlę D. W końcowym etapie następuje synteza naprawcza na matrycy nieuszkodzonej nici. B) Niehomologiczne łączenie wolnych końców polega na ligacji końców dwóch cząsteczek DNA. W wyniku dopasowania do siebie końców nici dochodzi często do zmiany sekwencji nukleotydu w miejscu uszkodzenia. C) Pierwszy etap naprawy DSB na drodze SSA polega na dopasowaniu dwóch jednoniciowych zakończeń DNA na podstawie mikrohomologii (~30 nt). W procesie tym biorą udział białka Rad52 i Rad59. Następnie usuwane są fragmenty poza obszarem homologii za pomocą kompleksu białkowego złożonego z białek Rad1-Rad10 oraz MSH2 i MSH6. W efekcie następuje utrata sekwencji w miejscu uszkodzenia.

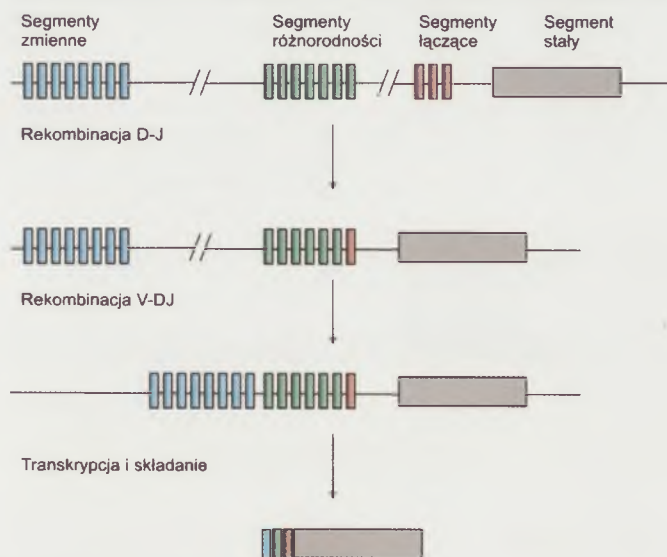
pęknięcia. Sekwencje te są wykorzystywane do wzajemnego dopasowania i połączenia na zasadzie homologii jednoniciowych zakończeń dwóch fragmentów DNA [14-19]. Efektywną naprawę zaobserwowano w przypadku homologii o długości około 30 pz [15]. Naprawa DSB w szlaku NHEJ polega na bezpośrednim połączeniu dwóch wolnych końców nici DNA. NHEJ oraz HR uczestniczą w porównywalnym stopniu w usuwaniu dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach ssaków. O wyborze szlaku naprawy decyduje najprawdopodobniej faza cyklu komórkowego, aczkolwiek nie można wykluczyć również wpływu innych, dodatkowych czynników [20]. O wyborze szlaku naprawy może decydować współzawodnictwo o wolne końce nici DNA pomiędzy dwoma kluczowymi białkami systemu NHEJ i HR, Ku70/80 oraz Rad52 [21]. Rad52 wiąże się preferencyjnie z długimi jednoniciowymi fragmentami końcowymi DNA. Takiej preferencji nie wykazuje Ku70/80, które wiąże się ze wszystkimi możliwymi do wystąpienia w przypadku pęknięcia dwóch nici DNA końcami [22]. Struktura końców DNA może mieć, obok fazy cyklu komórkowego w której wystąpiło uszkodzenie, decydujący wpływ na wybór systemu naprawy [23, 24]. Wzrost efektywności naprawy DSB poprzez rekombinację homologiczną u mutantów z wyłączonymi genami kodującymi białka systemu NHEJ sugeruje łączną kontrolę nad obydwoma systemami naprawy [25].

Pęknięcia dwuniciowe DNA mogą powodować powstawanie następujących struktur końcowych DNA (Rys. 2): końce nieligowalne (fosfoglikolany, zablokowane końce nie podlegające ligacji, uszkodzone nukleotydy, utracone lub zmodyfikowane chemicznie zasady); tępy koniec-jednoni-



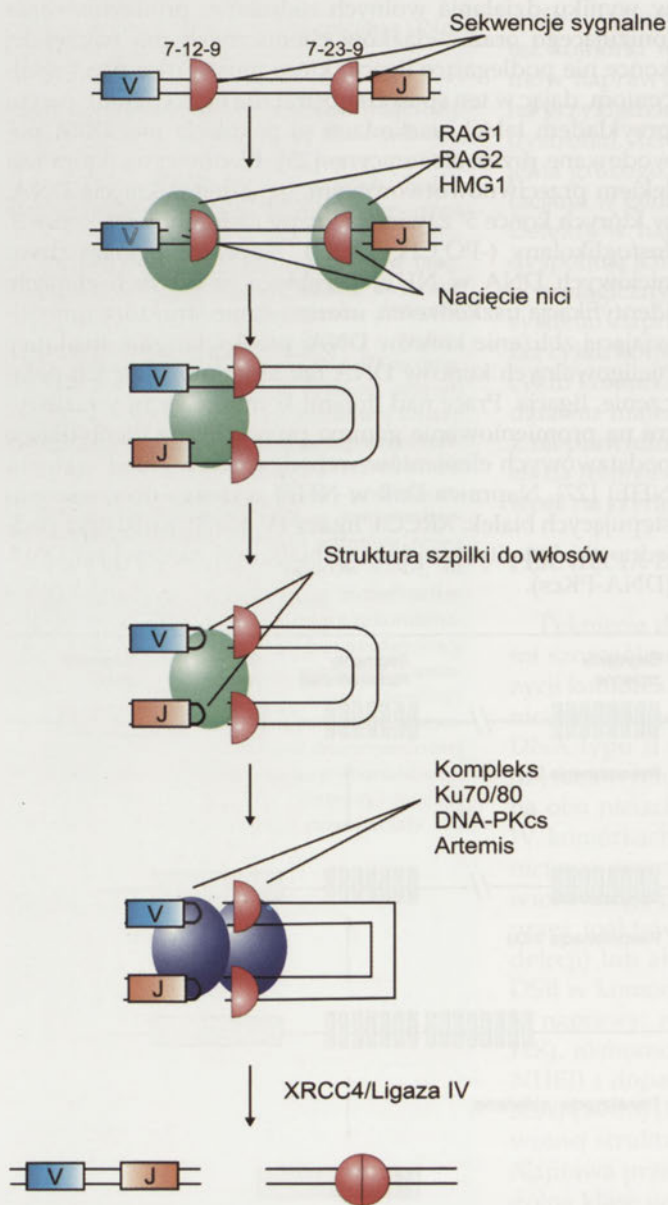
Rysunek 2. Struktura pęknięć dwuniciowych DNA i ich naprawa.

ciowe zakończenie 5' (5'ss); tępy koniec-3'ss; 3'ss-5'ss; końce o jednakowej polaryzacji. Większość DSB powstających w wyniku działania wolnych rodników, promieniowania jonizującego oraz związków chemicznych ma najczęściej końce nie podlegające ligacji, które muszą ulec przekształceniom, dając w ten sposób substrat dla ligazy. Modelowym przykładem takich uszkodzeń są pęknięcia nici DNA powodowane przez bleomycynę [25]. Bleomycyna, która jest lekiem przeciwnowotworowym, generuje pęknięcia DNA, w których końce 5' zawierają grupy fosforanowe a końce 3' fosfoglikolany (-PO₄CH₂COOH). Naprawa pęknięć dwuniciowych DNA w NHEJ przebiega w czterech etapach: identyfikacja uszkodzenia, uformowanie struktury umożliwiającej zbliżenie końców DNA, przekształcenie struktury nieligowalnych końców DNA tak aby umożliwić ich połączenie, ligacja. Prace nad liniami komórkowymi wrażliwymi na promieniowanie gamma pozwoliły na identyfikację podstawowych elementów wchodzących w skład systemu NHEJ [27]. Naprawa DSB w NHEJ wymaga obecności następujących białek: XRCC4, ligazy IV, Ku70, Ku80 oraz podjednostki katalitycznej kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PKcs).



Rysunek 3. Rekombinacja V(D)J. Opis w tekście.

Pęknięcia dwuniciowe DNA powstają nie tylko w wyniku działania czynników o charakterze chemicznym lub fizycznym, są także wprowadzane przez komórkę w sposób kontrolowany, podczas procesów rearanżacji genomowych. Procesy te zachodzą w trakcie różnicowania układu immunologicznego, w czasie którego dochodzi do wytworzenia funkcjonalnych genów immunoglobulin i receptorów limfocytów T. Geny kodujące przeciwciała składają się z wielu podobnych segmentów zmiennych V (ang. *variable*), segmentów różnorodności D (ang. *diversity*), segmentów łączących J (ang. *joining*) oraz fragmentu stałego C (ang. *constant*). W procesie rearanżacji następuje łączenie tych odcinków DNA, w wyniku czego powstaje wiele różnych genów. Pierwsze przegrupowanie następuje w *locus* łańcucha ciężkiego przeciwciał, gdzie dochodzi do połączenia jednego z segmentów D z jednym z segmentów J, z jednoczesnym usunięciem dzielącego te segmenty DNA. Następnie, jeden z wielu segmentów V łączy się z kom-



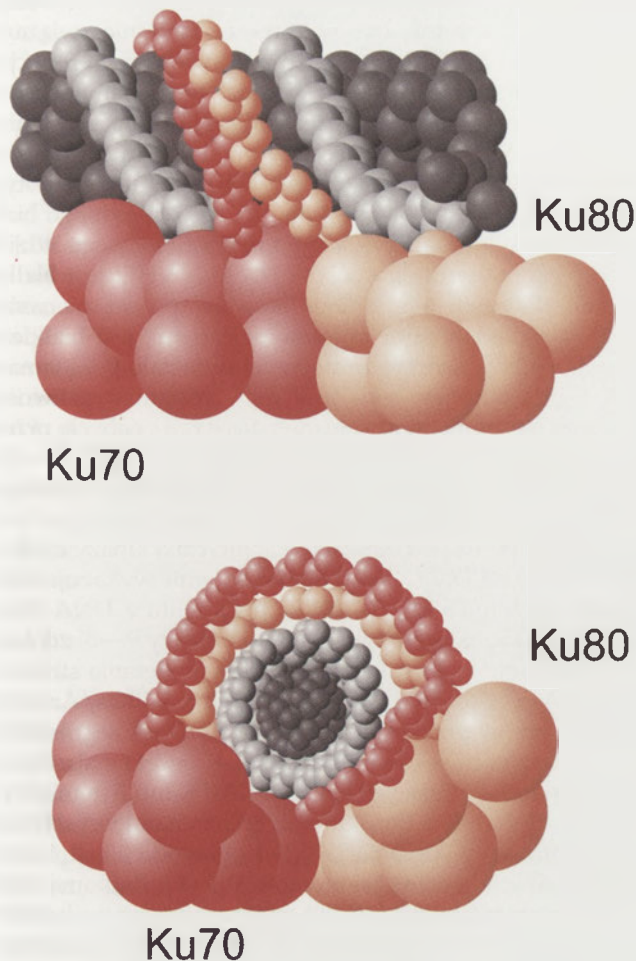
Rysunek 4. Łączenie segmentów V i J w rekombinacji V(D)J.

pleksem DJ, tworząc gen VDJ. W kolejnym etapie, w *locus* łańcucha lekkiego zachodzi rekombinacja somatyczna i przebiega według podobnego schematu, z tą różnicą, że jeden z segmentów V jest przyłączany tylko do jednego z segmentów J [26] (Rys. 3). Przegrupowanie genów Ig, polegające na wycinaniu odpowiednich odcinków DNA pomiędzy segmentami genów i ich łączeniu, zachodzi dzięki klasie enzymów określanym jako rekombinazy. Białka te, kodowane przez geny RAG1 i RAG2 (ang. *recombination-activating gene*), aktywują rekombinację [27]. Rozpoznają one specyficzne sekwencje sygnałowe znajdujące się w pozycji 3' wobec każdego segmentu V i w pozycji 5' wobec każdego segmentu J oraz po obu stronach segmentów D. Domeny te, o zachowanej w ewolucji sekwencji o wielkości 7- lub 9-nukleotydów, są oddzielone sekwencją zmienną, o długości 12 lub 23 nukleotydów. Rola heptamerów i nonamerów polega na tym, że rozpoznają one obszary komplementarne, dzięki czemu sekwencje sygnałowe ulegają zbliżeniu zgodnie z regułą 12-23. Reguła ta mówi, że rekombinacja zachodzi zawsze między DNA z 12-nukleotydowym rejonem a DNA z rejonem 23-nukleotydowym. W kolejnym etapie kompleks RAG wprowadza nacięcia obu nici DNA w tych sekwencjach, a powstające wolne końce przybierają strukturę szpilki do włosów, stanowiącą substrat dla NHEJ [11]. Wiązanie heterodimeru białek Ku z dwoma końcami DNA powoduje odłączenie białek RAG od DNA i przyłączenie kompleksu DNA-PKcs/Artemis. Kompleks ten w wyniku aktywności endonukleolitycznej otwiera strukturę szpilki do włosów oraz bierze udział w przekształcaniu końców DNA segmentów V, D oraz J. Ostatecznie, ligaza IV przy współudziale białka XRCC4 dokonują połączenia fragmentów DNA i utworzenia kompletnego genu VDJ [28] (Rys. 4). Obniżenie aktywności jednego z elementów systemu NHEJ prowadzi do wystąpienia zespołu ciężkiego złożonego niedoboru odporności SCID (ang. *severe combined immunodeficiency*), którego jednym z objawów jest zmniejszenie liczby limfocytów B i T [29, 30].

BIAŁKA NAPRAWY DNA PRZEZ NHEJ

KINAZA BIAŁKOWA ZALEŻNA OD DNA (DNA-PK)

DNA-PK jest wieloskładnikowym zespołem białek (holoenzymem) zbudowanym z heterodimeru Ku 70/80 oraz podjednostki katalitycznej DNA-PKcs o masie 469 kDa [31, 32]. Aktywność podjednostki katalitycznej DNA-PKcs ulega podwyższeniu poprzez jej oddziaływanie z heterodimerem Ku70/80, wykazującym wysokie powinowactwo do zakończeń DNA. Ku70/80 u człowieka składa się z dwóch podjednostek o masie 73 i 86 kDa [33]. Białka Ku są białkami jądrowymi występującymi u wszystkich eukariontów, zidentyfikowanymi po raz pierwszy jako autoantygeny rozpoznawane przez przeciwciała w chorobach autoimmunologicznych. Forma heterodimeryczna białek Ku tworzy symetryczną strukturę pierścienia która otacza DNA, oddziałującą z około 16-18 nukleotydowym fragmentem na jego końcu. Pierścień złożony z białek Ku potrafi przemieszczać się wzdłuż DNA [33, 34] (Rys. 5). Formowanie funkcjonalnego kompleksu DNA-PK zachodzi na wolnym końcu DNA. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* wykazano, że podjednostka katalityczna białkowej kinazy zależnej od DNA wiąże się z końcami DNA [35]. Proces ten



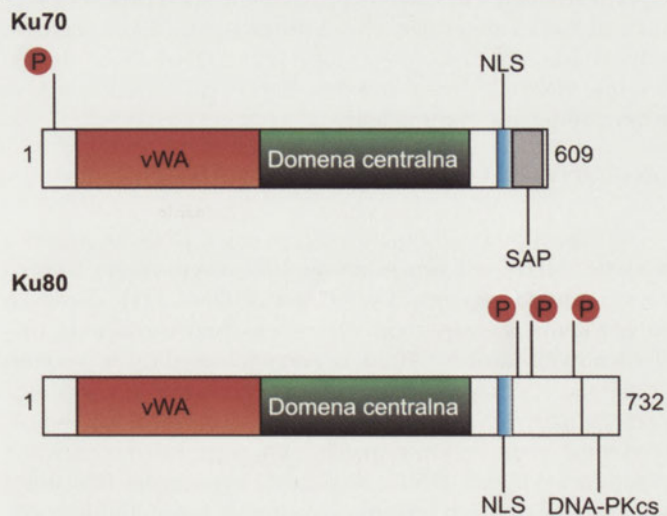
Rysunek 5. Pierścien białek Ku70/80 związany z końcem DNA.

nie wymaga obecności białek Ku, niemniej jednak przyłączenie Ku do DNA-PKcs powoduje ponad 100-krotne zmniejszenie stopnia dysocjacji DNA-PKcs od DNA [36]. W komórce w pierwszym etapie naprawy DSB w NHEJ do DNA przyłącza się heterodimer Ku70/80. Do powstałego kompleksu DNA-białko przyłącza się następnie DNA-PKcs, która przemieszcza białka Ku na końcu DNA o 10 pz. [37, 38]. Heterodimer Ku70/80 oddziałuje z DNA za pośrednictwem centralnego regionu (aminokwasy 261-505 Ku70 oraz 251-509 Ku80). Białka Ku wiążą się ze sobą za pośrednictwem domen von Willebranda (aminokwasy 7-260 Ku70 i 9-235 Ku80) [31, 38]. Region centralny oraz domena von Willebranda są regionami o znacznym stopniu homologii. Zasadnicze różnice w budowie białek Ku występują w ich końcach karboksylowych. Koniec C białka Ku70 zawiera motyw SAP, charakterystyczny dla większości białek jądrowych uczestniczących w procesach organizacji struktury chromosomów. Koniec COOH Ku80 zawiera domenę biorącą udział w wiązaniu podjednostki katalitycznej DNA-PKcs oraz jej aktywacji [38-41] (Rys. 6). DNA-PKcs ze względu na swoje właściwości biochemiczne zaliczana jest do białkowych kinaz serynowo-treoninowych, a obecność konserwatywnej domeny w jej strukturze pozwala zaklasyfikować ją do rodziny kinaz białkowych spokrewnionych z kinazami fosfatydylo-3-inozytolu (PIKK). Do tej samej rodziny należą białka ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (ang. *ATM- and RAD3-related*), biorące udział w reakcji komórki

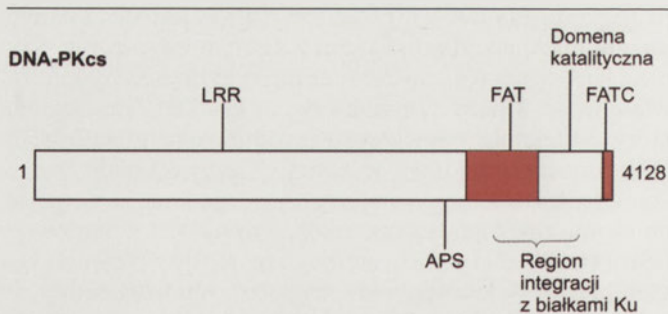
na uszkodzenia DNA [31, 42]. DNA-PKcs jest stosunkowo dużym białkiem, zbudowanym z 4129 aminokwasów. Koniec karboksylowy zawiera domenę odpowiedzialną za właściwości kinazy (aminokwasy 3645-4029) oraz region, który oddziałuje z białkami Ku (aminokwasy 3002-3850) [43]. Mutacje punktowe w końcu C prowadzą do wzrostu wrażliwości na promieniowanie gamma, wskazując na istotną rolę tego regionu białka DNA-PKcs w naprawie DSB [44, 45]. Na końcu aminowym zidentyfikowano region bogaty w leucynę, oraz fragment odpowiedzialny za autofosforylację DNA-PKcs [31] (Rys. 7). Obecność miejsca bogatego w leucyny może sugerować rolę tego fragmentu białka jako obszaru odpowiedzialnego za kontakt z innymi białkami niż Ku70/80, XRCC2 czy też ligaza IV. Trójwymiarowe struktury ATM i DNA-PKcs wykazują znaczny stopień podobieństwa [46, 47]. Obydwa białka wykazują charakterystyczną strukturę palca, która po „zaciśnięciu” wiąże DNA poprzez wytworzenie pierścienia otaczającego DNA oraz aktywuje oba białka, które są gotowe do fosforylacji kolejnych substratów [48].

KOMPLEKS LIGAZA IV/XRCC4

Kompleks ligaza IV/XRCC4 odpowiada za połączenie dwóch fragmentów DNA w końcowym etapie naprawy DSB przez system NHEJ. Inaktywacja ligazy IV lub białka XRCC4 u myszy prowadzi do śmierci zarodków w późnym stadium życia płodowego, której przyczyną są zaburzenia w dojrzewaniu układu odpornościowego i neurogeniezie [49-51]. Komórki z niesprawną ligazą IV lub XRCC4 wykazują wrażliwość na promieniowanie jonizujące i wadliwą rekombinację V(D)J [12]. Ligaza IV DNA jest enzymem o masie około 100 kDa, zależnym od ATP. Białko to w końcu N, zawierającym centrum aktywne, wykazuje znaczny stopień homologii z ligazami I i III. Porównanie sekwencji aminokwasowej białek ligazy I, III i IV wykazało znaczące różnice w budowie ich części karboksylowej [52]. W tym regionie ligazy IV zidentyfikowano dwa motywy BRCT (ang. *BRCA1 carboxy-terminal*) charakterystyczne dla białek spokrewnionych z białkiem BRCA1. Pomiędzy nimi znajduje się fragment biorący udział w oddziaływaniu z białkiem XRCC4



Rysunek 6. Strukturalna organizacja białek Ku. vWA - domena von Willebranda, P - miejsca fosforylacji przez DNA-PKcs, SAP - domena SAP, DNA-PKcs - miejsce wiązania podjednostki katalitycznej DNA-PKcs, NLS - domena sygnały jądrowego.



Rysunek 7. Strukturalna organizacja ludzkiego białka podjednostki katalitycznej kinazy zależnej od DNA (DNA-PKcs). LRR – region bogaty w leucynę, APS – miejsce autofosforylacji (aminokwasy Thr w pozycji 2609, 2638, 2647 i Ser w pozycji 2612, 2624, 3205), FAT, FATC – domeny charakterystyczne dla rodziny kinaz fosfotydylo-3-inozytolu (ATM, ATR, DNA-PKcs)

[53-55]. Kompleks ligaza IV/XRCC4 ma masę około 300kDa, co sugeruje, że jest tetramerem zbudowanym z dwóch cząsteczek ligazy IV i dwóch cząsteczek białka XRCC4 [56]. Wyniki badań biochemicznych oraz krystalograficznych sugerują jednak, że w komórce formowany jest raczej kompleks składający się z dwóch cząsteczek XRCC4 i jednej cząsteczki ligazy IV [57, 58]. Analiza trzeciorzędowej struktury białka XRCC4 wskazuje na istnienie w końcu N, struktury globularnej zawierającej motyw helisa-skreć-helisa, oddziałujący z DNA [58, 59]. XRCC4 oddziałuje z ligazą poprzez aminokwasy znajdujące się na końcu karboksylowym [53, 54]. XRCC4 może również tworzyć kompleks białkowy zbudowany z czterech cząsteczek XRCC4 połączonych ze sobą przez domenę C-terminalną w nieobecności ligazy IV. Nie jest jasna rola jaką spełnia w komórce tetramer ligaza IV/XRCC4. Jednakże jego zdolność do wiązania się z końcami DNA oraz jednoniciowymi pęknięciami DNA, jak i poważne zaburzenia funkcji komórek obserwowane u mutantów z wyłączonym genem kodującym białko XRCC4 sugeruje jego inne funkcje, poza udziałem w NHEJ [57, 60]. Białko XRCC4 ulega fosforylacji *in vitro* przez DNA-PKcs [61]. Reakcja ta powoduje zmniejszenie powinowactwa XRCC4 do DNA, co sugeruje że oddziaływanie pomiędzy DNA a XRCC4, występującym zarówno w formie tetrameru jak i kompleksu białkowego z ligazą IV, są kontrolowane przez DNA-PKcs [57]. Hipoteza ta pozostaje w sprzeczności z wynikami badań sugerujących, że mutacja XRCC4 w regionie odpowiedzialnym za fosforylację przez DNA-PKcs nie powoduje nabycia przez komórkę fenotypu wrażliwego na promieniowanie gamma [64].

ARTEMIS – GRECKA BOGINI OPIEKI NAD DZIEĆMI

Naprawa podwójnociowych pęknięć DNA za pomocą systemu NHEJ jest procesem niedokładnym, który bardzo często powoduje zmiany w sekwencji DNA [11]. Zjawisko to jest spowodowane poprzez proces przekształcenia nieligowalnych końców DNA o złożonej strukturze w końce mogące podlegać łączeniu (ligacji). Proces ten wymaga szeregu różnych reakcji takich jak: usuwanie lub wprowadzenie grup fosforanowych, skracanie lub wydłużanie pojedynczych nici DNA. Reakcje te wymagają obecności wielu różnorodnych enzymów: fosfataz, kinaz, nukleaz czy też polimeraz DNA [24]. Badania komórek wrażliwych na promieniowanie jonizujące pozwoliły na zidentyfikowanie zaledwie kilku białek odpowiedzialnych za modyfikację

końców DNA podczas naprawy DSB przez system NHEJ, co sugeruje, że pełnią one w komórce inne, nie związane bezpośrednio z NHEJ a istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki funkcje (w związku z tym ich mutacja powoduje śmierć komórki), lub też istnieje kilka białek pełniących podobne funkcje w procesie przekształcania końców nieligowalnych (które nawzajem się uzupełniają i fenotyp nieprawidłowy jest maskowany, gdy funkcję jednego białka przejmuje inne). Przykładem enzymu biorącego udział w procesie modyfikacji końców DNA w NHEJ jest białko Artemis. Czynnikiem ten, zidentyfikowany po raz pierwszy u dzieci z niedoborami immunologicznymi, jest białkiem o masie 70 kDa należącym do rodziny metalo- β -laktamaz. Brak tego białka jest związany ze wzrostem wrażliwości komórek na promieniowanie jonizujące oraz nabycie przez komórki fenotypu charakterystycznego dla SCID [29, 62-64]. Aktywacja Artemis odbywa się poprzez utworzenie kompleksu z białkiem DNA-PKcs, i następującą po tym fosforylację przez podjednostkę katalityczną kinazy białkowej zależnej od DNA. Samo białko Artemis wykazuje właściwości egzonukleazy 5'→3'. W połączeniu z DNA-PKcs Artemis wykazuje właściwości endonukleazy 5'→3' zdolnej do przycinania lepkich końców 5' oraz otwierania struktury szpilki do włosów [28]. Kompleks DNA-PKcs/Artemis bierze udział w przekształcaniu końców DNA segmentów V, D i J w procesie rekombinacji V(D)J. Komórki mające mutacje w genach kodujących białka DNA-PK lub Artemis wykazują podobny fenotyp, którego cechą charakterystyczną jest niesprawna rekombinacja V(D)J z powodu niezdolności do modyfikacji końców segmentów V, D i J. Znikoma ilość połączonych segmentów V(D)J zaobserwowana w komórkach pozbawionych Artemis, ma charakterystyczne, długie jednoniciowe trakty nukleotydowe, powstające w przypadku nieprawidłowej modyfikacji struktur drugorzędowych DNA [30, 65]. Za przekształcania struktury końców DNA przez Artemis odpowiedzialna jest domena złożona z 385 aminokwasów znajdujących się na jego końcu N [66]. Artemis jest białkiem, którego rola nie ogranicza się tylko do modyfikacji końców w rozwoju układu immunologicznego, bierze również udział w procesie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [66]. Kompleks Artemis/DNA-PKcs odpowiada za przycinanie jednoniciowych zakończeń DNA z utworzeniem struktury tępego końca, umożliwiając tym samym późniejsze połączenie dwóch fragmentów DNA katalizowane przez kompleks ligaza IV/XRCC4 [11].

INNE BIAŁKA NHEJ

Inną modyfikacją jednoniciowych zakończeń DNA jest ich przekształcenie do tępych końców poprzez syntezę drugiej nici. Powstała w ten sposób cząsteczka DNA zakończona tępym końcem jest docelowym substratem dla kompleksu ligazy IV z białkiem XRCC4. Proces wypełniania jednoniciowych zakończeń DNA przeprowadzają enzymy o aktywności polimerazy DNA zależnej od DNA. Dotychczas zidentyfikowano trzy typy polimeraz z rodziny pol X uczestniczących w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA z udziałem systemu NHEJ. Jedną z nich jest terminalna transferaza deoksynukleotydowa (TdT). Enzym ten dodaje nukleotydy do jednoniciowego zakończenia 3' DNA oraz ma zdolność do oddziaływania z kluczowymi białkami systemu NHEJ: Ku oraz DNA-PKcs [67-69]. TdT jest

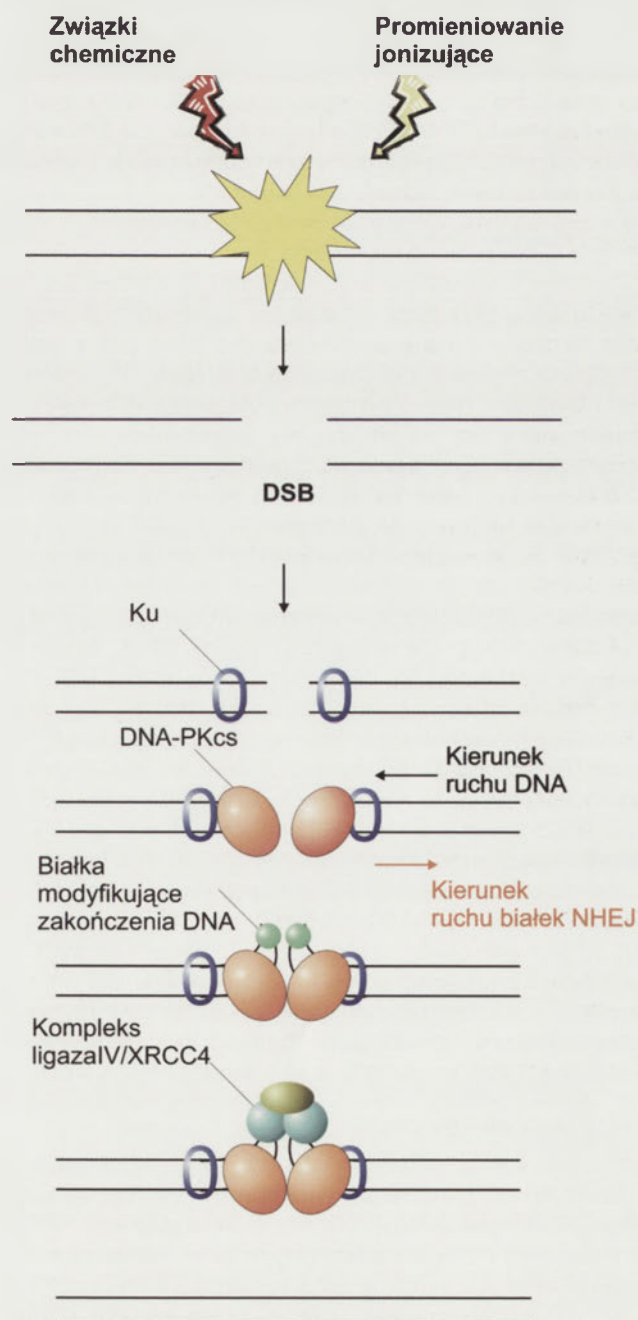
enzymem charakterystycznym dla komórek limfoidalnych, wydaje się więc, że jego rola w NHEJ ogranicza się tylko do rekombinacji V(D)J. Kolejną polimerazą uczestniczącą w procesie różnicowania komórek układu immunologicznego jest polimeraza mi (pol μ) (ang. *polymerase mu*). Myszy pozbawione genu kodującego pol μ wykazywały nieprawidłowości w rejonie łańcucha lekkiego immunoglobulin spowodowane zaburzeniami procesu rekombinacji V(D)J [70, 71]. W naprawie dwuniciowych pęknięć DNA powstałych w wyniku działania procesów niefizjologicznych bierze udział inna polimeraza – polimeraza lambda (pol λ). Aktywacja tej polimerazy następuje poprzez kontakt z kompleksem ligaza IV/XRCC4 poprzez N-terminalną część białka pol λ – domenę BRCT, w sposób analogiczny do aktywacji pol λ . Analiza mutantów białka pol μ wykazała, że za właściwości enzymatyczne tej polimerazy odpowiedzialny jest region bogaty w aminokwas prolinę [72, 73]. Usunięcie pol λ – z ekstraktów HeLa powodowało zahamowanie reakcji łączenia wolnych końców DNA *in vitro* [70, 74]. Innym białkiem biorącym udział w przekształcaniu struktury wolnych końców powstałych w wyniku dwuniciowych pęknięć DNA jest kinaza polinukleotydomowa (PNK) [75]. Białko to wykazuje właściwości 5' kinazy oraz 3' fosfatazy DNA. PNK ulega aktywacji poprzez fosforylację przez XRCC4 lub DNA-PKcs. Ostatnie badania wskazują, że fosforylacja kinazy polinukleotydomowej zachodzi poprzez oddziaływanie z XRCC4 (który wymaga wcześniejszej aktywacji przez kinazę białkową CK-2) poprzez domenę FHA [76]. Region ten jest odpowiedzialny za wiązanie ufosforylowanych substratów i jest charakterystyczny dla białek aktywowanych przez białka rodziny XRCC [77]. Zahamowanie oddziaływania pomiędzy PNK a XRCC4 prowadzi do wzrostu wrażliwości komórek na promieniowanie gamma oraz spowalnia tempo naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [78].

ODDZIAŁYWANIA DNA-BIAŁKO PODCZAS NAPRAWY NIEHOMOLOGICZNEGO ŁĄCZENIA WOLNYCH KOŃCÓW DNA

ROZPOZNIANIE USZKODZENIA DNA

W początkowym etapie naprawy z udziałem systemu NHEJ uszkodzenie DNA rozpoznawane jest przez heterodimer Ku (Rys. 8). Związanie białka Ku z końcami DNA stymuluje przyłączenie DNA-PKcs. Podjednostka DNA-PKcs przyłączająca się w miejsce uszkodzenia „spycha” heterodimer Ku na DNA o 10 pz. W efekcie tego procesu cały kompleks kinazy białkowej zajmuje około 30-nukleotydowy fragment DNA na jego końcach. W następstwie utworzenia holoenzymu DNA-PK dochodzi do aktywacji jego podjednostki katalitycznej. Aktywacja ta, stymulowana przez białka Ku, ma miejsce tylko wtedy, kiedy DNA jest dłuższe niż 26 pz. Znaczenie aktywacji podjednostki katalitycznej DNA-PK dla prawidłowego przebiegu NHEJ potwierdziły badania z wykorzystaniem inhibitora aktywności kinazowej DNA-PK wortmanniny oraz mutantów tego białka w domenie odpowiedzialnej za właściwości kinazy [79, 80]. W wyniku uruchomienia aktywności kinazowej następuje autofosforylacja DNA-PKcs i fosforylacja innych białek biorących udział w naprawie NHEJ, oraz białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego i apoptozie [32]. Identyfikacja substratów dla DNA-PK została w większości

przypadków przeprowadzona *in vitro*, nie jest więc jasne czy procesy te zachodzą *in vivo* i czy mają znaczenie fizjologiczne [81-83]. Hipoteza, że DNA-PKcs jest jednym ze składników białkowych pośredniczących w przekazywaniu sygnałów komórkowych w odpowiedzi na uszkodzenia DNA lub modulujących fazy cyklu komórkowego wymaga potwierdzenia. Nie wykazano bowiem dotychczas związku pomiędzy zmianami aktywności białka p53 czy ATM, a brakiem DNA-PKcs, pomimo wykazania w badaniach *in vitro* fosforylacji tych białek przez DNA-PKcs [82]. Bardziej przekonująca jest teza, że DNA-PKcs bierze udział w procesie naprawy pęknięć dwuniciowych przez system NHEJ w sposób bezpośredni jako element łączący dwie cząsteczki DNA, poprzez wiązania z heterodimerami Ku umieszczonymi na końcach DNA (analogicznie do mostu łączącego



Rysunek 8. Mechanizm naprawy DSB przez NHEJ.

dwie drogi znajdujące się na przeciwległych stronach rzeki, gdzie przeszła mostu stanowią białka Ku, zaś DNA-PKcs tworzy kładkę) [84-86, 92]. Taki model działania DNA-PKcs wydaje się jednak nieprawdziwy, gdyż nie pozostawia miejsca dla działania enzymów, które muszą zmodyfikować końce DNA tak, aby podlegały wydajnemu procesowi łączenia przez ligazę IV.

Zgodnie z inną hipotezą DNA-PKcs w powiązaniu z białkami Ku pozostawia wolne końce DNA, które w kolejnym etapie naprawy NHEJ mogą ulec modyfikacji i następnie ligacji [85-89]. Badania *in vitro* z wykorzystaniem substratów reakcji NHEJ wykazały, że w obecności DNA-PKcs następuje przewaga reakcji międzycząsteczkowej nad reakcją wewnątrzcząsteczkową [90]. Zjawisko to następuje nawet wówczas, gdy substrat dla białek systemu NHEJ jest obecny w środowisku w małym stężeniu, przy którym przeważa ligacja wewnątrzcząsteczkowa. Dane te sugerują, że DNA-PKcs najprawdopodobniej spina dwa końce tej samej cząsteczki uniemożliwiając tym samym ich połączenie, jednocześnie czyniąc je dostępnymi dla końców należących do innej cząsteczki DNA. Spekulacje odnośnie roli DNA-PKcs w naprawie NHEJ powinno przerwać poznanie i opisanie trójwymiarowej struktury tego białka.

MODYFIKACJE KOŃCÓW DNA

Jednym z głównych problemów powstających w procesie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA przez system NHEJ jest obecność nieligowalnych końców, które muszą ulec modyfikacji przed procesem połączenia. W komórkach prokariotów oraz u drożdży nie zidentyfikowano białek biorących udział w modyfikacji końców DNA w procesie NHEJ, pomimo istnienia eukariotycznych odpowiedników innych składników tego systemu (Ku, Ligaza IV/XRCC4) [97-100]. Najprawdopodobniej głównym systemem naprawy DSB w tych organizmach jest rekombinacja homologiczna, a NHEJ służy wyłącznie do naprawy prostych uszkodzeń DNA (zawierających końce DNA dające się połączyć bezpośrednio, bez modyfikacji). Brak DNA-PKcs w tych komórkach sugeruje, że białko to u wyższych eukariotów może pełnić funkcję regulatorową i decydować o drodze przekształcania wolnych końców będących substratem dla systemu NHEJ. Spekulacje na temat takiej roli DNA-PKcs wydają się być w pełni uzasadnione wynikami badań z użyciem substratów zawierających tępe końce [91]. Takie uszkodzenia są wydajnie naprawiane w komórkach pozbawionych DNA-PKcs. Można postawić hipotezę, że DNA-PKcs pełni rolę stymulującą, ale nie jest czynnikiem niezbędnym w naprawie DSB zawierających końce, których komórka nie musi modyfikować przed kolejnym etapem procesu naprawy czyli ligacji. Naprawa skomplikowanych uszkodzeń DNA wymaga jednak obecności DNA-PKcs.

LIGACJA KOŃCÓW DNA

Efektywność procesu łączenia końców DNA *in vivo* zależy od aktywności kompleksu ligazy IV z białkiem XRCC4. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* zaobserwowano, że proces ten może przebiegać także z udziałem ligazy I lub ligazy III. Łączenie końców DNA przez kompleks ligaza IV/XRCC4 najefektywniej zachodzi w obecności białek Ku

[92]. Fakt ten potwierdzono w badaniach *in vitro*, gdzie zaobserwowano wzrost wydajności reakcji łączenia końców stymulowanych przez oczyszczony kompleks ligazy IV/XRCC4, po dodaniu ekstraktu komórkowego zawierającego inne składniki systemu NHEJ [56]. Analogicznie po usunięciu z ekstraktu białka Ku lub DNA-PK następował znaczący spadek efektywności reakcji ligacji substratów DNA. Analiza EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*) wykazała oddziaływanie pomiędzy heterodimerem złożonym z białek Ku a kompleksem ligaza IV/XRCC4 [92]. Szacuje się, że wzajemne oddziaływanie pomiędzy tymi białkami przyspieszają proces ligacji około 20 razy. Podobne oddziaływanie zaobserwowano u drożdżowych odpowiedników ludzkich białek Ku oraz XRCC4 [85, 93]. Wydaje się więc, że podstawowy zestaw białek systemu NHEJ (Ku, DNA-PK, ligaza IV i XRCC4) warunkuje wydajną naprawę dwuniciowych pęknięć DNA [94]. Oprócz kilku podstawowych białek NHEJ, zidentyfikowano ostatnio kilka innych, zwiększających efektywność naprawy DSB. Jednym z nich jest białko zespołu Wernera (WRN), którego cechą charakterystyczną jest przedwczesne starzenie oraz zwiększona częstotliwość występowania nowotworów w porównaniu do osób o prawidłowym genotypie. Choroba ta jest spowodowana mutacjami w genie kodującym białko WRN. Białko to wykazuje aktywność helikazy oraz egzonukleazy 3'→5' [95, 96] i oddziałuje z białkami Ku, blokując tym samym miejsce dla DNA-PKcs [97]. Ponadto do stymulacji aktywności egzonukleolitycznej białka WRN niezbędne jest wiązanie z Ku, co sugeruje, że WRN może być jednym z elementów systemu NHEJ [97-101]. Myszy z wyłączonym genem kodującym odpowiednik białka WRN człowieka nie wykazują jednak fenotypu wrażliwego na promieniowanie jonizujące, który jest charakterystyczny dla komórek z wadliwym systemem NHEJ [112]. Sugeruje to, że białko WRN nie jest niezbędnym czynnikiem NHEJ i pełni jedynie funkcje pomocnicze w procesie naprawy uszkodzeń DNA przez niehomologiczne łączenie wolnych końców. Podobną funkcję jak białko WRN może pełnić również kompleks Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN). Kompleks ten jest odpowiedzialny za rozpoznanie uszkodzenia DNA w procesie naprawy DSB przez rekombinację homologiczną [12]. Zaobserwowano *in vitro*, że dodanie MRN do ekstraktów komórek HeLa stymuluje naprawę przez rekombinację niehomologiczną, co pozwala przypuszczać, że kompleks ten może pełnić podobną rolę jak WRN w NHEJ [102]. Na uwagę zasługuje fakt, że podobne funkcje jak WRN i MRN pełni również czynnik niebiałkowy. Wykazano, że heksofosforan inozytoli oddziałuje z białkami Ku, co skutkuje zwiększoną aktywnością naprawy dwuniciowych pęknięć DNA na drodze rekombinacji niehomologicznej [89, 103, 104].

UWAGI KOŃCOWE

Zrozumienie i poznanie wszystkich aspektów NHEJ może pozwolić na skuteczne leczenie wielu chorób. Jedną z takich chorób jest AIDS, która jest spowodowana infekcją retrowirusem upośledzenia odporności. Wykazano, że wydajna integracja wirusowego cDNA do genomu gospodarza zachodzi w komórkach z efektywnym systemem NHEJ [105, 106]. Mutacje w genach kodujących podstawowe białka NHEJ (DNA-PKcs, Ku, Ligaza IV, XRCC4) oraz pomocnicze (MRN) powodowały spadek częstości integracji wirusowe-

go cDNA z genomem gospodarza [105, 107]. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują, że białka NHEJ mogą stanowić cel w terapii skierowanej przeciwko zakażeniom reowirusowym. Równie interesującą propozycją wydaje się być wykorzystanie białek NHEJ jako celu w leczeniu chorób nowotworowych. Hamowanie aktywności NHEJ w komórkach nowotworowych uczyła je na radioterapię i chemioterapię z użyciem leków uszkadzających DNA, takie jak bleomycyna czy inhibitory topoizomerazy II. Badania z wykorzystaniem inhibitora DNA-PK - NU7026 (2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one), wykazały znaczący wzrost cytotoksycznego efektu inhibitorów topoizomerazy II na komórki białaczkowe [108]. Podobny efekt zaobserwowano stosując siRNA dla mRNA DNA-PKcs [109] oraz Mre11 [111]. Komórki nowotworowe z wprowadzonym wektorem plazmidowym zawierającym geny kodujące siRNA skierowane przeciwko DNA-PKcs oraz Mre11 wykazywały zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące. Zastosowanie takiej strategii umożliwi zmniejszenie dawki niezbędnej do osiągnięcia pozytywnego efektu radioterapii. Pełniejsze poznanie mechanizmu NHEJ, w szczególności dalsza identyfikacja kluczowych dla tego szlaku białek, może pomóc w zastosowaniu terapii genowej u osób chorych na zespół ciężkiego złożonego niedoboru odporności, u którego podłoża leżą defekty w genach kodujących białka NHEJ [111]. Wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów topoizomerazy II sugerują istnienie alternatywnego szlaku naprawy DSB przez NHEJ niezależnego od DNA-PKcs, z udziałem PARP-1 i kompleksu XRCC1/ligaza III [112]. Rezultaty tych badań wskazują na następny, obok zastosowań klinicznych, kierunek dalszych badań nad NHEJ. Dalszych studiów wymagają również badania nad ochronną roli DNA-PK wobec zakończeń chromosomów - telomerów [113, 114].

PIŚMIENNICTWO

- Spivak G (2004) The many faces of Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15273-15274
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF (1998) ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 20: 398-400
- Mitra S, Narasimharao KL, Pathak IC (1983) Xeroderma pigmentosa. *J Indian Med Assoc* 81: 204-205
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD (2001) ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8: 1052-1065
- Khanna KK, Chenevix-Trench G (2004) ATM and Genome Maintenance: Defining Its Role in Breast Cancer Susceptibility. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 247-262
- Matsuura S, Kobayashi J, Tauchi H, Komatsu K (2004) Nijmegen breakage syndrome and DNA double strand break repair by NBS1 complex. *Adv Biophys* 38: 65-80
- Gennery AR, Slatter MA, Bhattacharya A, Barge D, Haigh S, O'Driscoll M, Coleman R, Abinun M, Flood TJ, Cant AJ, Jeggo PA (2004) The clinical and biological overlap between Nijmegen Breakage Syndrome and Fanconi anemia. *Clin Immunol* 113: 214-219
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27: 247-254
- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van G (1998) Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8: 483-489
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712-720
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196-206
- van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A (2002) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem* 383: 873-892
- Lin FL, Sperle K, Sternberg N (1990) Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Mol Cell Biol* 10: 113-119
- Sugawara N, Ira G, Haber JE (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 20: 5300-5309
- Davies AA, Friedberg EC, Tomkinson AE, Wood RD, West SC (1995) Role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision repair and recombination. *J Biol Chem* 270: 24638-24641
- Saparbaev M, Prakash L, Prakash S (1996) Requirement of mismatch repair genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 pathway of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142: 727-736
- Paques F, Haber JE (1997) Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 6765-6771
- Sugawara N, Haber JE (1992) Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* 12: 563-575
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497-5508
- Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398: 728-731
- Ristic D, Modesti M, Kanaar R, Wyman C (2003) Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 31: 5229-5237
- Labhart P (1999) Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur J Biochem* 265: 849-861
- Smith J, Baldeyron C, De O, I, Sala-Trepat M, Papadopoulou D (2001) The influence of DNA double-strand break structure on end-joining in human cells. *Nucleic Acids Res* 29: 4783-4792
- Povirk LF, Han YH, Steighner RJ (1989) Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry* 28: 5808-5814
- Ferguson SE, Thompson CB (1993) A new break in V(D)J recombination. *Curr Biol* 3: 51-53
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002) Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108: 781-794
- Moshous D, Pannetier C, Chasseval RR, Deist FF, Cavazzana-Calvo M, Romana S, Macintyre E, Canioni D, Brousse N, Fischer A, Casanova JL, Villartay JP (2003) Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest* 111: 381-387

30. Rooney S, Sekiguchi J, Zhu C, Cheng HL, Manis J, Whitlow S, DeVido J, Foy D, Chaudhuri J, Lombard D, Alt FW (2002) Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Mol Cell* 10: 1379-1390
31. Lees-Miller SP, Meek K (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85: 1161-1173
32. Smith GC, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916-934
33. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607-614
34. Chai W, Ford LP, Lenertz L, Wright WE, Shay JW (2002) Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem* 277: 47242-47247
35. Hammarsten O, Chu G (1998) DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 525-530
36. West RB, Yaneva M, Lieber MR (1998) Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Mol Cell Biol* 18: 5908-5920
37. Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16: 5098-5112
38. Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27: 4679-4686
39. Gell D, Jackson SP (1999) Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res* 27: 3494-3502
40. Marangoni E, Foray N, O'Driscoll M, Douc-Rasy S, Bernier J, Bourhis J, Jeggo P (2000) A Ku80 fragment with dominant negative activity imparts a radiosensitive phenotype to CHO-K1 cells. *Nucleic Acids Res* 28: 4778-4782
41. Singleton BK, Torres-Arzayus MI, Rottinghaus ST, Taccioli GE, Jeggo PA (1999) The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol Cell Biol* 19: 3267-3277
42. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
43. Jin S, Kharbanda S, Mayer B, Kufe D, Weaver DT (1997) Binding of Ku and c-Abl at the kinase homology region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *J Biol Chem* 272: 24763-24766
44. Errami A, Overkamp WJ, He DM, Friedl AA, Gell DA, Eckardt-Schupp F, Jackson SP, Hendrickson EA, Lohman PH, Zdzienicka MZ (2000) A new X-ray sensitive CHO cell mutant of ionizing radiation group 7, XR-C2, that is defective in DSB repair but has only a mild defect in V(D)J recombination. *Mutat Res* 461: 59-69
45. Woods T, Wang W, Convery E, Errami A, Zdzienicka MZ, Meek K (2002) A single amino acid substitution in DNA-PKcs explains the novel phenotype of the CHO mutant, XR-C2. *Nucleic Acids Res* 30: 5120-5128
46. Leuther KK, Hammarsten O, Kornberg RD, Chu G (1999) Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA. *EMBO J* 18: 1114-1123
47. Llorca O, Rivera-Calzada A, Grantham J, Willison KR (2003) Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA. *Oncogene* 22: 3867-3874
48. Boskovic J, Rivera-Calzada A, Maman JD, Chacon P, Willison KR, Pearl LH, Llorca O (2003) Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs. *EMBO J* 22: 5875-5882
49. Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T (1998) Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol* 8: 1395-1398
50. Frank KM, Sekiguchi JM, Seidl KJ, Swat W, Rathbun GA, Cheng HL, Davidson L, Kangaloo L, Alt FW (1998) Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 396: 173-177
51. Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, Davidson L, Ferrini R, Stamato T, Orkin SH, Greenberg ME, Alt FW (1998) A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 95: 891-902
52. Tomkinson AE, Mackey ZB (1998) Structure and function of mammalian DNA ligases. *Mutat Res* 407: 1-9
53. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 7: 588-598
54. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388: 492-495
55. Grawunder U, Zimmer D, Leiber MR (1998) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol* 8: 873-876
56. Lee KJ, Huang J, Takeda Y, Dynan WS (2000) DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J Biol Chem* 275: 34787-34796
57. Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, van de RM, Gellert M, Yang W, Kanaar R (2003) Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol* 334: 215-228
58. Sibanda BL, Critchlow SE, Begun J, Pei XY, Jackson SP, Blundell TL, Pellegrini L (2001) Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct Biol* 8: 1015-1019
59. Junop MS, Modesti M, Guarne A, Ghirlando R, Gellert M, Yang W (2000) Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. *EMBO J* 19: 5962-5970
60. Modesti M, Hesse JE, Gellert M (1999) DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *EMBO J* 18: 2008-2018
61. Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998) The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273: 1794-1801
62. Li L, Moshous D, Zhou Y, Wang J, Xie G, Salido E, Hu D, de Villartay JP, Cowan MJ (2002) A founder mutation in Artemis, an SNM1-like protein, causes SCID in Athabaskan-speaking Native Americans. *J Immunol* 168: 6323-6329
63. Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le DF, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP (2001) Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105: 177-186
64. Noordzij JG, Verkaik NS, van der Burg M, van Veelen LR, de Bruin-Versteeg S, Wiegant W, Vossen JM, Weemaes CM, de Groot R, Zdzienicka MZ, van Gent DC, van Dongen JJ (2003) Radiosensitive SCID patients with Artemis gene mutations show a complete B-cell differentiation arrest at the pre-B-cell receptor checkpoint in bone marrow. *Blood* 101: 1446-1452
65. Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J, Fugmann S, Ferguson DO, Schatz DG, Sekiguchi J (2003) Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197: 553-565

66. Poinsignon C, Moshous D, Callebaut I, de CR, Villey I, de Villartay JP (2004) The metallo-beta-lactamase/beta-CASP domain of Artemis constitutes the catalytic core for V(D)J recombination. *J Exp Med* 199: 315-321
67. Bogue MA, Wang C, Zhu C, Roth DB (1997) V(D)J recombination in Ku86-deficient mice: distinct effects on coding, signal, and hybrid joint formation. *Immunity* 7: 37-47
68. Mahajan KN, Gangi-Peterson L, Sorscher DH, Wang J, Gathy KN, Mahajan NP, Reeves WH, Mitchell BS (1999) Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13926-13931
69. Mickelsen S, Snyder C, Trujillo K, Bogue M, Roth DB, Meek K (1999) Modulation of terminal deoxynucleotidyltransferase activity by the DNA-dependent protein kinase. *J Immunol* 163: 834-843
70. Bertocci B, De SA, Berek C, Weill JC, Reynaud CA (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* 19: 203-211
71. Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22: 5194-5202
72. Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh CL, Schwarz K, Lieber MR (2004) A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining. *Mol Cell* 16: 701-713
73. Fan W, Wu X (2004) DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 1328-1333
74. Lee JW, Blanco L, Zhou T, Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel TA, Wang Z, Povirk LF (2004) Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* 279: 805-811
75. Chappell C, Hanakahi LA, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, West SC (2002) Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J* 21: 2827-2832
76. Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, Weinfeld M, Durocher D (2004) Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 23: 3874-3885
77. Date H, Igarashi S, Sano Y, Takahashi T, Takahashi T, Takano H, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O (2004) The FHA domain of aprataxin interacts with the C-terminal region of XRCC1. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1279-1285
78. Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, Weinfeld M, Durocher D (2004) Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 23: 3874-3885
79. Kienker LJ, Shin EK, Meek K (2000) Both V(D)J recombination and radioresistance require DNA-PK kinase activity, though minimal levels suffice for V(D)J recombination. *Nucleic Acids Res* 28: 2752-2761
80. Kurimasa A, Kumano S, Boubnov NV, Story MD, Tung CS, Peterson SR, Chen DJ (1999) Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol Cell Biol* 19: 3877-3884
81. Gurley KE, Kemp CJ (2001) Synthetic lethality between mutation in Atm and DNA-PK(cs) during murine embryogenesis. *Curr Biol* 11: 191-194
82. Lakin ND, Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18: 7644-7655
83. Sekiguchi J, Ferguson DO, Chen HT, Yang EM, Earle J, Frank K, Whitlow S, Gu Y, Xu Y, Nussenzweig A, Alt FW (2001) Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3243-3248
84. Bliss TM, Lane DP (1997) Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J Biol Chem* 272: 5765-5773
85. Kysela B, Doherty AJ, Chovanec M, Stiff T, Meer-Beg SM, Vojnovic B, Girard PM, Jeggo PA (2003) Ku stimulation of DNA ligase IV-dependent ligation requires inward movement along the DNA molecule. *J Biol Chem* 278: 22466-22474
86. Ramsden DA, Gellert M (1998) Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J* 17: 609-614
87. Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B (1999) The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* 274: 7848-7856
88. Chen L, Trujillo K, Sung P, Tomkinson AE (2000) Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275: 26196-26205
89. Hanakahi LA, Bartlett-Jones M, Chappell C, Pappin D, West SC (2000) Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell* 102: 721-729
90. Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res* 31: 7238-7246
91. van Heemst D, Brugmans L, Verkaik NS, van Gent DC (2004) End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair* 3: 43-50
92. Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20: 2996-3003
93. Teo SH, Jackson SP (2000) Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks. *Curr Biol* 10: 165-168
94. Hsu HL, Yannone SM, Chen DJ (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair* 1: 225-235
95. Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA (1997) The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17: 100-103
96. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-262
97. Li B, Comai L (2001) Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex. *J Biol Chem* 276: 9896-9902
98. Cooper MP, Machwe A, Orren DK, Brosh RM, Ramsden D, Bohr VA (2000) Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* 14: 907-912
99. Karmakar P, Piotrowski J, Brosh RM, Jr., Sommers JA, Miller SP, Cheng WH, Snowden CM, Ramsden DA, Bohr VA (2002) Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 18291-18302
100. Li B, Comai L (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 30: 3653-3661
101. Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J, Chen DJ (2001) Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276: 38242-38248
102. Huang J, Dynan WS (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* 30: 667-674

103. Hanakahi LA, West SC (2002) Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *EMBO J* 21: 2038-2044
104. Ma Y, Lieber MR (2002) Binding of inositol hexakisphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs. *J Biol Chem* 277: 10756-10759
105. Daniel R, Greger JG, Katz RA, Taganov KD, Wu X, Kappes JC, Skalka AM (2004) Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* 78: 8573-8581
106. Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, Lieber M, Martin SL, Bushman FD (2001) Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J* 20: 3272-3281
107. Kilzer JM, Stracker T, Beitzel B, Meek K, Weitzman M, Bushman FD (2003) Roles of host cell factors in circularization of retroviral dna. *Virology* 314: 460-467
108. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, Durkacz BW (2004) A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103: 4659-4665
109. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, Dewese TL (2003) Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res* 63: 1550-1554
110. Xu M, Myerson RJ, Hunt C, Kumar S, Moros EG, Straube WL, Roti Roti JL (2004) Transfection of human tumour cells with Mre11 siRNA and the increase in radiation sensitivity and the reduction in heat-induced radiosensitization. *Int J Hyperthermia* 20: 157-162
111. Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR (2003) Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays* 25: 1061-1070
112. Audebert M, Salles B, Calsou P (2004) Involvement of PARP-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279: 55117-26
113. Bailey SM, Brenneman MA, Halbrook J, Nickoloff JA, Ullrich RL, Goodwin EH (2004) The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA Repair* 3: 225-233
114. Espejel S, Martin M, Klatt P, Martin-Caballero J, Flores JM, Blasco MA (2004) Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep* 5: 503-509

Non-homologous DNA end joining

Tomasz Popławski, Janusz Błasiak✉

Department of Molecular Genetics, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland
 ✉e-mail: janusz@biol.uni.lodz.pl

Key words: DNA double strand breaks, NHEJ

ABSTRACT

DNA double strand breaks (DSB) are the most serious form of DNA damage. Repair of DSBs is important to prevent chromosomal fragmentation, translocations and deletions. Non-homologous end joining (NHEJ) is one of three major pathways for the repair of DSBs in human cells. In this process two DNA ends are joined directly, usually with no sequence homology, although in the case of same polarity of the single stranded overhangs in DSBs, regions of microhomology are utilized. NHEJ is typically imprecise, a characteristic that is useful for immune diversification in lymphocytes in V(D)J recombination. The main components of the NHEJ system in eukaryotes are the catalytic subunit of DNA protein kinase (DNA-PKcs), Ku proteins, XRCC4, DNA ligase IV, and Artemis. This review focuses on the mechanisms and regulation of DSB repair by NHEJ in mammalian cells.

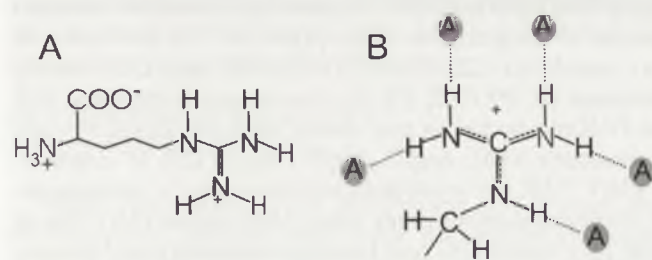
Oddziaływanie argininy z RNA

STRESZCZENIE

Oddziaływania pomiędzy aminokwasami a RNA, odgrywają istotną rolę w wielu systemach biologicznych. Na szczególną uwagę zasługuje oddziaływanie RNA z arginina, ponieważ grupa guanidylowa argininy może utworzyć pięć wiązań wodorowych z odpowiednio usytuowanymi grupami akceptorowymi w RNA. Arginina oddziałuje z wieloma tykami cząsteczek RNA, które wiążą ją z różną specyficznością i powinowactwem. Cząsteczki te nie wykazują między sobą żadnego podobieństwa w sekwencji nukleotydów. Jednym z najlepiej opisanych przykładów jest oddziaływanie pojedynczej reszty argininy w białku Tat wirusa HIV-1 z elementem TAR RNA. Ponadto wolna arginina może wiązać się także w centrum katalitycznym prekursora rybosomalnego RNA u orzęska *Tetrahymena* oraz z aptamerami argininowymi, wyizolowanymi z zastosowaniem metody selekcji *in vitro*.

WPROWADZENIE

Cząsteczki RNA uczestniczą w wielu procesach o fundamentalnym znaczeniu dla komórki, takich jak biosynteza białek, składanie i dojrzewanie RNA (dzięki własnej aktywności enzymatycznej), a także stanowią składnik rybonukleoprotein – rybosomów i spliceosomów. Cząsteczki RNA specyficznie oddziałując z białkami uczestniczą w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Jednym z aspektów wszechstronności RNA jest także jego zdolność do wiązania niskocząsteczkowych ligandów, np. aminokwasów [1]. Na szczególną uwagę zasługuje oddziaływanie RNA z arginina (Rys. 1A), która jest zdolna do tworzenia specyficznych wiązań z RNA. W pH 7 arginina charakteryzuje się ładunkiem dodatnim, co wydaje się odgrywać rolę w tworzeniu niespecyficznych wiązań z ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwasu nukleinowego [2]. Ponadto grupa guanidylowa argininy może utworzyć pięć specyficznych wiązań wodorowych (Rys. 1B) z odpowiednio usytuowanymi grupami akceptorowymi w RNA, na przykład grupą fosforanową, grupą 2'OH rybozy oraz z grupami zasad azotowych O-6, N-7 w guaninie lub O-4 w urydynie [3].



Rysunek 1. Cząsteczka argininy (A) oraz grupa guanidylowa argininy (B). Grupa guanidylowa argininy może tworzyć pięć wiązań wodorowych z odpowiednio usytuowanymi grupami akceptorowymi oznaczonymi literą A [22].

DOMENY BIAŁKOWE BOGATE W ARGININĘ SPECYFICZNIE ODDZIAŁUJĄCE Z RNA

W wielu białkach oddziaływujących z RNA, wyodrębnione zostały sekwencje o charakterze zasadowym o długości 10-20 reszt aminokwasów, bogate w reszty argininy, tak zwane ARMs (ang. *arginine rich motifs*), pośredniczące w specyficznym rozpoznawaniu struktur RNA [4, 5]. Sekwencje ARM nie wykazują wzajemnej homologii (Rys. 2). Ich wspólną cechą jest sposób oddziaływania i rozpoznawania właściwych struktur RNA. Pojedyncza reszta argininy lub ich kilka występujących w sekwencji ARM, może odpowiadać za specyficzne oddziaływanie z określoną sekwencją RNA. Sekwencje bogate w reszty argininy występują w wielu białkach wirusowych (np. w białkach Tat lub Gag) [4] oraz w białkach bakteriofagów (np. antyterminatorowe białko N faga P22) [4, 6]. Oddziaływanie białko-RNA, w którym pośredniczy ARM, jest niezbędne w procesie replikacji patogennych wirusów, np. HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus type 1*) i HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type 1). Sekwencje bogate w reszty argininy występują także w białkach prokariotycznych i eukariotycz-

Karina Błachnio[✉]

Anna Przykorska

[✉]Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Zakład Biosyntezy Białka, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; e-mail: karabo@ibb.waw.pl, tel. (22) 592 24 14

Artykuł otrzymano 25 listopada 2004 r
Artykuł zaakceptowano 28 lutego 2005 r.

Słowa kluczowe: L-arginina, ARM, TAR, Tat, SELEX, aptamer

Wykaz stosowanych skrótów: ARMs (ang. *arginine rich motifs*) – sekwencje bogate w reszty argininy; BIV (ang. *bovine immunodeficiency virus*) – bydłczy wirus niedoboru odporności immunologicznej; EIAV (ang. *equine infectious anemia virus*) – wirus zakaźnej anemii koni; HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus type 1*) – wirus niedoboru odporności immunologicznej typu 1 człowieka; HTLV-1 (ang. *human T-cell leukemia virus type 1*) – wirus białaczki limfocytów T typu 1 człowieka; pre-rRNA- prekursor rybosomalnego RNA; SELEX – metoda selekcji aptamerów *in vitro*; TAR (ang. *trans-activation-responsive element*) – rejon RNA wirusa, do którego przyłącza się białko Tat

Podziękowanie: Prace badawcze prowadzone przez Autorów są finansowane ze środków przyznanych przez Polsko-Francuskie Centrum Biotechnologii Roślin, ze środków migranta SBM-19/2003 oraz przyznanych przez Komitet Badań Naukowych na realizację projektu badawczego nr 2 P04A 002 86

HIV-1 Tat GRKKRRQRRR
BIV Tat RPRGTRGKGRRIRR
EIAV Tat LDASLRKKNKQRLK
HIV-1 Rev TRQARRNRRRRWRERQR
HTLV-1 Rex MPKTRRRPRRSQRKRP
P22 N KTRRHERRRKL
SSV Gag RERRRDRRQEK

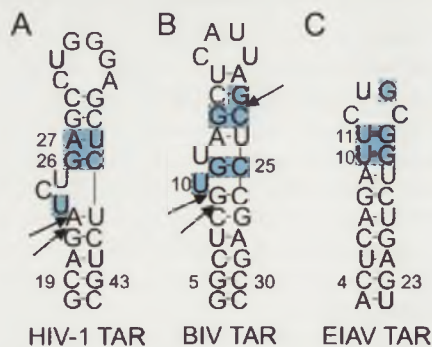
Rysunek 2. Sekwencje bogate w reszty argininy (ARM) obecne w białkach specyficznie oddziałujących z cząsteczkami RNA. Reszty argininy (R) zaznaczono kolorem żółtym [4, 5, 7, 22, 25, 28, 34].

nych [7]. W sekwencjach tych mogą występować także reszty seryny (RS) [8] lub glicyny (RGG) [9, 10]. W komórkach organizmów eukariotycznych RS są obecne w białkach SR, biorących udział w reakcji wycinania intronów z pierwotnego transkryptu (pre-mRNA) [8]. Natomiast powtarzające się sekwencje RGG zostały zlokalizowane w białkach rybosomalnych komórek eukariotycznych (np. S2 i L7) [11, 12], w białku SSB1 z *S. cerevisiae* [13] oraz w rybonukleoproteinach (np. hnRNP U), tworzących kompleksy z jądrowym RNA (hnRNA) [9, 10]. Homologi białka S2 wykryto także w komórkach prokariotów w białkach rybosomalnych należących do rodziny białek S5 (np. u *E. coli*) [12]. Reszta argininy zostały zachowane w ewolucji w domenach białkowych (np. kinazy p68 człowieka) wiążących dwuniciowe RNA (ang. *double-stranded binding motifs*) [14]. Niestety niewiele wiadomo jest na temat specyficzności oddziaływań oraz struktur RNA, z którymi wiążą się wymienione białka zwierające domeny bogate w reszty argininy. Wykazano natomiast, że białka organizmów eukariotycznych, takie jak histony i protaminy, posiadające także dużą zawartość reszt argininy, oddziałują z RNA w sposób niespecyficzny, na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych [15].

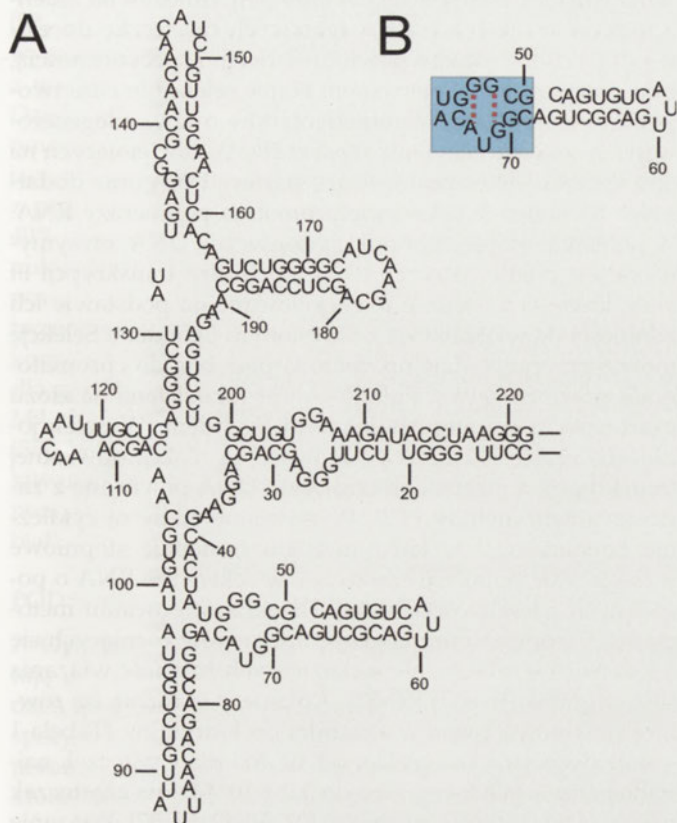
ODDZIAŁYWANIE BIAŁEK TAT ZE STRUKTURAMI RNA TYPU TAR

Jednym z najlepiej opisanych w literaturze przedmiotu przykładów, w którym pośredniczą reszty argininy, jest oddziaływanie pojedynczej reszty argininy występującej w rejonie ARM białka Tat wirusa HIV-1 ze strukturą TAR RNA (ang. *trans-activation-responsive element*), zlokalizowaną blisko końca 5' genomu wirusa. Funkcja kompleksu Tat-TAR polega na transaktywacji wirusowej transkrypcji zachodzącej z 5' LTR (ang. *long terminal repeat*). Białko Tat zbudowane jest z 86 reszt aminokwasowych. Sekwencja ARM składa się z sześciu reszt argininy, dwóch reszt lizyny oraz reszty glicyny i glutaminy. TAR natomiast stanowi rejon RNA o długości 58 nukleotydów [16]. Minimalna sekwencja TAR potrzebna do związania peptydu (Rys. 3A) w HIV-1 LTR występuje pomiędzy nukleotydami +19 i +42 i ma strukturę ramię-pętla, z trzema nukleotydami zlokalizowanymi poza dwuniciową strukturą, tworzącymi wybrzuszenie. Elementy niezbędne do transaktywacji zawarte są w rejonie otaczającym wybrzuszenie [17], gdzie następuje bezpośrednie

związanie reszty argininy sekwencji ARM białka Tat [18]. Zarówno sekwencja nukleotydów otaczająca wybrzuszenie, jak i struktura drugorzędowa TAR RNA odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach Tat-TAR [17, 19, 20]. Grupa guanidynowa argininy tworzy wiązania wodorowe z zasadą G26 w rejonie dwuniciowym, powyżej wybrzuszenia, oraz z dwoma grupami fosforanowymi (P21 i P22) zlokalizowanymi poniżej. Kompleks ten jest stabilizowany przez oddziaływanie pomiędzy trzema zasadami, U23 występującą na końcu 5' wybrzuszenia oraz A27-U38, przylegającymi bezpośrednio do końca 3' wybrzuszenia [21]. Natomiast sześcionukleotydowa pętla oddziałuje z innymi białkami regulującymi ekspresję genów wirusa HIV-1 i nie odgrywa roli podczas rozpoznawania struktury TAR przez Tat [17]. Badania z wykorzystaniem techniki dichroizmu kołowego sugerują, że bogata w reszty argininy sekwencja białka Tat nie ma określonej struktury w nieobecności TAR. Jej struktura zostaje określona dopiero po związaniu z RNA, indukując jednocześnie zmiany konformacyjne w TAR [2, 22, 23]. Syntetyczne peptydy zbudowane z 14 (rejon odpowiadający sekwencji 48-61 w białku Tat), 12 (rejon 47-58 w białku Tat) lub z 9 (rejon 49-57) reszt aminokwasowych, odpowiadające rejonowi białka Tat o charakterze zasadowym, są wystarczające do związania się z TAR, z podobnym powinowactwem jak białko Tat [20, 22, 24]. Z TAR oddziałuje również wolna L-arginina [21], indukując podobne zmiany konformacyjne w RNA jak białko Tat; za zmiany te odpowiedzialna jest grupa guanidylowa aminokwasu [23]. Specyficzne oddziaływanie białka Tat z sekwencją TAR jest również niezbędne w procesie replikacji innych wirusów takich jak BIV (ang. *bovine immunodeficiency virus*) oraz EIAV (ang. *equine infectious anemia virus*), jakkolwiek sekwencje TAR tych wirusów różnią się od odpowiednich sekwencji wirusa HIV-1 (Rys. 3) [5]. BIV TAR tworzy strukturę typu ramię-pętla, zawierającą dwa wybrzuszenia, ze zdelokalizowanymi resztami uracylu. W rozpoznaniu RNA przez BIV Tat niezbędne są pary zasad G11-C25, G14-C23 i C15-G22 oraz U10 i reszty fosforanu P8, P9 i P22 [5]. Do utworzenia kompleksu BIV Tat-TAR niezbędne są trzy reszty argininy zlokalizowane w sekwencji ARM, Arg77, Arg70 i Arg73 [25]. W cząsteczce EIAV TAR nie występuje wybrzuszenie, a nukleotydamy rozpoznawanymi przez rejon ARM białka EIAV Tat są dwie pary zasad U:G (nie tworzące oddziaływań Watsona Cricka), ułożone na końcu ramienia TAR, oraz zasada G14 występująca w pętli TAR [26]. Prawdopodobnie pary U:G są funkcjonalnymi odpowiednikami „wypchniętych”



Rysunek 3. Minimalne struktury TAR RNA potrzebne do związania białek Tat. Nukleotydy (oznaczone kolorem niebieskim) oraz grupy fosforanowe (zaznaczone strzałkami) są niezbędne w oddziaływaniu z odpowiednim białkiem Tat. Niekanoniczne pary zasad oznaczono gwiazdkami [23, 25, 26].



Rysunek 4. Prawdopodobna struktura drugorzędowa RRE RNA (A) i elementu RRE IIB RNA (B) biorącego udział w bezpośrednim oddziaływaniu z białkiem Rev [58]. Nukleotydy oznaczone na niebiesko są niezbędne w oddziaływaniach z białkiem Rev. Tworzenie się niekanonicznych par zasad oznaczono przerywaną linią.

nukleotydów z HIV-1 TAR, ponieważ niekanoniczne pary zasad podobnie jak wybrzuszenia wprowadzają nieregularność w strukturze helikalnej, co może być specyficznie rozpoznawane przez białko EIAV Tat [26].

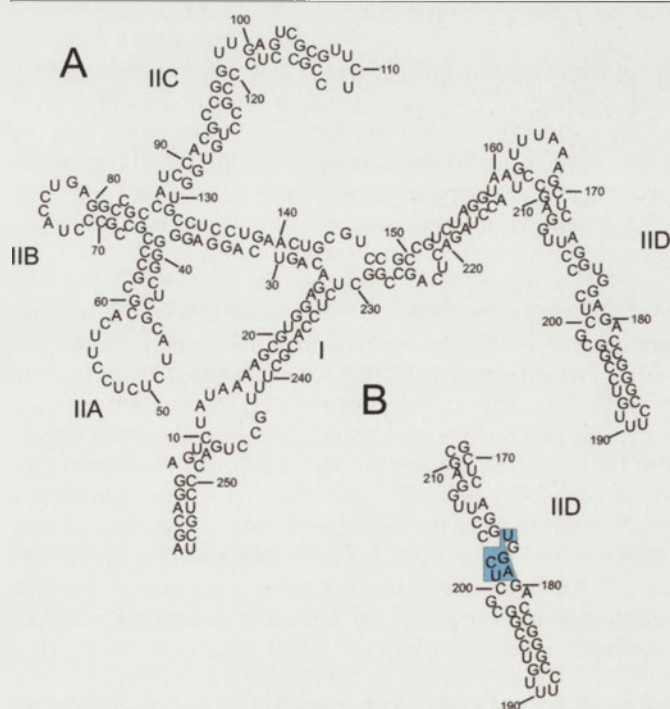
ODDZIAŁYWANIE BIAŁKA REV WIRUSA HIV-1 Z RRE RNA

Białko Rev wirusa HIV-1 zbudowane ze 116 reszt aminokwasowych zawiera rejon ARM o charakterze zasadowym, w którym 10 z 17 reszt aminokwasowych, pomiędzy pozycjami 34 i 50 to reszty argininy. Białko Rev (ang. *Rev responsive element*) oddziałuje z wirusowym elementem RRE RNA o długości 234 nukleotydów (Rys. 4), zlokalizowanym w obrębie genu *env* [27]. W oddziaływaniu uczestniczą cztery reszty argininy ARM rozpoznające strukturę elementu RRE RNA [28]. Związanie białka aktywuje eksport mRNA retrowirusa do cytoplazmy oraz wzmagą ekspresję mRNA kodujących białka wirusa [29, 30]. Rejon wystarczający do związania białka Rev określany jest jako RRE IIB [31, 32]. Zarówno białko Rev, syntetyczny peptyd zawierający sekwencję ARM, jak i peptyd zawierający 12-15 reszt argininy wiążą się z RRE IIB RNA z podobną stałą dysocjacji ($\sim 10^8 M^{-1}$) [31]. RRE IIB RNA charakteryzuje się strukturą typu ramię-pętla w obrębie której występuje tzw. wewnętrzna pętla. Związanie białka Rev z RNA zachodzi w obrębie tej pętli, w której łączą się niekanoniczne pary zasad leżące naprzeciw siebie, G47:A73 i G48:G71. Powstanie opisanej struktury powoduje delokalizację zasady U72 ze struktury

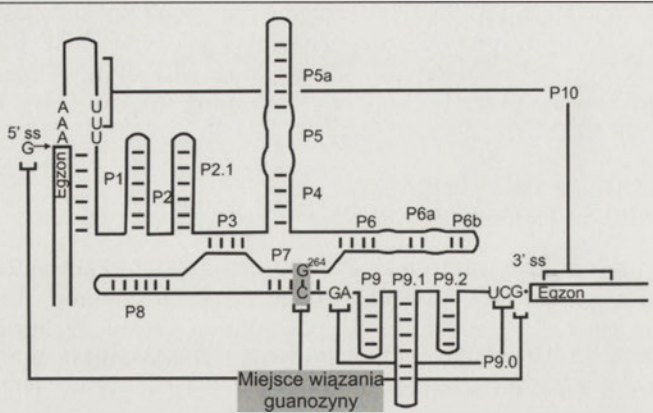
dwuniciowej [27, 31-33] i skrócenie cząsteczki RNA, co jest niezbędne w procesie rozpoznawania sekwencji RRE IIB RNA przez białko Rev [27, 32]. Struktura RRE IIB RNA rozpoznawana przez białko Rev przypomina strukturę HIV-1 TAR RNA [32].

ODDZIAŁYWANIE BIAŁKA REX WIRUSA HTLV-1 Z REXRE RNA

W oddziaływaniu białka Rex o masie cząsteczkowej 27 kDa wirusa HTLV-1 z elementem RexRE RNA (ang. *Rex responsive element*) również pośredniczą reszty argininy (Rys. 5). W rejonie ARM tego białka zbudowanym z 16 reszt aminokwasowych występuje 7 reszt argininy [15], z których co najmniej dwie uczestniczą w rozpoznawaniu RexRE RNA [34]. Białko Rex oddziałując z RexRE, reguluje eksport z jądra do cytoplazmy niekompletnie złożonych cząsteczek mRNA, kodujących wirusowe białka strukturalne, env i gag [35]. Element RexRE składający się z 254 nukleotydów występuje w regionie 3' LTR. Zbudowany jest z dwóch segmentów o strukturze podwójnej helisy oraz czterech o strukturze ramię-pętla (IIA-IIID) [36]. Związanie reszt argininy sekwencji ARM białka Rex zachodzi w obrębie obejmującego 43 nukleotydy segmentu IID elementu RexRE RNA [15]. Segment ten zawiera dwa wybrzuszenia zidentyfikowane jako miejsce wiązania białka Rex [15, 36-38]. Pary zasad G175-C203, G177-C202 oraz zasada U176 zlokalizowana na zewnątrz dwuniciowej struktury są prawdopodobnie odpowiedzialne za tworzenie bezpośredniego kontaktu z białkiem Rex [15]. Jedna z tych struktur zawiera ponadto zachowane z ewolucji sekwencje przypominające strukturę elementu TAR wirusa HIV-1 [15, 37].



Rysunek 5. Prawdopodobna struktura drugorzędowa RexRE RNA (A) i elementu RexRE RNA (B) uczestniczącego w oddziaływaniach z białkiem Rex [15]. Zaznaczony na niebiesko segment IID RNA przypomina strukturę elementu TAR RNA wirusa HIV-1.



Rysunek 6. Schemat struktury drugorzędowej prekursora rybosomalnego RNA z orzęska *Tetrahymena*. Dziesięć struktur dwuniciowych o zachowanych w ewolucji sekwencji, wspólnych dla większości grupy I autokatalitycznie wycinających się intronów, oznaczono jako P1-P10. Miejsce wiązania guanozyny, blokowane przez L-argininę, oznaczono kolorem jasnoszarym. Strzałka wskazuje miejsce, które atakowane jest przez guanozyny, co zapoczątkowuje reakcję splicingu. Symbole 5' ss i 3' ss oznaczają odpowiednio miejsce splicingowe 5' i 3' [40, 59].

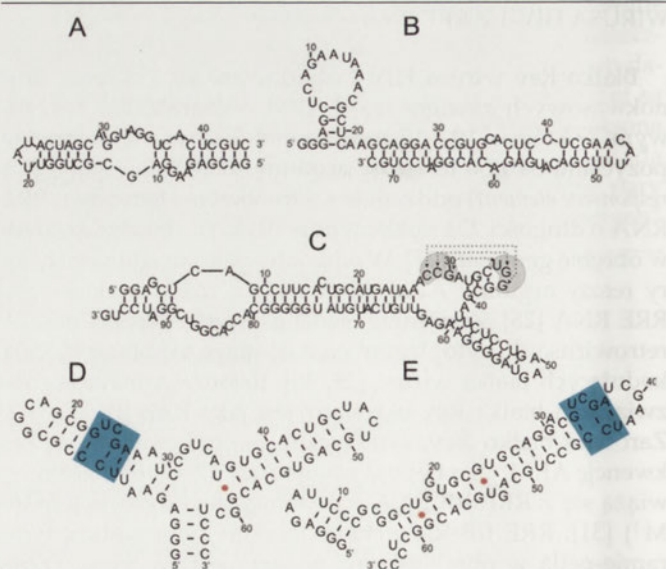
STEREOSELEKTYWNE ODDZIAŁYWANIE ARGININY Z PREKURSOREM RYBOSOMALNEGO RNA U *TETRAHYMENA*

Zidentyfikowano także inne typy cząsteczek RNA, które mogą specyficznie oddziaływać z arginina. Wolna arginina pełni rolę inhibitora reakcji autokatalicznego splicingu prekursora rybosomalnego RNA (pre-rRNA) u orzęska *Tetrahymena* (Rys. 6) [39, 40]. Aminokwas hamuje samowycinięcie się złożonego z 414 nukleotydów intronu grupy I z pre-rRNA, a kofaktorem tej reakcji jest guanozyna (także GMP, GDP i GTP). Guanozyna jest wymagana podczas pierwszego etapu reakcji. Wiąże się ona z RNA i następnie atakuje miejsce splicingowe 5', tworząc wiązanie fosfodiesterowe z końcem 5' intronu [41]. W wyniku tej reakcji na końcu egzonu powstaje wolna grupa 3'-OH, która atakuje miejsce splicingowe 3'. Następnie oba egzony łączą się i zachodzi uwolnienie intronu [42]. W pre-rRNA u *Tetrahymena*, w obrębie elementu P7 występującego w centrum katalitycznym intronu, zlokalizowane jest miejsce, z którym wiąże się guanozyna, oddziałując z parą zasad G264:C311, poprzez utworzenie dwóch wiązań wodorowych z G264 [43]. Arginina hamuje opisaną reakcję autokatalicznego splicingu, poprzez utworzenie dwóch wiązań wodorowych z G264 i zablokowanie miejsca wiązania dla guanozyny [39, 44]. Doświadczenia przeprowadzone z niemal wszystkimi aminokwasami wykazały, że zahamowanie reakcji samowycinięcia się intronu z pre-rRNA u *Tetrahymena*, jest procesem o wysokim stopniu specyficzności i tylko arginina może ją wywołać [45]. O specyficzności tego oddziaływania świadczy także fakt, że miejsce wiązania argininy charakteryzuje się stereoselektywnością – preferowana jest L-arginina [45, 46]. Stereoselektywne oddziaływanie L-argininy z pre-rRNA u *Tetrahymena* nie jest odosobnionym przypadkiem, ale jest właściwością charakteryzującą całą grupę I autokatalitycznie wycinających się intronów zidentyfikowanych u różnych odległych filogenetycznie organizmów [47].

APTAMERY RNA SPECYFICZNIE WIĄŻĄCE L-ARGININĘ

Metoda SELEX ukierunkowanej ewolucji *in vitro* (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), okre-

ślana również jako selekcja *in vitro* [48], umożliwiła zidentyfikowanie sekwencji RNA wiążących cząsteczkę docelową (ligand) z wysokim powinowactwem i specyficznością, tzw. aptamerów. W pierwszym etapie selekcji *in vitro* tworzona jest biblioteka oligonukleotydów o tzw. zdegenerowanych sekwencjach (ang. *random DNA*), zawierających na obu końcach sekwencje wiążące startery DNA oraz dodatkowo na końcu 5' sekwencję promotora polimerazy RNA. W kolejnym etapie, z populacji cząsteczek DNA, otrzymywana jest pula cząsteczek RNA na drodze transkrypcji *in vitro*, które są następnie selekcjonowane na podstawie ich zdolności do wiązania się z określonym ligandem. Selekcję można przeprowadzić np. metodą podobną do chromatografii powinowactwa. Pula RNA jest rozdzielana na złożu agarozowym z unieruchomionym ligandem. Wyselekcjonowane cząsteczki RNA poddawane są reakcji odwrotnej transkrypcji, a otrzymane cząsteczki DNA powielane w zastosowaniu metody PCR. Wymienione etapy są cyklicznie powtarzane i w każdym cyklu następuje stopniowe wzbogacanie populacji cząsteczek w sekwencje RNA o pożądanym właściwościach [49]. Dzięki zastosowaniu metody SELEX opisano liczną grupę aptamerów różniących się sekwencją i strukturą, ale wykazujących zdolność wiązania się z arginina (Rys. 7) [50-52]. Aptamery te różnią się również powinowactwem w stosunku do L-argininy (Tabela 1 – stałe dysocjacji kompleksu od $10^3 M^{-1}$ dla cząsteczek naj słabiej wiążących L-argininę do $3,0 \times 10^6 M^{-1}$ dla cząsteczek naj silniej wiążących L-argininę) [21, 50-52, 56, 57]. Wiązanie aptamerów z aminokwasem charakteryzuje się stereoselektywnością (większość wiąże lepiej L- niż D-argininę) [50, 51]. W aptamerze wiążącym L-argininę z największym powinowactwem zaobserwowano powstawanie struktury pseudo węzła, odpowiedzialnej prawdopodobnie za bezpośredni kontakt ze związaną arginina lub za powstawanie struktur trzeciorzędowych indukowanych przez arginina [51]. Natomiast w cząsteczce RNA wyizolowanej przez Famuloka [50], L-arginina wiąże się z trzema nukleotydami (C13, A29 i U31) wewnętrznej pętli [53, 54]. W aptamerze tym związa-



Rysunek 7. Proponowana struktura drugorzędowa aptamerów wiążących argininę [50-52, 55]. Linia przerywaną zaznaczono nukleotydy, które mogą oddziaływać ze sobą tworząc strukturę tzw. pseudo węzła. Fragmenty RNA, zaznaczone na niebiesko, przypominają strukturę TAR RNA wirusa HIV-1. Niekanoniczne pary zasad oznaczono gwiazdkami.

nie L-argininy z RNA powoduje jego zmianę konformacyjną [53, 54]. Zastosowanie metody SELEX umożliwiło również wyselekcjonowanie aptamerów wiążących się z D-argininą z większym powinowactwem niż z L-argininą (Tabela 1). Dzięki zastosowaniu techniki selekcji *in vitro*, wyselekcjonowano także cząsteczki RNA o strukturze przypominającej element TAR z wirusa HIV-1, oddziałujące z argininą z podobnym powinowactwem jak peptyd Tat [55]. Około 40% wyselekcjonowanych cząsteczek RNA zawierało dwunukleotydowe wyrzuczenie, na którego końcu 5' występowała zasada U. Natomiast do jego końca 3' przylegały bezpośrednio pary zasad G/C i A/U [55]. Stałe dysocjacji kompleksu tych cząsteczek z argininą wynosiły od 21 M^{-1} dla cząsteczek najslabiej wiążących L-argininę do $7,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ dla cząsteczek najmocniej wiążących ten aminokwas [55]. Wydaje się, że zastosowanie metody SELEX do poszukiwania aptamerów zdolnych wiązać się z argininą ułatwi poznanie zasad rządzących oddziaływaniami pomiędzy białkami i cząsteczkami RNA [50].

PODSUMOWANIE

Opisane w niniejszym artykule cząsteczki RNA oddziałują z resztami argininy obecnymi w białkach lub peptydach albo z wolnym aminokwasem. Istnieje możliwość, że specyficzne oddziaływania RNA/arginina są realizowane przez wiele różnorodnych sekwencji oraz struktur RNA, które wiążą jedną lub kilka reszt arginin z różnym powinowactwem. Wydaje się, że sekwencje bogate w reszty argininy obecne w białkach służą do rozpoznawania cząsteczek RNA o różnej strukturze [51]. Ze wspomnianej różnorodności można wysnuć przypuszczenie, że istnieją jeszcze nie zidentyfikowane dotąd przez badaczy sekwencje RNA zdolne do oddziaływania z argininą w formie wolnej lub wchodzącej w skład łańcuchów peptydowych białek.

Tabela 1. Porównanie stałych dysocjacji (K_D) kompleksów L- lub D-argininy lub peptydu BIV Tat (65-81) z różnymi cząsteczkami RNA.

Ligand	RNA	K_D	Piśmiennictwo
L-arginina	TAR	$2,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$	[21]
BIV Tat(65-81)	BIV TAR	$2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	[56]
L-arginina	<i>Tetrahymena</i> pre-rRNA	$2,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[57]
L-arginina	aptamer A	$1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[50]
D-arginina	aptamer A	$2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[50]
L-arginina	aptamer B	10^3 M^{-1}	[52]
D-arginina	aptamer B	$1,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[52]
L-arginina	aptamer C	$3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	[51]
D-arginina	aptamer C	$2,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$	[51]

PIŚMIENNICTWO

- Yarus M (1998) Amino acids as RNA ligands: a direct-RNA-template theory for the code's origin. *J Mol Evol* 47: 109-117
- Aboul-ela F, Karn J, Varani G (1995) The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol Biol* 253: 313-332
- Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD (1991) Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 252: 1167-1171

- Lazinski D, Grzadzilska E, Das A (1989) Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59: 207-218
- Sundquist WI (1996) Tattle tales. *Nat Struct Biol* 3: 8-11
- Austin RJ, Xia T, Ren J, Takahashi TT, Roberts RW (2003) Differential modes of recognition in N peptide-boxB complexes. *Biochemistry* 42: 14957-14967
- Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265: 615-621
- Shen H, Kan JL, Green MR (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol Cell* 13: 367-376
- Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11: 2655-2664
- Kim S, Merrill BM, Rajpurohit R, Kumar A, Stone KL, Papov VV, Schneiders JM, Szer W, Wilson SH, Paik WK, Williams KR (1997) Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 36: 5185-5192
- Weiss MA, Narayana N (1998) RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* 48: 167-180
- Suzuki K, Olvera J, Wool IG (1991) Primary structure of rat ribosomal protein S2. A ribosomal protein with arginine-glycine tandem repeats and RGGF motifs that are associated with nucleolar localization and binding to ribonucleic acids. *J Biol Chem* 266: 20007-20010
- Jong AY, Clark MW, Gilbert M, Oehm A, Campbell JL (1987) *Saccharomyces cerevisiae* SSB1 protein and its relationship to nucleolar RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 7: 2947-2955
- Feng GS, Chong K, Kumar A, Williams BR (1992) Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon-induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5447-5451
- Baskerville S, Zapp M, Ellington AD (1995) High-resolution mapping of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex-binding element by *in vitro* selection. *J Virol* 69: 7559-7569
- Clever JL, Mirandar D, Jr., Parslow TG (2002) RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 76: 12381-12387
- Berkhout B, Jeang KT (1991) Detailed mutational analysis of TAR RNA: critical spacing between the bulge and loop recognition domains. *Nucleic Acids Res* 19: 6169-6176
- Edwards TE, Robinson BH, Sigurdsson ST (2005) Identification of Amino Acids that Promote Specific and Rigid TAR RNA-Tat Protein Complex Formation. *Chem Biol* 12: 329-337
- Hamy F, Asseline U, Grasby J, Iwai S, Pritchard C, Slim G, Butler PJ, Karn J, Gait MJ (1993) Hydrogen-bonding contacts in the major groove are required for human immunodeficiency virus type-1 tat protein recognition of TAR RNA. *J Mol Biol* 230: 111-123
- Weeks KM, Crothers DM (1992) RNA binding assays for Tat-derived peptides: implications for specificity. *Biochemistry* 31: 10281-10287
- Tao J, Frankel AD (1992) Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2723-2726
- Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD (1991) Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev* 5: 201-210
- Tan R, Frankel AD (1992) Circular dichroism studies suggest that TAR RNA changes conformation upon specific binding of arginine or guanidine. *Biochemistry* 31: 10288-10294
- Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM (1990) Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* 249: 1281-1285
- Puglisi JD, Chen L, Blanchard S, Frankel AD (1995) Solution structure of a bovine immunodeficiency virus Tat-TAR peptide-RNA complex. *Science* 270: 1200-1203
- Carvalho M, Derse D (1991) Mutational analysis of the equine infectious anemia virus Tat-responsive element. *J Virol* 65: 3468-3474

27. Bartel DP, Zapp ML, Green MR, Szostak JW (1991) HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* 67: 529-536
28. Tan R, Chen L, Buettner JA, Hudson D, Frankel AD (1993) RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* 73: 1031-1040
29. Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, Gallo RC, Wong-Staal F (1986) HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* 46: 807-817
30. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W (1986) A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321: 412-417
31. Kjems J, Calnan BJ, Frankel AD, Sharp PA (1992) Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J* 11: 1119-1129
32. Iwai S, Pritchard C, Mann DA, Karn J, Gait MJ (1992) Recognition of the high affinity binding site in rev-response element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucleic Acids Res* 20: 6465-6472
33. Gosser Y, Hermann T, Majumdar A, Hu W, Frederick R, Jiang F, Xu W, Patel DJ (2001) Peptide-triggered conformational switch in HIV-1 RRE RNA complexes. *Nat Struct Biol* 8: 146-150
34. Hammes SR, Greene WC (1993) Multiple arginine residues within the basic domain of HTLV-I Rex are required for specific RNA binding and function. *Virology* 193: 41-49
35. Younis I, Green PL (2005) The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci* 10:431-45.
36. Grone M, Hoffmann E, Berchtold S, Cullen BR, Grassmann R (1994) A single stem-loop structure within the HTLV-1 Rex response element is sufficient to mediate Rex activity in vivo. *Virology* 204: 144-152
37. Unge T, Solomin L, Mellini M, Derse D, Felber BK, Pavlakakis GN (1991) The Rex regulatory protein of human T-cell lymphotropic virus type I binds specifically to its target site within the viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7145-7149
38. Grassmann R, Berchtold S, Aepinus C, Ballaun C, Boehnlein E, Fleckenstein B (1991) In vitro binding of human T-cell leukemia virus rex proteins to the rex-response element of viral transcripts. *J Virol* 65: 3721-3727
39. Yarus M, Illangsekare M, Christian E (1991) Selection of small molecules by the Tetrahymena catalytic center. *Nucleic Acids Res* 19: 1297-1304
40. Yarus M, Levine J, Morin GB, Cech TR (1989) A Tetrahymena intron nucleotide connected to the GTP/arginine site. *Nucleic Acids Res* 17: 6969-6981
41. Strobel SA, Cech TR (1995) Minor groove recognition of the conserved G.U pair at the Tetrahymena ribozyme reaction site. *Science* 267: 675-679
42. Cech TR (1986) RNA as an enzyme. *Sci Am* 255: 64-75
43. Kitamura A, Muto Y, Watanabe S, Kim I, Ito T, Nishiya Y, Sakamoto K, Ohtsuki T, Kawai G, Watanabe K, Hosono K, Takaku H, Katoh E, Yamazaki T, Inoue T, Yokoyama S (2002) Solution structure of an RNA fragment with the P7/P9.0 region and the 3'-terminal guanosine of the tetrahymena group I intron. *RNA* 8: 440-451
44. Michel F, Hanna M, Green R, Bartel DP, Szostak JW (1989) The guanosine binding site of the Tetrahymena ribozyme. *Nature* 342: 391-395
45. Yarus M (1988) A specific amino acid binding site composed of RNA. *Science* 240: 1751-1758
46. Yarus M (1989) Specificity of arginine binding by the Tetrahymena intron. *Biochemistry* 28: 980-988
47. Hicke BJ, Christian EL, Yarus M (1989) Stereoselective arginine binding is a phylogenetically conserved property of group I self-splicing RNAs. *EMBO J* 8: 3843-3851
48. Bowser MT (2005) SELEX: just another separation? *Analyst* 130: 128-130
49. Kusser W (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 74: 27-38
50. Famulok M (1994) Molecular recognition of amino acids by RNA-aptamers: an L-citrulline binding RNA motif and its evolution into an L-arginine binder. *J Am Chem Soc* 116: 1698-1706
51. Geiger A, Burgstaller P, von der EH, Roeder A, Famulok M (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* 24: 1029-1036
52. Connell GJ, Illangsekare M, Yarus M (1993) Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites. *Biochemistry* 32: 5497-5502
53. Burgstaller P, Kochoyan M, Famulok M (1995) Structural probing and damage selection of citrulline- and arginine-specific RNA aptamers identify base positions required for binding. *Nucleic Acids Res* 23: 4769-4776
54. Yang Y, Kochoyan M, Burgstaller P, Westhof E, Famulok M (1996) Structural basis of ligand discrimination by two related RNA aptamers resolved by NMR spectroscopy. *Science* 272: 1343-1347
55. Tao J, Frankel AD (1996) Arginine-binding RNAs resembling TAR identified by in vitro selection. *Biochemistry* 35: 2229-2238
56. Chen L, Frankel AD (1994) An RNA-binding peptide from bovine immunodeficiency virus Tat protein recognizes an unusual RNA structure. *Biochemistry* 33: 2708-2715
57. Yarus M, Majerfeld I (1992) Co-optimization of ribozyme substrate stacking and L-arginine binding. *J Mol Biol* 225: 945-949
58. Gait MJ, Karn J (1993) RNA recognition by the human immunodeficiency virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem Sci* 18: 255-259
59. Burke JM, Belfort M, Cech TR, Davies RW, Schweyen RJ, Shub DA, Szostak JW, Tabak HF (1987) Structural conventions for group I introns. *Nucleic Acids Res* 15: 7217-7221

Specific arginine mediated RNA recognition

Karina Błachnio[✉], Anna Przykorska

Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Department of Protein Biosynthesis, 5A Pawinskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

✉e-mail: karabo@ibb.waw.pl

Keywords: L-arginina, ARM, TAR, Tat, SELEX, aptamer

ABSTRACT

In many biological systems substantial roles are played by interactions between amino acids and RNA. Among amino acids L-arginine seems to be particularly relevant, because the guanidinium group of arginine side chain can potentially form five hydrogen bonds with appropriately positioned acceptor groups of RNA. Extensive studies reveal that specific arginine recognition is achieved by many different RNAs over a broad range of binding affinities. Arginine is frequently found among amino acids in the nucleic acid-binding motifs in various proteins. For example, specific binding of the HIV-1 Tat protein to its RNA site (TAR) is mediated by a single arginine residue. Free arginine can be also bound by the guanosine site in the group I *Tetrahymena* ribosomal RNA intron catalytic centre, as well as by numerous RNA motifs, called arginine aptamers, which have been selected *in vitro*.

Zastosowanie metod biologii molekularnej do poszukiwania genów biosyntezy antybiotyków poliketydowych i peptydowych produkowanych przez promieniowce

STRESZCZENIE

Bakterie należące do rzędu promieniowców wytwarzają większość znanych obecnie antybiotyków. Wyniki sekwencjonowania genomów tych bakterii ujawniają obecność dużej liczby zespołów potencjalnych genów biosyntezy metabolitów wtórnych, których ekspresji dotychczas nie stwierdzono. Automatyzacja i miniaturyzacja wielu procesów związanych z izolacją, klonowaniem i sekwencjonowaniem DNA oraz rozwój bioinformatyki ułatwiają poszukiwanie nowych zespołów genów w organizmach o nieznanym dotąd sekwencji genomu, a także w DNA izolowanym bezpośrednio z próbek środowiskowych. W pracy omówiono techniki stosowane do identyfikacji genów syntaz poliketydowych i syntez peptydowych. Poza dostarczaniem nowych metabolitów, które mogą znaleźć zastosowanie jako leki bądź jako substraty do modyfikacji chemicznych, geny tych enzymów są wykorzystywane do tworzenia nowych związków o zaplanowanych strukturach metodami biosyntezy kombinatorycznej.

WSTĘP

Pojawianie się szczepów bakterii chorobotwórczych opornych na antybiotyki zaobserwowano już w pierwszych latach po wprowadzeniu penicyliny do powszechnego użytku [1]. Jednak ostatnio zjawisko to gwałtownie narasta i coraz częściej lekarze okazują się bezradni w walce z chorobami, które jeszcze do niedawna uważano za opanowane. Coraz częściej spotyka się drobnoustroje odporne na niemal wszystkie dostępne antybiotyki, również całkowicie syntetyczne [2].

Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest powszechne, często nieuzasadnione, stosowanie antybiotyków w praktyce medycznej, przedwczesne przerywanie kuracji przez pacjentów, a także fakt, że połowę produkowanych antybiotyków wykorzystuje się jako dodatki do pasz dla zwierząt hodowlanych oraz do produkcji kosmetyków i środków czyszczących [3]. Szerzenie się oporności na leki antybakteryjne można zahamować przez przestrzeganie zasad racjonalnej antybiotykoterapii i ograniczenie „konsumpcji” antybiotyków, szczególnie do celów pozamedycznych [4]. Duże nadzieje wiązane są z zastosowaniem bakteriofagów do leczenia zakażeń bakteryjnych [5, 6]. Nie zmienia to jednak faktu, że wciąż rośnie zapotrzebowanie na nowe, skuteczne leki antybakteryjne. Aktualne badania zmierzają w kierunku ulepszenia antybiotyków stosowanych obecnie poprzez modyfikację ich struktur chemicznych oraz poszukiwania w przyrodzie zupełnie nowych związków o innym mechanizmie działania.

PROMIENIOWCE – NAJBOGATSZE ŹRÓDŁO ANTYBIOTYKÓW

Pod koniec XX wieku przemysł farmaceutyczny inwestował przede wszystkim w metody chemii kombinatorycznej [7], kładąc nieco mniejszy nacisk na poszukiwanie nowych leków wśród produktów naturalnych pochodzenia roślinnego i mikrobiologicznego [8]. W ostatnich kilku latach odnotowano ponowny wzrost zainteresowania tradycyjnymi źródłami substancji leczniczych: roślinami i mikroorganizmami. Ponad 50% znanych obecnie antybiotyków pochodzenia naturalnego to związki produkowane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*, należące do rzędu promieniowców (*Actinomycetales*) [9]. Są to tlenowe, Gram-dodatnie bakterie glebowe charakteryzujące się złożonym cyklem życiowym. Są one zdolne do wytwarzania olbrzymiej liczby niezwykle zróżnicowanych metabolitów wtórnych i enzymów o znaczeniu przemysłowym. Oprócz antybiotyków, do metabolitów wtórnych promieniowców należą związki wykazujące właściwości przeciwrzybicze, antypasożytnicze, przeciwnowotworowe, immunosupresyjne, a także naturalne herbicydy i insektycydy [10]. Do tej pory poznano pełne sekwencje genomu 25 szczepów promieniowców, w tym 4 gatunków *Streptomyces*, ale nie wszystkie z nich są dostępne (baza danych GOLD: <http://www.genomesonline.org>) [11]. Chromosomy *Streptomyces*, w odróżnieniu od większości bakterii, mają strukturę liniową i są największe z do-

Magdalena Kotowska

Zakład Mikrobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław

Zakład Mikrobiologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: szulc@iitd.pan.wroc.pl, tel. (71) 337 11 72 wew. 184

Artykuł otrzymano 6 stycznia 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 22 lutego 2005 r.

Słowa kluczowe: poszukiwanie genów, promieniowce, syntazy poliketydowe, syntetazy peptydowe

Wykaz skrótów: BAC – sztuczny chromosom bakteryjny (ang. *bacterial artificial chromosome*); CIL – (ang. *cluster identification library*); eDNA – DNA izolowany bezpośrednio z próbek środowiskowych (ang. *environmental DNA*); ESAC – (ang. *E. coli-Streptomyces artificial chromosome*); GSL – (ang. *genome sampling library*); GST – (ang. *genome sequence tags*); HTS – wysokowydajne badania przesiewowe (ang. *high throughput screening*); NRPS – syntetaza peptydowa (ang. *non-ribosomal peptide synthetase*); PKS – syntaza poliketydowa (ang. *polyketide synthase*)

Podziękowania: Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Immunologii i Terapii doświadczalnej PAN przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych, KBN 3P04B 004 25

tychczas sekwencjonowanych chromosomów bakteryjnych (*S. coelicolor* – 8,7 Mpz, *S. avermitilis* – 9 Mpz) [12, 13]. Geny niezbędne do życia komórki są zlokalizowane w centralnej części chromosomu, natomiast geny kodujące białka zaangażowane w syntezę metabolitów wtórnych oraz degradację polimerów i ksenobiotyków znajdują się głównie w ramionach chromosomu [14]. Liczba genów tych bakterii (*S. coelicolor* – 7825 genów, *S. avermitilis* – 7574) znacznie przewyższa liczbę genów *Escherichia coli* K12 (4289), a nawet liczbę genów organizmu eukariotycznego *Saccharomyces cerevisiae* (6203). Znaczna część z nich to potencjalne geny regulatorowe (12,3% genów *S. coelicolor*) co odzwierciedla złożony cykl życiowy tych organizmów i ich przystosowanie do zmiennych warunków panujących w glebie.

Geny biosyntezy metabolitów wtórnych występują jako zespoły (zgrupowania) w tym samym obszarze chromosomu. Oprócz genów kodujących enzymy odpowiedzialne za syntezę i modyfikację podstawowego szkieletu węglowego zespoły genów obejmują także geny kodujące białka regulatorowe, białka odpowiedzialne za transport produktu oraz warunkujące oporność, jeśli produkt jest antybiotykiem. Chromosom *S. coelicolor* zawiera 23 takie zgrupowania obejmujące 5% chromosomu [12], a chromosom *S. avermitilis* – 30 (7%) [14]. Są to głównie syntazy poliketydowe typu I i II, syntetazy peptydowe, syntazy chalkonowe, cyklazy terpenowe i inne. Produkty większości z nich nie zostały do tej pory zidentyfikowane. Już wcześniej stwierdzano obecność kilku zespołów genów syntaz poliketydowych lub syntetaz peptydowych w jednym szczepie [15-17]. Liczne zespoły genów biosyntezy metabolitów wtórnych zlokalizowane są także na dużych, liniowych plazmidach często spotykanych u promieniowców [18]. Jak oszacowano za pomocą modelu matematycznego, do tej pory poznano jedynie 3% metabolitów wtórnych *Streptomyces*, a ich ogólna liczba oceniana jest na ok. 100 000 [19]. Należy pamiętać, że *Streptomyces* to najdokładniej zbadana grupa promieniowców [20]. Wiele szczepów produkujących antybiotyki należy do innych rodzajów promieniowców. Powszechnie stosowaną erytromycynę wytwarza *Saccharopolyspora erythraea*, a rifamycynę *Amycolatopsis mediterranei*. Również chromosomy promieniowców chorobotwórczych takich jak *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae* czy *Nocardia farcinia* zawierają liczne geny syntaz poliketydowych różnych typów oraz syntetaz peptydowych [21-23]. Do tej pory zidentyfikowano produkty tylko niektórych z tych zespołów enzymatycznych. Możemy się więc spodziewać, że potencjał biosyntetyczny organizmów należących do innych niż *Streptomyces* rodzajów reprezentujących różne rodziny promieniowców jest równie bogaty i że wytwarzają one wiele cennych związków, które wciąż jeszcze czekają na odkrycie [17, 24].

BIOSYNTENZA ZWIĄZKÓW POLIKETYDOWYCH I PEPTYDOWYCH

Jedną z najważniejszych klas metabolitów wtórnych promieniowców oraz innych bakterii, a także grzybów i roślin wyższych, są poliketydy – grupa związków niezwykle zróżnicowana pod względem struktury i funkcji biologicznej. Do poliketydów należą antybiotyki (makrolidy, tetracykliny, polieny) związki przeciwgrzybicze (nystatyna,

natamycyna), antypasożytnicze (awermektyna, milbemycyna), immunosupresyjne (rapamycyna, FK506) i przeciwnowotworowe (daunomycyna, mitramycyna). Związki poliketydowe powstają w wyniku cyklicznie powtarzających się reakcji kondensacji i redukcji reszt krótkich kwasów karboksylowych [25, 26] katalizowanych przez duże, wieloenzymatyczne kompleksy – syntazy poliketydowe (PKS – ang. *polyketide synthase*). Syntazy poliketydowe kontrolują dobór substratów (tzw. jednostek wydłużających), stopień i stereospecyficzność redukcji w każdym cyklu biosyntezy oraz sposób cyklizacji wydłużanego łańcucha. Enzymy modyfikujące towarzyszące syntazom przeprowadzają dalsze przemiany szkieletu poliketydowego (glikozylacja, hydroksylacja, metylacja), co również zwiększa różnorodność produktów [27].

Klasyczny podział bakteryjnych syntaz poliketydowych wyróżnia syntazy typu I (PKS I) przeprowadzające biosyntezę makrolidów (np. erytromycyny) i innych poliketydów niearomatycznych oraz syntazy typu II (PKS II) wytwarzające poliketydy aromatyczne (np. aktynorodynę, tetracenomycynę). Syntazy typu I (modułowe – ang. *modular*) składają się z jednego lub kilku wysokocząsteczkowych (300-1000 kDa), wielofunkcyjnych białek obejmujących domeny enzymatyczne zgrupowane w moduły, z których każdy katalizuje jeden cykl kondensacji i redukcji. Syntazy typu II (iteracyjne – ang. *iterative*) to kompleksy kilku odrębnych enzymów wykorzystywanych wielokrotnie do przeprowadzenia wszystkich wymaganych cykli biosyntezy. Badania ostatnich lat ukazują jednak większą różnorodność w zakresie budowy i sposobu działania syntaz poliketydowych. Obszerne omówienie tych zagadnień znajdzie czytelnik w artykułach przeglądowych [26, 28].

Budowa chemiczna poliketydów jest „zaprogramowana” w strukturze syntaz poliketydowych. W ostatnim dziesięcioleciu uczyniono ogromny postęp w zrozumieniu reguł tego programu [29], a rozwój metod biologii molekularnej pozwolił na kontrolowane modyfikacje syntaz poliketydowych i wprowadzanie zaplanowanych zmian do struktury produktu [30-32]. Przez sukcesywną inaktywację lub dodawanie poszczególnych domen, wymianę na domeny o innej specyficzności, łączenie domen i całych modułów pochodzących z różnych syntaz czy wreszcie dobór różnych enzymów modyfikujących tworzone są tzw. biblioteki kombinatoryczne związków nie występujących w naturze, które są następnie testowane pod względem aktywności biologicznej [33, 34].

Drugą liczną i zróżnicowaną grupą metabolitów wtórnych mikroorganizmów są związki peptydowe syntetyzowane bez udziału rybosomów przez syntetazy peptydowe (NRPS – ang. *non-ribosomal peptide synthetase*). Należą do nich antybiotyki (penicylina, wankomycyna, bacytracyna), związki o aktywności przeciwwirusowej (lantiopeptyna, siamicyna), przeciwnowotworowej (aktynomycyna D), immunosupresyjnej (cyklosporyna A), a także herbicydy (bialafos), siderofory czyli nośniki jonu żelaza(III) (enterobaktyna) i biosurfaktanty (surfaktyna). Ogromne bogactwo struktur chemicznych wynika m.in. z wbudowywania nietypowych aminokwasów nie występujących w białkach (o konfiguracji D i N-metylowanych) oraz hydroksykwa-

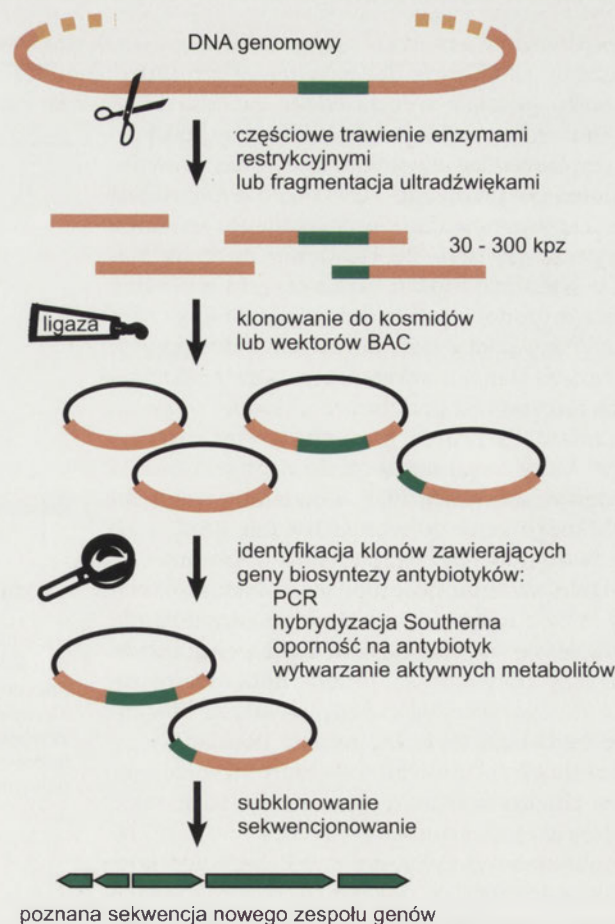
sów. Powstające liniowe, cykliczne lub rozgałęzione łańcuchy są następnie acylowane, glikozylowane lub wchodzą w skład pierścieni heterocyklicznych [35]. Syntetazy peptydowe, podobnie jak syntazy poliketydowe typu I, to białka o wysokiej masie cząsteczkowej (480 – 1600 kDa) zbudowane z modułów zawierających domeny katalityczne odpowiedzialne za rozpoznanie i przyłączenie (oraz ewentualną modyfikację) kolejnych reszt aminokwasowych [36]. Ułożenie modułów w białku syntetazy decyduje o strukturze produktu. Inżynieria genetyczna pozwala na wymianę domen i modułów i tworzenie sztucznych układów zdolnych do biosyntezy produktów o zaplanowanej strukturze [37, 38]. Znane są także związki naturalne zawierające zarówno część poliketydową jak i peptydową. Ich biosynteza jest katalizowana przez odrębne kompleksy syntazy poliketydowej i syntetazy peptydowej bądź też przez syntazy hybrydowe, w których zachodzą bezpośrednie oddziaływania między białkami PKS i NRPS [39]. Również takie układy są przedmiotem zainteresowania inżynierii genetycznej [40].

Biosynteza kombinatoryczna pozwala na otrzymywanie bardzo złożonych związków o wielu centrach chiralności, których synteza chemiczna byłaby niezwykle trudna [41-43]. Osiągnięcia biosyntezy kombinatorycznej spowodowały gwałtowny wzrost zainteresowania nie znanymi wcześniej genami syntaz poliketydowych i syntetaz peptydowych, które mogłyby zwiększyć zasób fragmentów o różnych właściwościach do konstrukcji sztucznych układów syntetyzujących nowe związki o zaplanowanych strukturach.

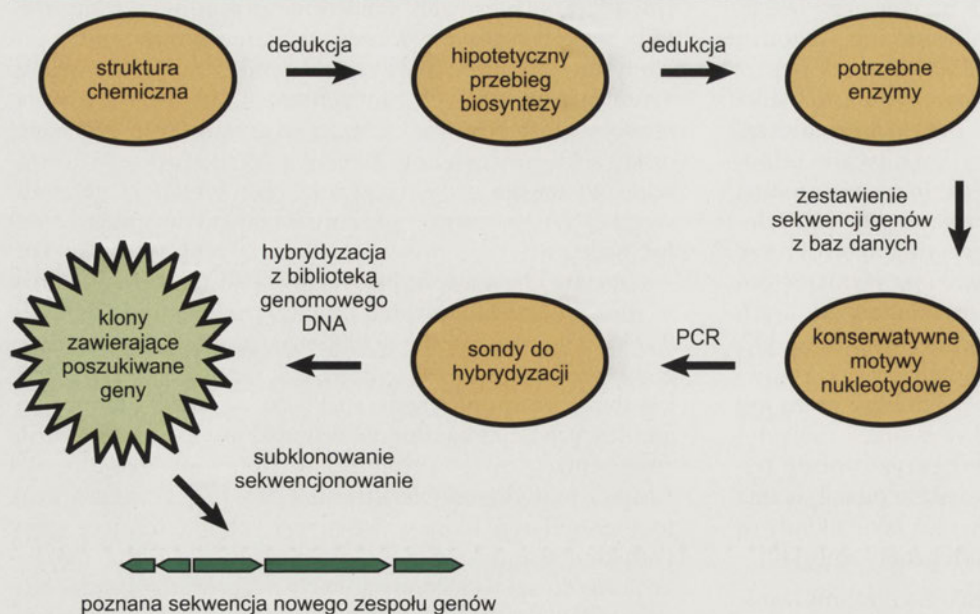
STRATEGIE POSZUKIWANIA NOWYCH GENÓW BIOSYNTETY ANTYBIOTYKÓW I INNYCH METABOLITÓW WTRÓNYCH

Istnieje kilka możliwych podejść do poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwbakteryjnym. Pierwsze z nich, to projektowanie inhibitorów konkretnych enzymów lub receptorów bakteryjnych [44]. Drugie, to wysokowydajne badania przesiewowe (HTS – ang. *high throughput screening*) czyli testowanie pod względem aktywności biologicznej dużych kolekcji (tzw. bibliotek) związków [45, 46]. Mogą to być produkty syntezy chemicznej bądź biosyntezy kombinatorycznej, lub ekstrakty z hodowli mikroorganizmów. Trzeci kierunek badań, który stanowi zasadniczy przedmiot niniejszego artykułu, to poszukiwanie nowych zespołów genów biosyntezy antybiotyków i innych związków aktywnych biologicznie. W dalszej części artykułu terminem „antybiotyki” objęto również inne metabolity wtórne. Nie można wyznaczyć ścisłej granicy pomiędzy powyższymi podejściami badawczymi. Na przykład wysokowydajne badania przesiewowe mogą służyć zarówno do testowania świadomie zaprojektowanych związków o zdefiniowanej strukturze jak i do wykrywania substancji aktywnych w ekstraktach z hodowli wyizolowanych szczepów czy też do identyfikacji klonów z biblioteki DNA zawierających sekwencję genów biosyntezy antybiotyków. Automatyczne urządzenia pomiarowe i pipetujące oraz zastosowanie mikroplątek zawierających kilka tysięcy mikrostudzienek mieszczących po kilka mikrolitrów reagentów pozwalają na przebadanie ponad 100 tysięcy próbek dziennie [47]. Jednak o powodzeniu badań przesiewowych decyduje jakość biblioteki i opracowanie odpowiednich testów aktywności

[24, 48]. Poniżej zostały omówione przede wszystkim metody wykorzystywane do poszukiwania genów syntaz poliketydowych, które mają zastosowanie również do genów syntetaz peptydowych i innych enzymów. Przedstawione sposoby postępowania dotyczą organizmów o nieznanym dotąd sekwencji genomu. Niemal wszystkie opisane tu strategie wymagają skonstruowania tzw. biblioteki genomowego DNA badanego mikroorganizmu w kosmidach [49] lub wektorach typu BAC (ang.: *bacterial artificial chromosome* – sztuczny chromosom bakteryjny) [50] (Rys. 1). Wektory te umożliwiają klonowanie długich fragmentów DNA (do 300 kpz). Liczba klonów w bibliotece powinna być tak duża żeby praktycznie cały genom był reprezentowany. Przy założeniu równomiernego rozkładu, ok. 1000 klonów kosmidowych (średnia długość wstawki ok. 40 kpz) zapewnia reprezentację całego chromosomu *Streptomyces* o długości 8 Mbp z prawdopodobieństwem 99,9 % [51]. Następnym krokiem jest identyfikacja klonów zawierających interesujące geny i subklonowanie krótszych fragmentów (ok. 1 kpz) nadających się do sekwencjonowania. Występowanie genów biosyntezy metabolitów wtórnych w postaci zgrupowań bardzo ułatwia zadanie; wystarczy identyfikacja jednego genu, a analiza sąsiadujących z nim odcinków DNA pozwala znaleźć pozostałe geny. Klony z biblioteki można badać pod kątem oporności na badany antybiotyk, wytwarzania substancji hamujących wzrost bakterii testowych czy też wykazujących aktywność w innych testach (np. wiązanie receptorów). Najczęściej jednak do przeszukiwania bibliotek



Rysunek 1. Schemat konstrukcji biblioteki genomowego DNA i identyfikacji klonów zawierających geny biosyntezy antybiotyków. BAC – ang. *bacterial artificial chromosome*.



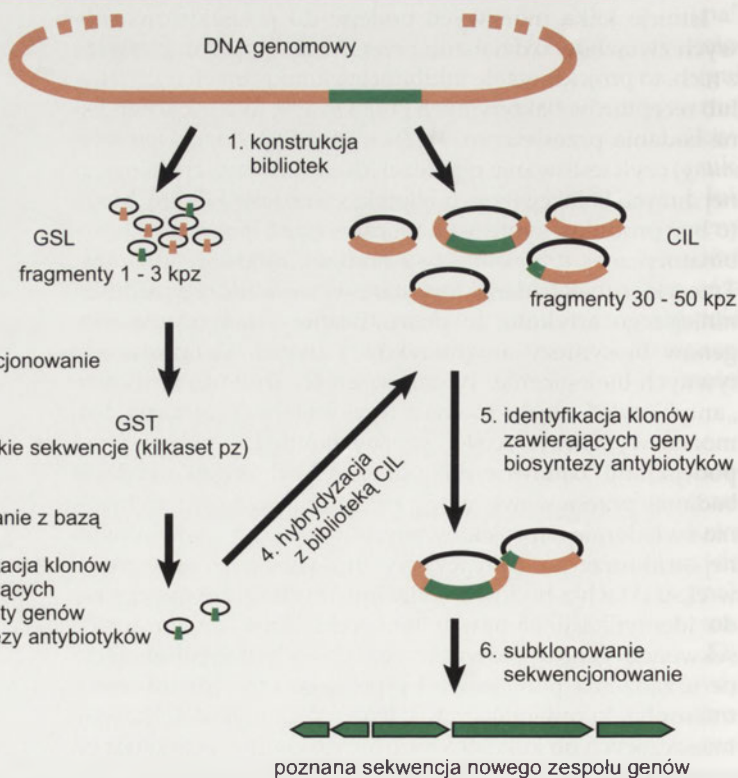
nomowego DNA z sondami reprezentującymi syntazy poliketydowe wykazywały obecność od dwóch do dziesięciu różnych zespołów genów PKS I i od jednego do trzech zespołów genów PKS II w genomie jednego szczepu. Aby jednoznacznie zidentyfikować zespół genów biosyntezy konkretnego antybiotyku niezbędna była dodatkowa hybrydyzacja z sondami wykrywającymi geny enzymów modyfikujących szkielet poliketydowy, a także analiza funkcjonalna znalezionych genów. Jak widać na powyższym przykładzie, zastosowanie techniki hybrydyzacji pozwala na znalezienie nie tylko genów biosyntezy znanych związków, ale również innych zespołów genów, których produkty nie są znane. Za kolejny przykład może posłużyć praca Sosio i współ.

genomowego DNA stosuje się technikę PCR i hybrydyzację typu „Southern”, które pozwalają na wykrycie obecności poszukiwanych genów niezależnie od tego czy w danych warunkach ulegają one ekspresji.

„ODWROTNA GENETYKA”

„Odwrótną genetyką” (ang. *reverse genetics*) nazwano strategię, w których dane na temat struktury chemicznej związku (a także wyniki badań procesu biosyntezy przy użyciu znakowanych radioaktywnie prekursorów) umożliwiają wydedukowanie prawdopodobnego przebiegu biosyntezy i pozwalają na zaproponowanie wymaganego zestawu enzymów [9] (Rys. 2). Wiadomo, że geny białek o podobnej funkcji bardzo często wykazują znaczne podobieństwo sekwencji nukleotydowej. W związku z tym, porównanie dostępnych w bazach danych sekwencji genów analogicznych enzymów z podobnych układów pozwala na zidentyfikowanie konserwatywnych motywów, które mogą posłużyć do zaprojektowania starterów do reakcji PCR. Powielony fragment wybranego genu po wyznakowaniu służy jako sonda do hybrydyzacji z biblioteką genomowego DNA szczepu produkującego badany związek. Klony kosmidowe hybrydujące z sondą poddaje się subklonowaniu i sekwencjonowaniu. Aby potwierdzić, że zidentyfikowany zespół genów rzeczywiście odpowiada za biosyntezę badanego związku można poddać klony kosmidowe ekspresji albo skonstruować mutanty ze zinaktywowanymi genami. Stosując takie podejście eksperymentalne Weber i wsp. [9] zidentyfikowali geny biosyntezy 10 antybiotyków poliketydowych o ciekawych właściwościach biologicznych lub nietypowych strukturach chemicznych produkowanych przez różne szczepy *Streptomyces*. Wyniki hybrydyzacji biblioteki ge-

dyzacji bibliotek kosmidowych *Planobispora rosea* i *Actinoplanes teichomyceticus* oraz genomowego DNA kilku innych szczepów należących do różnych rodzajów promieniowców z sondami obejmującymi konserwatywne fragmenty genów syntetaz peptydowych. Wykazali oni obecność wielu zespołów genów NRPS w genomach większości szczepów, nawet takich, u których nie stwierdzono wcześniej wytwarzania oligopeptydów. Przykłady blisko 40 zespołów genów biosyntezy antybiotyków promieniowców zidentyfikowanych



Rysunek 2. Strategia „odwrótniej genetyki”.

przy użyciu sond uzyskanych na drodze reakcji PCR można znaleźć w artykule Weber i współ. [9].

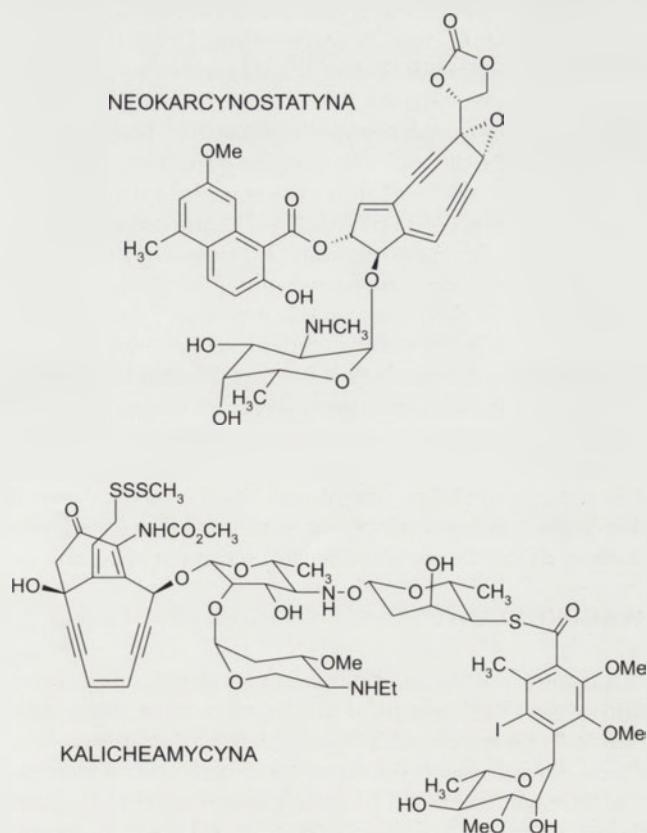
„SKANOWANIE” GENOMU

W celu poszukiwania zupełnie nowych zespołów genów metabolitów wtórnych, nawet tych, które nie ulegają ekspresji, opracowano bardzo wydajną metodę tzw. „skanowania” genomu [52]. Wymaga ona skonstruowania dwóch bibliotek genomowego DNA (Rys. 3). Jedna z nich (GSL – ang. *genome sampling library*) zawiera fragmenty długości 1-3 kbp w wektorze plazmidowym, a druga (CIL – ang. *cluster identification library*) – fragmenty długości 30-50 kbp (lub dłuższe) w wektorze kosmidowym lub BAC. Klony z biblioteki krótszych fragmentów (GSL) są częściowo sekwencjonowane, a uzyskane krótkie odcinki sekwencji (GST – ang. *genome sequence tags*) są następnie porównywane z sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych w celu zidentyfikowania tych, które wchodzi w skład genów zaangażowanych w biosyntezę produktów naturalnych. Na podstawie wybranych w ten sposób fragmentów sekwencji projektowane są sondy do hybridyzacji z biblioteką dłuższych fragmentów (CIL). Klony kosmidowe, dla których uzyskano pozytywny wynik hybridyzacji poddaje się szczegółowej analizie, a uzyskaną sekwencję obszaru obejmującego nowy zespół genów dołącza się do bazy danych. Duża wydajność metody „skanowania” genomu wynika stąd, że analiza stosunkowo niewielkiej liczby sekwencji zapewnia „przegląd” całego genomu. Zespoły genów biosyntezy antybiotyków obejmują 20 – 200 kbp. W przypadku chromosomu o długości 8,5 Mbp można się więc spodziewać, że spośród 1000 sekwencji GST co najmniej 2 będą reprezentować każdy zespół genów [52]. Metoda ta została zastosowana do analizy genów biosyntezy antybiotyków enediinowych (ang. *enediine*) [52]. Są to bardzo toksyczne związki o silnym działaniu przeciwnowotworowym, np. kalicheamycyna, neokarcynostatyna. Szczegółowo poznano struktury 10 spośród ponad 20 związków należących do tej grupy [53]. Posiadają one bardzo reaktywne ugrupowania chromatoforowe z 9 lub 10 członowym pierścieniem zawierającym układ sprzężonych wiązań podwójnych i potrójnych (Rys. 4). Ugrupowanie to bywa nazywane „głowicą bojową”. Stosując metodę „skanowania” genomu zidentyfikowano geny biosyntezy pięciu znanych antybiotyków enediinowych [52]. Stwierdzono, że biosyntezę „głowicy” katalizuje nowy typ syntazy poliketydowej – iteracyjna syntaza typu I (tzn. wielofunkcyjne białko wykorzystywane wielokrotnie w procesie biosyntezy jednej cząsteczki poliketydu) [52, 53]. Do niedawna uważano, że tego typu syntazy są charakterystyczne dla grzybów (np. syntaza kwasu 6-metylosalicylowego *Penicillium patulum* [54]) i nie występują u bakterii. Badania ostatnich lat pokazują jednak, że iteracyjne PKS I są rozpowszechnione również u bakterii [28]. Metodą „skanowania” genomu przebadano także 70 szczepów, u których nie stwierdzono wcześniej produkcji antybiotyków enediinowych. U 16 % z nich wykryto geny biosyntezy związków z tej grupy. Geny biosyntezy „głowicy” enediinowej szczepów należących do 6 rodzajów promieniowców (*Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Kitasatosporia*, *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Streptomyces*) posiadały bardzo podobny układ i sekwencję nukleotydową. Co więcej, stosując urozmaicone podłoża hodowlane udało się wywołać biosyntezę tych związków [52]. Te dane

pozwalają mieć nadzieję, że odkrycie nowych struktur z tej grupy jest kwestią niedalekiej przyszłości, a zastosowanie biosyntezy kombinatorycznej pozwoli opracować związki o lepszych właściwościach terapeutycznych.

GENY MIKROORGANIZMÓW TRUDNYCH DO HODOWLI

Wraz z opracowaniem metod pozwalających na identyfikację drobnoustrojów bez konieczności ich izolacji i namnażania stało się jasne, że ogromnej większości gatunków występujących w przyrodzie nie udaje się wyhodować w standardowych warunkach laboratoryjnych [55, 56]. Szacuje się, że do tej pory odkryto zaledwie 1% istniejących gatunków. Olbrzymia ilość informacji zawarta w genach nieznanymi mikroorganizmów rozpala wyobraźnię naukowców i budzi uzasadnione nadzieje na odkrycie nowych antybiotyków. Podejmowane są projekty klonowania i sekwencjonowania DNA izolowanego bezpośrednio z próbek środowiskowych (tzw. eDNA – ang. *environmental DNA*) [57]. Największym przedsięwzięciem tego typu była analiza całkowitego DNA mikroorganizmów żyjących w Morzu Sargassowym [58]. Poza ukazaniem zróżnicowania biocenozy, badania takie dają dostęp do wielu nowych genów o potencjalnym znaczeniu praktycznym dla człowieka. W bibliotece eDNA z gleby (tzw. biblioteki metagenomowej) zidentyfikowano klony zawierające geny syntaz poliketydowych typu I [59], a w bibliotece DNA bakteryjnych symbiontów chrząszczy i gąbek wykryto klony zawierające geny nietypowych syntaz modułowych, w których domena acylotransferazy jest zastąpiona odrębnym białkiem działającym iteracyjnie [60]. Metody identyfikacji mikroorganizmów oparte są na analizie sekwencji konserwatywnych i zmiennych regionów ge-



Rysunek 3. Schemat poszukiwania genów biosyntezy antybiotyków metodą

nów kodujących rybosomowy RNA (rRNA) bakterii i wykorzystują technikę amplifikacji i hybrydyzacji DNA [56, 61, 62]. Wstępne informacje na temat składu populacji bakteryjnej w próbkach środowiskowych (gleba, osady denne, woda, materiał roślinny i zwierzęcy i in.) mają duże znaczenie przy tworzeniu kolekcji szczepów mogących produkować nowe związki biologicznie aktywne. Pozwalają one dobrać odpowiednią metodę izolacji i hodowli poszukiwanych grup mikroorganizmów [24, 63, 64]. Wychodząc z założenia, że badanie rzadkich, słabo poznanych mikroorganizmów zwiększa szanse znalezienia producentów nowych związków biologicznie aktywnych np. w Biosearch Italia w ciągu 4 lat wyizolowano ponad 9 tys. szczepów promieniowców z których tylko 1% należy do rodzaju *Streptomyces* [24]. Cała, stale rozbudowywana, kolekcja obejmuje ponad 50 tys. szczepów promieniowców i grzybów nitkowatych. Otrzymane z nich płyny pohodowlane, wysuszone i zamrożone w mikropłytkach, stanowią materiał do wysokowydajnych badań przesiewowych.

Ogromnym ułatwieniem badań nad genami słabo poznanych, trudnych do hodowli organizmów jest możliwość przenoszenia całych zespołów genów do komórek innego gospodarza (tzw. ekspresja heterologiczna). Ekspresji heterologicznej poddaje się także fragmenty DNA izolowanego bezpośrednio z gleby i innych próbek środowiskowych [65]. Najczęściej zastępczymi gospodarzami bywają dobrze poznane i specjalnie modyfikowane genetycznie szczepy *Escherichia coli* i *Streptomyces lividans*, a ostatnio także *Pseudomonas putida* [66]. Zwiększenie spektrum testowanych gospodarzy zwiększa szanse uzyskania ekspresji genów i znalezienia interesujących metabolitów. Aby umożliwić tego typu manipulacje genetyczne opracowano specjalne wektory – pochodne BAC. Niezwykle ważną ich cechą jest zdolność przenoszenia dużych fragmentów DNA (ponad 100 kbp) mogących pomieścić cały zespół genów. Są to wektory określane wspólną nazwą ESAC (ang. *E. coli-Streptomyces artificial chromosome*) ulegające replikacji w komórkach *E. coli* i integrujące się z chromosomem *Streptomyces* w miejscu *attB* dzięki zastosowaniu systemu *attP-int* faga Φ C31, np. plazmidy pPAC-S1 i pPAC-S2 [67]. Inna seria wektorów (pMBD7, -9, -12) skonstruowanych przez Martinez i wsp. [66] posiada, oprócz elementów wymaganych do integracji z chromosomem *Streptomyces*, sekwencję *oriT* umożliwiającą przekazywanie ich z dużą wydajnością przez koniugację z *E. coli* do *Streptomyces* i *Pseudomonas*. Plazmidy te ulegają także integracji z chromosomem *Pseudomonas putida* MBD1 – specjalnie skonstruowanego szczepu wyposażonego w sekwencję *attB* ze *Streptomyces* [66]. Wektory ESAC nadają się do tworzenia bibliotek genomowego DNA, eDNA oraz do rekonstrukcji pełnych zespołów genów z kilku klonów kosmidowych zawierających mniejsze fragmenty [24, 68].

UWAGI KOŃCOWE

Ogromny postęp technologiczny w dziedzinie sekwencjonowania DNA przyniósł lawinowy wzrost ilości informacji genetycznych zdeponowanych w komputerowych bazach danych (ogólnodostępnych i będących własnością firm farmaceutycznych i biotechnologicznych). Poznanie sekwencji genomów organizmów produkujących antybiotyki nie tylko dostarcza danych na temat nowych genów

biosyntezy metabolitów wtórnych, ale daje wgląd w mechanizmy regulacji metabolizmu, pozwala usprawniać szczepy przemysłowe i konstruować zmodyfikowane szczepy zdolne do wydajnej ekspresji całych zespołów genów pochodzących z innych organizmów. Wykorzystanie coraz bogatszej puli informacji genetycznych pochodzących z laboratoriów na całym świecie nie byłoby możliwe bez rozwoju bioinformatyki i stworzenia wyrafinowanego oprogramowania pozwalającego na sprawne gromadzenie i przetwarzanie danych o genach i białkach oraz szybkie wyszukiwanie i porównywanie ogromnej liczby sekwencji. Dostęp do dużej liczby sekwencji zwiększa skuteczność strategii poszukiwania nowych genów biosyntezy antybiotyków takich jak „odwrotna genetyka” czy „skanowanie” genomu, ze względu na możliwość lepszego zaprojektowania starterów do reakcji PCR i sond do hybrydyzacji. Równoległe z komputeryzacją postępuje miniaturyzacja i automatyzacja wielu czynności laboratoryjnych (przesiewanie bakterii, izolacja DNA, hybrydyzacja, sekwencjonowanie). Zastosowanie robotów umożliwia szybkie testowanie tysięcy próbek i sprawia, że znalezienie „na chybił-trafił” nowych metabolitów lub genów warunkujących ich biosyntezę jest na tyle realne, że coraz więcej firm inwestuje w tego typu badania. Wciąż opracowywane są nowe wektory i ulepszone szczepy umożliwiające obróbkę bardzo dużych fragmentów DNA. Dzięki nim zyskujemy coraz lepszy dostęp do informacji genetycznej organizmów trudnych lub niemożliwych do hodowli. Poznawanie kolejnych syntaz poliketydowych i syntetaz peptydowych oraz ich produktów ukazuje niezwykłą różnorodność metabolitów wtórnych mikroorganizmów, dostarcza nowych substancji leczniczych i wzbogaca zasób narzędzi do tworzenia związków o zaplanowanej strukturze metodami biosyntezy kombinatorycznej.

PIŚMIENICTWO

1. Rozwadowska-Dowzenko M, Lamers H (1950) Zakażenia gronkowcami penicyloodpornymi. *Med Dośw Mikrobiol* 2: 183-184
2. Wilson P, Andrews J A, Charlesworth R, Walesby R, Singer M, Farrell D J, Robbins M (2003) Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 51: 186-188
3. World Health Organization (2000) Overcoming Antimicrobial Resistance. WHO Report on Infectious Diseases 2000. WHO/CDS/20002
4. World Health Organization (2001) Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/200110
5. Bradbury J (2004) “My enemy’s enemy is my friend.” Using phages to fight bacteria. *Lancet* 363: 624-625
6. Weber-Dąbrowska B, Mulczyk M, Gorski A (2000) Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute’s experience. *Arch Immunol Ther Exp* 48: 547-551
7. Wijkman JC, Beckett R P (2002) Combinatorial chemistry in anti-infectives research. *Drug Discov Today* 7: 126-132
8. Demain A L (2002) Prescription for an ailing pharmaceutical industry. *Nat Biotechnol* 20: 331
9. Weber T, Welzel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W (2003) Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol* 106: 221-232
10. Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, Chater K F, Hopwood D A (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, UK

11. Bernal A, Ear U, Kyrpides N (2001) Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. *Nucleic Acids Res* 29: 126-127
12. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147
13. Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12215-12220
14. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21: 526-531
15. Kuczek K, Pawlik K, Kotowska M, Mordarski M (1997) *Streptomyces coelicolor* DNA homologous with acyltransferase domains of type I polyketide synthase gene complex. *FEMS Microbiol Lett* 157: 195-200
16. Ruan X, Stassi D, Lax SA, Katz L (1997) A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* 203: 1-9
17. Sosio M, Bossi E, Bianchi A, Donadio S (2000) Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. *Mol Gen Genet* 264: 213-221
18. Mochizuki S, Hiratsu K, Suwa M, Ishii T, Sugino F, Yamada K, Kinashi H (2003) The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol Microbiol* 48: 1501-1510
19. Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176: 386-390
20. Hopwood DA (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* 145: 2183-2202
21. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekai F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544
22. Cerdeno-Tarraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res* 31: 6516-6523
23. Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, Shiba T, Hattori M (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14925-14930
24. Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavalletti L, Sosio M, Puglia AM (2002) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol* 99: 187-198
25. Kuczek K, Kotowska M, Mordarski M (1996) Sterowana biosynteza antybiotyków poliketydowych. *Post Bioch* 42: 276-282
26. Staunton J, Weissman K (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* 18: 380-416
27. Hutchinson C R, Fujii I (1995) Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 49: 201-238
28. Shen B (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7: 285-295
29. Hopwood D A (2004) Cracking the polyketide code. *PLoS Biol* 2: 0166-0169
30. Kuczek K, Kotowska M, Pawlik K (1999) Kombinatoryczna biosynteza nowych makrolidów i innych poliketydów złożonych. *Postępy Biochemii* 45: 320-331
31. Xue Q, Ashley G, Hutchinson CR, Santi DV (1999) A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11740-11745
32. Carreras CW, Santi DV (1998) Engineering of modular polyketide synthases to produce novel polyketides. *Curr Opin Biotechnol* 9: 403-411
33. Kuczek K (2002) Nowe związki poliketydowe o zaplanowanej strukturze wytwarzane przez promieniowce. *Biotechnologia* 4: 130-141
34. Donadio S, Sosio (2003) Strategies for combinatorial biosynthesis with modular polyketide synthases. *Comb Chem High Throughput Screen* 6: 489-500
35. Konz D, Marahiel MA (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* 6: R39-48
36. Crosa JH, Walsh CT (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 223-249
37. Stachelhaus T, Schneider A, Marahiel MA (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* 269: 69-72
38. Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA (2000) Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5848-5853
39. Du L, Shen B (2001) Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4:215-228
40. Du L, Sanchez C, Shen B (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng* 3: 78-95
41. Shen, B (2004) Accessing natural products by combinatorial biosynthesis. *Sci STKE* 225:pe14
42. Rodriguez E, McDaniel R (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr Opin Microbiol* 4: 526-534
43. Cane D E, Walsh C T, Khosla C (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations and mutations. *Science* 282: 63-68
44. Chalker AF, Lunsford RD (2002) Rational identification of new antibacterial drug targets that are essential for viability using a genomics-based approach. *Pharmacol Ther* 95: 1-20
45. Hertzberg RP, Pope AJ (2000) High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol* 4: 445-451
46. Chmiel A (2001) *Biotechnologia farmaceutyczna: dokonania wieku XX i oczekiwania wieku XXI*. *Biotechnologia* 4: 56-78
47. Wolcke J, Ullmann D (2001) Miniaturized HTS technologies - uHTS. *Drug Discov Today* 6: 637-646
48. Donadio S, Carrano L, Brandi L, Serina S, Soffientini A, Raimondi E, Montanini N, Sosio M, Gualerzi CO (2002) Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *J Biotechnol* 99: 175-185
49. Hohn B, Koukolikova-Nicola Z, Lindenmaier W, Collins J (1988) Cosmids. *Biotechnology* 10: 113-127
50. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8794-8797
51. Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 21: 77-96
52. Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, Liu W, Bachmann BO, Nonaka K, Ahlert J, Thorson JS, Shen B, Farnet CM (2003) A genomics-guided

- approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol* 21: 187-190
53. Shen B, Liu W, Nonaka K (2003) Eneidyne natural products: biosynthesis and prospect towards engineering novel antitumor agents. *Curr Med Chem* 10: 2317-2325
 54. Beck J, Ripka S, Siegner A, Schiltz E, Schweizer E (1990) The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur J Biochem* 192: 487-498
 55. Ward DM, Weller R, Bateson MM (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345: 63-65
 56. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169
 57. Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66: 2541-2547
 58. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74
 59. Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, Robe P, Pujic P, Tuphile K, Bertrand H, Vogel TM, Perriere G, Simonet P, Nalin R (2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol* 70: 5522-5527
 60. Piel J, Hui D, Fusetani N, Matsunaga S (2004) Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* 6: 921-927
 61. Amann R, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* 24: 555-565
 62. Zakrzewska-Czerwinska J (2002) Sondy molekularne w diagnostyce mikrobiologicznej. *Biotechnologia* 4: 79-89
 63. Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15681-15686
 64. Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA, Janssen PH (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69: 7210-7215
 65. Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martinez A, Kolvek SJ, Hopke J, Osburne MS, August PR, Nalin R, Guerineau M, Jeannin P, Simonet P, Pernodet JL (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* 69: 49-55
 66. Martinez A, Kolvek SJ, Yip CL, Hopke J, Brown KA, MacNeil IA, Osburne MS (2004) Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl Environ Microbiol* 70: 2452-2463
 67. Sosio M, Giusino F, Cappellano C, Bossi E, Puglia AM, Donadio S (2000) Artificial chromosomes for antibiotic-producing actinomycetes. *Nat Biotechnol* 18: 343-345
 68. Sosio M, Bossi E, Donadio S (2001) Assembly of large genomic segments in artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 29: E37

Application of molecular biology for the discovery of biosynthetic genes of polyketide and peptide antibiotics produced by actinomycetes

Magdalena Kotowska

Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 12 Weigla St., 53-114 Wrocław, Poland
 e-mail: szulc@iitd.pan.wroc.pl

Key words: genome scanning, actinomycetes, polyketide synthase, non-ribosomal peptide synthetase

ABSTRACT

Actinomycetes are currently the main source of antibiotics. Genome sequencing reveals the presence in these organisms of multiple gene clusters for the synthesis of yet unidentified secondary metabolites. Technological advances in DNA isolation, cloning and sequencing, as well as development of bioinformatics, facilitate large scale search for new gene clusters in organisms with unknown genome sequence and in environmental DNA. Methods used for detection of polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes are described in this article. New PKS and NRPS genes give access to new biologically active natural products which can become drugs or substrates for chemical modifications. Even more inspiring is their use in combinatorial biosynthesis to produce a variety of compounds with rationally designed structures.

UNIwersytet Warszawski

Poszukuję kandydata na pozycję „post-doca” od stycznia 2006 r. Pozycja jest finansowana przez EC (STREP 6FP). Projekt realizowany we współpracy z pięcioma laboratoriami europejskimi dotyczy zastosowania metod biologii systemowej do modelowania przepływu zmian RNA w jądrze komórkowym drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, od transkrypcji do degradacji (tytuł: RIBOSYS: System Biology for RNA metabolism in yeast). Kandydat powinien być niezależny i kreatywny, posiadać doktorat z biologii molekularnej, biochemii lub pokrewnej dziedziny, oraz mieć doświadczenie w technikach RNA; znajomość technik typu Northern, pulse-chase, nuclear run-on, ChIP mile widziana.

Kontakt: Dr Joanna Kufel, Zakład Genetyki UW, Pawińskiego 5a, Warszawa
 e-mail: kufel@ibb.waw.pl; tel: 048-22-592 2245.



Wskazówki dla Autorów

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek odautorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinie recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępów Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępów Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Re-

dakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się przysyłanie prac na dyskietce lub płycie CD. Tekst winien być zapisany jako *.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: *.tif, *.cdr, *.psd lub *.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

Kolejno numerowane strony obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych

przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang DN, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikula S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
4. Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment, W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
5. Darżynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

Ilustracje: ryciny winny być zapisane jako: *.tif, *.cdr, *.psd, lub *.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szeroko-

ści jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8. Ilustracje i tabele prosimy przesyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czern i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przesyłać na adres:

postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskiecie lub płycie CD, zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

Sławomir Pikula
redaktor naczelny
kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Komunikat Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

SKŁADKI CZŁONKOWSKIE I PRENUMERATA „POSTĘPÓW BIOCHEMII” W 2005 ROKU

Składka członkowska Towarzystwa w 2005 roku wynosi dla członków rzeczywistych 80 zł, dla członków studentów 40 zł (w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”); małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 120 zł (80 + 40). Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2005 roku, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą 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 jedynie 30 zł za roczną prenumeratę „Postępów Biochemii”. Osoby, które nie są członkami Towarzystwa, mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii”. Koszt prenumeraty w 2005 roku wynosi 100 zł (w tym koszty wysyłki). Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” (wraz z kosztami wysyłki) 140 zł.

UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Składki członkowskie Towarzystwa i należności za prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii” prosimy wpłacać na konto:

**BPH PBK S.A. ODDZIAŁ W WARSZAWIE, UL. KRUCZA 24-26,
NR KONTA 95 1060 0076 0000 4110 5000 0371.**

Wpłaty za prenumeratę kwartalnika „Acta Biochimica Polonica” należy dokonywać na konto:

**BPH PBK S.A. ODDZIAŁ W WARSZAWIE, UL. KRUCZA 24-26,
NR KONTA 35 1060 0076 0000 4110 5000 0384.**

dr Anna Dygas
skarbnik Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

When was the last time
you saw something for the
first time?

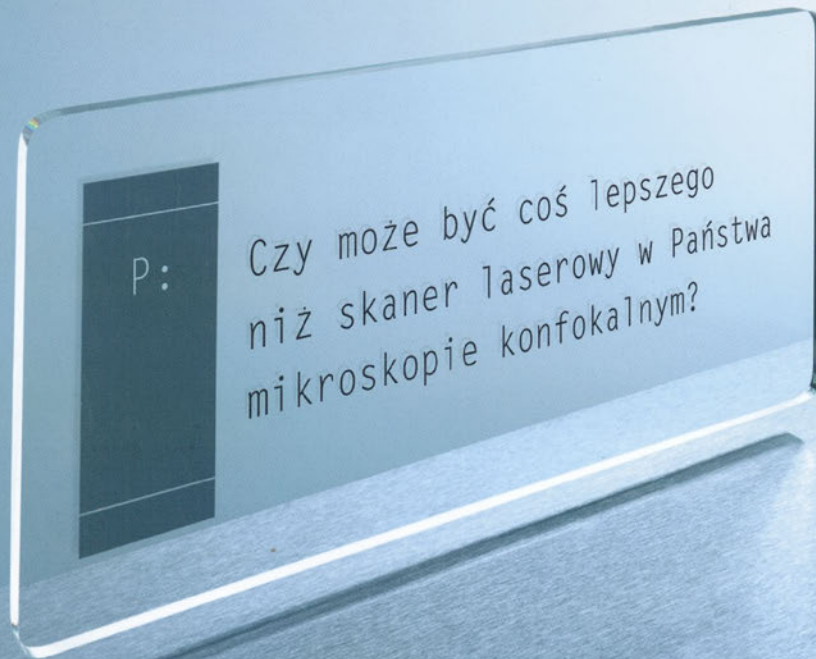
Carl Zeiss: FluoresScience

<http://www.zeiss.pl>
zeiss.com/FluoresScience

<http://rcin.org.pl>



We make it visible.



P:

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

O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

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

Wiecej informacji pod adresem:
Olympus Polska Sp. z o.o.
Tel. (22) 860 00 77, Faks (22) 831 04 53
mikroskopy@olympus.pl
www.olympus.pl

