

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 48, NR 3, 2002

Chromosom Filadelfia	156
Zagadka histonu H1	167
Prion [<i>PSI</i>]	175
Wyciszenie ekspresji genów u roślin	182
Procesy komórkowe aaRS.	189
Niedobór cholesterolu – SREBP	200
Rola lipidów w MDR	208
Receptory nukleotydowe	220
Adenozyna – neuromodulatorem	230
Recenzja	239

WYDAWCA

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

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

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

REDAKTORZY

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

BIURO REDAKCJI

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

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EWA BROJER (Warszawa)
TADEUSZ CHOJNACKI (Warszawa)
ANNA DYGAŚ (Warszawa)
MICHAŁ KOMOSZYŃSKI (Toruń)
BARBARA NAWROT (Łódź)
ANDRZEJ PASZEWSKI (Warszawa)
SŁAWOMIR PIKUŁA (Warszawa)
PAWEŁ SABAŁA (Warszawa)
KRZYSZTOF STAROŃ (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Chromosom Filadelfia Philadelphia chromosome IRENEUSZ MAJSTEREK, JANUSZ BŁASIAK.	156
Zagadka histonu H1 The histone H1 mystery ANDRZEJ T. WIERZBICKI.	167
Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Prion [PSI] and its effect on termination of translation in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAŁGORZATA JAKUBIEC, MAGDALENA BOGUTA.	175
Wyciszenie ekspresji genów i nowe narzędzia biologii molekularnej roślin Gene silencing and new tools in plant molecular biology MAREK KOTER, JACEK HENNIG.	182
Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w procesach komórkowych Participation of aminoacyl-tRNA synthetases in cellular processes MONIKA KAMIŃSKA, ADRIANNA ZAKRZEWSKA, MARIA MADAJKA, JAN BARCISZEWSKI.	189
Niedobór cholesterolu sygnałem dla transdukcji informacji z endoplazmatycznego retikulum do jądra komórkowego — procesy proteolitycznego odszczepienia czynników transkrypcyjnych z błon ER Depletion of cholesterol in signal transduction from endoplasmic to the cell nucleus — the proteolytic cleavage of transcription factors from the ER membranes BOŻENA WIECZOREK, JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA.	200
Rola lipidów błony komórkowej w zjawisku oporności wielolekowej MDR i jego modulacji The role of cell membrane lipids in multidrug resistance and its modulation KRYSZYNA MICHALAK, ANDRZEJ B. HENDRICH.	208
Receptory nukleotydowe Nucleotide receptors EDYTA GENDASZEWSKA-DARMACH.	220
Adenozyna — neuroprzekaźnik i neuromodulator w centralnym układzie nerwowym Adenosine — neurotransmitter and neuromodulator in central nervous system MAŁGORZATA ROMANOWSKA, MICHAŁ KOMOSZYŃSKI.	230
Recenzja Review KRZYSZTOF ZABŁOCKI.	239

Chromosom Filadelfia

Philadelphia chromosome

IRENEUSZ MAJSTEREK¹, JANUSZ BŁASIAK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Klonalny charakter białaczek
- III. Chromosom Filadelfia
 - III-1. Obszar pęknięć chromosomu 22 (*BCR*)
 - III-2. Protoonkogen *c-ABL*
- IV. Gen fuzyjny *BCR/ABL*
- V. Rola *BCR/ABL* w procesach komórkowych
 - V-1. Stymulowana przez *BCR/ABL* naprawa DNA
 - V-2. Oddziaływanie *BCR/ABL* z genem supresorowym *P53*
- VI. Rola *BCR/ABL* w regulacji apoptozy
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: 14-3-3 — białko z rodziny BAP-1; ABL — kinaza tyrozynowa; ALL — ostra białaczka limfoblastyczna; AML — ostra białaczka szpikowa; ATM — mutacja genu *AT* (ang. *ataxia-teleangiectasia*); BAD, BAK, BAX — inhibitory apoptozy; Bap-1 — białko towarzyszące *BCR*; BCL-2, BCLX_L, BCL-W — promotory apoptozy; *BCR* — region złamań chromosomu 22; CML — przewlekła białaczka szpikowa; CLL — przewlekła białaczka limfocytarna; CRKL, CRK, CBL, GRB-2, SHC — białka adaptorowe; DNA-PK — zależna od DNA kinaza białkowa; Doc-1 — białko przewodzące sygnał z receptora czynnika wzrostu KIT; GAP — białko aktywujące GTPazę; GEF — czynnik regulujący wymianę GDP/GTP; ICSBP — białka wiążące interferon; IFN- α — interferon- α ; JAK — kinazy cytoplazmatyczne z rodziny Janus; Kit — międzybłonowy receptor kinaz tyrozynowych; MAP — białka stowarzyszone z mikrotubulami; M-bcr — główny region złamań chromosomu 22; m-bcr — mniejszy region złamań chromosomu 22; MDR — oporność wielolekowa; NLS — sekwencje lokalizacji jądrowej; OTK — onkogenna kinaza tyrozynowa; Ph — chromosom Filadelfia; PI3K — kinaza fosfatydyloinozytolowa; RAC, RHO — białka o aktywności GTPazy;

Contents:

- I. Introduction
- II. Clonal nature of leukemias
- III. Philadelphia chromosome
 - III-1. Breakpoint cluster region of chromosome 22 (*BCR*)
 - III-2. Proto-oncogene *c-ABL*
- IV. *BCR/ABL* fusion gene
- V. Role of *BCR/ABL* in cellular processes
 - V-1. *BCR/ABL*-stimulated DNA repair
 - V-2. Interaction of *BCR/ABL* with *P53* tumour suppressor gene
- VI. Role of *BCR/ABL* in regulation of apoptosis
- VII. Concluding remarks

RAD51 — białko biorące udział w naprawie przez rekombinację homologiczną; RAD52/RAD51/RPA — kompleks rekombinacyjny; RAF-1, AKT, MEK1/MEK2, ERK — kinazy serynowo-treoninowe; SH — domena homologiczna z SRC (ang. *Src Homology*); *SRC*, *MYC*, *RAS* — protoonkogeny komórkowe; STAT1,5 — czynniki transkrypcyjne; VDAC — napięciowo zależne kanały anionowe.

I. Wprowadzenie

Białaczkom towarzyszy na ogół niestabilność genomowa, będąca skutkiem zaburzeń funkcjonowania układów endokrynologicznego i immunologicznego oraz oddziaływania czynników chemicznych i fizycznych, a także wirusów. U chorych na białaczki obserwuje się aberracje chromosomalne oraz rearanżacje protoonkogenów, genów supresorowych i genów białek naprawy DNA [1-6]. Zmiany w protoonkogenach, będące wynikiem mutacji punktowych, integracji wirusowego DNA, amplifikacji oraz translokacji, mogą prowadzić do ich aktywacji. Mutacje punktowe w protoonkogemie *N-RAS* wykrywane są u chorych w stanach ostrych białaczek, a także u chorych ze stanami przedbiałczkowymi [7, 8]. W białaczkach i chłoniakach obserwuje się także akty-

¹Dr, ²prof. dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

wację protoonkogenów *C-MYC* i *BCL-2* [9-13]. Za udziałem czynników genetycznych w powstawaniu białaczek przemawia także wysoka częstość pojawiania się ostrej białaczki mieloblastycznej u chorych z zespołem Downa (trisomia chromosomu 21) oraz z genetycznie uwarunkowanymi syndromami towarzyszącymi niestabilności genomowej — niedokrwiłości Fanconiego i zespołu Blooma [14-16]. W komórkach białaczkowych wykrywa się różne nieprawidłowości chromosomalne, z których najczęstszą określa się mianem chromosomu Filadelfia, powstającego na skutek translokacji z udziałem chromosomów 9 i 22 [17-19].

II. Klonalny charakter białaczek

Białaczki są nowotworami krwi i charakteryzują się akumulacją nieprawidłowych krwinek białych w szpiku. Komórki te przedostają się często do krwi obwodowej i naciekają narządy. Białaczki są chorobami klonalnymi, wywodzą się zazwyczaj z jednej komórki, która uległa transformacji nowotworowej. W niektórych białaczkach komórką przechodzącą transformację jest wielopotencjalna komórka macierzysta, która może dać początek wszystkim liniom komórkowym krwi. W innych przypadkach białaczka jest związana z transformacją bardziej zróżnicowanej komórki, która może zapoczątkować tylko jedną linię. Zmieniona komórka daje początek klonowi potomnych komórek nowotworowych. W białaczkach ostrych klon nowotworowy charakteryzuje się wysoką zdolnością do progresji, a w białaczkach przewlekłych — niską [20].

Podstawą klinicznego podziału białaczek jest stopień dojrzałości komórek dominującego typu w szpiku i we krwi. Cztery najczęściej występujące odmiany białaczek, to: ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ostra białaczka szpikowa (AML), przewlekła białaczka szpikowa (CML) i przewlekła białaczka limfocytarna (CLL) [21-24].

III. Chromosom Filadelfia

W 1960 roku *Novell* i *Hungerford* opisali pierwszą specyficzną nieprawidłowość chromosomalną nowotworów krwi, nazwaną od miasta dokonania odkrycia chromosomem Filadelfia (Ph). Został on zidentyfikowany w komórkach szpiku pobranego od pacjentów z CML. W 1973 roku wykazano, że Ph jest wynikiem translokacji fragmentu chromosomu 22 do chromosomu 9 (t(9q+;22q-)(q34;q11)) [25]. Translokacja jest zapoczątkowana pęknięciami w dłuższych ramionach chromosomu 9 (9q34) i 22

(22q11) i powoduje przeniesienie fragmentu genu *BCR* z chromosomu 22 do *locus* protoonkogeny *C-ABL* w chromosomie 9 [26-28]. W rezultacie zostaje utworzony gen fuzyjny *BCR/ABL*, kodujący cytozolowe białko charakteryzujące się aktywnością onkogennej kinazy tyrozynowej [29-31].

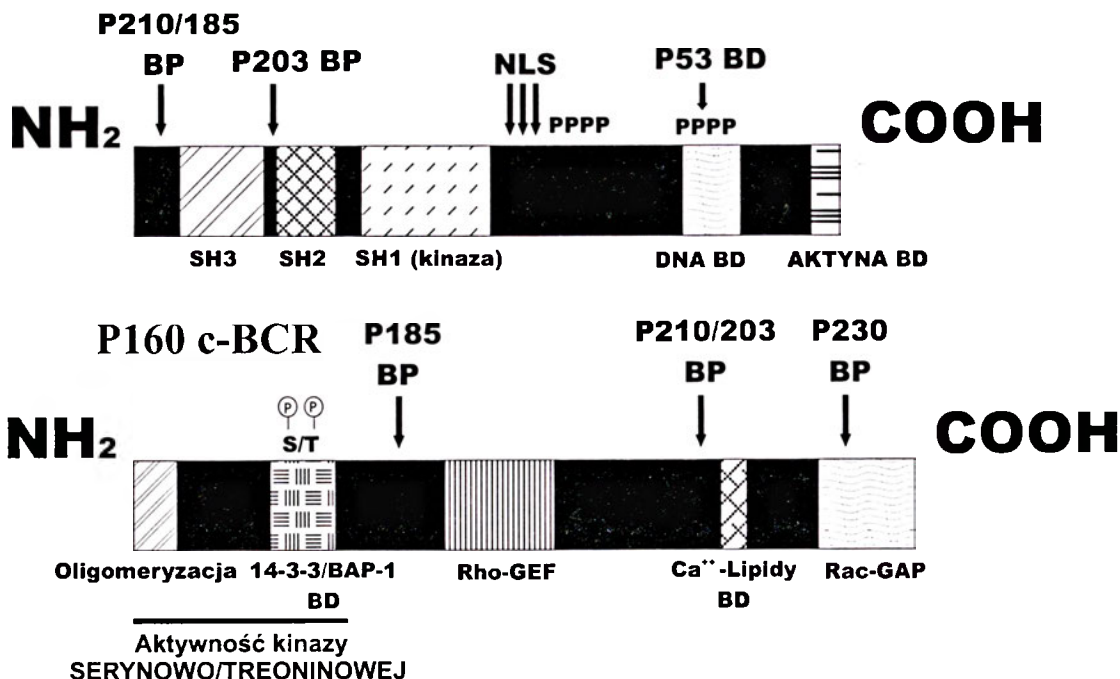
Chromosom Filadelfia występuje w 95% CML oraz w około 5% ALL u dzieci i 15-25% ALL u dorosłych; jest także wykrywany w AML [32, 33]. W CML translokacja ma miejsce w wielopotencjalnych macierzystych komórkach mieloidalnych i limfoidalnych, a w ALL — prekursorowych komórkach B lub T, niekiedy także w wielopotencjalnych komórkach pnia [33]. Translokacje *BCR-ABL* w CML i ALL różnią się punktem pęknięcia w *BCR*, a powstałe geny fuzyjne kodują białka różnych wielkości (190 kDa i 210 kDa) [33, 34]. Z klinicznego punktu widzenia identyfikacja Ph u dzieci z CML jest bardzo ważna, gdyż są one kwalifikowane do leczenia typowego dla CML u dorosłych i rokowanie jest u nich lepsze niż w postaci bez Ph [29, 30]. W ALL występowanie Ph związane jest z niekorzystnym rokowaniem i kwalifikuje chorych do przeszczepu szpiku. Szczególnie źle rokujące dla pacjentów z ALL jest występowanie Ph łącznie z monosomią chromosomu 7 [32, 33, 35].

Ostrej fazie choroby w CML towarzyszą wtórne zmiany chromosomalne: dodatkowy Ph, trisomia chromosomu 19, brak chromosomu Y [36]. W tym stadium w około połowie komórek wykrywa się więcej niż jeden chromosom Filadelfia, powstający prawdopodobnie w wyniku duplikacji lub triplikacji pierwotnego Ph, a nie w wyniku nowych, niezależnych translokacji [36-39]. Zmiany chromosomalne pojawiają się dużo wcześniej przed wystąpieniem klinicznych objawów tej fazy. Opisano także złożone translokacje Ph, w których oprócz chromosomów 9 i 22 biorą udział dodatkowe chromosomy, na przykład chromosom 20 [31].

III-1. Obszar pęknięć chromosomu 22 (*BCR*)

Pęknięcie w chromosomie 22, zapoczątkowujące translokację Ph, ma miejsce w genie *BCR* [40]. Gen ten liczy 130 kpz, zawiera 25 eksonów i koduje białko o masie 160 kDa, P160^{BCR} [41-43] (Ryc. 1). Ekson pierwszy genu *BCR* koduje *N*-końcowy region białka charakteryzujący się aktywnością kinazy serynowo-treoninowej [44, 45]. Eksony 3-10 mają sekwencje homologiczne z onkogenem *DBL*, który koduje białko z rodziny białek GEF (czynnik wymiany GDP/GTP). Białko GEF pełni razem z białkiem wspomagającym GAP (białko aktywujące GTPazy)

P145 c-ABL



Ryc. 1. Struktura białek c-ABL (P145) i c-BCR (P160). NLS — sekwencje lokalizacji jądrowej, PPPP — sekwencje bogate w prolinę, BD — domeny wiążące, BP — punkty pęknięć w *N*-końcowym obszarze c-BCR i *C*-końcowym obszarze c-ABL prowadzące do translokacji, powodującej powstawanie chromosomu Filadelfia z genem fuzyjnym *BCR/ABL*, którego ekspresja prowadzi do powstania białek P185, P203 i P210 BCR/ABL występujących w białaczkach człowieka (na podstawie [1, 18])

rolę regulatora enzymów charakteryzujących się aktywnością GTPazy [46]. Białko BCR zbudowane jest w sposób domenowy — zawiera domenę oligomeryzacji, zależne od wapnia miejsce wiązania lipidów, miejsce wiązania czynnika 14-3-3 z rodziny BAP-1 (białka stowarzyszone z BCR), domenę homologiczną z RHO-GEF oraz *C*-końcową domenę RAC-GAP, wykazującą aktywność GTPazy [47–49]. Mechanizm działania BCR w hematopoezie nie został jeszcze dokładnie poznany, jednak wyniki badań na myszach z wyłączonym genem *BCR* sugerują związek pomiędzy P160^{BCR} i regulacją wytwarzania rodników tlenowych przez układ oksydazy NADPH w komórkach mieloidalnych i B-limfoidalnych [50]. Myszy *BCR*^{-/-} wykazują normalne czynności życiowe, podobnie ich system hematopoetyczny funkcjonuje bez zaburzeń, jednak w obecności endotoksyn rozwija się u nich szok septyczny. W neutrofilach tych zwierząt następuje nadmierne wytwarzanie rodników tlenowych, które zaburzają kontrolę nad białkiem P21^{rac2} aktywującym neutrofilowy wybuch oddechowy [51].

III-2. Protoonkogen *c-ABL*

c-ABL występuje u wszystkich zwierząt kręgowych oraz bezkręgowców i charakteryzuje się filogenetyczną konserwatywnością [52]. Ludzki *c-ABL* zawiera 12 eksonów z sekwencjami homologicznymi

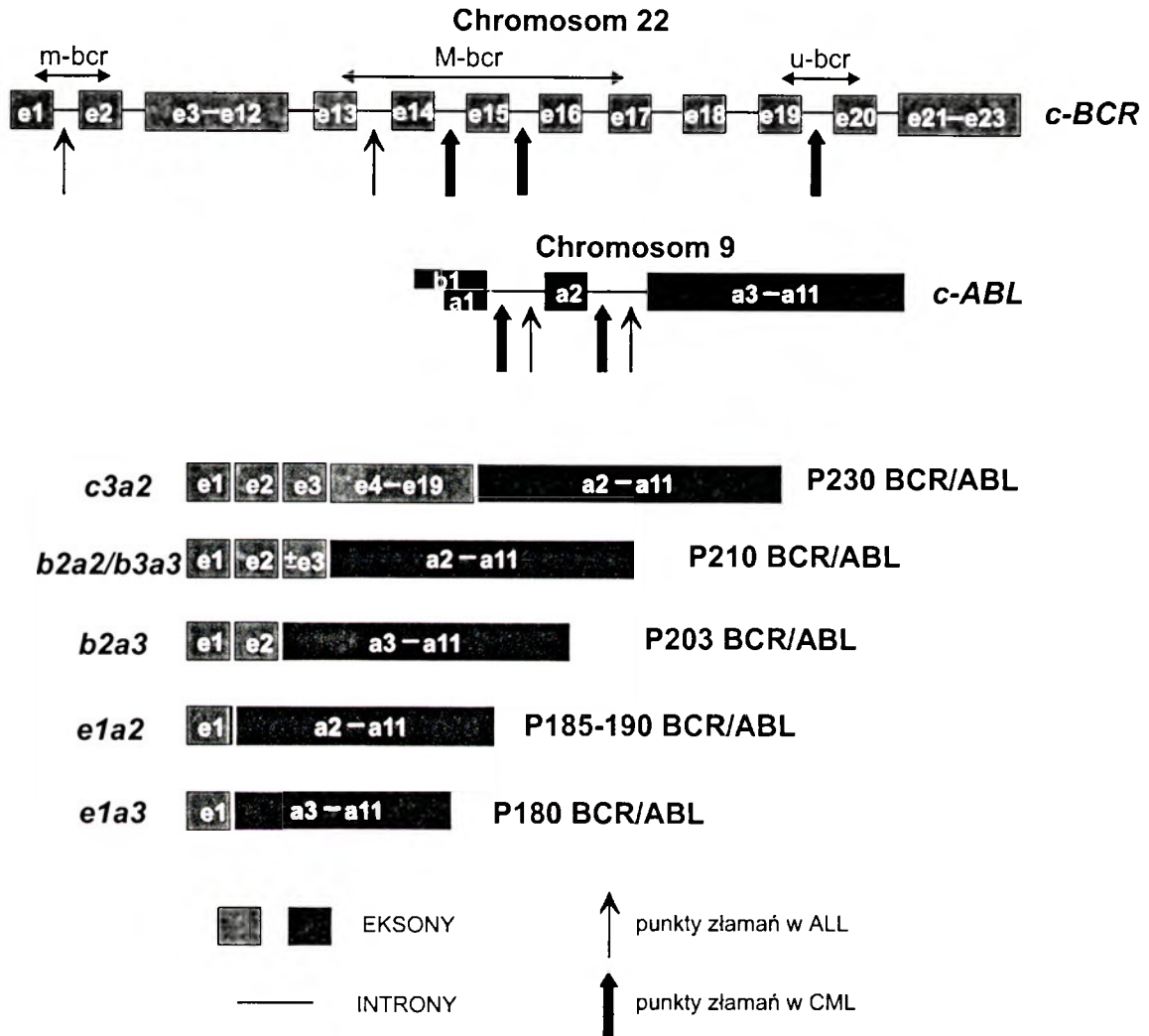
mi z sekwencją onkogeny *v-ABL* rozłożonymi nieciągłe w obszarze 300 kpz [41, 53, 54]. Dwa pierwsze eksony *c-ABL*, a1 i b1, są transkrybowane alternatywnie, co prowadzi do syntezy dwóch cząsteczek mRNA o długości 6 kpz i 7 kpz, ulegających translacji na białka liczące 1122 i 1142 aminokwasów [54]. Ludzki *c-ABL* koduje kinazę tyrozynową o masie 145 kDa, (P145^{c-ABL}) (Ryc. 1). P145^{c-ABL} jest jedną z niereceptorowych kinaz tyrozynowych spokrewnionych z białkiem SRC, pierwszą scharakteryzowaną onkogeną kinazą tyrozynową (OTK) [17, 55]. Białko *c-ABL* zawiera domeny homologiczne z SRC: SH1, SH2 i SH3. Domena SH1 wykazuje aktywność kinazową, SH2 wiąże ufosforylowaną tyrozyne a SH3 wykazuje powinowactwo do sekwencji bogatych w prolinę i bierze udział w regulacji aktywności SH1 [56–58]. P145^{c-ABL} zawiera *C*-końcowy fragment z domenami sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS) i sekwencji bogatych w prolinę, domenę wiążącą DNA, miejsce wiązania P53 i domenę wiążącą aktyne. Lokalizacja komórkowa P145^{c-ABL} umożliwia jego udział w procesach zachodzących zarówno w jądrze jak i cytoplazmie [56].

IV. Gen fuzyjny *BCR/ABL*

Translokacja fragmentu genu *BCR* z chromosomu 22 do *locus* protoonkogeny *c-ABL* w chromosomie 9 (t(9q+;22q-)(q34;q11)) prowadzi do powstania genu

fuzyjnego *BCR/ABL* (Ryc. 2), którego ekspresja sprzyja proliferacji i stwarza przewagę komórek Ph⁺ nad otaczającymi je prawidłowymi komórkami szpiku [17, 48, 59]. W komórkach Ph⁺ ekspresji ulegają zarówno gen fuzyjny *BCR/ABL* jak i *c-BCR* oraz *c-Abl* [60-61].

W chromosomie 22 pęknięcia następują wewnątrz intronów genu *BCR*, głównie w trzech regionach: M-bcr, m-bcr i μ -bcr [66-68]. W regionie M-bcr pęknięcia mają miejsce w obszarze o długości 5,8 kpz, obejmującym 5 eksonów e12-e16 (b1-b5) i występują zazwyczaj pomiędzy eksonami e13 (b2) i e14



Ryc. 2. Molekularne konsekwencje translokacji *t(9q+;22q-)* prowadzącej do powstania chromosomu Filadelfia. Lokalizacja punktów pęknięć w chromosomach 22 i 9 oraz główne mRNA białek fuzyjnych występujących w białaczkach człowieka (na podstawie [8, 15, 17, 18, 19])

Region chromosomu 9, w którym następują pęknięcia prowadzące do powstania chromosomu Filadelfia obejmuje obszar ponad 200 kpz. Najczęściej pęknięcia występują w pierwszym eksonie od końca 5' genu *c-ABL*, co powoduje, że translokacji do chromosomu 22 ulega prawie cały ten gen (eksony a2-a11), a wycięciu ulegają eksony 1a i 1b [59, 62]. Ekson 2 odgrywa kluczową rolę w składaniu *BCR/ABL* [63]. Pęknięcia pomiędzy eksonami b1 i a1 powodują translokację dłuższego fragmentu *ABL* (a1-a11), a wycięciu ulega tylko wewnętrzny ekson b1 [62]. W chromosomie 9 stwierdza się również zwiększoną częstość pęknięć w intronie przedzielającym eksony a2 i a3. Wówczas translokacji ulega krótszy region a3-a11 [64, 65].

(b3) lub e14 (b3) i e15 (b4) [59, 64]. Gdy fragmenty *BCR* ulegają fuzji z eksonami a2-a11 *ABL*, podczas transkrypcji powstaje hybrydowy mRNA b2a2/b3a2, zawierający 8,5 kZ z sekwencją pochodzącą z *BCR* na końcu 5' i sekwencją z *ABL* na końcu 3' [31, 62]. Białko *BCR/ABL* o masie 210 kDa, (P210), zawiera 902 lub 927 aminokwasów kodowanych przez gen *BCR* oraz 426 aminokwasów kodowanych przez gen *ABL* [59, 69]. Ekspresję P210 stwierdza się u większości pacjentów z CML oraz u około połowy ALL z Ph [31]. W kilku przypadkach ALL Ph⁺ i CML obserwowano ekspresję białka 203 kDa (P203) z transkrypty b2a3/b3a3 *BCR/ABL* [64, 65].

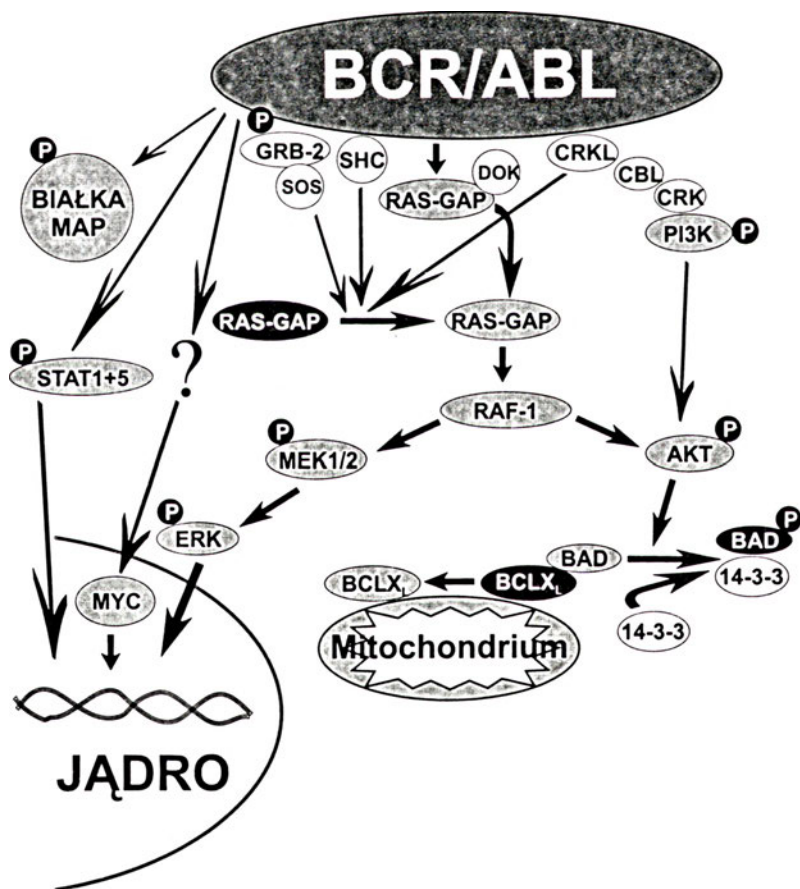
W ponad 75% przypadków ALL i nielicznych przypadkach CML Ph⁺, ekspresja genu fuzyjnego

BCR/ABL prowadzi do syntezy mniejszego białka o masie 185-190 kDa, P185-190 [17, 48]. W genie *BCR* miejsca pęknięć znajdują się w regionie m-bcr, pomiędzy dwoma pierwszymi eksonami e1 i e2 [62, 64]. W wyniku połączenia eksonów a2-a11 genu *ABL* z eksonem e1 genu *BCR* powstaje mRNA *BCR/ABL* liczący 7,5 kb [62]. Ze względu na alternatywne składanie białko P185-190 może występować razem z białkiem P210 [70]. W ALL Ph⁺ można obserwować także ekspresję białka o masie 180 kDa, będącego produktem translacji e1a3 mRNA, powstającego w wyniku połączenia eksonu e1 *BCR* i eksonów a3-a11 *ABL* [64, 65]. Geny fuzyjne *BCR/ABL* z miejscem pęknięcia w obszarze μ -bcr pomiędzy eksonami e19 i e20 genu *BCR* rzadko towarzyszą CML. Połączenie eksonów e1-e19 *BCR* z obszarem a2-a11 *ABL* prowadzi do powstania transkryptu c3a2 mRNA, ulegającego translacji na białko o masie 230 kDa [65, 71, 72].

tywność przypisuje się białku P185^{BCR/ABL} [32, 73]. O ile białko c-ABL występuje zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, to białka fuzyjne *BCR/ABL* wykrywane są niemal wyłącznie w cytoplazmie [25]. Taka lokalizacja *BCR/ABL* może mieć udział w onkogennej aktywności genu *BCR/ABL*, na którą wpływać także mogą zwiększona aktywność kodowanego przez niego enzymu i zdolność *BCR/ABL* do fosforylacji substratów nie rozpoznawanych przez c-Abl [74–76].

V. Rola *BCR/ABL* w procesach komórkowych

BCR/ABL uczestniczy w aktywacji wewnątrzkomórkowych kaskad przesyłania sygnałów w szlakach: RAS [77-79], JAK/STAT [80–83] oraz kinazy PI3K [84-85] (Ryc. 3). Proliferacja komórek *BCR/ABL*⁺ wymaga aktywności kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K [86, 87], jednakże to *BCR/ABL* two-



Ryc. 3. Niektóre formy aktywności *BCR/ABL* w komórce. Kolorem czarnym zaznaczono białka w postaci nieaktywnej, kolorem białym — białka adaptorowe. Szczegółowy opis procesów przedstawionych na rycinie umieszczono w tekście (na podstawie [84])

Tak więc ekspresja genu fuzyjnego *BCR/ABL*, w zależności od miejsca pęknięcia w *BCR* i *ABL*, powoduje syntezę kilku białek: P180, P185-190, P203, P210 lub P230, związanych z różnymi postaciami białaczek u ludzi. Wszystkie białka fuzyjne wykazują kilkakrotnie wyższą aktywność kinaz tyrozynowych niż białko P145^{c-ABL}. Najwyższą ak-

tywność przypisuje się białku P185^{BCR/ABL} [32, 73]. O ile białko c-ABL występuje zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, to białka fuzyjne *BCR/ABL* wykrywane są niemal wyłącznie w cytoplazmie [25]. Taka lokalizacja *BCR/ABL* może mieć udział w onkogennej aktywności genu *BCR/ABL*, na którą wpływać także mogą zwiększona aktywność kodowanego przez niego enzymu i zdolność *BCR/ABL* do fosforylacji substratów nie rozpoznawanych przez c-Abl [74–76].

Wzrost komórek hematopoetycznych kontrolują cytokiny, których receptory przekazują sygnał poprzez aktywację kinaz cytoplazmatycznych JAK, fosforylujących i aktywujących czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT. W komórkach *BCR/ABL*⁺ ma miejsce stała aktywacja szlaku JAK/STAT. Może być ona spowodowana niezależną od JAK fosforylacją STAT5, wykazującego aktywność antyapoptotyczną w obecności BCR/ABL [48, 81, 93, 94]. W odróżnieniu do naturalnych mechanizmów aktywacji szlaku JAK/STAT, BCR/ABL może bezpośrednio wpływać na czynniki STAT1 i STAT5, bez uprzedniej fosforylacji kinaz JAK. W konsekwencji, ekspresja genu *BCR/ABL* uniezależnia komórki od czynników wzrostu. Proces ten może być także zależny od białka RAS, będącego produktem protoonkogenu *RAS* [95, 96]. W aktywacji RAS biorą udział białka adaptorowe GRB-2, SHC i CRKL. GRB-2 razem z białkami SOS stabilizuje RAS w jego formie aktywnej, co pozwala na przyłączenie GTP. Białka GRB-2, SHC oraz CRKL są substratami BCR/ABL biorącego udział w aktywacji RAS [48]. Współdziałanie BCR/ABL i RAS może prowadzić do aktywacji kinazy RAF-1, inicjującej kaskadę sygnałów regulujących transkrypcję i apoptozę [84].

Nadekspresja onkogenu *MYC* towarzyszy wielu nowotworom u ludzi, także białaczkom. BCR/ABL może aktywować protoonkogen *c-MYC*, jednakże mechanizm tego procesu nie został jeszcze poznany [99-101]. Białko *MYC* pochodzi z rodziny czynników transkrypcyjnych, do której należą również białka JUN i FOS, a heterodimer JUN/FOS ma właściwości plejotropowego aktywatora transkrypcji. BCR/ABL może fosforylować JUN, przyczyniając się do ekspresji *MYC* [102].

BCR/ABL może stymulować proliferację komórek, jednakże aktywność ta może być hamowana przez białko P27. Białko to jest inhibitorem zależnych od cyklin kinaz i odgrywa kluczową rolę w regulacji wzrostu komórek hematopoetycznych. Taki charakter działania BCR/ABL może wynikać z jednoczesnej aktywacji cyklu komórkowego i zależnych od cyklin kinaz przez oddziaływanie z czynnikami hamującymi cykl komórkowy [103]. Stymulacja proliferacji komórek przez BCR/ABL może się odbywać z wykorzystaniem szlaków działania czynników wzrostu: BCR/ABL może oddziaływać z podjednostką βc receptora interleukiny-3 (IL-3) oraz międzybłonowym receptorem kinaz tyrozynowych, KIT. Fosfoproteina Dok-1 (P26^{DOK2}), biorąca udział w przesyłaniu sygnału z receptora KIT, może tworzyć kompleks z CRKL, RAS-GAP i BCR/ABL [84]. BCR/ABL może także fosforylować i aktywować

fosfolipazę C γ (PLC γ), fosfataze inozytolową SHIP-2, białka VAV i FAK, kinazy ERK i SRC [104-110] (Tabela 1).

Komórki *BCR/ABL*⁺ charakteryzują się obniżoną zdolnością adhezji. Ponieważ adhezja hamuje proliferację, to ta właściwość komórek *BCR/ABL*⁺ może mieć znaczenie dla ich zwiększonej aktywności proliferacyjnej, mającej kluczowe znaczenie w progresji nowotworów [111, 112]. Zdolności adhezyjne komórek *BCR/ABL*⁺ mogą zostać zwiększone przez interferon- α (IFN- α), który jest stosowany w terapii CML [113].

V-1. Stymulowana przez *BCR/ABL* naprawa DNA

Kluczową rolę u człowieka w procesie naprawy rekombinacyjnej odgrywa białko RAD51, biorące także udział w innych systemach naprawy DNA [114-120]. RAD51 może oddziaływać z produktami genów supresorowych *P53*, *BRCA1* i *BRCA2* [120, 122]. Białka rodziny RAD51 mogą także bezpośrednio kontrolować wzrost komórek [123].

Uszkodzenia DNA w komórce mogą powodować aktywację białka c-ABL, które może fosforylować Tyr⁵⁴ białka RAD51 [84, 124, 125]. Fosforylacja RAD51 stymuluje jego wiązanie z RAD52 i tworzenie kompleksu rekombinacyjnego RAD52/RAD51/RPA [126]. RAD51 może być także fosforylowany przez zależną od DNA kinazę białkową, DNA-PK, biorącą udział w naprawie przez rekombinację niehomologiczną [127]. BCR/ABL może bezpośrednio aktywować RAD51 [23, 57, 128] (Ryc. 4). Wzrost aktywności RAD51 w komórkach *BCR/ABL*⁺ może być wynikiem stymulowanej przez BCR/ABL transaktywacji promotora genu *RAD51* przy udziale czynnika transkrypcyjnego STAT5 [58].

Naprawa przez rekombinację homologiczną z udziałem RAD51 odgrywa główną rolę w usuwaniu dwuniciowych pęknięć DNA, które, gdy nie są naprawiane, mogą prowadzić do śmierci komórki. BCR/ABL, poprzez oddziaływanie z RAD51, może powodować zwiększenie efektywności naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. Takie uszkodzenia są wywoływane przez wiele leków przeciwnowotworowych oraz promieniowanie jonizujące stosowane w celach terapeutycznych, a ich efektywniejsza naprawa w komórkach *BCR/ABL*⁺ może indukować oporność tych komórek na promieniowanie i cytostatyki [129]. *BCR/ABL* może stymulować naprawę DNA w komórkach poddanych działaniu leków przeciwnowotworowych: cisplatyny, mitomycyny C oraz promieniowania γ ; w komórkach tych następuje wyraźny wzrost poziomu ekspresji

RAD51 [128, 130]. Dane te sugerują, że zależna od *RAD51* naprawa przez rekombinację homologiczną, jest jednym z mechanizmów biorących udział w indukcji oporności komórek *BCR/ABL*⁺ na leki i promieniowanie [128]. *BCR/ABL* może także indukować lekooporność poprzez inne mechanizmy: blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M czy prowadzące do blokowania apoptozy sty-

mogą mieć związek z powstawaniem chromosomu Filadelfia, będącego jednym z wyznaczników CML [139].

BCR/ABL może brać udział w regulacji ekspresji *P53*, wpływając na procesy związane z indukcją apoptozy oraz przejściowym blokowaniem cyklu komórkowego przed wyjściem z fazy G1 (Ryc. 4). Ekspresji *BCR/ABL* może towarzyszyć obniżenie

Tabela 1

Substraty *BCR/ABL*^a

Substrat	Funkcja
CBL	Białko adaptorowe
Grb-2	Białko adaptorowe
CRKL	Białko adaptorowe
CRK	Białko adaptorowe
SHC	Białko adaptorowe
Ras-GAP	GTPaza aktywująca białko RAS
Paksylina	Białko strukturalne (cytoszkieleł/błona komórkowa)
Talina	Białko strukturalne (cytoszkieleł/błona komórkowa)
FAK	Białko strukturalne (cytoszkieleł/błona komórkowa)
PLC-(Fosfolipaza fosfatydyloinozytolowa
P13K podjednostka p85	Kinaza serynowo-treoninowa
VAV	Różnicowanie komórek hematopoetycznych
FES	Różnicowanie komórek mieloidalnych
STAT1/STAT5	Czynnik transkrypcyjny
P62DOK	Białko adaptorowe

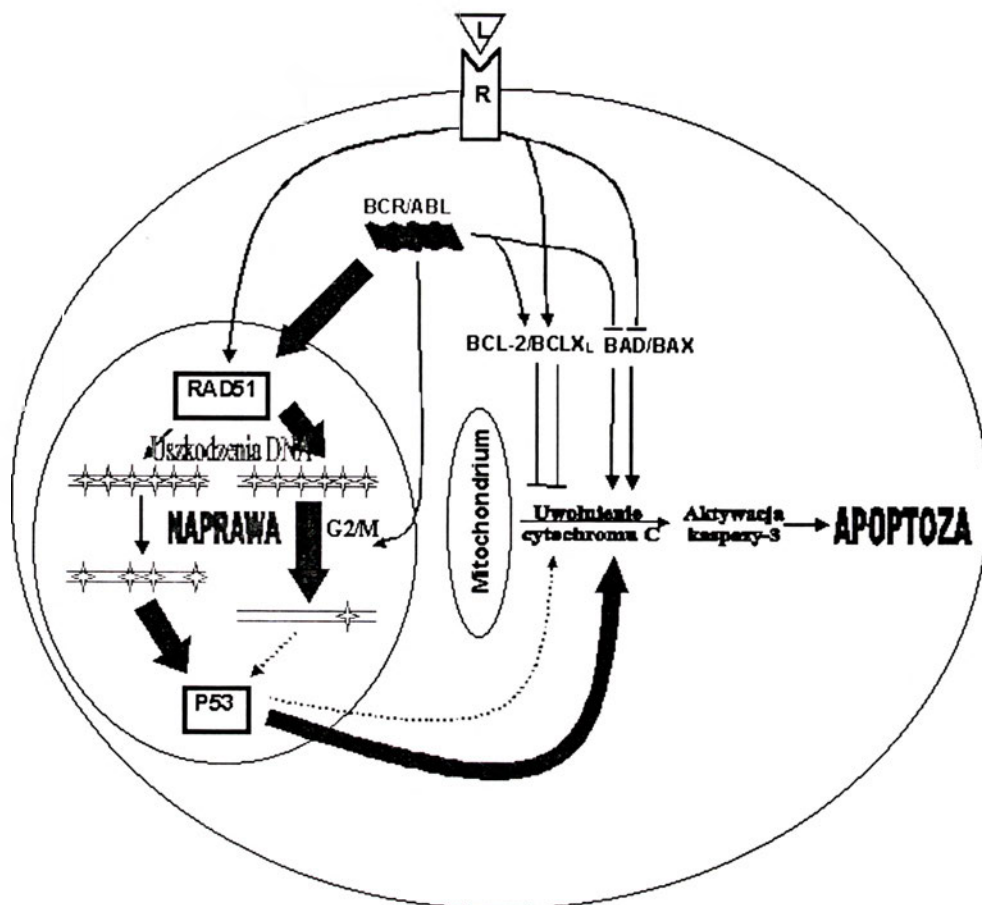
^a na podstawie [84]

mulowanie hamowania aktywności kaspazy 3 przez białka z rodziny *BCL-2* (Ryc. 4) [111, 128, 131, 132]. Do oporności komórek *BCR/ABL*⁺ na promieniowanie i cytostatyki może też przyczyniać się zwiększona efektywność naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację niehomologiczną. Zachodzi ona wskutek bezpośredniego oddziaływania *BCR/ABL* z kinazą *DNA-PK*, mającą kluczowe znaczenie dla tego rodzaju naprawy [133].

V-2. Oddziaływanie *BCR/ABL* z genem supresorowym *P53*

Mutacje *P53* towarzyszą wielu nowotworom złośliwym, jednakże w białaczkach ich częstość jest stosunkowo niska w porównaniu z innymi nowotworami [134, 135]. Wyjątkiem jest CML, gdzie mutacje wykrywa się u około 30% pacjentów w fazie ostrej choroby [136–138]. Sugeruje to, że mutacje *P53*

wewnątrzkomórkowego poziomu *P53*, co sugeruje udział *BCR/ABL* w hamowaniu aktywności *P53* [140]. Mechanizm tego procesu nie jest znany, jednak w odpowiedzi na uszkodzenia DNA prawidłowe białko *c-ABL* może być aktywowane przez białko *ATM*. Jest ono produktem zmutowanego genu *AT* (ang. *ataxia teleangiectasia*) i tworzy kompleks z *P53*. Wiązanie *P53* poprzedza fosforylacja Ser⁴⁶⁵ *c-ABL* przez *ATM* [100]. Być może podobny proces zachodzi także w odniesieniu do domeny *ABL* białka *BCR/ABL*. Na hamowanie aktywności *P53* przez *BCR/ABL* wskazują także wyniki doświadczeń przeprowadzonych na myszach z wyłączonym genem *P53*, u których stwierdzono podwyższoną zdolność do proliferacji i zmniejszoną podatność na apoptozę komórek *BCR/ABL*⁺ [141–143]. Zatem hamowanie aktywności *P53* przez *BCR/ABL* może być elementem transformacji komórek *BCR/ABL*⁺ do stanu charakterystycznego dla ostrej fazy białaczek.



Ryc. 4. Udział RAD51 i P53 w procesach komórkowych stymulowanych przez BCR/ABL. L ligand, R błonowy receptor komórkowy, BCL-2/BCLX_L białka hamujące apoptozę, BAD/BAX białka proapoptotyczne. Grubość strzałek odzwierciedla stopień aktywacji lub hamowania

VI. Rola *BCR/ABL* w regulacji apoptozy

Jak już wspomniano, ekspresji genu *BCR/ABL* może towarzyszyć hamowanie apoptozy [144-151] (Ryc. 4). Uszkodzenia DNA w komórkach *BCR/ABL*⁺ wywołują aktywację szlaku RAS prowadzącego do zwiększenia tempa proliferacji i blokowania apoptozy [111, 129]. *BCR/ABL* może hamować apoptozę poprzez blokowanie uwalniania cytochromu C z mitochondriów; cytochrom może się łączyć z białkiem APAF-1 oraz proenzymem kaspazy-9 [131, 132]. Utworzenie takiego kompleksu prowadzi do aktywacji kaspazy-9, uruchomienia kaskady innych kaspaz i apoptozy. Białka z rodziny BCL, w tym inhibitory apoptozy: BCL-2, BCLX_L, BCL-W oraz promotory apoptozy: BAD, BAK, BAX mogą funkcjonować jako integratory na drodze przekazywania sygnału apoptozy [152, 153]. Białka BAX i BAK wraz z białkami VDAC (białka napięciowo-zależnych kanałów anionowych) tworzą duże kanały błonowe, przez które przedostają się cząsteczki cytochromu C z mitochondrium do cytoplazmy. *BCR/ABL* może także hamować apoptozę przez

zmianę aktywności genów należących do rodziny BCL: BCLX_L i BCL-2 [89, 154-157]. Oddziaływaniu *BCR/ABL* z BCL-2 towarzyszyć może aktywacja szlaków RAS lub kinazy PI3K [158]. *BCR/ABL* może hamować apoptozę również przez fosforylację proapoptotycznego białka BAD przy udziale RAS [159-162]. Fosforylowane białko BAD tworzy kompleks z białkami frakcji cytoplazmatycznej z rodziny 14-3-3 i w takim stanie jest nieaktywne [92]. *BCR/ABL* może blokować uwalnianie cytochromu C z mitochondriów i aktywację kaspazy 3, hamując proapoptotyczną aktywność BAD [132, 154, 155, 163].

VII. Uwagi końcowe

Odkrycie chromosomu Filadelfia i poznanie mechanizmów translokacji t(9q+;22q-) stworzyło nowe perspektywy molekularnej analizy białaczek. Identyfikacja sekwencji regionów pęknięć w chromosomach biorących udział w powstawaniu Ph otwiera nowe możliwości prowadzenia badań nad jego znaczeniem biologicznym i rozwojem nowych

strategii diagnozowania oraz terapii. Określono rolę Ph i genu fuzyjnego *BCR/ABL* w patogenezie białaczek. *BCR/ABL* może brać udział w transformacji nowotworowej komórek hematopoetycznych przez zwiększenie tempa proliferacji, zaburzenie adhezji, hamowanie apoptozy, aktywację białek MAP, aktywację protoonkogenów *C-MYC* i *BCL-2*, oddziaływanie z genami supresorowymi i aktywację genów, których produkty uczestniczą w naprawie DNA.

Znajomość molekularnych podstaw translokacji Ph stwarza nowe perspektywy w leczeniu białaczek. Ekspresja *BCR/ABL* może być hamowana na etapie transkrypcji przez użycie antysensowych cDNA lub RNA. Zastosowanie specyficznych inhibitorów kinaz tyrozynowych pozwala na hamowanie aktywności *BCR/ABL*, w szczególności jego działania antyapoptycznego, wynikającego ze zdolności do fosforylacji białek regulujących apoptozę. Pomimo obiecujących efektów terapii genowej z zastosowaniem strategii antysensowej, inhibitory kinaz tyrozynowych wzbudzają największe nadzieje. W 1998 roku wprowadzono do zastosowania klinicznego związek o nazwie STI571, hamujący aktywność *BCR/ABL*, poprzez blokowanie jego domeny ATP, niezbędnej dla aktywności kinazy *BCR/ABL* [164]. STI571 jest obecnie stosowany w leczeniu ALL i CML, w których stwierdza się translokacje Ph [165].

Artykuł otrzymano 13 września 2001

Zaakceptowano do druku 11 kwietnia 2002

Piśmiennictwo

- Ferrara F, Vicari L, Festa B, Di Noto R, Pane F, Sebastio L, Cimino R (1995) *Haematologica* 80: 434-436
- Sebastio L, Ferrara F, Vicari L, di Noto R, del Vecchio L, Pane F, Fasanaro A, Cimino R, Salvatore F, Ventruto V (1995) *Am J Hematol* 50: 49-52
- Guin B, Padua R A (1995) *Cancer J* 8: 195-200
- Sheer D, Squire J (1996) *Cancer Biology* 7: 1-32
- De Angeli C, Gandini D, Cuneo A, Moretti S, Bigoni R, Roberti M G, Bardi A, Castoldi G L, del Senno L (2000) *Haematologica* 85: 913-921
- Iida S, Hanamura I, Suzuki T, Kamiya T, Kato M, Hayami Y, Miura K, Harada S, Tsuboi K, Wakita A, Akano Y, Taniwaki M, Nitta M, Ueda R (2000) *Int J Hematol* 72: 85-91
- Schaich M, Ritter M, Illmer T, Lisske P, Thiede C, Schakel U, Mohr B, Ehninger G, Neubauer A (2001) *Br J Haematol* 112: 300-307
- Scheele J S, Ripple D, Lubbert M (2000) *Cell Mol Life Sci* 57: 1950-1963
- Botti A C, Verma R S (1990) *Anticancer Res* 10: 519-526
- Bruckert P, Kappler R, Scherthan H, Link H, Hagmann F, Zankl H (2000) *Cancer Genet Cytogenet* 120: 73-79
- Bartova E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsova P, Lukasova E, Skalnikova M, Cafourkova A, Kotna I (2000) *Gene* 244: 1-11
- Wu Y, Mehew J W, Heckman C A, Arcinas M, Boxer L M (2000) *Haematologica* 85: 913-921
- Stamatoullas A, Buchonnet G, Lepretre S, Lenain P, Lenormand B, Duval C, Callat MP, Gaulard P, Bastard C, Tilly H (2000) *Leukemia* 14: 1960-1966
- Perera F P (1996) *J Natl Cancer Inst* 88: 469-509
- Grignani F, Fagioli M, Alcoy M (1994) *Blood* 83: 10-25
- Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R (1998) *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 643-660
- Kolibaba K S, Druker B J (1997) *Biochim Biophys Acta* 1333: 217-248
- Clark S S, McLaughlin J, Timmons M, Pendergast A M, Ben-Neriah Y, Dow L W, Crist W, Rovera G, Smith S D, Witte O N (1988) *Science* 1: 775-777
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale R P, Roe B A, Canaani E (1986) *Cell* 2: 277-284
- Finch S C, Linet M S (1992) *Clin Haematol* 5: 27-56
- Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A G, Gralnick H R, Sultan C (1976) *Br Haematol* 33: 451-459
- Bennett J M, Catovsky D, Daniel M T, Flandrin G, Galton D A G, Gralnick H R, Sultan C (1980) *Br J Haematol* 44: 169-170
- Coplean A E, McGuire E A (1995) *Blood* 85: 1151-1168
- Dameshec W (1967) *Blood* 29: 566-584
- Rowley J D (1973) *Nature* 243: 290-293
- Rowley J D (1990) *Cancer* 65: 2178-2184
- Bartram C R, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith M A, Davies T, Stone M (1983) *Nature* 306: 227-280
- Heisterkamp N, Stephenson J R, Groffen J, Hansen P F, de Klein A, Bartram C R, Grosveld G (1983) *Nature* 306: 239-242
- Harbott J, Ritterbach J, Janka-Schaub G, Ludwig W D, Reiter A, Riehm H, Lampert F (1990) *Hematol Bluttransfus* 33: 451-458
- Kalwinsky D K, Raimondi S C, Schell M J, Mirro J Jr, Santana V M, Behm F, Dahl G V, Williams D (1990) *J Clin Oncol* 8: 75-83
- Morris C, Kennedy M, Heisterkamp N, Columbano-Green L, Romeril K, Groffen J, Fitzgerald P (1991) *Genes Chromosomes Cancer* 3: 263-271
- Lampert F, Harbott J, Ritterbach J (1991) *Klin Padiatr* 203: 311-318
- Pui C H, Crist W M, Look A T (1990) *Blood* 76: 1449-1463
- Rowley J D (1990) *Semin Hematol* 27: 122-136
- Fletcher J A, Kimball V M, Lynch E, Donnelly M, Pavelka K, Gelber R D, Tantravahi R, Sallan S E (1989) *Blood* 74: 2130-2135
- Rai K R, Sawitsky A, Cronkite E P, Chanana A D, Levy R N, Pasternak B S (1975) *Blood* 46: 219-234
- Sokol J E, Baccarini M, Russo D, Tura S (1988) *Semin Hematol* 25: 49-61
- Collins S J (1991) W: Deisseroth AB, Arlinghaus RB (red) *Chronic myelogenous leukemia*. Dekker, NY, str. 3-72
- Collins S J (1986) *J Clin Invest* 78: 1392-1396
- Groffen J, Stephenson J R, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram C R, Grosveld G (1984) *Cell* 36: 93-99
- Chisoe S L, Bodenteich A, Wang Y F, Wang Y P, Burian D, Clifton S W, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L (1995) *Genomics* 27: 67-82
- Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G (1985) *Nature* 315: 758-761
- Melo J V (1996) *Leukemia* 10: 751-756
- Maru Y, Witte O N (1991) *Cell* 67: 459-468
- Muller A J, Young J C, Pendergast A M, Pondel M, Landau N R, Littman D R, Witte O N (1991) *Mol Cell Biol* 11: 1785-1792

46. Eva A, Aaronson S A (1985b) *Nature* **316**: 273-275
47. Peters K L, Smithgall T E (1999) *Cell Signal* **11**: 507-514
48. Raitano A B, Whang Y E (1997) *Biochim Biophys Acta* **1333**: 210-216
49. Skorski T, Wlodarski P, Daheron L, Salomoni P, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Wasik M, Calabretta B (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **29**: 11858-11862
50. Voncken J W, van Schaick H, Kaartinen V, Demer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch G M, Groffen J (1995) *Cell* **80**: 719-728
51. Groffen J (1997) W: Abstracts *J Mol Med* **75**: B150
52. Pendergast A M, Traugh J A, Witte O N (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 4280-4289
53. Abelson H T, Rabstein L S (1970) *Cancer Res* **30**: 2213-2222
54. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G (1985a) *J Mol Appl Genet* **2**: 57-68
55. Konopka J B, Witte O N (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 3116-3123
56. Wang J Y J (1999) *Curr Opin Gen Rev* **3**: 35-43
57. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Wasik P, Trotta R, Kanakaraj P, Salomoni P, Antonyak M, Martinez R, Majewski M, Wong A, Perussia B, Calabretta B (1998) *Blood* **15**: 406-418
58. Nieborowska-Skorska M, Wasik M A, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T (1999) *J Exp Med* **19**: 1229-1242
59. Zamecnikova A (2000) *Neoplasma* **47**: 269-273
60. Melo J V, Gordon D E, Cross N C, Goldman J M (1993) *Blood* **81**: 158-165
61. Issaad C, Ahmed M, Novault S, Bonnet M L, Bennardo T, Varet B, Vainchener W, Turhan A G (2000) *Leukemia* **14**: 662-670
62. Bernards A, Rubin C M, Wheatbrook C A, Pas-kind M, Baltimore D (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 3231-3236
63. Lichty B D, Kamel-Reid S (2000) *Biochem J* **15**: 63-69
64. Iwata S, Mizutani S, Nakazawa S, Yata J (1994) *Leukemia* **8**: 1696-1702
65. Martinelli G, Amabile M, Terragana C, Testoni N, Ottaviani E, Montefuseco V, de Vivo A, Baccarani M, Ricci P, Sagilo G, Tura S (1999) *Leukemia* **13**: 1463-1472
66. Hermans A, Heisterkamp N, von Liden M, van Baaal S, Meijer D, van der Plas D, Wiedemann L M Groffen J, Bootsma D, Grosveld G (1987) *Cell* **51**: 33-40
67. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale R P, Canaani E (1985) *Nature* **315**: 550-554
68. Saglio G, Guerrasino A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege-Cambri G, Mazza U, Gavosto F (1990) *Blood* **76**: 1819-1824
69. Guo J Q, Lian J Y, Xian Y M, Lee M S, Deisseroth A B, Stass S A, Champlin R E, Talpaz M, Wang J Y, Arlinghaus R B (1994) *Blood* **83**: 3629-3637
70. Winter S S, Greene J M, McConnell T S, Willman C L (1999) *Leucemia* **13**: 2007-2011
71. Pane F, Frigeri F, Sindoma M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B (1996) *Blood* **88**: 2410-2414
72. Rotoli B, Pane F, Salvatore F, Saglio G (2000) *Br J Haematol* **110**: 493-649
73. Lugo T G, Pendergast A M, Muller A J, Wite O N (1990) *Science* **247**: 1041-1044
74. Reynolds C H, Willson M G, Groffen J, Heisterkamp N, Peakman T C, Page M J (1993) *Biochim Biophys Acta* **1181**: 122-130
75. Deininger M W, Viera S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman J M (2000) *Cancer Res* **1**: 2049-2055
76. Takeda N, Shibuya M, Maru Y (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 203-207
77. Mandanas R A, Leibowitz D S, Gharehbaghi K, Tauchi T, Burgess G S, Miyazawa K, Jayaram H N, Boswell H S (1993) *Blood* **82**: 1838-1847
78. Matsuguchi T, Salgia R, Hallek M, Eder M, Druker B, Ernst T J, Griffin J D (1994) *J Biol Chem* **7**: 5016-5021
79. Pui L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pellicci P G, Arlinghaus R, Pawson T (1994) *EMBO J* **13**: 764-773
80. Carlesso N, Frank D A, Griffin J D (1996) *J Exp Med* **183**: 811-820
81. Ilaria R L J, Van Etten R A (1996) *J Biol Chem* **271**: 31704-31710
82. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers C L (1996) *Oncogene* **13**: 247-254
83. Cortez D, Reuther G W, Pendergast A M (1997) *Oncogene* **15**: 2333-2342
84. Deininger M W N, Goldman J M, Melo J V (2000) *Blood* **96**: 3343-3356
85. Varticovski L, Daley G Q, Jackson P, Baltimore D, Cantley L C (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1107-1113
86. Marais R, Light Y, Paterson H F, Marshall C J (1995) *EMBO J* **14**: 3136-3145
87. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M (1995) *Blood* **86**: 726-736
88. Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin M A, Pisick E, Xu G, Li J L, Prasad K V, Griffin J D (1996) *Oncogene* **12**: 839-846
89. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi J K, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan T O, Wasik M A, Tsichlis P N, Calabretta B (1997) *EMBO J* **16**: 6151-6161
90. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, Morris S W, Wasik M A, Skorski T (2001) *Cancer Res* **61**: 2194-2199
91. Constantino R S S, Lacronique V, Boucharet I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, Gouilleux F (2001) *Oncogene* **20**: 2080-2090
92. del Peso L, Gonzales-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1998) *Science* **278**: 687-689
93. Horita M, Andreu E J, Benito A Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna J L (2000) *J Exp Med* **191**: 977-984
94. Sillaber C, Gesbert F, Frank D A, Sattler M, Griffin J D (2000) *Blood* **95**: 2118-2125
95. Kabarowski J H, Allen P B, Wiedemann L M (1994) *EMBO J* **13**: 5887-5889
96. Aley G Q, Baltimore D (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9312-9316
97. Oda T, Heaney C, Hagopian J R, Okuda K, Griffin J D, Druker B J (1994) *J Biol Chem* **269**: 22925-22928
98. Pelicci G, Lanfrancone L, Salcini A E, Romano A, Mele S, Grazia Borrello M, Segatto O, Di Fiore P P, Pelicci P G (1995) *Oncogene* **11**: 899-907
99. Sawyers C L, Callahan W, Witte O N (1992) *Cell* **70**: 901-910
100. Bissonnette R P, Echeverri F, Mahboubi A, Green D R (1992) *Nature* **359**: 552-554
101. Evan G I, Wyllie A H, Gilbert C S, Littlewood T D, Land H, Brooks M, Waters C M, Penn L Z, Hancock D C (1992) *Cell* **69**: 119-128
102. Ratino A B, Halpern J R, Hambuch T M, Sawyers C L (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11746-11750
103. Jonuleit T, Kuip van der H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky W E (2000) *Blood* **96**: 1933-1939
104. Gotoh A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Toyama K (1994) *Leukemia* **8**: 115-120
105. Tauchi T, Feng G S, Shen R, Song H Y, Donner D, Pawson T, Broxmeyer H E (1994) *J Biol Chem* **269**: 15381-15387

106. Matsuguchi T, Inhorn R C, Carlesso N, Xu G, Druker B, Griffin J D (1995) *EMBO J* 14: 257-265
107. Salgia R, Brunkhorst B, Pisick E, Li J L, Lo S H, Chen L B, Griffin J D (1995) *Oncogene* 11: 1149-1155
108. Salgia R, Li J L, Lo S H, Brunkhorst B, Kansas G S, Sobhany E S, Sun Y, Pisick E, Hallek M, Ernst T (1995) *J Biol Chem* 270: 5039-5047
109. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker B J, Emmerich B, Hallek M (1996) *Cancer Res* 56: 3589-3596
110. Warmuth M, Bergmann M, Priess A, Häuslmann K, Emmerich B, Hallek M (1997) *J Biol Chem* 272: 33260-33270
111. Bedi A, Zehnbauser B A, Barber J P, Sharkis S J, Jones R J (1994) *Blood* 83: 2038-2044
112. Verfaillie C M, Hurley R, Lundell B I, Zhao C, Bhatia R (1997) *Acta Haematol* 97: 40-52
113. Bhatia R, Wayne E A, McGlave P B, Verfaillie C M (1994) *J Clin Invest* 94: 384-391
114. Trzeciak A, Błasiak J (1999) *Post Biol Kom* 26: 707-729
115. New J H, Sugiyama T, Zaitseva E, Kowalczykowski S C (1998) *Nature* 391: 407-410
116. Yu Z, Chen J, Ford B N, Brackley M E, Glickman B W (1999) *Environ Mol Mutagen* 33: 3-20
117. Dyck van E, Stasiak A Z, Stasiak A, West S C (1999) *Nature* 398: 728-731
118. Schild D, Lio Y C, Collins D W, Tosomondo T, Chen D J (2000) *J Biol Chem* 275: 16443-16449
119. Song B, Sung P (2000) *J Biol Chem* 275: 15895-15904
120. Sharan S K, Motimasu M, Albrecht U, Lim D-S, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A (1997) *Nature* 386: 804-810
121. Sturzbecher H-W, Donzelmann B, Hennig W, Knippschild U, Bunchlop S (1996) *EMBO J* 15: 1992-2002
122. Scully R, Chen j, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston D M (1997) *Cell* 88: 265-275
123. Havre P A, Rice M C, Noe M, Kmiec E B (1998) *Cancer Res* 58: 4733-4739
124. Takao N, Mori R, Kato H, Shinohara A, Yamamoto Ki (2000) *J Biol Chem* 275: 725-728
125. Yuan Z M, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D (1998) *J Biol Chem* 273: 3799-802
126. Chen G, Yuan S S, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff S P, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser P J, Park M S, Sung P, Lee E Y (1999) *J Biol Chem* 274: 12748-12752
127. Kharbanda S, Yuan Z M, Weichselbaum R, Kufe D (1998) *Oncogene* 17: 3309-3318
128. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Fishel R, Błasiak J, Skorski T (2002) *Mol Cell Biol* 22: 4189-4201
129. Bedi A, Barber J P, Bedi G C, el-Deiry W S, Sidransky D, Vala M S, Akhtar A J, Hilton J, Jones R J (1995) *Blood* 1: 1148-1158
130. Błasiak J, Trzeciak A, Kaczyński K, Majsterek I, Hoser G, Gloc E, Mlynarski W, Skorski T (2001) *Leukemia* 15: 483
131. Amarante-Mendes G P, Naekyung K C, Liu L, Huang Y, Perkins C L, Green D R, Bhalla K (1998) *Blood* 91: 1700-1705
132. Dubrez L, Eymin B M, Sordet O, Droin N, Turhan A G, Solary E (1998) *Blood* 91: 2415
133. Deutsch, E, Dugray A, Abdul Karim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy S D, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan A G, Bourhis J (2001) *Blood* 97: 2084
134. Beach D, Stillman B, Watson J D (1991) 96: *Cold Spring Harbor Press, New York*, 1991
135. Skuze G R, Ludlow J W (1995) *Lancet* 345: 902-906
136. Rovira A, Urbano-Ispizua A, Cervantes F, Rozman M, Vives-Corrons J L, Montserrat E, Rozman C (1995) *Ann Hematol* 70: 129-133
137. Okabe M, Kunieda Y, Nakane S, Kurosawa M, Itaya T, Vogler W R, Shoji M, Miyazaki T (1995) *Leuk Lymphoma* 16: 493-503
138. Neubauer A, He M, Schmidt C A, Huhn D, Liu E T (1993) *Leukemia* 7: 593-600
139. Guerrasio A, Serra A, Gottardi E, Cilloni D, Vischia F, Parvis G, Cilli V, Sagilo G (1997) *Leukemia* 11 (Suppl 3): 519-521
140. Pierce A, Spooncer E, Wooley S, Dive C, Francis J M, Miyan J, Owen-Lynch P J, Dexter T M, Whetton A D (2000) *Oncogene* 19: 5487-5497
141. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Perrotti D, Martinez R, Wasik M A, Calabretta B (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13137-13142
142. Honda H, Hirai H (2001) *Blood Cells Mol Dis* 27: 265-278
143. Honda H, Ushijima T, Wakazono K, Oda Y, Aizawa S, Ishikawa T, Yazaki Y, Hirai H (2000) *Blood* 95: 1144-1150
144. Aldeerman E M, Fudenberg H H, Lovins R E (1980) *Blood* 55: 817-822.
145. Alnemri E S, Livingston D, Nicholson D, Salvesen G, Thornberry N, Wong W, Yu J (1996) *Cell* 87: 171
146. Allsopp T E, Wyatt S, Peterson H F, Davies A M (1993) *Cell* 73: 295-307
147. Alnemri E S, Robertson N M, Fernandes T F, Croce C M, Litwack G (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7295-7299
148. Cotter T G (1995) *Leukemia lymphoma* 18: 231-236
149. Wang J Y (2000) *Oncogene* 2019: 5643-5650
150. Daley G Q, Baltimore D (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9312-9316
151. Sirard C, Laneuville P, Dick J E (1994) *Blood* 83: 1575-1585
152. Adams J M, Cory S (1998) *Science* 281: 1322-1326
153. Makin G, Hickman J A (2000) *Cell Tissue Res* 301: 143-152
154. Amarante-Mendes G P, McGahon A J, Nishioka W K, Afsar D E, Witte O N, Green D R (1998) *Oncogene* 16: 1383-1390
155. Salomoni P, Condorlli F, Sweeney S M, Calabretta B (2000) *Blood* 96: 676-684
156. Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J (1999) *Genes Dev* 13: 1899-1911
157. Karni R, Jove R, Levitzki A (1999) *Oncogene* 18: 4654-4662
158. Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D (1997) *J Mol Biol* 267: 225-228
159. Wang H G, Rapp U R, Reed J C (1996) *Cell* 87: 629-638
160. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer S J (1996) *Cell* 87: 619-628
161. Neshat M S, Raitano A B, Wang H G, Reed J C, Sawyers C L (2000) *Mol Cell Biol* 20: 1179-1186
162. Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Slupianek A, Reiss K, Trotta R, Calabretta B, Skorski T (1999) *Cancer Res* 59: 2815-2819
163. Johnson B W, Cepero E, Boise L H (2000) *J Biol Chem* 275: 31546-31553
164. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2558-2562
165. LeCountre P, Mologoni L, Cleris L (1999) *J Natl Cancer Inst* 91: 163-168

Zagadka histonu H1

The histone H1 mystery

ANDRZEJ T. WIERZBICKI

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Chromatyna uczestniczy w regulacji ekspresji genów
- III. Powszechność występowania i rola strukturalna sugerują istotną rolę histonu H1
 - III-1. Histon H1 występuje u wszystkich grzybów, roślin i zwierząt
 - III-2. Histon H1 ulokowany jest w krytycznym miejscu na nukleosomie
- IV. Brak histonu H1 nie wpływa na żywotność organizmów
 - IV-1. *Tetrahymena thermophila*
 - IV-2. Komórki kręgowców *in vitro*
 - IV-3. Grzyby
 - IV-4. Zwierzęta
 - IV-5. Rośliny
- V. Sprzeczność między danymi strukturalnymi a funkcjonalnymi
- VI. Pierwszym kluczem do zagadki histonu H1 jest redundancja
 - VI-1. Redundancja jest powszechną cechą układów biologicznych
 - VI-2. Mechanizmy działające na poziomie chromatyny tworzą sieć wzajemnych powiązań
 - VI-3. Histon H1 jest elementem sieci mechanizmów chromatynowych
 - VI-4. Zasada redundancji tłumaczy sprzeczność danych strukturalnych i funkcjonalnych
- VII. Drugim kluczem do zagadki histonu H1 jest jego dynamiczne zachowanie w chromatynie
 - VII-1. Procesów biologicznych nie należy rozumieć mechanistycznie
 - VII-2. Chromatyna jest układem dynamicznym
 - VII-3. Histon H1 może modyfikować właściwości dynamiczne chromatyny
 - VII-4. Dynamika tłumaczy sprzeczność danych strukturalnych i funkcjonalnych
- VIII. Jak rozwikłać paradoks histonu H1?
 - VIII-1. Redundancja
 - VIII-2. Dynamika
- IX. Podsumowanie

I. Wstęp

Histon H1 jest białkiem występującym w dużej ilości w jądrach komórkowych praktycznie wszyst-

Mgr, Uniwersytet Warszawski, Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, e-mail: andw@ibb.waw.pl

Contents:

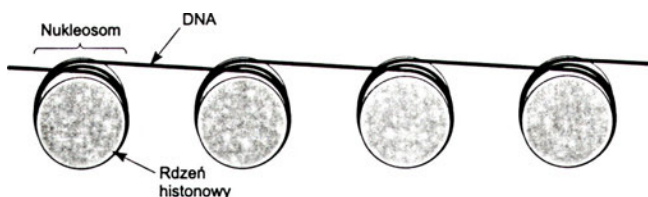
- I. Introduction
- II. Chromatin participates in the regulation of gene expression
- III. Common occurrence and structural function suggest a significant role for histone H1
 - III-1. Histone H1 is found in all fungi, plants and animals
 - III-2. Histone H1 occupies a critical position on the nucleosome
- IV. The absence of histone H1 does not influence viability of organisms
 - IV-1. *Tetrahymena thermophila*
 - IV-2. Vertebrate cell lines *in vitro*
 - IV-3. Fungi
 - IV-4. Animals
 - IV-5. Plants
- V. Contradiction between structural and functional data
- VI. The first key to the histone H1 mystery is redundancy
 - VI-1. Redundancy is a common feature of biological systems
 - VI-2. Chromatin processes constitute a network of interactions
 - VI-3. Histone H1 is an element of the chromatin network
 - VI-4. Redundancy explains the contradiction between structural and functional data
- VII. The second key to the histone H1 mystery is its dynamic behaviour in chromatin
 - VII-1. Biological processes should not be explained mechanistically
 - VII-2. Chromatin is a dynamic system
 - VII-3. Histone H1 may modify the dynamic properties of chromatin
 - VII-4. Dynamics explains the contradiction between structural and functional data
- VIII. How to solve the histone H1 paradox?
 - VIII-1. Redundancy
 - VIII-2. Dynamics
- IX. Conclusion

kich organizmów eukariotycznych. Dlatego pytanie o jego funkcję od wielu lat przyciąga uwagę badaczy. Pomimo to rola histonu H1 pozostaje do dzisiaj zagadkowa. W artykule tym przedstawiam aktualny stan wiedzy na temat funkcji histonu H1 ukazujący głęboką sprzeczność między danymi pochodzącymi z różnych podejść badawczych oraz proponuję dwa hipotetyczne wyjaśnienia roli histonu H1 wraz ze sposobami ich weryfikacji.

II. Chromatyna uczestniczy w regulacji ekspresji genów

DNA w jądrach komórkowych organizmów eukariotycznych pozostaje stale związane z białkami, tworząc chromatynę. Odkrycie niespełna 30 lat temu podstawowej, nukleosomowej struktury chromatyny zapoczątkowało intensywne badania nad rolą organizacji strukturalnej materiału genetycznego. Początkowo przypuszczano, że połączenie DNA z białkami jest statyczne i ma znaczenie wyłącznie strukturalne. Z czasem okazało się, że pogląd ten był błędny [1]. Organizacja chromatyny ma istotne znaczenie dla regulacji procesów takich jak replikacja [2], rekombinacja [3], naprawa DNA [4], a przede wszystkim transkrypcja. Wydaje się, że struktura chromatyny jest ważnym czynnikiem w regulacji ekspresji genów, a przez to w regulacji różnicowania i rozwoju oraz odpowiedzi organizmów na warunki środowiska [5-9].

DNA nawinięty jest na rdzenie utworzone z ośmiu cząsteczek histonów, po dwie cząsteczki każdego rodzaju: H2A, H2B, H3 i H4. Są to tak zwane histony rdzeniowe. Podjednostka zbudowana z rdzenia histonowego wraz z niemal dwukrotnie owiniętym wokół niego odcinkiem DNA o długości około 150 par zasad została nazwana nukleosomem. Sąsiadujące nukleosomy połączone są odcinkiem DNA (tak zwanym łącznikiem) o długości kilkudziesięciu par zasad [1] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Struktura nukleosomowa chromatyny.

Uważa się, że struktura nukleosomowa w swoim podstawowym stanie stanowi zawadę steryczną, która uniemożliwia lub silnie utrudnia wiązanie innych białek z DNA. Tam gdzie niemożliwy jest dostęp białek do DNA, niemożliwe staje się zachodzenie procesów związanych z DNA, przede wszystkim transkrypcji. Wykazano, że struktura chromatyny ulega zmianom oraz opisano mechanizmy ją modyfikujące, regulujące przez to procesy zależne od DNA [1]. Najistotniejsze z nich to: aktywne, zależne od

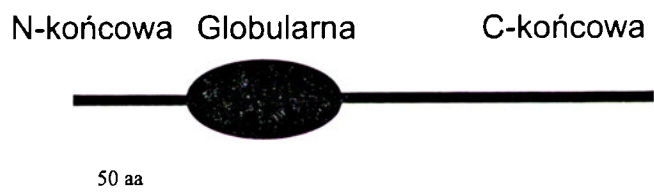
hydrolizy ATP, przesuwanie nukleosomów i zmiany oddziaływań histony-DNA [6, 10, 11], acetylacja, metylacja i inne modyfikacje histonów rdzeniowych [7, 12], a także metylacja DNA [13].

III. Powszechność występowania i rola strukturalna sugerują istotną rolę histonu H1

III-1. Histon H1 występuje u wszystkich grzybów, roślin i zwierząt

Histon H1, zwany również histonem łącznikowym, występuje u praktycznie wszystkich grzybów, roślin oraz zwierząt [14, 15] i pozostaje związany z większością nukleosomów w jądrze komórkowym [1]. U roślin i zwierząt z reguły występują liczne niealleliczne warianty histonu H1 różniące się nieznacznie sekwencją aminokwasową [14, 16].

Histon H1 jest białkiem silnie zasadowym, bogatym w aminokwasy lizynę i argininę. Ma budowę trójcząściową. Składa się z centralnej domeny globularnej oraz krótkiej domeny N-końcowej i dłuższej C-końcowej (Ryc. 2). Domeny końcowe są słabo

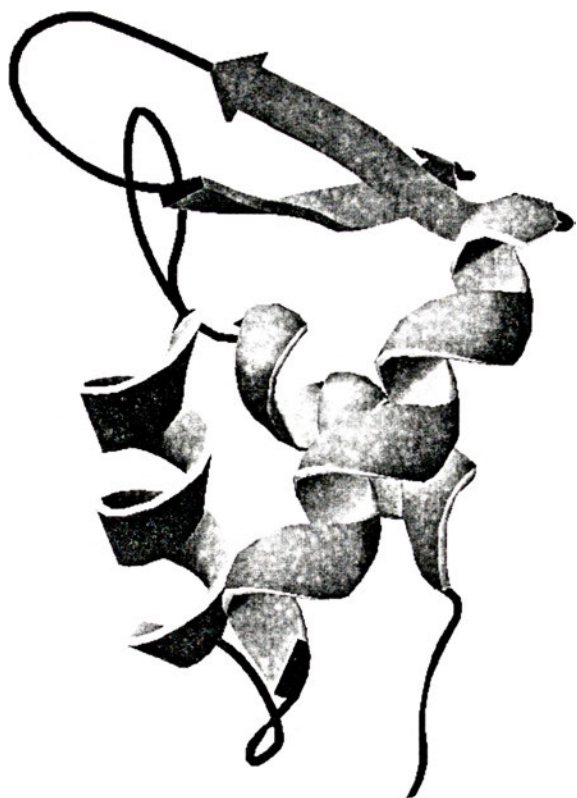


Ryc. 2. Histon H1 składa się z trzech domen: N-końcowej, globularnej i C-końcowej.

ustrukturalizowane i słabo konserwowane ewolucyjnie. Domena globularna jest za to silnie konserwowana ewolucyjnie i przyjmuje dobrze określoną strukturę trzeciorzędową [14, 17] (Ryc. 3).

III-2. Histon H1 ulokowany jest w krytycznym miejscu na nukleosomie

Histon H1 zajmuje w strukturze nukleosomowej miejsce odmienne niż histony rdzeniowe, przyłącza się bowiem do nukleosomu od zewnątrz [1]. Podczas gdy szczegółowa budowa samego nukleosomu została poznana dzięki zastosowaniu metod krystalograficznych [18] (Ryc. 4a), lokalizacja histonu H1 pozostaje przedmiotem kontrowersji. Za najbardziej prawdopodobne uważa się ułożenie domeny globularnej w miejscu, gdzie DNA wchodzi i schodzi z nukleosomu pomiędzy nicią wchodzącą a przebie-



Ryc. 3. Struktura krystalograficzna domeny globularnej histonu H1 według [17].

gającą przez środek nukleosomu [14, 19, 20] (Ryc. 4b). Domena C-końcowa może wtedy oddziaływać z DNA łączącym nukleosomy. Taka lokalizacja histonu H1 sugeruje jego bardzo istotną funkcję. Spina on bowiem i stabilizuje strukturę nukleosomu od zewnątrz.

Wykazano, że funkcja strukturalna histonu H1 nie ogranicza się do budowania nukleosomu. Bierze on

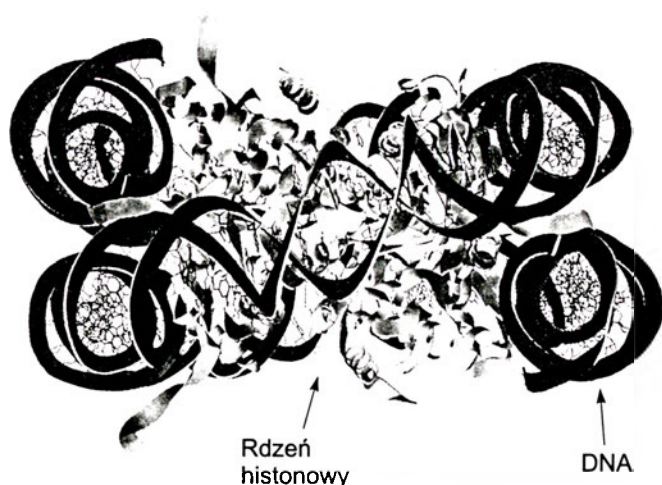
udział w organizowaniu wyższego rzędu struktur chromatyny, czyli tak zwanego włókna 30 nm [14, 21-23]. Wyraźnie widoczną strukturę ponadnukleosomową przyjmują obszary chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie [23]. A zatem histon H1 może utrudniać dostęp do DNA co najmniej na dwa sposoby: stabilizując strukturę nukleosomu oraz biorąc udział w organizacji struktury ponadnukleosomowej chromatyny. To właśnie dlatego uznano histon H1 za białko o kluczowym znaczeniu dla hamowania ekspresji genów, najprawdopodobniej niezbędne do życia komórek i organizmów.

IV. Brak histonu H1 nie wpływa na żywotność organizmów

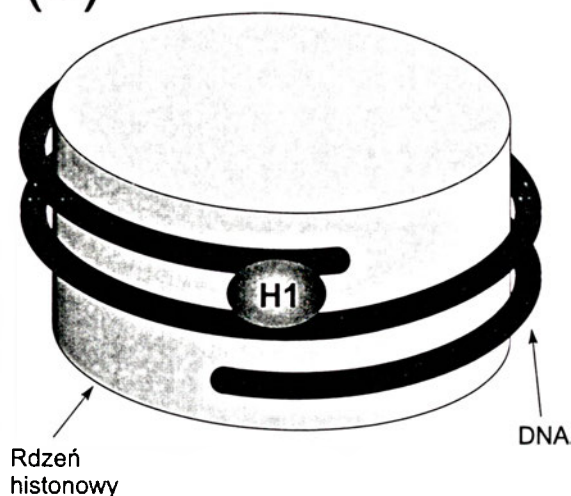
IV-1. *Tetrahymena thermophila*

Równoległe do badań nad rolą histonu H1 w strukturze nukleosomowej, w miarę pojawiających się nowych możliwości metodycznych prowadzono badania funkcjonalne. Pierwsze doświadczenia przeprowadzono na orzęsku *Tetrahymena thermophila*. Ku wielkiemu zaskoczeniu szczep *T. thermophila* pozbawiony całkowicie białka uznanego za histon H1 nie wykazywał żadnych istotnych zaburzeń [24]. Zaobserwowano co prawda niewielkie zmiany w strukturze jądra komórkowego oraz drobne zmiany w ekspresji genów, jednak wzrost komórek był całkowicie normalny. Również ogólna ekspresja genów nie była zaburzona [24, 25]. Wyniki te pozwoliły po raz pierwszy zakwestionować tezę, jakoby histon H1 był niezbędny do funkcjonowania organizmów. Badania te miały jednak pewien słaby punkt. Otóż białko

(a)



(b)



Ryc. 4. Struktura krystalograficzna nukleosomu według [18] (a), umiejscowienie histonu H1 na nukleosomie według [19] (b).

uznane przez autorów za histon H1 jest w rzeczywistości podobne jedynie do C-końcowej domeny klasycznych histonów H1 wyższych eukariontów, przy czym podobieństwo to dotyczy wyłącznie składu aminokwasowego. Brak domeny globularnej pozwala wątpić, czy białko to jest w rzeczywistości histonem H1 i czy *T. thermophila* i pozostałe orzęski w ogóle mają histon H1.

IV-2. Komórki kręgowców *in vitro*

Następny cykl badań funkcjonalnych poświęconych roli histonu H1 przeprowadzono na hodowlanych *in vitro* komórkach kręgowców. Otrzymano linie komórkowe z podwyższonym [26] lub obniżonym [27, 28] poziomem wybranych wariantów histonu H1. Wyniki były podobne do opisanych wyżej: drobne zmiany nie wpływające na żywotność komórek. Za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej wykazano pewne zmiany w ekspresji genów. W komórkach pozbawionych wybranych wariantów histonu H1 zaburzenia w ekspresji genów były obecne, dotyczyły jednak tylko bardzo niewielkiej liczby genów [27]. Ugruntowało to tezę, że histon H1 nie pełni kluczowej roli w podstawowych procesach życiowych, a co najwyżej jakąś funkcję ograniczoną i specyficzną. Niestety również te badania miały swój słaby punkt. Nadekspresji lub wyłączeniu określonego wariantu histonu H1 towarzyszył efekt kompensacyjny czyli zawartość pozostałych wariantów odpowiednio spadała lub wzrastała. Sumaryczna zawartość histonu H1 zmieniała się najwyżej o 50 procent.

IV-3. Grzyby

Aby ominąć problem kompensacji sięgnięto po organizmy mające tylko jeden gen histonu H1 – grzyby. Trzem niezależnym grupom badawczym udało się uzyskać szczepy trzech różnych gatunków grzybów pozbawione histonu H1. Pomimo wnikliwych analiz fenotypowych nie znaleziono żadnych nieprawidłowości w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* [29] ani w *Aspergillus nidulans* [30]. W *Ascobolus immersus* zaobserwowano pewne nieprawidłowości, podstawowy wzrost nie był jednak zakłócony [31]. Wydaje się zatem, że histon H1 nie jest niezbędny do zachodzenia podstawowych procesów życiowych na poziomie komórkowym. Funkcja jego może być bardziej subtelna niż sądzono i może dotyczyć raczej funkcjonowania organizmu jako całości. Kwestię tę rozstrzygnąć mogły tylko badania na organizmach wielokomórkowych.

IV-4. Zwierzęta

Podjęto próby zbadania funkcji histonu H1 u zwierząt. Pierwszą było pokazanie, że w początkowym etapie rozwoju w zarodku *Drosophila* nie ma histonu H1 [32]. Później rozpoczęto serię eksperymentów na myszach, mających na celu wyłączenie kolejnych wariantów histonu H1. Opublikowane dotychczas dane potwierdzają brak jakichkolwiek zaburzeń spowodowanych przez usunięcie części wariantów histonu H1 [33]. Udało się za to znaleźć interesującą, choć bardzo specyficzną funkcję histonu H1 we wczesnym rozwoju zarodkowym płaza *Xenopus laevis*. Wykazano, że wymiana wariantów histonu H1 powoduje istotną w rozwoju utratę zdolności komórek do różnicowania w tkankę mezodermalną [34].

IV-5. Rośliny

Do badania funkcji histonu H1 wykorzystano również rośliny. Pierwszym znaczącym rezultatem było uzyskanie roślin tytoniu z silnie podwyższoną zawartością histonu H1 [35]. Nadmiar tego białka nie upośledzał żywotności roślin, obserwowane zaburzenia były niewielkie. Podobnie jak u zwierząt, również w przypadku roślin żadna z dotychczas przeprowadzonych prób wyłączenia histonu H1 nie przełamała mechanizmu kompensacji. Zmiany proporcji wariantów histonu H1 w tytoniu nie zaburzyły żywotności roślin, a obserwowane defekty były ograniczone i specyficzne [36, 37]. Dotychczas dostępne dane z eksperymentów na organizmach wielokomórkowych potwierdzają zatem wcześniej wysnuwane wnioski. Histon H1 nie jest niezbędny dla przeżycia. Jego rola jest raczej ograniczona i dotyczy tylko wybranych procesów [14].

V. Sprzeczność między danymi strukturalnymi a funkcjonalnymi

Jak zatem pogodzić wnioski płynące z różnych podejść eksperymentalnych? Z jednej strony powszechność występowania, istotne miejsce w strukturze nukleosomowej i rola w tworzeniu wyższego rzędu struktur chromatyny. Z drugiej, brak poważniejszych defektów w organizmach pozbawionych histonu H1 lub z zaburzonymi proporcjami wariantów bądź nadekspresją histonu H1. Czy to możliwe, by białko tak silnie konserwowane ewolucyjnie było jednocześnie zbędne dla przeżycia? Czy białko występujące na powierzchni każdego nukleosomu może nie pełnić żadnej istotnej funkcji?

VI. Pierwszym kluczem do zagadki histonu H1 jest redundancja

VI-1. Redundancja jest powszechną cechą układów biologicznych

Wydaje się, że pierwszym kluczem do rozwiązania zagadki histonu H1 jest redundancja mechanizmów biologicznych, czyli istnienie więcej niż jednego mechanizmu odpowiedzialnego za konkretną funkcję. W razie uszkodzenia jednego mechanizmu pozostałe przejmują jego rolę. Redundancja jest jedną z podstawowych cech układów biologicznych, a jej najlepszym przykładem jest istnienie dwóch kopii wszystkich genów w większości organizmów eukariotycznych.

VI-2. Mechanizmy działające na poziomie chromatyny tworzą sieć wzajemnych powiązań

Różne procesy regulujące funkcjonowanie chromatyny są ze sobą silnie powiązane a jednocześnie ich funkcje w dużym stopniu pokrywają się. Wykazano, że acetylacja histonów rdzeniowych i przesuwanie nukleosomów, mechanizmy uważane za kluczowe dla aktywacji ekspresji genów, są od siebie zależne [38]. Jednoczesne usunięcie acetylazy histonowej oraz czynnika przesuwającego nukleosomy wywołuje efekt letalny, podczas gdy usunięcie tylko jednego z nich nie zaburza żywotności [38, 39]. Oznacza to, że ich funkcje muszą przynajmniej częściowo się pokrywać.

Podobnie, trzy najistotniejsze mechanizmy odpowiedzialne za hamowanie transkrypcji na poziomie struktury chromatyny: metylacja lizyny 9 histonu H3, deacetylacja histonów rdzeniowych i metylacja DNA są od siebie nawzajem zależne [12, 13, 40, 41]. Jednocześnie istnieją organizmy pozbawione jednego lub nawet dwóch z nich [13, 41]. Pozostające mechanizmy przejmują funkcje brakujących, co świadczy o ich przynajmniej częściowej redundancji.

Istnienie sieci mechanizmów zależnych od siebie i również częściowo się pokrywających zapewnia niezawodność regulacji ekspresji genów. Jednocześnie uszkodzenie jednego mechanizmu nie uniemożliwia działania całego układu.

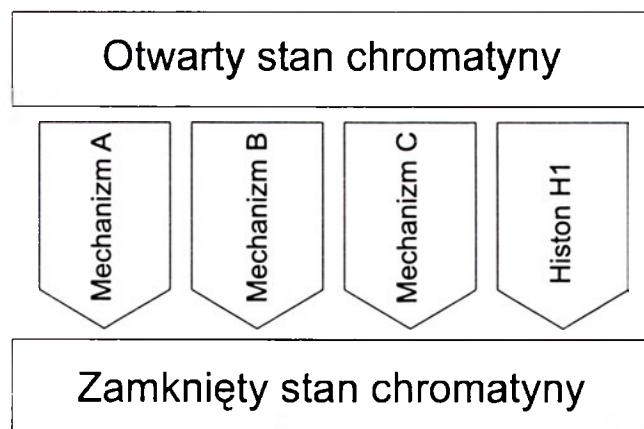
VI-3. Histon H1 jest elementem sieci mechanizmów chromatynowych

Skoro struktury i mechanizmy chromatynowe tworzą sieć wzajemnych powiązań, czy histon H1 może być elementem tej sieci? Liczne dane wska-

zuja, że tak. Wykazano, że obecność histonu H1 silnie hamuje acetylację histonów rdzeniowych [42]. Wydaje się, że histon H1 ma podobny wpływ na działanie czynników przesuwających nukleosomy [43]. Oba te procesy są uważane za bardzo ważne dla aktywacji ekspresji genów. Zaobserwowano również związek histonu H1 z metylacją DNA. Z jednej strony jego obecność zapobiega nadmiernej metylacji DNA [31], z drugiej zaś histon H1 jest odpowiedzialny za kondensację chromatyny w odpowiedzi na metylację DNA [22]. Nie bez znaczenia wydaje się również zdolność do oddziaływania histonu H1 z białkami strukturalnymi odpowiedzialnymi za inaktywację transkrypcyjną obszarów chromatyny [44].

VI-4. Zasada redundancji tłumaczy sprzeczność danych strukturalnych i funkcjonalnych

Wydaje się zatem, że histon H1 rzeczywiście jest elementem sieci mechanizmów chromatynowych. Dostępne dane wskazują, że powiązany jest raczej z hamowaniem transkrypcji. Jest to zgodne z wnioskami z badań strukturalnych, które sugerują, że histon H1 hamuje dostęp do DNA przez stabilizowanie struktury nukleosomu i skondensowanych struktur chromatyny wyższego rzędu. Jednocześnie jego funkcja pokrywa się w dużej mierze z innymi mechanizmami, które mogą kompensować brak histonu H1 (Ryc. 5). Jest to zgodne z wynikami badań funkcjo-



Ryc. 5. Redundancja mechanizmów chromatynowych odpowiedzialnych za hamowanie transkrypcji. Brak jednego mechanizmu może zostać skompensowany przez pozostałe.

nalnych, które pokazują, że jego brak nie zaburza podstawowych procesów życiowych. Tak więc spojrzenie na rolę histonu H1 uwzględniające redundancję procesów biologicznych zdaje się wyjaśniać paradoksalną sprzeczność między danymi strukturalnymi a funkcjonalnymi.

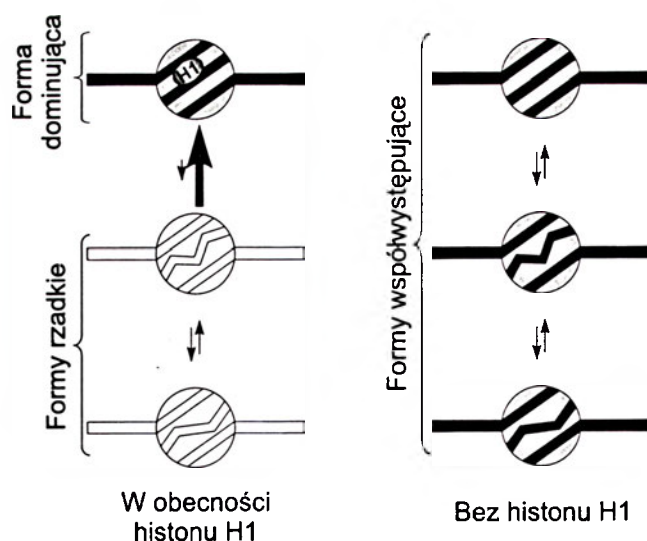
VII. Drugim kluczem do zagadki histonu H1 jest jego dynamiczne zachowanie w chromatynie

VII-1. Procesów biologicznych nie należy rozumieć mechanistycznie

Drugim kluczem do rozwiązania zagadki histonu H1 może być bardziej realistyczne rozumienie procesów biochemicznych. Istnieje tendencja, aby procesy te rozpatrywać w kategoriach mechanistycznych. Częstotki chemiczne często traktuje się jak tryby w maszynie, ich oddziaływanie jako popychanie, a modyfikacje strukturalne jako przestawianie elementów. Tymczasem na poziomie molekularnym rządzi dynamika i prawa statystyczne. Aktualny stan każdego układu sprowadza się zawsze do równowagi dynamicznej różnych stanów przejściowych.

VII-2. Chromatyna jest układem dynamicznym

Klasyczne badania nad strukturą i funkcją chromatyny interpretowane były w kategoriach mechanistycznych. Wraz ze wzrostem wiedzy na ten temat, podejście to okazuje się coraz mniej użyteczne. Dobrze ilustrują to wyniki doświadczeń, w których dwukrotnie zmniejszono gęstość nukleosomów w chromatynie drożdży, a następnie analizowano ekspresję wszystkich genów [45]. Ponieważ organizacja nukleosomowa postrzegana jest jako kluczowy czyn-



Ryc. 6. Przyłączenie histonu H1 może zmieniać równowagę dynamiczną między różnymi stanami konformacyjnymi nukleosomów przez stabilizowanie jednego stanu (po lewej). Bez histonu H1 mogą spontanicznie powstawać stany o zmienionej konformacji (po prawej).

nik hamujący transkrypcję, spodziewano się ogólnego wzrostu ekspresji genów. Wynik był jednak zaskakujący. Ekspresja trzech czwartych ogólnej liczby genów wcale się nie zmieniła, a spośród pozostałej jednej czwartej ekspresja połowy genów była podwyższona, a połowy obniżona [45]. Okazuje się więc, że znaczenia struktury nukleosomowej dla ekspresji genów i ogólnie dla zachodzenia procesów w chromatynie nie można wytłumaczyć w kategoriach czysto mechanistycznych.

Ostatnio zaproponowano, aby otwarty lub zamknięty (w odniesieniu do ekspresji genów) stan chromatyny rozpatrywać jako układ w równowadze dynamicznej. W takim rozumieniu nukleosom może przyjmować stany konformacyjne różniące się dostępnością do DNA (Ryc. 6). Stany te różnią się energią swobodną, a przejście między nimi może wymagać osiągnięcia stanu pośredniego o wysokiej energii swobodnej [10, 46].

VII-3. Histon H1 może modyfikować właściwości dynamiczne chromatyny

Rolę histonu H1 również trudno jest wyjaśnić w kategoriach mechanistycznych. Nie dość, że lokalizacja w krytycznym miejscu na nukleosomie nie pociąga za sobą niezbędności dla zachodzenia podstawowych procesów życiowych, to ostatnie badania wskazują, że histon H1 jest białkiem bardzo ruchliwym. Wykazano, że cząsteczki histonu H1 występują w jądrze komórkowym w stanie dynamicznej równowagi między formą wolną a przyłączoną do nukleosomu [47]. Bardzo możliwe zatem, że histon H1 nie jest statycznym elementem żadnej struktury. Można spekulować, że jest on niezbędny dla utrzymania określonej równowagi między różnymi stanami konformacyjnymi nukleosomów. Może on stabilizować pewien stan i tym samym przesuwać równowagę na jego korzyść (Ryc. 6). Może również przez przyłączanie się do nukleosomów zwiększać energię swobodną stanu przejściowego między stanem otwartym a zamkniętym chromatyny.

VII-4. Dynamika tłumaczy sprzeczność danych strukturalnych i funkcjonalnych

Przedstawiona wyżej interpretacja roli histonu H1 mogłaby wskazywać na jego niezwykle istotne znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Stabilizując jeden z możliwych stanów konformacyjnych nukleosomów, histon H1 zapobiegałby nieuprawnionemu samoistnemu przechodzeniu nukleosomów w inny stan (Ryc. 6). To z kolei redukowałoby nieupraw-

nioną ekspresję genów i tym samym zmniejszałoby straty energetyczne wywołane niedoskonałością procesów regulacyjnych oraz dawałoby przewagę selekcyjną organizmom posiadającym histon H1. W ten sposób zbędność histonu H1 dla przeżycia organizmów staje się możliwa do wyjaśnienia. Być może histon H1 nie jest potrzebny dla procesów elementarnych, jest za to niezbędny dla uzyskania odpowiednio precyzyjnej regulacji ekspresji genów. Defekt wywołany brakiem histonu H1 jest przez to niewielki i może ujawniać się tylko w szczególnych warunkach lub po długim okresie czasu.

Przyjęcie, że histon H1 pełni rolę czynnika modyfikującego właściwości dynamiczne chromatyny, pozwala więc wyjaśnić sprzeczność między danymi strukturalnymi a funkcjonalnymi.

VIII. Jak rozwikłać paradoks histonu H1?

VIII-1. Redundancja

Jeśli paradoks histonu H1 wynika z pokrywania się jego funkcji z funkcjami innych białek chromatynowych, kluczem do jego rozszyfrowania będą wnikliwe badania funkcjonalne. Po pierwsze, konieczne jest zbadanie wpływu całkowitego usunięcia histonu H1 na funkcjonowanie organizmów roślin i zwierząt. Przypuszczalnie efekt całkowitej eliminacji histonu H1 może się ujawnić dopiero w skomplikowanym organizmie eukariotycznym [48]. Po drugie, konieczne jest sprawdzenie, czy w organizmach pozbawionych histonu H1 nie są zaburzone procesy chromatynowe potencjalnie powiązane z histonem H1. Na uwagę w pierwszej kolejności zasługują acetylacja i metylacja histonów rdzeniowych oraz metylacja DNA. Po trzecie wreszcie, należałoby sprawdzić efekty jednoczesnego wyłączenia histonu H1 oraz białek odpowiedzialnych za istotne procesy chromatynowe. Defekt obserwowany w organizmie z podwójnym wyłączeniem histonu H1 oraz wybranego innego białka może być dużo silniejszy niż suma defektów wynikających z pojedynczych wyłączeń. Gdyby tak było, sugerowałoby to, że obecność histonu H1 jest istotna dla zachodzenia określonego procesu. W tym wypadku, oprócz białek odpowiedzialnych za modyfikacje histonów rdzeniowych i metylację DNA, na uwagę zasługują też czynniki przebudowujące chromatynę oraz białka strukturalne chromatyny.

VIII-2. Dynamika

Wyjaśnienie paradoksu histonu H1 w kategoriach dynamiki chromatyny będzie trudniejsze. Tutaj rów-

nież kluczowe jest uzyskanie rośliny lub zwierzęcia całkowicie pozbawionego histonu H1, a następnie ich wnikliwa analiza. Szczególnie istotne może być sprawdzenie zachowania takich organizmów w warunkach stresowych, a także zbadanie koordynacji ekspresji genów w różnych tkankach i różnych warunkach środowiska. Rozstrzygające znaczenie miałyby bezpośrednie badania dynamiki struktur chromatynowych przy braku histonu H1. Obecnie możliwe jest to wyłącznie *in vitro* [46], jednak niewykluczone, że wkrótce powstaną techniki pozwalające badać to zjawisko bezpośrednio w żywych organizmach.

IX. Podsumowanie

Od czasu poznania struktury nukleosomowej, wiedza na temat mechanizmów rządzących chromatyną ogromnie posunęła się naprzód. Histon H1 pozostał ostatnim z głównych składników chromatyny, którego funkcja jest nieznana. Pojawiające się obecnie nowe hipotezy na temat jego funkcji stwarzają nadzieję, że już wkrótce zagadka histonu H1 zostanie rozwiązana.

Podziękowania

Dziękuję prof. Andrzejowi Jerzmanowskiemu za cenne uwagi w czasie redagowania pracy.

Artykuł otrzymano 14 marca 2002
Zaakceptowano do druku 27 maja 2002

Piśmiennictwo

1. Kornberg RD, Lorch Y (1999) *Cell* **98**: 285-294
2. Melendy T, Li R (2001) *Front Biosci* **6**: 1048-1053
3. Roth DB, Roth SY (2000) *Cell* **103**: 699-702
4. Modesti M, Kanaar R (2001) *Curr Biol* **11**: R229-R232
5. Farkas G, Leibovitch BA, Elgin SC (2000) *Gene* **253**: 117-136
6. Sudarsanam P, Winston F (2000) *Trends Genet* **16**: 345-350
7. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) *Cell* **103**: 263-271
8. Verbsky ML, Richards EJ (2001) *Curr Opin Plant Biol* **4**: 494-500
9. Müller C, Leutz A (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**: 167-174
10. Kingston RE, Narlikar GJ (1999) *Genes Dev* **13**: 2339-2352
11. Calikowski TT (2001) *Post Bioch* **47**: 129-137
12. Zhang Y, Reinberg D (2001) *Genes Dev* **15**: 2343-2360
13. Bird A (2002) *Genes Dev* **16**: 6-21
14. Jerzmanowski A (2002) W: Złatanova J, Leuba SH (red) *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Holland (w druku)
15. Kasinsky HE, Lewis JD, Dacks JB, Ausio J (2001) *FASEB J* **15**: 34-41
16. Khochbin S (2001) *Gene*: **271**: 1-12

17. Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM (1993) *Nature* **362**: 219-223
18. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) *Nature* **389**: 251-260
19. Zhou YB, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muyldermans S (1998) *Nature* **395**: 402-405
20. Thomas JO (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**: 312-317
21. Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14173-14178
22. Karymov MA, Tomschik M, Leuba SH, Caiafa P, Zlatanova J (2001) *FASEB J* **15**: 2631-2641
23. Woodcock CL, Dimitrov S (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**: 130-135
24. Shen X, Yu L, Weir JW, Gorovsky MA (1995) *Cell* **82**: 46-56
25. Shen X, Gorovsky MA (1996) *Cell* **86**: 475-483
26. Brown DT, Alexander BT, Sittman DB (1996) *Nucleic Acid Res* **24**: 486-493
27. Takami Y, Nishi R, Nakayama T (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 501-508
28. Takami Y, Nakayama T (1997) *Genes Cells* **2**: 711-723
29. Patterson HG, Landel CC, Landsman D, Peterson CL, Simpson RT (1998) *J Biol Chem* **273**: 7268-7276
30. Ramon A, Muro-Pastor MI, Scazzocchio C, Gonzalez R (2000) *Mol Microbiol* **35**: 223-233
31. Barra JL, Rhounim L, Rossignol JL, Faugeron G (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 61-69
32. Ner SS, Travers AA (1994) *EMBO J* **13**: 1817-1822
33. Fan Y, Sirotkin A, Russell RG, Ayala J, Skoultschi AI (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 7933-7943
34. Steinbach OC, Wolffe AP, Rupp RAW (1997) *Nature* **389**: 395-399
35. Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Iwkiewicz J, Egierszdorff S, Kuras M, Chaubet N, Gigot C, Spiker S, Jerzmanowski A (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10250-10255
36. Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Ślusarczyk J, Kuras M, Lichota J, Kilianczyk B, Jerzmanowski A (1999) *Plant Cell* **11**: 2317-2329
37. Przewłoka MR, Wierzbicki AT, Ślusarczyk J, Kuraś M, Grasser KD, Stemmer C, Jerzmanowski A (2002) *Planta* **215**: 371-379
38. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) *Cell* **108**: 457-487
39. Roberts SM, Winston F (1997) *Genetics* **147**: 451-465
40. Tamaru H, Selker EU (2001) *Nature* **414**: 277-283
41. Richards EJ, Elgin SCR (2002) *Cell* **108**: 489-500
42. Herrera JE, West KL, Schiltz RL, Nakatani Y, Bustin M (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 523-529
43. Hill DA, Imbalzano AN (2000) *Biochemistry* **39**: 11649-11656
44. Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R (2001) *Mol Cell* **7**: 729-739
45. Wyrick JJ, Holstege FCP, Jennings EG, Causton HC, Shore D, Grunstein M, Lander ES, Young RA (1999) *Nature* **402**: 418-421
46. Narlikar GJ, Phelan ML, Kingston RE (2001) *Mol Cell* **8**: 1219-1230
47. Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT (2000) *Nature* **408**: 877-881
48. Ausio J (2000) *Bioessays* **22**: 873-877

Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Prion [PSI] and its effect on termination of translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

MAŁGORZATA JAKUBIEC¹, MAGDALENA BOGUTA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odkrycie prionu [PSI]
- III. Wpływ [PSI] na fizjologię komórki
- IV. Indukcja prionu [PSI]
 - IV-1. Rola domen Sup35 w indukcji [PSI]
 - IV-2. Inne priony wpływające na indukcję [PSI]
 - IV-3. Białka opiekuńcze a [PSI]
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: Cox2 — białko podjednostki oksydazy cytochromu c drożdży *S. cerevisiae*; Hsp104, Hsp70, Hsp40 — białka opiekuńcze, wpływające na tworzenie i propagację prionu [PSI] u drożdży *S. cerevisiae*; Nam9 — białko rybosomów mitochondrialnych u drożdży *S. cerevisiae*; New1, Rnq1 — białka, które tworzą priony u drożdży; Pde2 — fosfodiesteraza cAMP u drożdży *S. cerevisiae*; [PIN] — prion drożdżowy, wpływający na indukcję [PSI]; PrP — białko komórkowe ssaków, które ulega przemianie konformacyjnej tworząc prion; [PSI] — prion drożdżowy, zagregowana forma białka Sup35; Sup35 — czynnik terminacji translacji (eRF3) u drożdży *S. cerevisiae*; Sup45 — czynnik terminacji translacji (eRF1) u drożdży *S. cerevisiae*; Ure2 - represor katabolizmu związków azotu u drożdży *S. cerevisiae*; [URE3] — prion drożdżowy, zagregowana forma białka Ure2.

I. Wstęp

Prion ssaczy był początkowo opisany jako patogeniczne białko, które powoduje neurodegenerację i śmierć komórki [1]. Obecnie terminem prion określa się niekonwencjonalny, zakaźny czynnik powstający w wyniku zmiany konformacji białka komórkowego PrP, które atakuje mózg ssaków. Zmiana konformacji PrP uważana jest za proces autokatalityczny, gdyż

Contents:

- I. Introduction
- II. [PSI] discovery
- III. The effects of [PSI] on cell physiology
- IV. [PSI] induction
 - IV-1. The role of Sup35 domains
 - IV-2. Other prions effect the induction of [PSI]
 - IV-3. Chaperones and [PSI]
- V. Summary

prion jest zdolny do przekazania swojej konformacji na natywne cząsteczki białka. Jest to reakcja łańcuchowa, która rozprzestrzenia się w mózgu i powoduje degenerację neuronów. Choroby wywołane przez prion u ssaków to: encefalopatia gąbczasta krów (choroba szalonych krów, BSE), scrapie u owiec i muflonów, a u człowieka — zespół Creutzfelda-Jacoba (CDJ), kuru, choroba Gertsmana-Strausslera-Scheinkera oraz śmiertelna rodzinna bezsenność [2].

Priony, w szerszym sensie oznaczają białka istniejące przynajmniej w dwóch różnych alternatywnych, stabilnych konformacjach. Priony zidentyfikowano również u grzybów, a ich istnienie objawia się jako cechy fenotypowe, które dziedziczą się niezgodnie z prawami Mendla. Priony u grzybów nie prowadzą do śmierci komórki, ale są elementem dziedzicznym, ważnym w regulacji procesów komórkowych i potencjalnie ważnym w ewolucji. Najlepiej scharakteryzowano priony [PSI] i [URE3] u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [3]. [URE3] jest formą konformacyjną białka Ure2 — negatywnego regulatora w metabolizmie azotu. [PSI] jest alternatywną formą konformacyjną białka Sup35 — czynnika terminacji translacji. Priony [PSI] i [URE3] można wyeliminować z komórek drożdży w wyniku traktowania chlorowodorkiem guanidyny (GuHCl) dodanym do pożywki w niskim stężeniu. Po przeniesieniu takich komórek na pożywkę bez GuHCl, agre-

¹Mgr, ²doc. dr hab, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel. 659 7072 w.1312, email: magda@ibbrain.ibb.waw.pl

gaty prionu tworzą się ponownie w wyniku nadprodukcji odpowiednio Sup35 i Ure2. Białka opiekuńcze, szczególnie Hsp104, biorą udział w tworzeniu prionu. Wiadomości ogólne o prionach u drożdży *S. cerevisiae* zostały zamieszczone poprzednio na łamach „Postępów Biochemii” w artykule pt. „Priony u drożdży i grzybów nitkowatych” [4].

Mechanizm dziedziczenia [*PSI*] i [*URE3*] polega prawdopodobnie na propagacji określonej konformacji białka komórkowego. Zarówno drożdżowe jak i ssące priony to nierozpuszczalne, odporne na proteazy agregaty, przyjmujące strukturę β -kartki. Spontanicznemu przejściu aktywnych białek do formy prionu zachodzącemu z niską częstotliwością (10^{-5} - 10^{-7}), towarzyszą zmiany fenotypowe. Zaproponowano różne modele tworzenia prionu. Najbardziej zgodny z wynikami doświadczalnymi model zakłada, że priony są regularnymi polimerami służącymi jako „zarodki” do polimeryzacji [5]. Agregaty prionów służą jako „zarodki” do rozmnażania, czyli propagacji prionów i są dziedziczone przez cytoplazmę. „Zarodki” powodują przemianę nowo zsyntetyzowanych białek Sup35 i Ure2 w prion. Analogiczny mechanizm zaproponowano dla przemiany komórkowego PrP do prionu u ssaków. Natura i specyfika „zarodków” jest obecnie tematem dyskusji na łamach wiodących czasopism naukowych [6, 7].

Tworzenie agregatów prionu zależy od domen białkowych bogatych w glutaminę i asparaginę, zwanych domenami prionowymi [8]. Przyłączenie domeny prionu może nadawać innemu białku zdolność do agregacji [9].

Przemiany konformacyjne Sup35 i Ure2 zaobserwowano także *in vitro*. Białka Sup35 i Ure2 syntetyzowane w *E. coli* i przetrzymywane w roztworze tworzą bardzo regularne agregaty w postaci włókien amyloidowych. Szybkość powstawania włókien drastycznie wzrasta po dodaniu wcześniej utworzonych agregatów [3, 10].

II. Odkrycie [*PSI*]

Supresja mutacji nonsens jest możliwa w szczepach drożdżowych ze zmutowanym tRNA, zdolnym do odczytania kodonów stop: UAA, UAG czy UGA. [*PSI*] był odkryty przez Briana Coxa w 1965 r., jako czynnik dziedziczenia nie związany z chromosomalnym DNA drożdży, który zwiększa wydajność odczytywania kodonów stop przez supresorowe tRNA. [*PSI*] umożliwia również słabą supresję nonsens w szczepie pozbawionym supresorowego tRNA [11]. Forma [*PSI*] dziedziczy się w sposób domi-

nujący i niezgodny z prawami Mendla, tj. segreguje w potomstwie mejotycznym 4:0. Próby powiązania czynnika [*PSI*] z pozachromosomalnym DNA były nieudane [12].

Oprócz zmutowanego tRNA, również mutacje w genach kodujących białka rybosomalne i czynniki translacyjne są odpowiedzialne za wierność procesu translacji [13]. W latach 60-tych wyizolowano i scharakteryzowano recesywne mutanty supresorowe *sup35* i *sup45* [14]. Geny *SUP35* i *SUP45* były następnie klonowane i wykazano, że są one niezbędne do życia komórki. W ostatnim czasie stwierdzono, że białka Sup35 i Sup45 są czynnikami terminacji translacji [15]. Sup45 (eRF1) jest odpowiedzialny za rozpoznawanie kodonu stop w mRNA i za uwalnianie peptydów z rybosomu po zakończeniu jego syntezy. Sup35 jest drożdżowym homologiem czynnika eukariotycznego eRF3, który jest GTP-azą i funkcjonuje razem z Sup45 [16].

Niezależne eksperymenty wykazały, że mutacja *PNM* zlokalizowana w genie *SUP35*, eliminuje zdolność do tworzenia [*PSI*] [17, 18]. Wyjaśnienie tego zjawiska było możliwe dzięki skojarzeniu przez Reda Wicknera prionu PrP i czynnika [*PSI*] [19]. Zgodnie ze sformułowaną przez niego hipotezą, [*PSI*] jest formą konformacją Sup35. Do utworzenia prionu [*PSI*] konieczne jest natywne, niezmutowane białko Sup35. Występowanie Sup35 w formie zagregowanej jako prion [*PSI*], powoduje defekt w terminacji translacji i supresję kodonów stop. Tak więc, [*PSI*] pozwala na regulację terminacji.

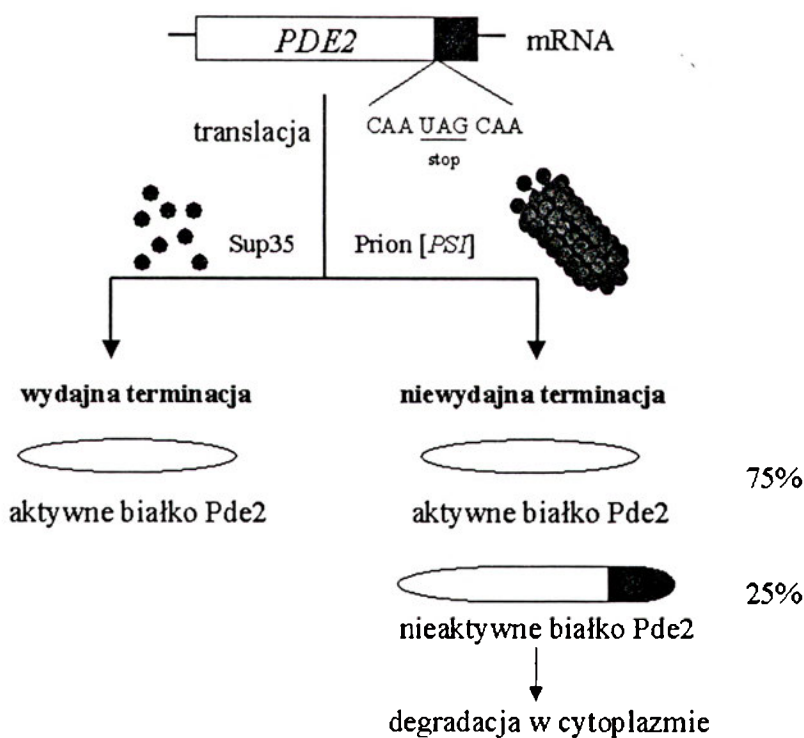
III. Wpływ [*PSI*] na fizjologię komórki

[*PSI*] obniżając wierność terminacji translacji, może mieć wpływ na morfologię, jak również modyfikuje metabolizm komórki [20]. Tworzenie nowych fenotypów związanych z indukcją prionu stanowi nowy, ewolucyjnie ważny mechanizm dziedziczenia, który może ułatwić adaptację komórek drożdży do wzrostu i rozwoju w zmieniających się warunkach środowiska. W szczególnych przypadkach obniżenie wydajności terminacji zależne od [*PSI*] może posłużyć do tworzenia polipeptydów wydłużonych od C-końca, co prowadzi do zmiany funkcji i lokalizacji powstałych białek. Obecność wydłużonego białka lub zmniejszenie poziomu produktu białka „normalnego” może w istotny sposób wpłynąć na funkcję komórki. Poniżej przedstawione zostaną konkretne przykłady takich efektów.

Głównym parametrem wpływającym na wydajną terminację jest lokalna sekwencja otaczająca kodon stop. Analiza statystyczna genów z różnych organi-

zmów wskazuje, że sekwencje otaczające kodonu stop nie są przypadkowe [21]. Określony kontekst nukleotydów wokół kodonu stop może umożliwić odczyt takiego kodonu jako sensowny [22, 23]. Poziom błędności odczytu kodonu stop jest dodatkowo zwiększony w obecności prionu [*PSI*]. Ostatnio stwierdzono, że w szczepach zawierających prion [*PSI*] rzeczywiście pewne białka są syntetyzowane w formie wydłużonej od C-końca. Przykładem jest białko Pde2, które jest fosfodiesterazą cAMP, działającą globalnie na fizjologię komórki [24]. W komórkach zawierających [*PSI*] zaobserwowano dwudziestokrotny wzrost poziomu odczytu kodonu stop w mRNA *PDE2* jako sensowny. Mylny odczyt wpłynął na syntezę dłuższej formy białka Pde2 o zmienionej funkcji wskutek dodatkowej sekwencji na C-końcu [24]. Ekspresję dłuższej formy Pde2 stwierdzono w 25% komórek w szczepie zawierającym [*PSI*] (Ryc. 1). Dłuższa forma Pde2 nie jest

Zaobserwowano, że prion [*PSI*] wpływa na funkcje mitochondrialnych białek rybosomalnych. Przykładem jest Nam9, białko małej podjednostki rybosomu mitochondrialnego [26]. Mutacja punktowa w genie *NAM9* nazywana *nam9-1*, powoduje zakłócenia w translacji genów kodowanych w mitochondriach, a w następstwie defekt oddechowy drożdży. Zastosowanie metod biochemicznych pozwoliło na sprecyzowanie przyczyny defektu oddechowego *nam9-1* jako zależnej od [*PSI*] niestabilności białek syntetyzowanych przez rybosomy mitochondrialne, posiadające zmienione białko Nam9. Pokazano to bezpośrednio na przykładzie białka Cox2, podjednostki oksydazy cytochromu *c*. Obniżona stabilność prowadziła do degradacji Cox2 i znacznego obniżenia poziomu innych białek syntetyzowanych w mitochondriach. Analiza genetyczna szczepu z mutacją *nam9-1* potwierdziła rolę prionu [*PSI*] jako czynnika odpowiedzialnego za niekompetencję od-

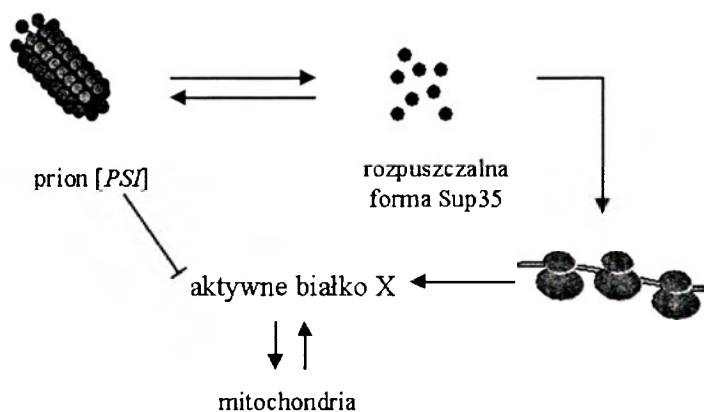


Ryc.1. Wpływ [*PSI*] na ekspresję genu *PDE2*

aktywna w hydrolizie cAMP i ulega degradacji w cytoplazmie. W konsekwencji w komórkach zawierających [*PSI*] hydroliza cAMP jest ograniczona, co powoduje dwukrotny wzrost poziomu cAMP. cAMP reguluje wiele funkcji w komórce, stąd tak znaczna zmiana jego poziomu może mieć związek z różnymi fenotypami powodowanymi przez [*PSI*] [25].

dechową i niestabilność Cox2. Jest to pierwszy, poznany dotychczas przykład wpływu [*PSI*] na funkcjonowanie mitochondriów [27] (Ryc. 2).

Opisane zależności kompetencji oddechowej komórki drożdży od prionu [*PSI*] sugerują istnienie specyficznych powiązań pomiędzy translacją cytoplazmatyczną i translacją mitochondrialną lub/i wy-



Ryc. 2. Hipotetyczny model wpływu [PSI] na funkcję mitochondriów. Zagregowane białko Sup35 (prion [PSI]) umożliwia kontynuację translacji mimo kodonu stop w mRNA białka X. Białko X, którego ekspresja zależałaby od [PSI] importowane do mitochondriów, mogłoby stanowić przekaznik między prionem a funkcją oddechową komórki.

darzeniami post-translacyjnymi, prowadzącymi do włączenia Cox2 w wewnętrzną błonę mitochondrialną i kompleks oksydazy cytochromowej [27].

IV. Indukcja [PSI]

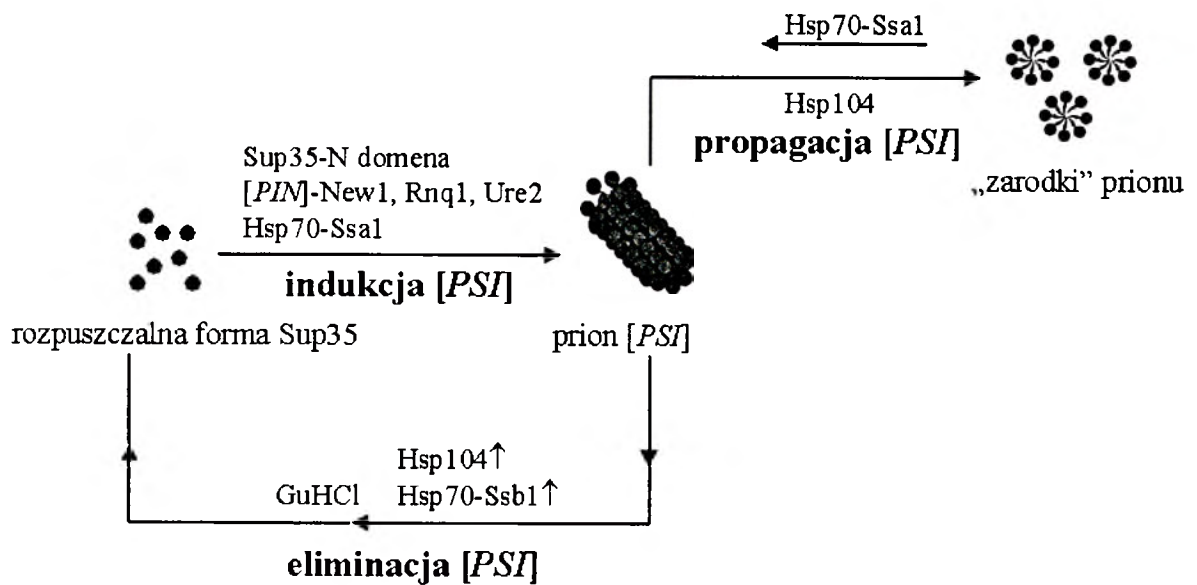
IV-1. Rola domen Sup35

Sup35 jest drożdżowym homologiem czynnika terminacji translacji eRF3. Białko to ma budowę domenową [28]. Domena C Sup35 (od 254 do 685-aminokwasu białka Sup35) jest odpowiedzialna za terminację translacji i warunkuje wzrost. Sekwencja domeny C konserwowanej w ewolucji, jest homologiczna do czynnika elongacji translacji (EF1- α) i zawiera cztery miejsca wiążące GTP [29]. W odróżnieniu, domena N a także środkowa domena białka (N i M, do 253 aminokwasu) nie jest ważna z punktu widzenia wzrostu i ewolucji [30]. Domena M o nieznannej funkcji, jest łącznikiem domeny N i C. Domena N, złożona z 113 aminokwasów jest odpowiedzialna za tworzenie [PSI] [18]. Co więcej, nadekspresja domeny N jest wystarczająca do indukcji [PSI] [31]. Zaobserwowano wzajemne oddziaływania między domenami. Delecja określonego fragmentu domeny C białka Sup35 powoduje wzrost wydajności tworzenia prionu przez domenę N [32]. N-terminalna domena jest bogata w glutaminę i asparaginę i zawiera czterokrotnie powtarzający się układ dziewięciu aminokwasów PGGYQQYN. Delecja tych sekwencji powodowała zmniejszenie częstości powstawania komórek [PSI], zaś wprowadzenie dodatkowych traktów zwiększenie tej częstości, połączone ze zwiększeniem szybkości tworzenia agregatów prionu [33]. Fuzja domeny N z GFP (białko fluory-

zujące zielonym światłem) powodowała agregację hybrydu Sup35-GFP, co było monitorowane z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Domena N odgrywa także kluczową rolę w konwersji białka Sup35 do formy prionu [PSI] w warunkach *in vitro* [31]. Tak więc, domena N białka Sup35 jest decydująca w regulacji wydajności terminacji translacji zależnej od [PSI] [30].

IV-2. Inne priony wpływające na indukcję [PSI]

[PSI] może być indukowane w określonych, lecz nie wszystkich szczepach drożdżowych. Wykazano, że kolejny prion, nazwany [PIN] dziedziczący się niezgodnie z prawami Mendla, jest potrzebny do indukcji prionu [PSI] [34]. [PIN] jest konieczny do spontanicznej indukcji [PSI], jak również do indukcji [PSI] przez nadmiar białka Sup35, ale nie jest potrzebny w propagacji [PSI] (Ryc. 3). [PSI] może być przekazywany wraz z cytoplazmą do komórki potomnej w obecności i nieobecności [PIN] [35]. [PIN] scharakteryzowano jako prion, ponieważ znika wskutek traktowania komórek GuHCl i może pojawiać się *de novo* po usunięciu GuHCl [35]. Nie zaobserwowano bezpośredniego związku [PIN] z białkiem Sup35. W wyniku klonowania [PIN] otrzymano różne geny z prionową domeną, co sugeruje, że więcej niż jeden prion wpływa na fenotyp [PIN] [7]. Niezależnie, stosując metody komputerowe, zidentyfikowano białka drożdżowe, które zawierają domeny bogate w glutaminę i asparaginę, a także wykazują podobieństwo do domeny N białka Sup35. Jednak tylko niektóre agregaty bogate w glutaminę i asparaginę powodują cechę [PIN] czyli są zdolne do indukcji [PSI]. Wykazano, że fenotyp [PIN] wiąże



Ryc. 3. Udział białek opiekuńczych w tworzeniu i degradacji prionu [PSI]

się z agregacją białek: Rnq1, Ure2 i New1. Natomiast analogiczna domena białka Pan1, bogata w glutaminę i asparaginę, nie powodowała indukcji [PSI] [6].

Dziewięć innych genów niosących domeny prionu jest także potencjalnie odpowiedzialna za fenotyp [PIN]. Takie obserwacje wskazują na powszechnie istniejący mechanizm kaskadowej indukcji prionu [PSI] przez inne priony [7].

Funkcje komórkowe białek Rnq1 i New1 są nieznanne, ponieważ inaktywacja genów *RNQ1* i *NEW1* nie daje widocznego efektu fenotypowego. Obydwa białka mają domeny prionu bogate w glutaminę i asparaginę. W wyniku fuzji domeny N białek New1 i Rnq1 z domeną C białka Sup35 obserwowano indukcję [PSI] [36]. Białko Rnq1 spełnia *in vivo* wszystkie kryteria prionu [37]. Fuzja domeny C prionu Rnq1 z GFP powoduje zależną od Hsp104 agregację hybrydu Rnq1-GFP [37]. Agregaty Rnq1 dziedziczą się w sposób niezgodny z prawami Mendla i korelują z indukcją fenotypu [PIN] [7]. Ponadto, obecność białka Rnq1 w szczepie biorcy jest konieczna do powstania [PIN].

IV-3. Białka opiekuńcze a [PSI]

Zastosowanie metod genetycznych umożliwiło wykrycie białek opiekuńczych, które kontrolują zwinanie białek. Udział białek opiekuńczych w powstawaniu [PSI] jest zrozumiały, gdyż właśnie proces zwinania białka towarzyszy tworzeniu prionu. Propagacja [PSI] jest możliwa dzięki białkom: Hsp104,

Hsp70 i Hsp40 [38]. Hsp104 pełni kluczową rolę w dziedziczeniu [PSI]. W utrzymaniu stabilnej konformacji prionu wymagana jest określona ilość tego białka. Białko Hsp104 jest także odpowiedzialne za przenoszenie prionów [URE3], [PIN] i Rnq1 do komórek potomnych [34,37,39]. Wśród znanych prionów drożdżowych tylko nowo wykryty prion [ISP] wydaje się być niezależny od Hsp104 [40]. Hsp104 nie jest konieczne do normalnego wzrostu, ale jest potrzebne do reaktywacji komórek po stresie [41]. Nadekspresja, jak również brak białka Hsp104, prowadzi do eliminacji prionu [PSI] z drożdży.

Zaproponowano dwa alternatywne modele interpretujące udział Hsp104 w powstawaniu prionu. Według modelu wcześniejszego, Hsp104 oddziałuje bezpośrednio z Sup35 tworząc konformację przejściową, która służy jako substrat do formowania prionu [42]. Drugi model zakłada, że Hsp104 jest niezbędny w propagacji prionu i tworzeniu „zarodków” prionu [30]. Model ten był potwierdzony przez szczegółową analizę eksperymentalną wyników rozpadu prionu po inaktywacji Hsp104. Obniżenie poziomu lub aktywności Hsp104 i wzrost rozmiaru agregatu prionu prowadzi do akumulacji dużych aglomeratów, które w nieobecności Hsp104 nie są przekazywane do komórek potomnych i w ten sposób eliminowane z populacji. Hsp104 wydaje się więc być niezbędny do rozpadu agregatów i tworzenia „zarodków”, które są przenoszone do komórki potomnej i zapoczątkowują w niej propagację prionu [43]. Wynik ten wskazuje na zasadniczą funkcję Hsp104 w propagacji prionu.

W przemianach konformacyjnych prionu [*PSI*] u drożdży oprócz Hsp104, uczestniczą białka z rodziny Hsp70: Hsp70-Ssa1 i Hsp70-Ssb1. Ssa1 jest indukowane w warunkach stresowych, podczas gdy Ssb1 jest związane z rybosomami, a jego ekspresja jest hamowana w warunkach stresowych. Wpływ Hsp70-Ssa1 na propagację [*PSI*] jest przeciwny do efektu Hsp104. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, Ssa1 sprzyja gromadzeniu nowych agregatów i propagacji [*PSI*] [43]. Nadmiar Ssa1 zapobiega eliminacji [*PSI*] przez nadekspresję Hsp104 [44]. Mutacja w genie *SSA1* prowadzi do obniżenia stabilności [*PSI*] [45]. Przeciwnie, nadprodukcja Hsp70-Ssb1 sprzyja eliminacji [*PSI*] [46] i powoduje zwiększenie skuteczności eliminacji prionu przez nadmiar Hsp104 [47]. Inaktywacja Hsp70-Ssb1 prowadzi do wzrostu indukcji [*PSI*]. Prawdopodobnie Ssb1 wpływa na [*PSI*], jako białko kontrolujące konformację, które przeciwdziała niewłaściwemu związaniu Sup35 [47].

Dotychczasowe badania pozwalają na identyfikację Hsp104 i Hsp70-Ssb1 jako białek zdolnych do eliminacji prionu [*PSI*]. Dokładna analiza eliminacji prionu z komórek drożdży jest szczególnie przydatna do badań prionów ssaczych, które mogą być aktywnie leczone w podobnych warunkach. Jednak nie stwierdzono istnienia homologów Hsp104 u takich organizmów wyższych jak nicienie i muszka owocowa. Wiadomo natomiast, że białko Hsp70-Ssb1 jest homologiczne w 61% do białka obecnego w komórkach ludzkich.

V. Podsumowanie

Obecność prionu [*PSI*] modyfikuje terminację translacji powodując zmianę funkcji wybranych białek i określonych cech fenotypowych. Ponieważ zmiany te są dziedziczne, [*PSI*] może być traktowany jako nowy epigenetyczny mechanizm dziedziczenia. Mechanizm ten jest kontrolowany na różnych poziomach. Zdolność tworzenia [*PSI*] jest zależna od obecności i udziału komórkowej domeny prionu-Sup35. Indukcja [*PSI*] jest również modulowana przez inne czynniki komórkowe: kodowane chromosomalnie białka opiekuńcze oraz kolejny prion komórkowy zwany [*PIN*]. Prawdopodobnie w regulację indukcji [*PSI*] są zaangażowane także inne procesy, jednak zrozumienie tego zagadnienia wydaje się być odległe.

Podziękowania

Dziękujemy Pani doc. Teresie Żołądek za krytyczne uwagi pomocne przy pisaniu pracy.

Praca została zrealizowana w ramach grantu KBN 3PO4A 03922 oraz grantu Polsko-Francuskiego Centrum Biotechnologii Roślin.

Artykuł otrzymano 25 lutego 2002
Zaakceptowano do druku 13 czerwca 2002

Piśmiennictwo

1. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE (1998) *Cell* **93**: 337-348
2. Horwich AL, Weissman JS (1997) *Cell* **89**: 499-510
3. Wickner RB, Taylor KL, Edskes HK, Maddelein ML, Moriyama H, Roberts BT (1999) *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 844-861
4. Boguta (2000) *Postępy Biochemii* **46**(2): 108-115
5. Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL (2000) *Science* **289**: 1317-1321
6. Osheroovich LZ, Weissman JS (2001) *Cell* **106**: 183-194
7. Derkatch IL, Bradley ME, Hong JY, Liebman SW (2001) *Cell* **106**: 171-182
8. DePace AH, Santoso A, Hillner P, Weissman JS (1998) *Cell* **93**:1241-1252
9. Tuite MF (2000) *Cell* **100**: 289-292
10. Glover JR, Kowal AS, Schirmer EC, Patino MM, Liu JJ, Lindquist SL (1997) *Cell* **89**: 811-819
11. Cox BS, Tuite MF, McLaughlin CS (1988) *Yeast* **4**: 159-178
12. Wickner RB, Masison DC, Edskes HK (1995) *Yeast* **11**: 1671-1685
13. Liebman SW, Chernoff YO, Liu R (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 1141-1149
14. Inge-Vechtomov SG, Adrianova MV (1970) *Genetika* **6**:103-115
15. Stansfield I, Jones KM, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Poznyakovski AI, Pauskhin SV, Nieras CR, Cox BS, Ter-Avanesyan MD, Tuite MF (1995) *EMBO J* **14**: 4365-4373
16. Zhouravleva G, Frolova L, Goff XL, Guellec RL, Inge-Vechtomov SG, Kiselev L, Philippe M (1995) *EMBO J* **14**: 4065-4072
17. Doel SM, McCready SJ, Nieras CR, Cox BS (1994) *Genetics* **137**: 659-670
18. Ter-Avanesyan MD, Dagkesamanskaya AR, Kushnirov VV, Smirnov VN (1994) *Genetics* **137**: 671-676
19. Wickner RB (1994) *Science* **264**: 566-569
20. True HL, Lindquist SL (2000) *Nature* **407**: 477-483
21. Brown CM, Dalphin ME, Stockwell PA, Tate WP (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 3119-3123
22. Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM (1995) *J Mol Biol* **251**: 334-345
23. Mottagu-Tabar S, Tuite MF, Isaksson LA (1998) *Eur J Biochem* **257**: 249-254
24. Namy O, Hatin I, Rousset JP (2001) *EMBO Rep* **2**: 787-793
25. Namy O, Duchateau-Nguyen GM, Rousset JP (2002) *Mol Microbiol*, in press.
26. Boguta M, Dmochowska A, Borsuk P, Wróbel K, Gargouri A, Lazowska J, Słonimski PP, Szcześniak B, Kruszewska A (1992) *Mol Cell Biol* **12**(1): 402-412
27. Chacińska A, Boguta M, Krzewska J, Rospert S (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 7220-7229
28. Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Didichenko SA, Chernoff YO, Inge-Vechtomov SG, Smirnov VN (1993) *Mol Microbiol* **7**: 683-6929
29. Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD, Telckov MV, Surguchov AP, Smirnov VN, Inge-Vechtomov SG (1988) *Gene* **66**: 45-54

30. Kushnirov VV, Ter-Avanesyanyan MD (1998) *Cell* **94**: 13-16
31. Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyanyan MD (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 2798-2805
32. Kochneva-Pervukhova NV, Poznyakovski AI, Smirnov VN, Ter-Avanesyanyan MD (1998) *Curr Genet* **34**: 146-151
33. Liu JJ, Lindquist S (1999) *Nature* **400**: 573-576
34. Derkatch IL, Bradley ME, Zhou P, Chernoff YO, Liebman SW (1997) *Genetics* **147**: 507-519
35. Derkatch IL, Bradley ME, Masse SV, Zadorsky SP, Polozkov GV, Inge-Vechtomy SG, Liebman SW (2000) *EMBO J* **19**: 1942-1952
36. Michelitsch MD, Weissman JS (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11910-11915
37. Sondheimer N, Lindquist S (2000) *Mol Cell* **5**: 163-172
38. Kushnirov VV, Kryndushkin DS, Boguta M, Smirnov VN, Ter-Avanesyanyan MD (2000) *Curr Biol* **10**: 1443-1446
39. Moriyama H, Edskes HK, Wickner RB (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 8916-8922
40. Volkov KV, Aksenova AY, Soom MJ, Osipov KV, Svitin AV, Kurischko C, Shkundine IS, Ter-Avanesyanyan MD, Inge-Vechtomy SG, Mironova LN (2002) *Genetics* **160**(1): 25-36
41. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S (1994) *Nature* **372**: 475-478
42. Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomy SG, Liebman SW (1995) *Science* **268**: 880-884
43. Wegrzyn RD, Bapat K, Newnam GP, Zink AD, Chernoff YO (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 4656-4669
44. Newnam GP, Wegrzyn RD, Lindquist SL, Chernoff YO (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 1325-1333
45. Jung G, Jones G, Wegrzyn RD, Masison DC (2000) *Genetics* **156**: 559-570
46. Chacińska A, Szcześniak B, Kochneva-Perukova N, Kushnirov V, Ter-Avanesyanyan MD, Boguta M (2001) *Curr Genet* **39**: 62-67
47. Chernoff YO, Newnam GP, Kumar J, Allen K, Zink AD (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 8103-9112

Wyciszanie ekspresji genów i nowe narzędzia biologii molekularnej roślin

Gene silencing and new tools in plant molecular biology

MAREK KOTER¹, JACEK HENNIG²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Kosupresja
 - III-1. Potranskrypcyjne wyciszanie genów (ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*)
 - III-2. Przykłady praktycznego zastosowania wyciszania genów indukowanego przez infekcję wirusa (ang. *Virus Induced Gene Silencing*)
- IV. Wirusowe supresory potranskrypcyjnego wyciszania genów
- V. Amplikony
 - V-1. Amplikony, a wysoce wydajna ekspresja transgenów w roślinach
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: CaMV (ang. *cauliflower mosaic virus*); chs — syntaza chalconowa (ang. *chalcone syntase*); CP — wirusowe białko płaszczka (ang. *coat protein*); GFP — zielone białko fluoryzujące (ang. *Green Fluorescent Protein*); GUS — β -glukuronidaza; Hc-Pro — proteaza (ang. *Helper component-Protease*); LAS — miejscowe wyciszenie ekspresji genu (ang. *Localised Acquired Silencing*); *Nia* — gen reduktazy azotanowej; PDS — desaturaza fitoenu (ang. *phytoene desaturase*); PTGS — potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów (ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*); PVX (ang. *potato virus X*); PVY (ang. *potato virus Y*); RYMV (ang. *rice yellow mottle sobemovirus*); SAS — systemowe wyciszenie ekspresji genu (ang. *Systemic Acquired Silencing*); TBRV (ang. *tomato black ring nepovirus*); TBSV (ang. *tomato bushy stunt tombusvirus*); TEV (ang. *tobacco etch potyvirus*); TEV (ang. *tobacco etch virus*); TGS — transkrypcyjne wyciszanie ekspresji genów (ang. *Transcriptional Gene Silencing*); TMV (ang. *tobacco mosaic tobamovirus*); TRSV (ang. *tomato ringspot nepovirus*); TRV (ang. *tobacco rattle virus*); *uidA* — gen β -glukuronidazy; UTR — region nie ulegający transkrypcji (ang. *untranscribed region*); VIGS — indukowane przez wirus wyciszanie ekspresji genowej (ang. *Virus Induced Gene Silencing*).

Contents:

- I. Introduction
- II. Cosuppression
 - III-1. Post-Transcriptional Gene Silencing
 - III-2. Practical applications of Virus Induced Gene Silencing
- IV. Viral Suppressors of Post-Transcriptional Gene Silencing
- V. Amplicons
 - V-1. Amplicons and high level transgene expression in plants
- VI. Final remarks

I. Wstęp

Opracowanie technik transformacji genetycznej roślin umożliwiło nowe podejście do genetyki, fizjologii a także biotechnologii tej grupy organizmów. W Stanach Zjednoczonych w 1999 roku ponad 40% kukurydzy, 50% bawełny i 45% soi pochodziło z odmian transgenicznych, charakteryzujących się większą odpornością na choroby lub ulepszoną wartością odżywczą niż odmiany otrzymane w wyniku tradycyjnych krzyżówek [1]. Postuluje się, że zmodyfikowane genetycznie rośliny mogą również stać się wygodnymi i tanimi bioreaktorami do syntezy substancji mających zastosowanie w różnych dziedzinach życia. Chociaż z metodycznego punktu widzenia transformacja roślin jest dobrze opracowana, często poziom ekspresji transgeny jest zmienny w różnych liniach roślin transgenicznych [2]. Nie jest też łatwo uzyskać wydajne i stabilne wyrażanie wprowadzonych do roślin genów ze względu na częste wyciszanie ich ekspresji (ang. *gene silencing*). Proces ten można podzielić na dwie grupy: wyciszanie na etapie transkrypcyjnym oraz potranskrypcyjnym (ang. *PTGS*). W ostatnich latach potranskrypcyjne wyciszanie genów wykorzystano dla otrzymania roślin odpornych na infekcje wirusowe oraz dla badania funkcji nieznanych genów roślinnych. W

¹Dr, ²Doc. dr hab., Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. A. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, e-mail: ¹koterm@megapolis.pl, ²jacekh@ibb.waw.pl

tym artykule ze względu na obszerność tematu ograniczymy się do opisanie zjawisk związanych z PTGS. Omówione zostaną również amplikony, nowe obiecujące narzędzie biologii molekularnej roślin, pozwalające na identyfikację funkcji genów oraz na tworzenie wysoce wydajnego systemu do nadprodukcji białek w roślinach.

II. Kosupresja

Homologiczne wyciszenie ekspresji genów zaobserwowano po raz pierwszy podczas doświadczeń, mających na celu zwiększenie intensywności barwy kwiatów petunii *Petunia hybrida* [3, 4]. Eksperymenty te polegały na transformacji roślin dodatkowymi kopiami genu syntazy chalkonowej (*chs*), enzymu ze szlaku syntezy antocyjanów odpowiedzialnego za zabarwienie kwiatów. Przeciwnie jednak do założeń doświadczenia, otrzymane rośliny charakteryzowały się kwiatami biało nakrapianymi lub jednolicie białymi, a oznaczenia poziomu mRNA syntazy chalkonowej w transformantach wykazały niski poziom w porównaniu do mRNA uzyskanego z roślin kontrolnych. Tak więc wprowadzenie transgeny przyczyniło się do redukcji jego ekspresji oraz endogennej syntazy chalkonowej w transformowanych roślinach. Zjawisko to nazwano kosupresją [5]. Nasunęło się w związku z tym pytanie, czy niski poziom transkrypty jest rezultatem zmniejszonej syntezy czy zwiększonej degradacji mRNA.

Dalsze badania pozwalające na odróżnienie aktywności syntetyzowanego *de novo* mRNA na matrycy DNA od całkowitego poziomu mRNA w komórce (ang. „*run-on*” experiments) wykazały identyczną aktywność syntezy mRNA w obydwu obszarach kwiatów. A więc niski poziom lub brak mRNA syntazy chalkonowej w białych sektorach kwiatów jest wynikiem specyficznej degradacji [6, 7].

III-1. Potranskrypcyjne wyciszenie genów (ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*)

Interesujące obserwacje przeprowadzono podczas badań linii transgenicznego tytoniu *Nicotiana tabacum* wyrażającego gen białka płaszczka wirusa TEV (ang. *tobacco etch virus*) [8, 9]. Po zainfekowaniu roślin wirusem TEV początkowo obserwowano wszystkie typowe objawy zakażenia, jednakże w miarę wzrostu roślin pojawiały się młode zdrowe liście, które wykazywały odporność na ponowną infekcję przez TEV. Proces ten nazwano „ozdrowieniem” (ang. *recovery*). Hybrydyzacyjna analiza poziomu mRNA dla białka płaszczka TEV w liściach przed za-

każeniem i po zaniku objawów infekcji, wykazała niski poziom transkrypty w młodych liściach, na których nie zaobserwowano objawów infekcji wirusowej. Ponieważ brak mRNA może świadczyć o jego degradacji lub też braku transkrypcji, wykonano doświadczenia „*run-on*” [8] pozwalające stwierdzić, czy na matrycy DNA następuje synteza mRNA *de novo*. Wykazały one, że zarówno w liściach z objawami infekcji wirusowej jak też w młodych liściach roślin, u których zanikły objawy porażenia, gen białka płaszczka wirusa TEV ulegał transkrypcji, a wydajność syntezy jego mRNA była w obydwu przypadkach identyczna. Tak więc wyniki eksperymentów świadczą o tym, że w roślinach z fenotypem „*recovery*” nastąpiła specyficzna degradacja wirusowego RNA. Jednak, pomimo że rośliny uzyskiwały odporność na TEV, były nadal wrażliwe na infekcje pokrewnym wirusem ziemniaka Y (PVY). Świadczy to o dużej specyficzności zjawiska, które nazwano potranskrypcyjnym wyciszeniem genów (ang. *Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS*).

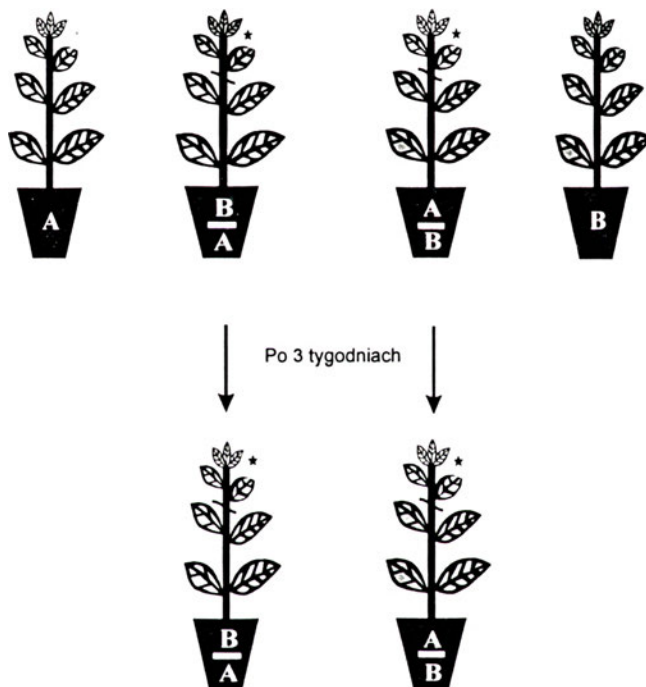
Obecność transgeny nie jest warunkiem niezbędnym dla wyciszenia ekspresji genu [9]. Infekcja tytoniu *Nicotiana clevelandii* szczepu W22 wirusem TBRV (ang. *tomato black ring nepovirus*) powodowała silne objawy porażenia na liściach. Jednakże liście, które rozwinęły się po inokulacji były wolne od jakichkolwiek objawów porażenia oraz wykazywały odporność na powtórne zakażenie tym wirusem na skutek degradacji wirusowego RNA [9]. Ponadto rośliny tych nie infekował specjalnie zmodyfikowany wirus PVX, jednak pod warunkiem, że do jego genomu włączono odcinek RNA wirusa TBRV szczepu W 22 [9]. Otrzymana w ten sposób odporność jest wysoce specyficzna wobec zakażającego wirusa: rośliny inokulowane spokrewnionym wirusem TRSV (ang. *tomato ringspot nepovirus*) lub PVX wykazywały silne objawy porażenia. Na podstawie tego typu doświadczeń wysunięto hipotezę, że infekcja wirusem może indukować naturalną odporność roślin polegającą na wysoce specyficznym degradowaniu obcego RNA [9].

Do indukcji odporności roślin przeciwko wirusom mogą służyć nie tylko geny pochodzenia wirusowego. Transgeniczny tytoń *N. tabacum*, w którym nastąpiło wyciszenie genu *uidA* kodującego pochodzący z bakterii enzym β -glukuronidazę (GUS) infekowano zmodyfikowanym wirusem mozaiki tytoniu TMV, do genomu którego dołączono gen *uidA*. Po kilkunastu dniach po infekcji rośliny kontrolne wykazały wszystkie objawy charakterystyczne dla porażenia przez TMV, podczas gdy rośliny transgeniczne pozostały odporne na infekcję [10]. Tak więc

można domniemywać, że warunkiem niezbędnym do wystąpienia odporności na infekcje wirusowe jest homologia sekwencji występującej w czynniku infekcyjnym do sekwencji znajdującej się w genomie gospodarza, a źródło jej pochodzenia nie odgrywa żadnej roli.

Sygnal indukujący PTGS rozchodzi się w roślinie systemowo. Liście transgenicznego tytoniu *Nicotiana benthamiana* wyrażającego gen białka GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*), infiltrowano zawiesiną bakterii *Agrobacterium tumefaciens* wyrażających gen reporterowy GFP. Tkanki, w których ma miejsce ekspresja tego genu charakteryzują się zieloną fluorescencją po naświetleniu ich UV. Już po dwóch dniach od infiltracji można było obserwować inten-

jest szczególnie użyteczny w tego typu eksperymentach, gdyż brak jego ekspresji manifestuje się występowaniem charakterystycznej chlorozy liści. Tak więc gdy zaszczepiono zraz pochodzący z rośliny z funkcjonalnym genem reduktazy azotanowej na podkładce z wyciszonym genem *Nia*, po trzech tygodniach również w zrazie obserwowano pojawienie się chlorozy. Natomiast zaszczepienie chlorotycznego zrazu na podkładce z genem aktywnym nie wywoływało wyciszenia genu reduktazy azotanowej w podkładce. Świadczy to jednoznacznie, że transport sygnału wyciszania odbywa się w kierunku od korzeni do merystemu wierzchołkowego rośliny [12]. Schemat opisanych powyżej badań przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający kierunkowe rozchodzenie się sygnału dla wyciszenia ekspresji genu *Nia*. A — roślina z wyciszonym genem *Nia*, B — roślina z aktywnym genem *Nia*. ★ Ekspresja genu *Nia* uległa wyciszeniu.

sywną fluorescencją w okolicy liścia, gdzie wprowadzono *Agrobacterium*. Sygnal ten, pochodzący z bakterii był znacznie intensywniejszy niż fluorescencja będąca wynikiem ekspresji transgenu roślinnego. Jednak na granicy strefy infiltrowanej liścia fluorescencja zanikła świadcząc o zachodzącym tam wyciszeniu ekspresji GFP.

Strefa lokalnego wyciszenia (ang. *Local Acquired Silencing*) rozszerzała się, by po 18 dniach osiągnąć górne liście infiltrowanej rośliny [11]. Efekt ten nazwano wyciszeniem systemowym (ang. *Systemic Acquired Silencing*) [12]. Doświadczenia z wykorzystaniem transgenicznych roślin tytoniu charakteryzujących się wyciszeniem genu reduktazy azotanowej *Nia* wykazały kierunek rozprzestrzeniania się sygnału PTGS w roślinie [12]. Gen *Nia*

Jak pokazują wyniki przedstawionych doświadczeń, w roślinach może istnieć system obrony zabezpieczający przed infekcjami wirusowymi polegający na specyficznej degradacji wirusowego RNA zdolny do szybkiej odpowiedzi w przypadku ponownej infekcji.

III-2. Przykłady praktycznego zastosowania wyciszenia genów indukowanego przez infekcję wirusa (ang. *Virus Induced Gene Silencing*)

Potranskrypcyjne wyciszenie ekspresji genów (PTGS) może być wykorzystane do wywoływania wyciszenia ekspresji genów gospodarza. Rośliny tytoniu *N. benthamiana*, do których wprowadzono gen

GFP po infekcji rekombinowanym wirusem PVX-GFP wykazywały normalne objawy porażenia. Jednakże proces namnażania się wirusa prowadził do włączenia się mechanizmu potranskrypcyjnego wyciszenia, który dotyczył zarówno ekspresji transgenu, jak i ekstrachromosomalnie replikującego się wirusa, co w rezultacie doprowadziło do całkowitej eliminacji PVX z rośliny [13]. Zjawisko to nazwano wyciszeniem ekspresji genów indukowanym przez wirus (ang. *Virus Induced Gene Silencing*, VIGS). Może być ono również wywoływane przez wirusy zawierające w swoim genomie odcinki DNA homologiczne do genów rośliny [14, 15]. Ma to duże zastosowanie praktyczne: dysponując wektorem wirusowym z wklonowanym genem roślinnym można zakażając podatne rośliny wywołać wyciszenie ekspresji homologicznego genu roślinnego. Otrzymuje się w ten sposób efekt fenotypowy mutacji (fenokopie) tego genu w roślinie.

Jednym z najbardziej spektakularnych przykładów wykorzystania zjawiska VIGS jest całkowite zablokowanie ekspresji desaturazy fitoenu (PDS) [13, 16], manifestujące się w tytoniu całkowitym wybieleniem górnych liści. W zakażonych zrekombinowanym wirusem PVX-PDS roślinach tytoniu proces ten spowodował obniżenie poziomu mRNA transkrybowanego z chromosomalnej kopii genu desaturazy, co w konsekwencji doprowadziło do zablokowania produkcji karotenoidów, niezbędnych do ochrony przed niszczącym wpływem światła [17].

Metoda ta ma duże perspektywy zastosowań przy analizie funkcjonalnej genów roślinnych. Znając choćby część sekwencji badanego genu sprawdzać można zmiany fenotypowe pojawiające się po upływie kilkunastu dni, to jest po okresie, gdy na górnych liściach pojawiają się pierwsze symptomy VIGS. Tak więc zależność między sekwencją nieznanego genu a odpowiadającym mu fenotypem można ustalić w ciągu zaledwie kilku tygodni [17]. Z pewnością łatwiejsza będzie teraz analiza funkcjonalna genów wielokopijnych oraz takich, których mutacje są letalne już we wczesnych stadiach rozwojowych roślin.

Technika ta może służyć również do ustalenia odwrotnej relacji: od fenotypu do odpowiadającego mu genu. W tym celu należałoby skonstruować biblioteki cDNA badanej rośliny z wykorzystaniem PVX jako wektora i analizować dużą liczbę infekowanych roślin [17].

Jednakże pomimo wielu zalet, technologia oparta na VIGS jest zjawiskiem zależnym od liczby i organizacji transgenów, oraz od regionu chromatyny, gdzie nastąpiło ich wbudowanie do chromosomu.

IV. Wirusowe supresory potranskrypcyjnego wyciszenia genów

Obserwacja przebiegu infekcji u roślin zakażonych dwoma gatunkami wirusów dała podstawy do przypuszczeń, że niektóre wirusy mogą kodować czynniki będące naturalnymi supresorami wyciszenia genów. Taka podwójna infekcja w wielu przypadkach prowadzi do synergizmu symptomów chorobowych i do akumulacji jedynie jednego z infekujących wirusów [18, 19]. Zaobserwowano również, że wiele z takich przypadków dotyczy wirusów z rodziny *Potyviriidae*, a infekowane rośliny transgeniczne, wyrażające geny zlokalizowane w rejonie 5' genomu wirusa TEV należącego do tej rodziny, wykazują znacznie ostrzejsze objawy chorobowe niż rośliny nie transgeniczne [19, 20]. Doświadczenia te sugerowały, że kompleks białkowy P1/HC-Pro kodowany przez tę część genomu wirusa inhibuje system ochrony antywirusowej u roślin. Istniało przypuszczenie, że systemem tym może być potranskrypcyjne wyciszenie genów PTGS [19].

Dla weryfikacji doświadczalnej tej hipotezy przeprowadzono dwa typy doświadczeń. W pierwszym eksperymencie skrzyżowano transgeniczne rośliny wyrażające P1/HC-Pro z roślinami transgenicznymi, u których gen reporterowy kodujący GUS uległ potranskrypcyjnemu wyciszeniu. U roślin potomnych tej krzyżówki gen ten ulegał wydajnej ekspresji [21, 22]. W wyniku dalszych doświadczeń wykazano, że genem odpowiedzialnym u potywirusów za inhibicję PTGS jest wielofunkcyjne białko HC-Pro, odpowiedzialne również za przemieszczanie się wirusa w roślinie, przenoszenie wirusa przez mszyce i modyfikowanie białek [23, 24].

Drugim typem doświadczeń były eksperymenty, w których udowodniono, że wektor wirusowy PVX wyrażający gen reporterowy GFP nie wywołuje zjawiska VIGS w roślinach transgenicznych wyrażających GFP w obecności P1/HC-Pro [21].

W laboratorium profesora Davida Baulc o m b a opracowano test umożliwiający poszukiwanie supresorów PTGS z wykorzystaniem transgenicznych roślin tytoniu *N. benthamiana* wyrażających GFP [23, 24]. W roślinach tych wyciszenie ekspresji transgenu indukowane było poprzez infiltrację liści zawiesiną bakterii *A. tumefaciens* niosącą plazmid z GFP [23]. Następnie rośliny takie zakażane są różnymi wirusami i monitorowane pod względem ekspresji GFP. Dzięki tej metodzie odkryto kilka kolejnych białek, mających zdolność do supresji roślinnego systemu ochrony przed infekcjami wirusowymi, jakim jest PTGS. Przykładem może tu

być białko P19 wirusa TBSV, AC2 geminiwirusa czy P1 z RYMV [24]. Wszystkie te białka uniemożliwiają skuteczną obronę przed infekcjami wirusowymi.

Aby nie pozostać bezbronnymi, rośliny zastosowały inną strategię obrony przed wirusami mającymi zdolności do inaktywacji systemu chroniącego przed patogenami: supresory PTGS są często tak zwanymi białkami awirulencji (*avr*), z którymi oddziałują produkty roślinnych genów odporności R [25, 26]. Interakcja dwu białek, produktów genów *avr* i R, prowadzi do uaktywnienia całego łańcucha reakcji prowadzących do zwalczania infekcji [27].

V. Amplikony

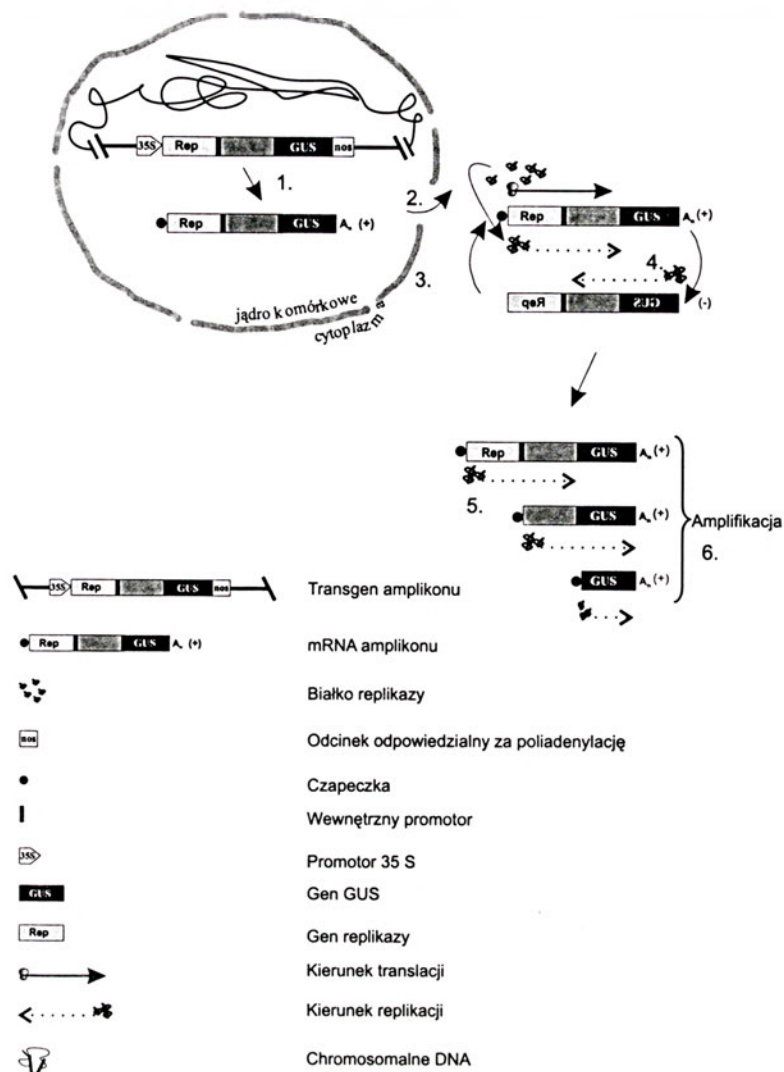
Przeprowadzane doświadczenia nad ekspresją transgenów w roślinach doprowadziły do skonstruowania amplikonów. Są to samoreplikujące się w komórkach roślinnych zmodyfikowane cząsteczki wirusowego RNA [28]. Schemat ekspresji amplikonów w transgenicznym roślinach przedstawia rycina 2. Pierwszy etap ich cyklu replikacyjnego polega na transkrypcji przez roślinną polimerazę RNA cDNA amplikonu, znajdującego się pomiędzy promotorem 35S wirusa mozaikowatości kalafiora (CaMV), a sekwencją 3' UTR *nos* odpowiedzialną za poliadenylację cząsteczek mRNA. Taka konstrukcja transgeny zapewnia stabilne namnażanie replikujących się w roślinach cząsteczek amplikonów (etap 1). Transkrypt, po przejściu z jądra komórkowego do cytoplazmy (etap 2), ulega translacji i powstaje wirusowa RNA-zależna polimeraza RNA odpowiedzialna za replikację wirusa (etap 3). Syntetyzowana przez nią ujemna nić RNA (etap 4) pełni rolę matrycy do syntezy potomnych (dodatnich) nici RNA obejmujących cały genom wirusa (etap 5), jak również do syntezy tak zwanego subgenomowego RNA, z którego ulegają translacji geny wirusowe (etap 6). Do konstrukcji amplikonów wykorzystano dobrze poznany wirus ziemniaka X (PVX), gospodarzem którego jest między innymi tytoń *N. tabacum*. Istotną dla przeprowadzanych doświadczeń cechą tego wirusa jest możliwość zastąpienia przez obcy gen wirusowego genu białka płaszczka bez jakiegokolwiek wpływu na replikację. Pierwotnie amplikony miały służyć jako wydajny system do ekspresji genów i produkcji obcych białek w roślinie [28]. Nieoczekiwanie doświadczenia wykazały, że są one bardzo dobrym narzędziem do wyciszania ekspresji genów roślinnych. Przykładem może być eksperyment, w którym rośliny tytoniu transformowano amplikonami zawierającymi pełen genom PVX, bądź też zmodyfikowa-

ny w ten sposób, że gen reporterowy GUS wklonowany był zamiast białka płaszczka wirusa (PVX-GUS) lub jako gen przylegający do genu białka płaszczka (PVX-GUS-CP). Rośliny wyrażające amplikony z PVX pomimo obecności w pełni infekcyjnych wirionów nie wykazywały objawów porażenia tym wirusem i były także odporne na wtórne infekcje tym samym szczepem wirusa. Obecność genu GUS w amplikonach powodowała wysoce specyficzne jego wyciszenie [28]. Zastosowanie amplikonów charakteryzuje specyficzność i powtarzalność wyników, jakiej nie osiągnięto w doświadczeniach z żadnym innym układem roślinnym, w którym zachodziło wyciszenie ekspresji genów. Każda z roślin wyrażających pojedynczy transgen wykazywała podobny, wysoki poziom odporności na infekcje wirusowe [9].

Do tej pory nie wyjaśniono zjawiska wysokiej wydajności indukowanego przez amplikony wyciszania ekspresji genów. Pewnym pozostaje tylko fakt, że odpornością na wirusy charakteryzowały się jedynie rośliny, w których zachodzi wydajna replikacja transkrybowanych z transgeny amplikonów. Rośliny zawierające konstrukty amplikonów ze zmutowaną replikazą nie były odporne na zakażenie wirusowe. Najprawdopodobniej w tym przypadku homologia sekwencji pomiędzy transgenem a RNA infekującego wirusa PVX wydaje się być nie wystarczająca do indukcji PTGS. Być może aktywacja wyciszania genów przez amplikony zachodzi jedynie w pewnym okresie rozwojowym roślin [9]. Autor pionierskich prac dotyczących amplikonów David Baulcombe sugeruje, że zjawisko ustępowania objawów chorobowych (ang. *recovery*) występujące tylko w młodych liściach może być związane z bezpośrednim oddziaływaniem wirusowego RNA z jądrowym DNA. A sytuacja taka może mieć właśnie miejsce w dzielących się komórkach bez otoczki jądrowej w młodych pędach roślin [9].

V-1. Amplikony, a wysoce wydajna ekspresja transgenów w roślinach

Amplikony stworzono poszukując narzędzia do wydajnej ekspresji obcych genów w roślinach. By wykorzystać je w tym celu, niezbędne jest równoczesne stosowanie amplikonów z wirusowymi supresorami potranskrypcyjnego wyciszania genów. Potwierdzają to doświadczenia z roślinami zawierającymi gen reporterowy GUS w amplikonie, w których potranskrypcyjne wyciszenie tego genu zostało zniesione w obecności białek P1/HC-Pro będących supresorami PTGS. Rośliny te charakteryzowały się



Ryc. 2. Schemat ekspresji amplikonów w roślinach transgenicznnych.

wysokim poziomem ekspresji GUS, w których białko to stanowiło do 3 % wszystkich białek komórkowych [26].

VI. Uwagi końcowe

W pracy tej przedstawiono jedynie zarys bardzo obszernego zagadnienia, jakim jest wyciszanie ekspresji genów. Ostatnia dekada przyniosła w tej dziedzinie wiele nowych odkryć: wykazano, że wyciszanie ekspresji genów może zachodzić na dwóch jej etapach (transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym), udowodniono, że kosupresja jest formą potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów a także odkryto wirusowe supresory potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów [24]. Wykazano również doświadczalnie, że infekcja wirusowa może być przewyciężana w roślinie na skutek specyficznej degradacji wirusowego RNA [8]. Zwłaszcza te dwa odkrycia dostarczają dowodów, że PTGS jest najprawdopodobniej naturalnym systemem obrony roślin przed infek-

cjami wirusowymi. Jednakże odkrycia związane z wyciszaniem genowym mają nie tylko znaczenie czysto poznawcze.

Infekcja roślin wirusami niosącymi sekwencje homologiczne z genami gospodarza prowadzić może do wyciszenia ich ekspresji w roślinie. Jest to proces wyciszania genów indukowany przez wirusy (VIGS). Stanowi on nowe narzędzie, pozwalające biologom roślin na wyciszanie ekspresji genów na żądanie, manifestujące się fenotypowymi efektami mutacji.

Wadą tej metody jest konieczność przebadania dużej liczby roślin w celu znalezienia stabilnie wyciszanego genu. Problem ten można ominąć stosując amplikony dające 100% pewność wyciszania ekspresji genów [9, 28].

Nadchodzące lata przyniosą z pewnością wiadomości o odkryciu wielu nowych genów u roślin, do czego przyczyni się zastosowanie amplikonów.

Artykuł otrzymano 25 marca 2002
Zaakceptowano do druku 15 kwietnia 2002

Piśmiennictwo

1. Stec W J (2000) *Biotechnologia* **48**: 15-30
2. Hobbs S L A, Kpodar P, DeLong C M O (1990) *Plant Mol Biol* **15**: 851-864
3. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) *Plant Cell* **2**: 279-289
4. Van der Krol A R, Mur L A, Beld M, Mol J N M (1990) *Plant Cell* **2**: 291-299
5. Matzke M, Matzke A J M (1993) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 53-76
6. Van Blokland R, van der Geest N, Mol J N M, Kooter J M (1994) *Plant J* **6**: 861-877
7. Metzlauff M, O' Dell M, Cluster P D, Flavell R B (1997) *Cell* **88**: 845-854
8. Lindbo J A, Dougherty W G (1992) *Virology* **189**: 725-733
9. van Kammen A (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 409-411
10. English J J, Mueller E, Baulcombe D C (1996) *Plant Cell* **179**: 179-188
11. Voinnet O, Baulcombe D C (1997) *Nature* **389**: 553
12. Palauqui J-C, Elmayan T, Pollien J-M, Vaucheret H (1997) *EMBO J* **16**: 4738-4745
13. Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C (1998) *Plant Cell* **10**: 937-946
14. Kumagai M H, Donson J, Della-Ciopa G, Harvey D, Hanley K, Grill L K (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 1679-1683
15. Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, Conkling M A, Thompson W F, Robertson D (1998) *Plant J* **14**: 91-100
16. Kumagai M H, Turpen T H, Weinzettl N, Della-Cioppa G, Turpen A M, Donson J, Hilf M R, Grantham G L, Dawson W O, Chow T P, Piatak M J, Grill L K (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 427-430
17. Baulcombe D C (1999) *Curr Opin Plant Biol* **2**: 109-113
18. Rochow W F, Ross A F (1955) *Virology* **1**: 10-27
19. Pruss G, Ge X, Shi X M, Carrington J C, Vance V B (1997) *Plant Cell* **9**: 859-868
20. Vance V B (1991) *Virology* **182**: 486-494
21. Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, Marathe R, Mallory A C, Smith T H, Vance V B (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13079-13084
22. Kasschau K D, Carrington J C (1998) *Cell* **95**: 461-470
23. Brigneti G, Voinnet O, Wan-Xiang L, Liang Hui J, Ding S-W, Baulcombe D C (1998) *EMBO J* **17**: 6739-6746
24. Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14147-14152
25. Li H-W, Lucy A P, Guo H-S, Li W-X, Ji L-H, Wong S M, Ding S-W (1999) *EMBO J* **18**: 2683-2691
26. Marathe R, Anandalakshmi R, Smith T H, Pruss G J, Vance V B (2000) *Plant Mol Biol* **43**: 295-306
27. Flor H H (1971) *Annu Rev Phytopatol* **9**: 275-296
28. Angell S M, Baulcombe D C (1997) *EMBO J* **16**: 3675-3684

Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w procesach komórkowych

Participation of aminoacyl-tRNA synthetases in cellular processes

MONIKA KAMIŃSKA¹, ADRIANA ZAKRZEWSKA²,
MARIA MADAJKA², JAN BARCISZEWSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA
- III. Procesy komórkowe kierowane przez syntetazy aminoacylo-tRNA
- IV. Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w powstawaniu chorób autoimmunologicznych
- V. Poszukiwanie antybiotyków skierowanych przeciwko bakteryjnym syntetazom aminoacylo-tRNA
- VI. Perspektywy

Wykaz stosowanych skrótów: aa — aminokwas; aa-AMP-aminooacyloadenylan; aaRS — syntetaza aminoacylo-tRNA; Adt — amidotransferaza; AlaRS — syntetaza alanylo-tRNA; ArgRS — syntetaza arginylo-tRNA; AsnRS — syntetaza asparaginylo-tRNA; AspRS — syntetaza aspartylo-tRNA; ATP-adenozynotrifosforan; CysRS — syntetaza cysteinylo-tRNA; GlnRS — syntetaza glutaminylo-tRNA; GluProRS — syntetaza gluproliło-tRNA; GluRS — syntetaza glutamylo-tRNA; GlyRS — syntetaza glicylo-tRNA; IleRS- syntetaza izoleucylo-tRNA; HisRS — syntetaza histydylo-tRNA; LeuRS — syntetaza leucylo-tRNA; LysRS — syntetaza lizylo-tRNA; MDa-mega Dalton; MetRS — syntetaza metionylo-tRNA; mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy; mtDNA — mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy; PheRS — syntetaza fenylo-tRNA; PPI — pirofosforan; ProCysRS — syntetaza procysteinylo-tRNA; ProRS — syntetaza prolilo-tRNA; SerRS — syntetaza serylo-tRNA, tRNA — transferowy kwas rybonukleinowy; TrpRS — syntetaza tryptofanylo-tRNA; TyrRS — syntetaza tyrozylo-tRNA.

¹Mgr inż., ²mgr, ³prof. dr hab., ¹Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań; e-mail: gregor@ibch.poznan.pl; ^{2,3}Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań; e-mail: jbarcisz@ibch.poznan.pl, adazak@g02.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Properties of aminoacyl-tRNA synthetases
- III. Cellular processes of aminoacyl-tRNA synthetases
- IV. Role of aminoacyl-tRNA synthetases in autoimmune diseases etiology
- V. Searching for antibiotics for bacterial aminoacyl-tRNA synthetases
- VI. Perspectives

I. Wstęp

Proces translacji informacji genetycznej zawartej w DNA polega na przepisaniu „języka kwasów nukleinowych” (4 nukleotydy) na „język białka” (21 aminokwasów). Głównym „tłumaczem” w tym procesie są syntetazy aminoacylo-tRNA, które rozpoznają tRNA i katalizują jego reakcję aminoacylacji. W pierwszym etapie następuje aktywacja aminokwasu w obecności adenozynotrifosforanu oraz utworzenie aminoacyloadenyłanu z jednoczesnym uwolnieniem pirofosforanu. Reakcja ta przebiega zasadniczo bez udziału tRNA, choć w przypadku syntetaz: arginylo-tRNA, glutaminylo-tRNA, glutamylo-tRNA jego obecność jest niezbędna. W drugim etapie następuje przeniesienie zaktywowanego aminokwasu z aminoacylo-AMP na grupę 2'- lub 3'-hydroksylową adenozyliny przy końcu 3' tRNA i utworzenie aminoacylo-tRNA.

Olbrzymie zróżnicowanie strukturalne aaRS tłumaczy szerokie spektrum ich działania. Enzymy te obok podstawowej funkcji acylacji tRNA, uczestniczą w procesach dojrzewania RNA, regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji i translacji, syntezy chlorofilu, alarmonów Ap₄A oraz biosyntezy aminokwasów (histydyny). Widoczny jest udział

aaRS w apoptozie i embriogenezie. Wydaje się, że wielofunkcyjność aaRS wraz z dostępnością nowych informacji strukturalnych stwarzają możliwości ich wykorzystania w medycynie molekularnej.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie udziału syntetaz aminoacylo-tRNA w różnych procesach komórkowych oraz powstawaniu niektórych chorób autoimmunologicznych. Wskażemy również na możliwości wykorzystania syntetaz aminoacylo-tRNA w poszukiwaniu nowych antybiotyków.

II. Właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA

Główną funkcją syntetaz aminoacylo-tRNA jest swoiste rozpoznanie a następnie dwuetapowa reakcja estryfikacji tRNA. Enzymy te wykazują olbrzymie zróżnicowanie strukturalne. Dotyczy to zarówno wielkości polipeptydów, sekwencji aminokwasowych jak i budowy czwartorzędowej [1]. aaRS mogą występować jako: monomery (α), homodimery i homotetramery (α_2 , α_4) lub heterotetramery ($\alpha_2\beta_2$), jednak analiza struktury kryształów PheRS *Thermus thermophilus* wskazuje, że ten enzym jest dimerem zbudowanym z dwóch podjednostek ($\alpha\beta$)₂ [2, 3]. aaRS dzieli się na dwie klasy (Tabela 1). Każda z

nich charakteryzuje się odmiennym motywem strukturalnym [4]. W klasie pierwszej aaRS miejsce katalityczne enzymu tworzy struktura Rossmanna pięciu na przemian ułożonych helis α (ang. *Rossmann fold*). W jej obszarze znajdują się dwie znacznikowe sekwencje peptydowe: His-Leu-Gly-His (HIGH) i Lys-Met-Ser-Lys-Ser (KMSKS). Aminokwasy te są zaangażowane w syntezę aminoacylo-adenylanu [5]. Dwie reszty lizynowe w sekwencji KMSKS wiążą i aktywują aminokwas. Ten pentapeptyd, oprócz wiązania ATP rozpoznaje koniec 3' cząsteczki tRNA. Dwie reszty histydynowe tetrapeptydu HIGH wiążą reszty fosforanowe ATP. Należy podkreślić, że podobne motywy sekwencyjne występują również w wielu innych białkach wiążących mono- i dinukleotydy np. w dehydrogenazach [6]. aaRS klasy I specyficznie rozpoznają określone fragmenty tRNA wiążąc się z mniejszą bruzdą helisy RNA i katalizują estryfikację grupy 2'OH końcowej 3' rybozy specyficznym aminokwasem [7]. Centrum aktywne syntetaz klasy II tworzy głównie siedem antyrównoległe ułożonych struktur β -daszkowych oraz trzy helisy α [8, 9]. Występują w nim trzy zdegenerowane motywy sekwencyjne [10, 11]. Syntetazy klasy II (z wyjątkiem PheRS) wiążą się z tRNA w jego większej

Tabela 1

Reakcja aminoacylacji tRNA i klasyfikacja syntetaz aminoacylo-tRNA

A.	
$\text{aa} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{aaRS}} \text{aa-AMP} + \text{PP}_i$ $\text{aa-AMP} + \text{tRNA} \xrightleftharpoons{\text{aaRS}} \text{aa-tRNA} + \text{AMP}$	
B.	
Klasa aaRS	I
Charakterystyczna sekwencja aminokwasowa	HIGH, KMSKS
Centrum katalityczne	struktura Rossmanna
Miejsce wiązania syntetazy do tRNA	mniejsza bruzda tRNA
Miejsce aminoacylacji przy końcowej rybozie tRNA	2'OH
Podklasy aaRS:	
a	Arg, Cys, Ile, Leu, Met, Val
b	Tyr, Trp
c	Gln, Glu
d	
	II
	(1) $\oplus\text{G}\oplus\text{x}\oplus\text{x}\text{P}\oplus\oplus$
	(2) $\oplus\oplus\oplus\text{x}\oplus\text{x}\text{x}(\text{F}/\text{Y}/\text{H})\text{R}\text{x}\text{E}$ (R/H)xxxFxxx(D/E)
	(3) $\text{x}\oplus\text{G}\oplus\text{G}\oplus\text{G}\oplus\text{E}\text{R}\oplus\oplus\oplus\oplus\oplus$
	antyrównoległa struktura β
	większa bruzda tRNA
	3'OH (z wyjątkiem PheRS)
	His, Thr, Pro, Ser Asp, Asn, Lys Ala, Gly Phe

(A) W pierwszym etapie aminoacylacji tRNA, aaRS aktywuje specyficzny aminokwas z wytworzeniem aminoacylo-adenylanu (aa-AMP) i jednoczesnym uwolnieniem pirofosforanu (PP_i). W drugim etapie następuje przeniesienie grupy aminoacylowej aminoacylo-AMP na cząsteczkę tRNA z utworzeniem aminoacylo-tRNA [1]. (B) Charakterystyczne sekwencje aminokwasowe aaRS przedstawiono w kodzie jednoliterowym (\oplus — aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim, \emptyset — aminokwas hydrofobowy, x — aminokwas dowolny), podklasy w kodzie trójliterowym. Wszystkie AARS z wyjątkiem LysRS (niektórych *Archea*, *Bacteria*) i ProCysRS podlegają powyższej klasyfikacji i są przydzielone do jednej z dwóch klas [2-11].

bruździe i katalizują przyłączanie aminokwasu do grupy 3'OH końcowej 3' rybozy [11].

aaRS *Prokaryota* w porównaniu z syntetazami *Eukaryota* zbudowane są z mniejszych podjednostek. Łańcuchy polipeptydowe syntetazy tryptofanylo-tRNA i walino-tRNA *E. coli* zawierają od 344 do 951 aminokwasów. U *Eukaryota* ich długość wynosi odpowiednio 481 i 1265 aminoakwasów [12, 13]. Jest to konsekwencją występowania dodatkowych peptydów przy końcu aminowym lub karboksylowym [14]. W syntetazie gluprolilo-tRNA o podwójnej specyficzności dodatkowa sekwencja aminokwasowa znajduje się pomiędzy sekwencjami swoistymi dla syntetaz glutaminylo-tRNA i prolino-tRNA [15]. Struktura i funkcja dodatkowych peptydów jest mało poznana. Dotychczas wykazano, że biorą one udział w tworzeniu wielocząsteczkowych kompleksów enzymatycznych [16, 17]. Syntetaza metioninylo-tRNA *Saccharomyces cerevisiae* występuje w kompleksie z białkiem Arc1p (ang. *aminoacyl-tRNA synthetase cofactor*), w tworzeniu którego uczestniczy dodatkowy polipeptyd 185 aminokwasowy przy końcu aminowym. Taki kompleks nie występuje u *Prokaryota*. Białko Arc1p przy końcu aminowym wiąże GluRS i MetRS, a przy końcu karboksylowym tRNA^{Glu} lub tRNA^{Met} [18]. Obecność Arc1p w kompleksie z MetRS i GluRS zwiększa wydajność aminoacylacji katalizowanej przez obie syntetazy. Domena karboksylowa białka Arc1p oddziałuje niespecyficznie z tRNA^{Phe}, tRNA^{Lys} i tRNA^{Arg} [19]. Przyłączenie tej domeny do centrum katalitycznego GlnRS *E. coli* umożliwia aminoacylację tRNA^{Gln} drożdży [20].

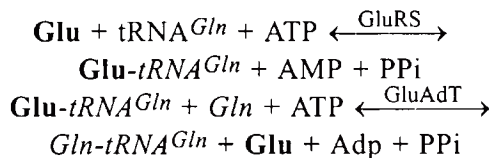
Syntetazy aminoacylo-tRNA występują w komórkach ssaków na ogół w postaci wielocząsteczkowego kompleksu o m. cz. 1,4 MDa. Składa się on z 11 białek, z których dziewięć to aaRS a pozostałe to białka nieenzymatyczne: p18, p38 i p43 [21]. Białko p38 wiąże się z ArgRS, GlnRS, AspRS, LysRS i Glu-ProRS stabilizując strukturę kompleksu [21]. Białko p43 uważane jest za prekursor cytokiny EMAPII (ang. *Endothelial Monocyte Activating Polipeptide*) (proEMAPII), która uczestniczy w ostrej odpowiedzi zapalnej i zaangażowana jest w proces apoptozy. Domena przy końcu karboksylowym p43 wykazuje właściwości chemotaktyczne wobec leukocytów (monocytów, granulocytów), powodując ich gromadzenie się w ogniskach apoptycznych [22-25]. P43 wiąże ponadto niespecyficznie tRNA, a jego proteoliza powoduje utratę tych właściwości, co prowadzi do zaburzeń biosyntezy białka i jest przyczyną wejścia komórki w apoptozę. Udział białka p43 jednocześnie w dwóch procesach komórkowych — translacji i apoptozie, wskazuje na wzajemne powiązanie tych

procesów. Z analizy sekwencji aminokwasowej białka p18 wynika, że jest to homolog przedłużenia syntetazy walino-tRNA przy końcu aminowym, która to sekwencja bierze udział w wiązaniu podjednostek czynnika elongacyjnego EF-1H [26]. Pomimo tych obserwacji, funkcja multisyntetazowego kompleksu jest wciąż słabo poznana. Kompleksy te występują nie tylko w cytoplazmie, ale także w jądrze komórkowym ssaków, gdzie mogą tworzyć inne połączenia transportujące tRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy [27]. Obecność dodatkowych domen poza rdzeniem katalitycznym aaRS nie jest jednak warunkiem tworzenia wieloskładnikowych kompleksów. Dodatkowe aminokwasy przy końcu karboksylowym SerRS *S. cerevisiae*, nie wpływają na tworzenie makrokompleksów, ale zwiększają powinowactwo seryny i tRNA^{Ser} do syntetazy w reakcji aminoacylacji [28]. Istnieją dane doświadczalne wskazujące, że dodatkowe polipeptydy występujące przy końcu aminowym lub karboksylowym, są zaangażowane w oddziaływanie z tRNA [29, 30]. Łańcuch 200 aminokwasów przy końcu karboksylowym roślinnej MetRS tworzy strukturę niespecyficznie wiążącą tRNA [31]. Przykład ten potwierdza wcześniejsze obserwacje według których C-końcowa domena MetRS może brać udział w początkowym procesie rozpoznania i przyłączania tRNA przez syntetazę. Pełniąc funkcję swoistego „magnesu” specyficznych i niespecyficznych tRNA w komórce, może zapobiegać ich dyfuzji w cytoplazmie przyczyniając się do zwiększenia efektywności aparatu translacyjnego. Bardziej szczegółowe badania wykazały, że dodatkowa domena wiąże i aminoacyluje ramię akceptorowe tRNA^{Met} [31, 32].

Ponad 40 lat temu, tuż po odkryciu syntetaz aminoacylo-tRNA, F.H.C. Crick postulował istnienie dwudziestu aaRS w komórkach wszystkich organizmów żywych, gdzie jedna syntetaza rozpoznaje pojedynczy aminokwas [33]. Szybko jednak stwierdzono przypadki będące odstępstwem od tego dogmatu. Ostatnie zaś wyniki sekwencjonowania genomów bakteryjnych potwierdziły, że nie we wszystkich organizmach występuje pełen zestaw aaRS. Genom *Methanococcus janashii* zawiera geny kodujące tylko 16 z 20 aaRS [34]. Nie zidentyfikowano w nim genów strukturalnych GlnRS, AsnRS, LysRS oraz CysRS, pomimo obserwowanej aktywności katalitycznej tych enzymów [34, 35]. Nasunęło to przypuszczenie, iż w komórkach znajdują się inne białka o podobnych właściwościach, których obecność umożliwia prawidłowy przebieg translacji.

Methanococcus janashii zalicza się do królestwa *Archaea* istniejącego obok *Bacteria* i *Eukarya*.

W każdym królestwie funkcjonuje prawdopodobnie inny mechanizm syntezy glutaminylo-tRNA^{Gln} (Gln-tRNA^{Gln}). W cytoplazmie komórek *Eukaryota* oraz w niektórych bakteriiach (np. *E. coli*) synteza Gln-tRNA^{Gln} zachodzi przy udziale syntetazy glutaminylo-tRNA [36]. Jednak u większości bakterii gram-dodatnich, niektórych gram-ujemnych, cyjanobakterii, w organellach komórkowych oraz u wszystkich znanych *Archaea* proces ten odbywa się pośrednio poprzez etapy aminoacylacji niespecyficznej i transamidacji [37,38]. U *M. janashii*, *M. thermoautotrophicum* i *B. subtilis* proces glutaminylacji przebiega w dwóch etapach.



W pierwszym etapie GluRS katalizuje niespecyficzne przyłączenie glutaminianu (Glu) do tRNA^{Gln} tworząc Glu-tRNA^{Gln}. Tak błędnie zacylowany tRNA jest następnie przekształcany do Gln-tRNA^{Gln} przez amidotransferazę glutaminylo-tRNA (GluAdt). W liniach współczesnych organizmów *Bacteria* i *Archaea* proces transamidacji przebiega przy udziale dwóch strukturalnie różnych amidotransferaz glutaminylo-tRNA. W bakteriiach oraz w chloroplastach ten heterodimerski enzym jest kodowany przez geny *gatA*, *gatB* i *gatC* a w królestwie *Archaea* enzym o tej samej specyficzności kodowany jest dodatkowo przez geny *gatD* i *gatE* [39]. W podobnym szlaku transamidacyjnym przy udziale syntetazy aspartylo-tRNA i amidotransferazy aspartylo-tRNA powstaje Asn-tRNA^{Asn} [40]. Analiza kryształu GluRS *Thermus thermophilus* wskazuje, że arginina w pozycji 358 swoiście rozpoznaje tRNA^{Glu} wykluczając acylację tRNA^{Gln} [41].

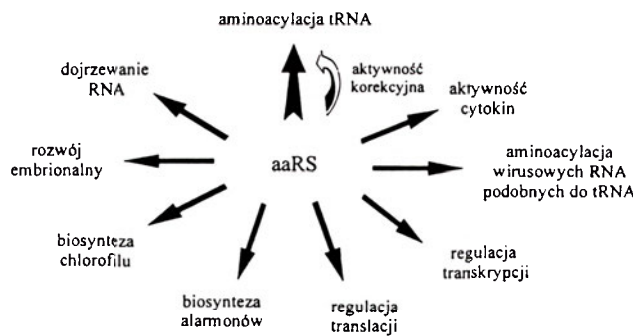
Poznanie sekwencji nowych genomów uwidoczniło kolejne przykłady odstępstw od dotychczasowych reguł podziału aaRS. Syntetazy lizylo-tRNA mają swoich przedstawicieli zarówno w klasie I (*Archaea* i niektóre bakterie) jak i drugiej (pozostałe organizmy). Centrum katalityczne LysRS *Methanococcus manipaludis* zawiera oba motywy sekwencyjne HIGH i KMSKS charakterystyczne tylko dla syntetaz klasy I [42]. LysRS klasy I i II pomimo braku podobieństw w budowie przestrzennej, rozpoznają te same fragmenty struktury tRNA^{Lys}: ramię akceptorowe i pętlę antykodonową. Jednak sposób wiązania ramienia akceptorowego przez LysRS obu klas jest odmienny. LysRS klasy I (*Borelia burgdorferi*) wiąże się z mniejszą bruzdą helisy tRNA, podczas gdy enzymy klasy II (np. *E. coli*) oddziałują z dużą

bruzdą tRNA. [43, 44]. Jest to jedyny przykład syntetazy o tej samej specyficzności należących do dwóch klas.

Brak genu kodującego CysRS w sekwencji genomowej *M. janashii* i *M. thermoautotrophicum* jest kolejnym przykładem odstępstw od reguł kodu genetycznego. Wykazano, że acylacja cysteiną u niektórych *Archaea* zachodzi przy udziale dwuspecyficznej ProCysRS. Jego sekwencja aminokwasowa odpowiada sekwencji ProRS. ProCysRS może syntetyzować *in vitro* i *in vivo* zarówno Pro-tRNA^{Pro} jak i Cys-tRNA^{Cys} [45]. Nie zaobserwowano błędnego tworzenia się kompleksów Pro-tRNA^{Cys} jak i Cys-tRNA^{Pro}. Mutageniza ProCysRS wykazała, że miejsca wiązania proliny i cysteiny są wspólne dla obu aminokwasów [46]. Etapy tworzenia cysteinylo-adenylanu i prolino-adenylanu przez ProCysRS są jednak odmienne. Aktywacja cysteiny przez ProCysRS jest możliwa tylko w obecności tRNA^{Cys}. Z kolei tworzenie prolino-adenylanu wobec ProCysRS zachodzi bez udziału tRNA^{Pro}. Przypuszcza się, że oddziaływanie tRNA^{Cys} z ProCysRS indukuje zmiany konformacyjne miejsca aktywnego syntetazy, umożliwiając wiązanie tylko specyficznego aminokwasu [47].

III. Procesy komórkowe kierowane przez syntetazy aminoacylo-tRNA

aaRS obok swej zasadniczej funkcji katalizy aminoacylacji tRNA biorą udział w wielu procesach nie związanych bezpośrednio z rozpoznawaniem tRNA i wiązaniem aminokwasu (Ryc. 1). Enzymy te regu-



Ryc. 1. Funkcje syntetaz aminoacylo-tRNA. aaRS katalizują reakcję aminoacylacji tRNA a także wykazują inne funkcje nie związane bezpośrednio z biosyntezą białka. Nie uwzględniono tutaj udziału aaRS w mechanizmie naprawczym [67-69].

lują ekspresję własnych genów, zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji [48]. Syntetaza treonylo-tRNA (ThrRS) *E. coli* wiąże się z dwoma do-

menami odcinka liderowego mRNA przypominającymi strukturę spinki do włosów. Każda z nich imituje kształtem ramię antykodonu tRNA^{Thr}. ThrRS tworząc kompleks z własnym mRNA uniemożliwia jego wiązanie do rybosomu [49, 50]. W podobny sposób ekspresję własnego genu autoreguuje AlaRS. Enzym ten hamuje syntezę AlaRS poprzez wiązanie się z sekwencją palindromową, otaczającą miejsce startu transkrypcji własnego genu [51]. Mitochondrialne aaRS zaangażowane są w proces dojrzewania mitochondrialnego RNA. W wycinaniu intronów grupy I (ang. *splicing*) udział biorą: TyrRS *N. crassa* [52], P. anserina [53], LeuRS *S. cerevisiae*, *S. douglasii* [54]. Domena MtTyrRS *N. crassa* zawiera dodatkową sekwencję przy końcu aminowym istotną dla tego procesu. Syntetaza rozpoznaje introny grupy I dzięki ich strukturalnej homologii do tRNA [55]. Bakteryjne LeuRS i ludzkie MtLeuRS nie uczestniczą w procesie składania własnych genów, gdyż nie zawierają intronów. Mogą natomiast wykazywać tę aktywność w procesie składania sekwencji kodującej MtLeuRS *S. cerevisiae* [56].

LysRS, PheRS i SerRS odpowiedzialne są za syntezę alarmonów — oligofosforanów dinukleotydocowych, odgrywających ważną rolę w odpowiedzi komórek bakteryjnych i eukariotycznych na różne warunki stresowe. Zalicza się do nich: Ap₄A, Ap₃Gpp, Ap₄G, Ap₃G, Ap₃A w których jedna z reszt fosforanowych cząsteczki ATP (pppA) jest zastąpiona przez ADP, AMP, ppGpp, GTP oraz GDP [57,58]. Alarmony stanowią swoiste „czujniki” sygnalizujące komórce o zmianie warunków otoczenia.

U roślin wyższych, glonów, *Eubacteria* i *Archeobacteria* syntetaza glutamyl-tRNA zaangażowana jest w proces biosyntezy porfiry. Utworzony przez nią glutamyl-tRNA^{Glu} jest substratem wyjściowym szlaku prowadzącego do powstania kwasu 5-aminolewulinowego, będącego prekursorem związków tetrapiolowych, do których należą chlorofil i hem [59].

W bakteryjnych genomach *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Synechocystis sp.* odkryto białko uczestniczące w biosyntezie histydyny i wykazujące podobieństwo do HisRS. Otwarta ramka odczytu sekwencji kodującej to białko zawiera gen *hisZ*, którego produkt jest homologiem domeny katalitycznej HisRS. Produkt ekspresji genu *hisZ* nie jest jednak zdolny zarówno do hydrolizy ATP jak i katalizy reakcji aminoacylacji tRNA^{His}. W komórkach bakteryjnych białko HisZ pełni funkcje podjednostki białka HisG o aktywności ATP fosforybotransferazy, który jest pierwszym enzymem uczestniczącym w szlaku biosyntezy histydyny. U bakterii w których genomie

brak sekwencji *hisZ* produkt genu *hisG* jest o 100 aminokwasów dłuższy i funkcjonuje bez białka HisZ. Przypuszcza się więc, że HisZ jest brakującym elementem niekompletnej ATP fosforybozylotransferazy [60].

aaRS katalizują przyłączanie aminokwasów nie tylko do tRNA ale także do genomowych RNA wirusów. RNA Tymowirusów, Tobamowirusów i Bromowirusów są aminoacylowane na jego końcu 3' ponieważ ta część kwasu nukleinowego przybiera strukturę podobną odpowiednio do tRNA^{Tyr}, tRNA^{Val}, tRNA^{His}. Przebieg tej reakcji uwarunkowany jest obecnością struktury tRNA przypominającej kształtem literę L oraz sekwencji CCA na końcu 3'. Utworzenie tej sekwencji przez nukleotydylotransferazę tRNA i przyłączenie aminokwasu przez odpowiednią aaRS chroni wirusowy genom przed działaniem nukleaz gospodarza. Aminoacylowane wirusowe RNA mogą też wiązać się z komórkowymi czynnikami elongacyjnymi i uczestniczyć w translacji białek wirusa [61].

Niektóre aaRS oraz białka z nimi oddziałujące wykazują aktywność cytokin. Ludzka TyrRS zbudowana jest z dwóch fragmentów wykazujących aktywność cytokin [62]. Domena przy końcu karboksylowym jest strukturalnie podobna do EMAPII-peptydu biorącego udział w prostej odpowiedzi zapalnej i zaangażowanego w proces apoptozy [63]. Powoduje ona chemotaksję leukocytów, monocytów i stymuluje syntezę mieloperoksydazy, czynnika nekrozy nowotworów TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*) oraz czynnika tkankowego MP (ang. *tissue factor produced by mononuclear phagocytes-MPs*). Domena katalityczna TyrRS wiąże się natomiast z receptorem interleukiny 8A [62]. Za prekursor EMAPII uważany jest również peptyd p43 wchodzący w skład kompleksów wielosyntetazowych (rozd. II). Aktywność TrpRS będącej bliskim homologiem TyrRS ma związek z regulacją procesu angiogenezy [64].

Aktywność aaRS może być szczególnie istotna we wczesnym etapie rozwoju organizmów. U *Arabidopsis thaliana* stwierdzono obecność mutantu *edd1*. Jego sekwencja jest homologiczna (70%) do sekwencji GlyRS *E. coli*. Efektem mutacji jest ograniczony wzrost zarodkowy rzodkiewnika, wywołany nieprawidłowym wykształceniem plastydów. Uważa się, że GlyRS odpowiedzialna jest za tworzenie i przekazywanie sygnału z jądra komórkowego do plastydów warunkujący prawidłowy ich rozwój [65].

Niedawno zauważono związek między niektórymi aaRS a rozwojem embrionalnym zwierząt. W badaniach nad rozwojem gruczołów ślinowych wykazano zwiększony poziom ekspresji TrpRS, TyrRS,

SerRS i AlaRS. Sekwencja TrpRS *Drosophila melanogaster* jest wysoce homologiczna do sekwencji TyrRS ssaków. W kulturach ludzkich komórek stwierdzono zdolność czynnika przeciwwirusowego IFN- γ do aktywacji TrpRS. Ludzka TrpRS posiada przed miejscem startu transkrypcji własnego genu elementy odpowiedzi na ten czynnik (ang. *interferon gamma-stimulating response elements*). Poziom ekspresji TrpRS w komórce może być regulowany przez czynniki transkrypcyjne aktywowane przez IFN- γ . Możliwe jest więc, że podwyższona ekspresja TrpRS muszki owocowej stanowi barierę dla rozwoju wirusów oraz innych wewnątrzkomórkowych pasożytów [66].

IV. Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w powstawaniu chorób autoimmunologicznych

W ostatnich latach badania nad niektórymi chorobami autoimmunologicznymi udowodniły ich związek z obecnością w osoczu pacjentów przeciwciał skierowanych przeciw określonym aaRS. Celem prac badawczych jest znalezienie przyczyn pojawiania się tego rodzaju przeciwciał.

Jak wiadomo, układ immunologiczny dojrzałego organizmu rozpoznaje i eliminuje tylko nieswoiste antygeny, a nie reaguje z własnymi. Jednakże zasada tolerancji nie jest absolutna. W pewnych warunkach może pojawić się tzw. reakcja autoimmunologiczna, w której własne antygeny mogą być nieprawidłowo rozpoznawane, co prowadzi do powstawania chorobotwórczych autoprzeciwciał. Proces ten nie został dotychczas całkowicie wyjaśniony. Rozważa się kilka możliwości ich tworzenia: 1) utrata zdolności układu immunologicznego do rozpoznawania swoistych substancji we własnym organizmie, 2) wywoływanie niewłaściwych reakcji immunologicznych w wyniku zmian w tkankach pod wpływem enzymów bakteryjnych i toksyn, 3) zaburzenia metaboliczne, genetyczne, mechaniczne podczas produkcji przeciwciał. Zatem powstawanie przeciwciał może mieć podłoże immunologiczne, genetyczne, infekcyjne lub hormonalne. Limfocyty T rozpoznają autoantygen jako egzogeny, jeśli nie oddziałuje on z komórkami układu immunologicznego. Zjawisko to nosi nazwę sekwestracji autoantygeny, w efekcie której nie wytwarza się tolerancja na ten autoantygen. Może on zostać rozpoznany również jako obcy, jeśli na skutek różnych przyczyn dojdzie do zmian w jego strukturze, co zachodzi w przypadku uszkodzenia tkanek, procesu zapalnego czy wpływu leków [70]. Dostępne są dowody potwierdzające wpływ in-

fekcji wirusowych na indukcję i rozwój procesu immunologicznego. Można ją tłumaczyć makromolekularną mimikrą, to jest podobieństwem w strukturze antygenów bakteryjnych i fragmentów struktur komórkowych. Przykładem jest syntetaza tryptofanylo-tRNA, której fragment aminokwasowy 130/HFLPR jest homologiczny do sekwencji białek wirusowych np. HFVRD *Herpes simplex*, HFVKU *Epsteina-Barra*. Wirusowe peptydy wywołują mononukleazę zakaźną w zespole Sjögrena [71].

Choroby autoimmunologiczne związane są z występowaniem przeciwciał przeciw wielu składnikom komórkowym, takim jak: polimeraza I [72], topoizomeraza I [73], dehydrogenaza [74] czy histony [75]. Powstające przeciwciała wywołuje wiele chorób tkanki łącznej jak: toczeń rumieniowaty (SLE, ang. *Systemic Lupus Erythematosus*), zespół Sjörgena (SS, ang. *Sjörger Syndrome*), reumatoidalne zapalenie stawów (RA, ang. *Rheumatoid Arthritis*), zapalenie mięśni (M, ang. *Myositis*), zapalenie wielomięśniowe (PM, ang. *Polymyositis*), zapalenie skórno-mięśniowe (DM, ang. *Dermatomyositis*), czy sklerodermę (SSc, ang. *Systemic Sclerosis*) [76]. U pacjentów z tymi chorobami stwierdzono występowanie przeciwciał wobec aaRS. U osób cierpiących na zapalenie mięśni i zapalenie skórno-mięśniowe wykryto przeciwciała anty-Jo-1 (A-Jo-1) reagujące z HisRS [77]. Chorobom tym towarzyszy także śródmiąższowe zapalenie płuc, a niekiedy reumatoidalne zapalenie stawów [78]. Powstawanie określonego rodzaju przeciwciał jest charakterystyczne wyłącznie dla danego antygeny, co oznacza, że nie ma to wpływu na powstawanie innych przeciwciał. Przeciwciała anty-Jo-1 rozpoznaje wyłącznie syntetazę HisRS. Jest ono specyficzne dla danego pacjenta i nie reaguje z innymi aaRS. Z analizy reakcji wiązania AsnRS z anty-HisRS, anty-AsnRS i anty-AlaRS wynika, że tylko anty-AsnRS hamują aminoacylację w 98%. Pozostałe przeciwciała wpływają na reakcję w nieznacznym stopniu [79]. Antygen Jo-1 występuje prawie wyłącznie we frakcji cytoplazmatycznej, co oznacza, że np. MtHisRS nie ma właściwości immunogennych. U chorych cierpiących na zapalenie skórno-mięśniowe wykryto przeciwciała reagujące z: ThrRS [80], AlaRS i tRNA^{Ala} [81], IleRS [82] i GlyRS [83], dla których stwierdzono występowanie antygenów, odpowiednio: PL7, PL12, OJ i EJ (Tabela 2). Wymienione wyżej aaRS (oprócz IleRS), przeciw którym może być skierowana odpowiedź immunologiczna, występują w komórce w postaci pojedynczych peptydów [17, 18]. Przeciwciała mogą także powodować inhibicję takich aaRS, które wchodzą w skład wieloenzymatycznych komplek-

sów. IleRS w wyniku reakcji z anty-OJ traci prawie całkowicie aktywność enzymatyczną, a kompleks syntetaz ulega wytrąceniu [82].

Metody biochemiczne i immunologiczne obecnie pozwalają na scharakteryzowanie autoantygeny. Określa się miejsca wiązania przeciwciał lub limfocytów T (epitopy) oraz bada się immunogenność określonego autoantygeny. Z analizy sekwencji aaRS wynika, że w ludzkiej HisRS 60 aminokwasowy peptyd przy końcu aminowym jest głównym epitopem rozpoznawanym przez przeciwciała u chorych

nak może mieć miejsce i zachodzi dwoma drogami: potranslacyjnie poprzez acylację reszt lizynowych białka lub translacyjnie poprzez włączanie S-nitro-Hcy do rosnącego łańcucha polipeptydowego białka. Efektem tego jest obniżenie aktywności biologicznej komórki oraz indukcja patologii i arteriosklerozy [89, 90].

W 1997 roku wykazano, że LysRS może mieć związek z chorobami ośrodkowego układu nerwowego np. w stwardnieniu rozsianym (ALS ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). Rozwój tej choroby na-

Tabela 2

Przeciwciała względem aaRS uczestniczące w powstawaniu chorób autoimmunologicznych

Przeciwciało	Antygen	Choroby autoimmunologiczne	Piśmiennictwo
Anty-Jo-1	HisRS	PM rzadziej DM	76, 77
Anty-PL-7	ThrRS	PM, DM	76, 80
Anty-PL-12	AlaRS+ tRNA ^{Ala}	PM, DM, ILD	76, 81
Anty-OJ	IleRS	PM, DM, ILD	76, 82
Anty-EJ	GlyRS	DM, rzadziej PM	76, 83

Anty-Jo-1 (anty-HisRS); anty-PL-7 (anty-ThrRS); anty-PL-12 (anty-AlaRS i tRNA^{Ala}); anty-OJ (anty-IleRS); anty-EJ (anty-Gly), DM — zapalenie skórno-mięśniowe, PM — zapalenie wielomięśniowe, ILD — śródmiąższowe zapalenie płuc.

na zapalenie mięśniowe i skórno-mięśniowe. Region ten tworzą głównie helikalne struktury białkowe [84, 85]. Homologiczny region został zidentyfikowany w dwuspecyficznej GluProRS *H. sapiens*. Obie syntetazy połączone są 3-krotnie powtarzającymi się blokami aminokwasowymi (ang. *tandem repeat motif*). Każdy segment o długości 57 aminokwasów jest odpowiednikiem końca aminowego HisRS. Podobny motyw występuje również przy końcu aminowym TrpRS i GlyRS, które podobnie jak HisRS mogą pełnić rolę autoantygenów w procesie autoimmunizacji [86].

Okazało się, że aaRS wyjaśnić może etiologię arteriosklerozy (tworzenie płytek miażdżycowych), która charakteryzuje się udziałem homocysteiny (Hcy) i syntetazy metionilo-tRNA w uszkodzeniach naczyń krwionośnych. Homocysteina jest produktem pośrednim w biosyntezie metioniny. Różni się od metioniny brakiem tylko jednej grupy metylowej, w wyniku czego może być niespecyficznie rozpoznawana przez MetRS. Aktywność korekcyjna MetRS zapobiega jednak przeniesieniu zaktywowanej Hcy na tRNA^{Met}, prowadząc w obecności ATP do powstania tiolaktonu homocysteiny. Proces ten odbywa się w komórkach wszystkich organizmów i zapobiega błędnemu wbudowaniu niebiałkowego aminokwasu w łańcuch polipeptydowy [87, 88]. Sytuacja ta jed-

stępuje w wyniku mutacji genu kodującego dysmutazę nadtlenkową. Zmutowane białko SOD1 tworzy kompleks z dwoma białkami, w tym z LysRS, podczas gdy natywna forma SOD1 nie wykazuje takiej właściwości. Ma to szczególne znaczenie w komórkach mózgowych, gdzie poziom ekspresji LysRS i białka SOD1 jest bardzo wysoki [91].

V. Poszukiwanie antybiotyków skierowanych przeciwko bakteryjnym syntetazom aminoacylo-tRNA

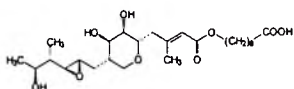
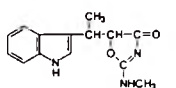
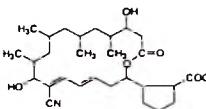
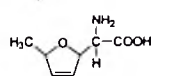
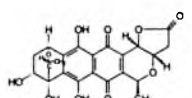
Antybiotyki stanowią grupę metabolitów wtórnych wytwarzanych przez bakterie (*Eubacteriales*), promieniowce (*Actinomycetales*), grzyby (*Fungi*), rzadziej przez podstawczaki (*Basidiomycetes*), porosty (*Lichenes*) a także rośliny zielone i zwierzęta wyższe [92]. Wspólną cechą wszystkich antybiotyków jest ich wybiórcza zdolność hamowania aktywności określonych układów enzymatycznych drobnoustrojów a przez to wpływania na ich podstawowe procesy życiowe. aaRS katalizujące podstawową reakcję aminoacylacji tRNA stanowią doskonałe narzędzie do syntezy tych inhibitorów. Duże różnicowanie strukturalne aaRS *Prokaryota* i *Eukaryota* świadczy o wysokiej selektywności tych enzymów, dzięki której mogą ograniczać aktyw-

ność patogena nie zaburzając funkcji enzymu ludzkiego. Leki będące substratami (np. aminokwasy) lub produktami pośrednimi (np. aminoacyloadenylan) w reakcji aminoacylacji tRNA z udziałem aaRS mogą prowadzić do silnych zaburzeń syntezy białka [93]. Jednym z lepiej poznanych antybiotyków, który specyficznym oddziałuje z syntetazą aminoacylo-tRNA jest mupirocyna (kwas pseudomonowy), wytwarzana przez bakterie *Pseudomonis fluorescens* [94]. Mupirocyna została po raz pierwszy wyizolowana w 1971 roku, a wkrótce potem określono

tworzenia izoleucylo-adenylanu. Posiada on szkielet węglowy L-izoleucyny zawierający grupę epoksydową. Wydaje się, że antybiotyk ten będący analogiem L-izoleucyny współzawodniczy o miejsce wiązania przez IleRS. Ponadto antybiotyk ten przyłącza się do miejsca aktywnego IleRS poprzez zachowawczą sekwencję $^{602}\text{KMSKS}^{606}$, blokując miejsce wiązania ATP [102]. Zastosowanie mupirocyny w leczeniu chorób zakaźnych ma jednak pewne ograniczenia. Jest to związek mało stabilny i we krwi ulega hydrolizie do kwasu monowego. Obec-

Tabela 3

Struktury chemiczne inhibitorów (antybiotyków) niektórych bakteryjnych syntetaz aminoacylo-tRNA

L.p.	Nazwa antybiotyku	Wzór strukturalny	AARS	Piśmiennictwo
I.	mupirocyna		IleRS	97
II.	indolmycyna		TrpRS	103
III.	borelidyna		ThrRS	104
IV.	furanomycyna		IleRS	105
V.	granatycyna		LeuRS	106

Antybiotyki te były projektowane w oparciu o strukturę substratów lub produktów pośrednich reakcji aminoacylacji.

jej strukturę (Tabela 3) [95-97]. Jest to inhibitor IleRS patogenów gram-dodatnich jak: *Staphylococcus epidermi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* oraz gram-ujemnych: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis* [98-100]. Infekcje wywoływane przez *S. aureus* prowadzą do zaburzeń układu oddechowego [100]. *S. aureus* charakteryzuje się wysoką opornością na większość stosowanych antybiotyków (np. β -laktamy). Mupirocyna charakteryzuje się znaczną selektywnością. Inhibuje ona aktywność bakteryjnej IleRS z wydajnością 10000-krotnie większą niż IleRS ssaków [101]. Kwas pseudomonowy blokuje aktywność IleRS na etapie

nie projektuje się antybiotyki syntetyczne, będące analogami mupirocyny o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych jak: wyższa stabilność i selektywność. Jednym z nich jest inhibitor CB432, który hamuje aktywność bakteryjnej IleRS z wydajnością 60-11000 krotnie większą aniżeli IleRS człowieka. Stężenie 0,1; 0,5 i 10 $\mu\text{g/ml}$ jest wystarczające aby zahamować wzrost bakterii odpowiednio: *S. aureus*, *S. pyogenes* i *E. coli* [93].

Innym antybiotykiem, inhibitorem syntetaz aminoacylo-tRNA jest indolmycyna, opisywana początkowo jako antybiotyk PA-155A. Jest to pochodna tryptofanu (Tabela 3). Hamuje ona wzrost bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Indolmy-

cyna blokuje aktywację tryptofanu na etapie tworzenia tryptofanylo-adenylanu [103].

Odmienny mechanizm działania antybiotyków na aaRS wykazuje borelidyna, która jest inhibitorem ThrRS, produkowanym przez *Streptomyces species* (Tabela 3) [104]. Przypuszcza się, że w tym przypadku blokowany jest etap aminoacylacji tRNA. Innymi naturalnymi inhibitorami bakteryjnymi aaRS są: furanomycyna (ang. *furanomycin*) [105], granatycyna (ang. *granaticin*) [106], ochratoksyna (ang. *ochratoxin*) i cyspentacyna (ang. *cispentacin*), które hamują działanie odpowiednio: IleRS [107], LeuRS [108] PheRS [108,109] i ProRS [110] (Tabela 3). Znane są także inhibitory GlnRS [111], GluRS [112] oraz MetRS [113, 114]. Są to analogi odpowiednio glutaminyloadenylanu, glutaminianu, metionyloadenylanu i metioniny.

Podstawowym problemem, który nie tylko ogranicza skuteczność antybiotyków, ale także zmusza do poszukiwania nowych, jest antybiooporność, polegająca na uodparnianiu się drobnoustrojów na ich działanie. Jak dotąd nie wydaje się, aby antybiotyki hamujące działanie aaRS mogły całkowicie rozwiązać ten problem. Składa się na to kilka czynników. Częstość spontanicznych mutacji w komórkach bakteryjnych waha się w granicach 10^{-5} - 10^{-9} . Punktowe mutacje bakteryjnych IleRS wywołują natychmiastowe obniżenie wrażliwości patogena na mupirocynę. W ostatnich latach wzrosła oporność szczepu *S. aureus* na ten antybiotyk. Przyczyną tego jest pojawienie się drugiego genu IleRS, który występuje w plazmidzie bakterii. Produkt tego genu wykazuje tylko 34% identyczności aminokwasowej z IleRS kodowanej przez chromosomalny DNA [115]. Jak wiadomo plazmidowy rodzaj oporności charakteryzuje się ogromną łatwością przenoszenia, nie tylko wśród szczepów tego samego gatunku, ale także rozprzestrzeniania się na inne gatunki. Zadaniem współczesnej medycyny jest poszukiwanie antybiotyków o zmienionych strukturach chemicznych, w odpowiedzi na nowo pojawiające się drobnoustroje. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości poszukiwanie antybiotyków realizowane będzie w oparciu o genomikę. W genomach *Helicobacter pylori*, *Methanococcus janashi* czy *Borelia burgdorferi* nie znaleziono genów syntetazy Gln-tRNA^{Gln} oraz Asn-tRNA^{Asn}. Pośrednia glutaminylacja zachodzi przy udziale syntetazy glutamylo-tRNA i amidotransferazy glutamylo-tRNA. Amidotransferaza, której obecność jest konieczna dla prawidłowego funkcjonowania aparatu translacyjnego *Archea* może stanowić interesujące narzędzie w projektowaniu antybiotyków [116]. Szczególnym przykładem wśród

syntetaz aminoacylo-tRNA jest LysRS, która według kanonicznego podziału syntetaz przynależy do klasy II, a wśród niektórych patogennych bakterii zidentyfikowano LysRS o strukturze typowej dla klasy I-jej syntetaz. Ta cecha LysRS może być wykorzystana w projektowaniu antybiotyków, które specyficznie blokowałyby aktywność tylko LysRS patogena.

VI. Perspektywy

Z przedstawionej charakterystyki wynika, że aaRS należą do jednej z najstarszych i najlepiej poznanych rodziny białek. Również z tego powodu stanowią one dobre narzędzie badawcze do poszukiwania odpowiedzi na pytania dotyczące ewolucji. Wiadomo, że enzymy te zawierają klasyczne motywy wiążące dinukleotydy występujące także w wielu innych białkach jak oksydazy czy dehydrogenazy. Nasuwa się natychmiast pytanie o relacje między tymi enzymami a także o wspólnego przodka.

Podstawowa rola komórkowa aaRS związana z acylacją tRNA specyficznym aminokwasem daje szanse wykorzystania tych enzymów do celów diagnostycznych. Na przykład inhibitory projektowane w oparciu o substraty lub produkty pośrednie tej reakcji stanowią nową alternatywę dla farmakologii. Podejmowane są również próby rozszerzenia kodu genetycznego w celu włączenia nienaturalnych aminokwasów do dowolnego białka. Ich celem jest skonstruowanie nowych par syntetaza-tRNA, które byłyby specyficzne wobec nowych aminokwasów i włączanie ich do powstającego peptydu. Rozwiązanie tego i podobnych zagadnień z udziałem nowych aa-tRNA umożliwi syntezę dowolnych białek o właściwościach i zastosowaniach terapeutycznych.

Artykuł otrzymano 23 kwietnia 2002

Zaakceptowano do druku 7 maja 2002

Piśmiennictwo:

1. Arnez JG, Moras D (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 211-216
2. Goldgur Y, Mosyak L, Reshetnikova L, Anki-lova V, Lavrik K, Khodyreva S, Safran M (1997) *Structure* **15**: 59-68
3. Siatecka M, Barciszewski J (1995) *Post Biochem* **41**: 266-275
4. Ibba M, Curnow AW, Söll D (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 39-42
5. JG Arnez and D Moras (1994) Oxford University Press, New York, wyd. przez: K Nagai i IW Mattaj
6. Burbaum J, Schimmel P (1991) *J Biol Chem* **266**: 16965-16968
7. Delarue M, Moras D (1993) *Bioessays* **15**: 675-686
8. Moras D (1990) *Nature* **344**: 195-197
9. Moras D (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 159-164
10. Cusack S (1997) *Curr Opin Struct Biol* **7**: 881-889
11. Cusack S (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 66-73

12. Cusack S (1995) *Nat Struct Biol* 2: 824-831
13. Mirande M, Lazard M, Kerjan P, Bec G, Agou F, Quevillon S, Waller J-P (1993): w: K. H. Nierhaus *The Translational Apparatus*, wyd. Plenu Press, New York str. 657-668
14. Ibba M, Söll D (2000) *Annu Rev Biochem* 69: 617-650
15. Rho SB, Lee JS, Jeong EJ, Kim YG, Kim S (1998) *J Biol Chem* 273: 11267-11273
16. Yang DCH (1996) *Curr Top Cell Regul* 34: 101-136
17. Berbeć H (1990) *Post Biochem* 3-4: 41-50
18. Deinert K, Fasiolo F, Hurt EC, Simos G (2001) *J Biol Chem* 276: 6000-6008
19. Simos G, Sauer A, Fasiolo F, Hurt EC (1998) *Mol Cell* 1: 235-242
20. Wang CC, Shimmel P (1999) *J Biol Chem* 274: 16508-16512
21. Quevillon S, Robinson JC, Berthonneau E, Sia-tecka M, Mirande M (1999) *J Mol Biol* 285: 183-195
22. Murray JC, Tas J (1996) *Int J Biochem Cell Biol* 28: 837-841
23. Quevillon S, Agou F, Robinson JC, Mirande M (1997) *J Biol Chem* 272: 32573-32579
24. Shalak V, Kamińska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande (2001) *J Biol Chem* 276: 23769-23776
25. Kim Y, Shin J, Li R, Cheong C, Kim K, Kim S (2000) *J Biol Chem* 275: 27062-27068
26. Quevillon S, Mirande M (1996) *FEBS Lett* 395: 63-67.
27. Nathanson L, Deutscher MP (2000) *J Biol Chem* 275: 31559-31562
28. Weygand-Durasević I, Lenhard B, Filipić S, Söll D (1996) *J Biol Chem* 271: 2455-2461
29. Frugier M, Moulinier L, Giege R (2000) *EMBO J* 19: 2371-2380
30. Schimmel P, Ribas de Popoplana L (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 207-209
31. Kamińska M, Deniziak M, Kerjan P, Barciszewski J, Mirande M A (2000) *EMBO J* 19: 6908-6917
32. Stapulionis R, Deutscher MP (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7158-7161
33. Wilcox M, Nirenberg M (1968) *Proc Natl Acad Sci USA* 61: 229-236
34. Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Weidman JF, Fuhrmann JL, Nguyen D, Uutterback TR, Kelley JM, Peterson JD, Sadow PW, Hanna MC, Cotton MD, Roberts KM, Hurst MA, Kaine BP, Borodovsky M, Klenk H-P, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter JC (1996) *Science* 273: 1058-1073
35. Ibba M, Söll D (2001) *EMBO reports* 2: 382-387
36. Arnez JG, Moras D (1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press
37. Ibba M, Curnow AW, Söll D (1997) *Trends Biochem Sci* 22: 39-42
38. Koonin EV, Aravind L (1998) *Curr Biol* 8: R266-R269
39. Ibba M, Becker HD, Stathopoulos C, Tumbula DL, Söll D (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 311-316
40. Curnow AW, Ibba M, Söll D (1996) *Nature* 382: 589-590
41. Sekine S, Nureki O, Shimada A, Vassilyev DG, Yokoyama S (2001) *Nat Struct Biol* 8: 203-206
42. Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Garden W, Lin W, Woese CR, Söll D (1997) *Science* 278: 1119-1122
43. Söll D, Becker HD, Plateau P, Blanquat S, Ibba M (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14224-14228
44. Ibba M, Losey HC, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, Bonjun S, Söll D (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 418-423
45. Stathopoulos C, Li T, Longman R, Vothknecht UC, Becker HD, Ibba M, Söll M (2000) *Science* 287: 479-482
46. Stathopoulos C, Jacquin-Becker C, Becker DH, Li T, Ambrogelly A, Longman R, Söll D (2001) *Biochemistry* 40: 46-52
47. Yarus M (2000) *Science* 287: 440-441
48. Putzer H, Grunberg-Manago M, Springer M (1995) w: *tRNA Structure, Biosynthesis and Function*, ASM Press, Washington DC, 293-333.
49. Sacerdot C, Caillet J, Graffe M, Eyermann F, Ehresmann B, Ehresmann C, Springer M, Romby P (1998) *Mol Microbiol* 29: 1077-1090
50. Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D (1999) *Cell* 97: 371-381
51. Putney SD, Schimmel P (1981) *Nature* 291: 632-635
52. Caprara MG, Lehnert V, Lambowitz AM, Westhof E (1996) *Cell* 87: 1135-1145.
53. Kamper U, Kuck U, Cherniack AD, Lambowitz AM (1992) *Mol Cell Biol* 12: 499-511
54. Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin G, Słonimski PP (1988) *EMBO J* 7: 473-483.
55. Lambowitz AM, Perlman PS (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 440-444.
56. Houman F, Rho SB, Zhang J, Shen X, Wang CC, Schimmel P, Martinis SA (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13743-13748
57. Nishimura A (1998) *Trends Biochem Sci* 23: 157-159
58. Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD, Frolova LY (1998) *FEBS Lett* 427: 157-163
59. Kumar AM, Schaub U, Söll D, Ujwal ML (1996) *TIBS* 1: 371-375
60. Sissler M, Delorme C, Bond J, Ehrlich SD, Renault P, Francklyn C (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8985-8990
61. Haenni A-L, Chapeville F (1997) *Acta Biochim Pol* 44: 827-837
62. Wakasugi K, Schimmel P (1999) *Science* 284: 147-151
63. Tass MPR, Murray JC (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 837-841
64. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Otani A, Ewalt K L, Friedlander M, Cheresch D A, Schimmel P (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 173-177
65. Uwer U, Willmitzer L, Altmann T (1998) *Plant Cell* 10: 1277-1294
66. Seshiah P, Andrew DJ: (1999) *Mol Biol Cell* 10: 1595-1608
67. Fersht AR (1997) *Enzyme Structure and Mechanism*, 263pp., Freeman, San Francisco
68. Nureki O, Vassilyev DG, Teteno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P, Yokoyama S (1998) *Science* 280: 578-582
69. Jakubowski H (1999) *Biochemistry* 38: 8088-8093
70. Jakóbisiak M (1995) *Immunologia*, wyd. PWN, Warszawa
71. Paley EL, Alexandrova N, Smelansky L (1995) *Immunol Lett* 48: 201-207
72. Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM (1987) *J Clin Invest* 79: 65-72
73. Samuels DS, Tojo T, Homma M, Shimizu N (1986) *FEBS Lett* 209: 231-234
74. Uibo R, Mackay IR, Rowley M, Humphries P, Armstrong JM, McNeilage J (1990) *Clin Exp Immunol* 80: 19-24
75. Thoren-Tolling K, Ryden L (1991) *Acta Vet Scand* 32: 15-26
76. Targoff IN (1992) *Rheum Dis Clin North Am* 18: 445-482
77. Biswas T, Miller FW, Takagaki Y, Plotz PH (1987) *J Immunol Methods* 98: 243-248
78. Targoff IN, Trieu EP, Plotz PH, Miller FW (1992) *Arthritis Rheum* 35: 821-830
79. Beaulande M, Tarbouriech N, Hartlein M (1998) *Nucleic Acid Res* 26: 521-524
80. Targoff IN, Arnett FC, Reichlin M (1988) *Arthr Rheum* 31: 515-524
81. Targoff IN, Arnett FC (1990) *Am J Med* 88: 241-251

82. Targoff IN, Trieu EP, Miller FW (1993) *J Clin Invest* **91**: 2556-64
83. Ge Q, Trieu EP, Targoff IN (1994) *J Biol Chem* **269**: 28790-28797
84. Raben N, Nicholas R, Dohlman J, McPhie P, Sridhar V, Hyde C, Leff R, Plotz P (1994) *J Biol Chem* **269**: 24277-24283
85. Blechynden LM, Lawson CM, Garlepp MJ (1996) *Gene* **178**: 151-156
86. Berthonneau E, Mirande M (2000) *FEBS Lett* **470**: 300-304
87. Jakubowski H (1995) *J Biol Chem* **270**: 17672-17673
88. Jakubowski H (1991) *EMBO J* **10**: 593-598
89. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguez A, Aviv A (2000) *Circ Res* **87**: 45-51
90. Jakubowski H (2001) *J Nutr* **131**: 2983S-7S
91. Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D (1997) *Nat Genet* **15**: 91-94
92. Zejc A, Gorczyca M (1998) *Chemia leków*, wyd. PZWL, Warszawa
93. Schimmel P, Tao J, Hill J (1998) *FASEB J* **12**: 1599-1609
94. Broom NJP, Cassels R, Cheng HY, Elder JS, Hannan PC, Masson N, O'Hanlon PJ, Pope A, Wilson JM (1996) *J Med Chem* **39**: 3596-3600
95. Baines PJ, Jackson D, Mellows G, Swaisland AJ, Tasker TCG (1984) Wilkinson DS, Price JD (eds), Royal Society of Medicine, London, UK: 13-22
96. Silvan L, Wang J, Steitz T A (1999) *Science* **285**: 1074-1077
97. Zejca A, Gorczyca M (1998) *Chemia leków* wyd.: PZWL Warszawa
98. Pope AJ, Lapointe J, Mensah L, Benson N, Brown M J, Moore KJ (1998) *J Biol Chem* **273**: 31680-31690
99. Pope AJ, Moore KJ, McVey M, Mensah L, Benson N, Osbourne N, Broom N, Brown MJ, O'Hanlon P (1998) *J Biol Chem* **273**: 31691-31701
100. Pope AJ, McVey M, Fantom K, Moore KJ (1998) *J Biol Chem* **273**: 31702-31706
101. Hughes J, Mellows G (1980) *Biochem J* **191**: 209-219
102. Yanagisawa T, Lee JL, Wu HC, Kawakami M (1994) *J Biol Chem* **269**: 24304-24309
103. Werner RG, Thorpe LF, Reuter W, Nierhaus KH (1976) *Eur J Biochem* **68**: 1-3
104. Freist W, Gauss DH (1995) *Biol Chem Hoppe Syler* **376**: 213-224
105. Negwer M (1978) *Organic-chemical drugs and their synonyms* vol 1, Akademie Verlag, Berlin
106. Korzybowski T, Kowszyk-Gindifer Z, Kuryłowicz W (1997) *Antybiotyki: pochodne, rodzaje i właściwości* PZWL Warszawa
107. Tanara K, Tamaki M, Watanabe S (1996) *Biochem Biophys Acta* **195**: 244-245
108. Konrad I, Rösenthaller R (1977) *FEBS Lett* **83**: 341-348
109. Roth A, Eriani G, Dirheimer G, Gangloff J (1993) *FEBS Lett* **326**: 87-91
110. Heacock DH, Forsyth CJ, Shiba K, Musier-Forsyth K (1996) *Bioorg Chem* **24**: 273-289
111. Bernier S, Dubois DY, Therrien M, Lapointe J, Chênevert R (2000) *Bioorg Med Chem Lett* **10**: 2441-2444
112. Desjardins M, Desgagnès J, Lacoste L, Yang F, Morin MP, Lapointe J (1997) *Bioorg Med Chem Lett* **7**: 2363-2366
113. Lee J, Kang SU, Kang MK, Chun MM, Jo YJ, Kwak JH, Kim S (1999) *Bioorg Med Chem Lett* **9**: 1365-1370
114. Lee J, Kang MK, Chun MM, Jo YJ, Kwak JH, Kim S (1998) *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 3511-3514
115. Brown JR, Zhang J, Hodgson JE (1998) *Curr Biol* **8**: R365-R367
116. Decicco CP, Nelson DJ, Luo Y, Shen L, Horiuchi KY, Amsler KM, Foster LA, Spitz SM, Merril JJ, Sizemone Ch, Gogers KC, Copeland RA, Harpel MR (2001) *Bioorg Med Chem Lett* **11**: 2561-2564

Niedobór cholesterolu sygnałem dla transdukcji informacji z endoplazmatycznego retikulum do jądra komórkowego — procesy proteolitycznego odszczepienia czynników transkrypcyjnych z błon ER

Depletion of cholesterol in signal transduction from endoplasmic reticulum to the cell nucleus — the proteolytic cleavage of transcription factors from the ER membranes

BOŻENA WIECZOREK¹, JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Sterolowe elementy regulatorowe SRE i białka SREBP
- III. Budowa białek SREBP
- IV. Mechanizm dwuetapowego procesu proteolizy białka SREBP
 - IV-1. SCAP — białko aktywujące proteolityczne rozszczepienie SREBP z udziałem proteaz S1P i S2P
 - IV-2. Proces proteolizy białka SREBP błon ER i uwolnienie czynnika transkrypcyjnego SREBP-68

Wykaz stosowanych skrótów: ACAT — acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol; AG — aparat Golgiego; bHLH-Zip — motyw suwaka leucynowego (ang. *basic-helix-loop-helix-leucine-zipper*); HDL — lipoproteiny o dużej gęstości; LDL — lipoproteiny o małej gęstości; SCAP — białko aktywujące proteolityczne rozszczepienie SREBP (ang. *SREBP cleavage activating protein*); S1P — proteaza miejsca 1 (ang. *site-1 protease*); S2P — proteaza miejsca 2 (ang. *site-2 protease*); SRE — sterolowy element regulatorowy (ang. *sterol regulatory element*); SREBP — białka błon o m.cz. 125 kDa podlegające proteolizie z uwolnieniem SREBP-68; SREBP-68 — białka wiążące się ze sterolowym elementem regulatorowym (ang. *sterol regulatory element binding protein*); VLDL — lipoproteiny o bardzo małej gęstości.

Contents:

- I. Introduction
- II. SRE-sterol regulatory elements and SREBP-sterol regulatory element binding proteins
- III. Structure of the SREBP proteins
- IV. Mechanism of the proteolytic cleavage and release of SREBP
 - IV-1. SCAP, the SREBP cleavage activating protein
 - IV-2. The proteolytic cleavage process and release of the transcription factor SREBP-68

I. Wstęp

Cholesterol jest związkami nieodzownym dla prawidłowego przebiegu wielu procesów metabolicznych zachodzących w komórkach i tkankach organizmów wyższych. Jako składnik błon biologicznych uczestniczy w regulacji ich struktury i funkcji. Cholesterol jest także wyjściowym substratem do biosyntezy wszystkich hormonów steroidowych, witaminy D₃, kwasów żółciowych i oksysteroli [1-8].

W komórkach eukariotycznych cholesterol pochodzi z wewnątrzkomórkowej syntezy *de novo* oraz cholesterolu dostarczanego z zewnątrz. Rozprowadzanie cholesterolu zachodzi z udziałem jego szybko wymiennej puli, którą stanowią lipoproteiny osocza (VLDL, LDL, HDL), a wychwytywany jest przez tkanki głównie poprzez receptorozależną endocytosę. U ssaków głównym miejscem biosyntezy chole-

¹Mgr, ²prof. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biologii (Ogólnej i Molekularnej), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7/9, 87-100 Toruń; e-mail: jgsz@biol.uni.torun.pl

sterolu są wątroba, jelito cienkie, mięśnie szkieletowe i skóra [1, 5, 8-10].

Synteza *de novo* w komórce zachodząca w błonach retikulum endoplazmatycznego (ER) podlega precyzyjnej regulacji na poziomie transkrypcji, translacji i bezpośredniej regulacji aktywności kluczowych enzymów szlaku biosyntezy cholesterolu. Nieprawidłowości metaboliczne wynikające z nadmiernej podaży cholesterolu ukierunkowały badania ostatnich trzydziestu lat głównie na poznanie mechanizmów ograniczających biosyntezę i zaangażowanych w utrzymaniu jego prawidłowego stężenia [1, 11-21].

Modulacja aktywności kluczowych enzymów szlaku biosyntezy cholesterolu jest procesem stosunkowo dobrze poznanym i polega na modyfikacji kowalencyjnej przez fosforylację i defosforylację, zmianie konformacji niektórych enzymów przez cholesterol i metabolity pośrednie oraz inhibitory kompetycyjne. Stwierdzono ponadto, iż enzymy szlaku biosyntezy cholesterolu pozostają pod kontrolą statusu oksydacyjno-redukcyjnego komórki i aktywności enzymów proteolitycznych [1, 11-15].

Konstitutywna regulacja procesów transkrypcji enzymów biosyntezy cholesterolu, przemian mewalonianu i metabolizmu kwasów tłuszczowych polega na oddziaływaniu szeregu sygnałowych związków z czynnikami transkrypcyjnymi uczestniczącymi w regulacji odczytu promotorów z ramką E (CANNTG-3'). Takimi związkami sygnałowymi są np. cholesterol, oksysterole, malonylo-CoA, kwasy tłuszczowe i kwasy żółciowe [16-19]. Transkrypcyjna regulacja syntezy enzymów szlaku biosyntezy przemian mewalonianu przez końcowy produkt cholesterol, była przedmiotem szczególnie intensywnych badań. Wymogiem strukturalnym, koniecznym dla wywarcia hamującego efektu przez cholesterol jest obecność niezestryfikowanej grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia steroidowego, a obecność grupy ketonowej lub hydroksylowej w pozycji 6, 7 lub 25 znacznie zwiększa efekt inhibitorowy. Wykazano również, że naturalne oksysterole, występujące w śladowych ilościach są skuteczniejszymi od cholesterolu inhibitorami transkrypcji [10, 17, 20, 21].

Oprócz mechanizmów regulujących homeostazę cholesterolu przy prawidłowej i nadmiernej jego podaży, istnieją również mechanizmy odbioru sygnału o jego niedoborze i konieczności uaktywnienia procesów biosyntezy. Mechanizmy te polegają na aktywacji genów z promotorami ze sterolowym elementem regulatorowym (SRE).

Przedmiotem niniejszego artykułu będzie omówienie poznanych w ostatnich latach mechanizmów

proteolitycznego odszczepienia czynników transkrypcyjnych z integralnych białek SREBP. Białka te zlokalizowane są głównie w błonach ER.

II. Sterolowe elementy regulatorowe SRE i białka SREBP

Za zależną od obniżonego poziomu steroli regulację transkrypcji odpowiedzialne są regiony promotorów ekspresji genów dla enzymów szlaku biosyntezy cholesterolu, receptora LDL i lipogenezy. Zawierają one jedną lub wiele kopii jednego z wariantów 10-nukleotydowej sekwencji: 3'-CATGAGATCA-CCCCACTGCAA-5'. Regiony te określane są mianem sterolowy element regulatorowy (SRE). Ich aktywacja jest niezbędna dla inicjacji transkrypcji w komórkach sygnalizujących zapotrzebowanie na cholesterol (Tabela 1) [17, 21, 22]. Aktywacja SRE nie zachodzi w warunkach konstytutywnej (podstawowej) ekspresji, gdy komórka nie sygnalizuje zapotrzebowania na cholesterol.

Obniżenie się stężenia cholesterolu w komórce inicjuje proteolityczne procesy prowadzące do uwolnienia z integralnych białek błonowych, SREBP, retikulum endoplazmatycznego, rozpuszczalnych fragmentów SERBP-68. Uwolnione białka SREBP-68 transportowane są do jądra komórkowego, gdzie uczestniczą w aktywacji genów z promotorami SRE.

Białka SREBP zostały wykryte w 1993 roku [25, 26] przez dwie odrębne grupy badaczy: Hua, Yokoyama, Wu, Briggs, Brown, Goldstein i Wang z University of Texas (Dallas), zajmujących się metabolizmem cholesterolu oraz Tontonoz, Kim, Graves i Spiegelman z Harvard Medical School (Boston), prowadzących badania nad metabolizmem cholesterolu i jego wpływem na procesy różnicowania [16-18, 21-23, 27, 28].

Białka SREBP są składnikiem błony retikulum endoplazmatycznego (ER). Ich obecność stwierdzono również w błonie jądrowej i błonach Aparatu Golgiego (AG).

Aktualnie znane są trzy izoformy białka SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2. Białka te kodowane są przez dwa geny. Gen SREBP-1 z dwoma promotorami koduje białka SREBP-1a i 1c, różniące się tylko długością N-końcowej domeny, SREBP-1a zawiera dodatkowo w tej domenie 29 kwaśnych aminokwasów. Gen SREBP-2 koduje pojedyncze białko (Ryc. 1) [17, 18, 28-30].

Nadekspresja SREBP-1a wywołuje intensywną biosyntezę cholesterolu i kwasów tłuszczowych, na-

dekspresja SREBP-1c umiarkowany wzrost biosyntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Według najnowszych badań SREBP-1c, najprawdopodobniej reguluje głównie syntezę kwasów tłuszczowych i w mniejszym stopniu cholesterolu.

SREBP-1c uczestniczy również w regulacji metabolizmu węglowodanów. Białko SREBP-2 wpływa głównie na biosyntezę cholesterolu i w pewnym stopniu również na biosyntezę kwasów tłuszczowych. Ekspresja białek SREBP jest kontrolowana na wielu poziomach i zachodzi w odpowiedzi na zmiany stężenia cholesterolu, oksysteroli, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, glukagonu, cAMP oraz stosunku insulina/glukoza (Tabela 2) [17, 28, 31].

mRNA pozostaje w korelacji z ilością odpowiednich białek SREBP [28].

III. Budowa białek SREBP

SREBP to trójdomenowe białka (~ 1150 aminokwasów) o masie 125 kDa, o orientacji szpilki do włosów, związane z błonami ER (Ryc. 2); ich N-terminalne domeny (~ 480 aminokwasów) i C-terminalne domeny (~ 590 aminokwasów) znajdują się w cytosolu. Białka SREBP zakotwiczone są w błonie domeną centralną (~ 80 aminokwasów). Ta unikalna domena odróżniająca SREBP od innych białek błonowych, zawiera dwa hydrofobowe 22-amino-

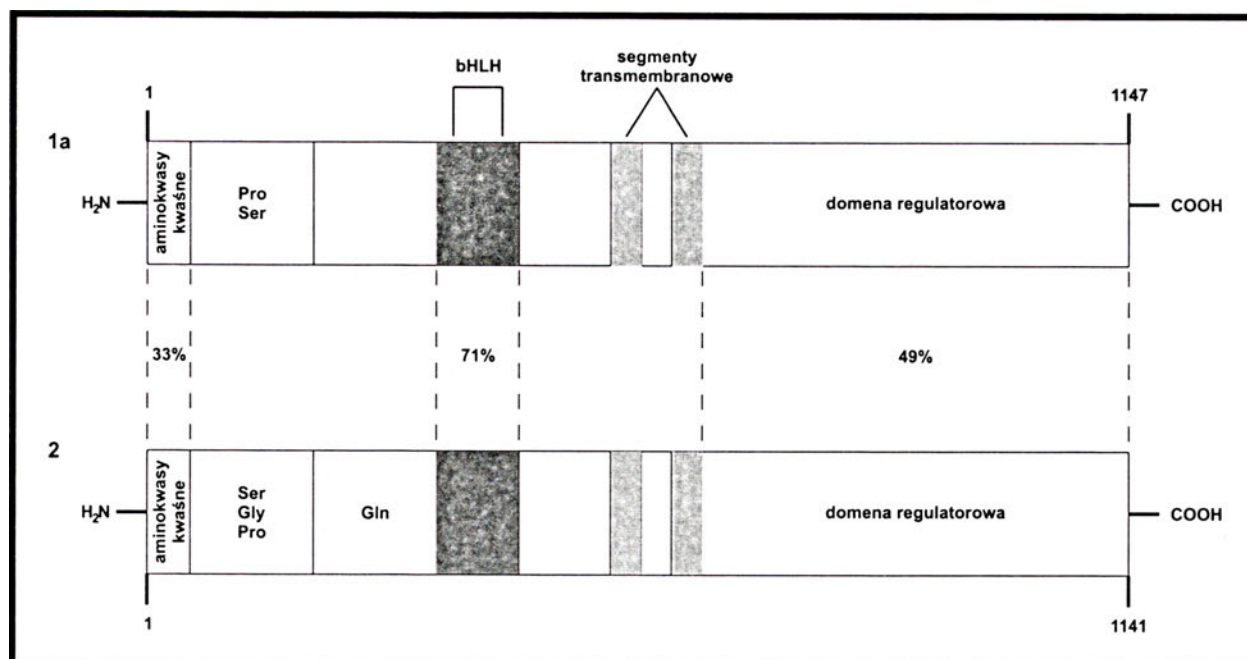
Tabela 1

Nukleotydowe sekwencje dla sterolowych elementów regulatorowych SRE [na podstawie 17]

	Geny odpowiedzialne za syntezę	Sekwencja SRE
Pobieranie i synteza cholesterolu	Receptora LDL	ATCACCCAC
	Syntazy HMG-CoA	CTCACCCAC
		GCCACCCTAC
	Reduktazy HMG-CoA	ACCGCACCAT
	Syntazy farnezylo-PP	CTCTCACCAC
	Syntazy skwalenu	CTCACACGAG
	ATCACGCCAG	
	CGATGCTGAG	
	SREBP-2	ATCACCCAC
Synteza kwasów tłuszczowych	Karboksylazy acetylo-CoA	GGAGGACCAT
		CTCACGTCGC
	Syntazy kwasów tłuszczowych	ATCACCCAC
	Desaturazy 1 stearylo-CoA	AGCAGATTGC
	Desaturazy 2 stearylo-CoA	AGCAGATTGT
	Acylotransferazy glicerylo-3-fosforanu	CTCAGCCTAG
Inne	Liaza ATP-cytrynian	TCAGGCTAG

Stężenie poszczególnych form SREBP jest odmienne w różnych tkankach. Dla przykładu w wątrobie i adipocytach ilość mRNA dla SREBP-1c przewyższa odpowiednio 9- i 3-krotnie zawartość mRNA dla SREBP-1a. Natomiast śledziona zawiera 10-krotnie więcej SREBP-1a, aniżeli 1c. W większości tkanek przeważa ekspresja białka SREBP-1a. Zawartość

kwasowe segmenty transmembranowe połączone krótką 31-aminokwasową pętlą zwróconą do światła błon ER. N-końcowe partie białek SREBP zawierają sekwencje bogate w aminokwasy kwaśne. Sekwencje te są stosunkowo długie w SREBP-1a (42 aminokwasy) i SREBP-2 (48 aminokwasów), natomiast w SREBP-1c ten odcinek jest krótszy i zawiera 24 ami-



Ryc. 1. Domeny i homologia struktury białek SREBP-1a i SREBP-2 wg [18].

nokwasy. Po odcinkach bogatych w aminokwasy kwaśne występują sekwencje bogate w prolinę, serynę, glicynę i glutaminę, z następującą po nich klasyczną sekwencją bHLH-Zip. Kolejne odcinki białek SREBP to dwa hydrofobowe segmenty transbłonowe przedzielone krótką sekwencją łącznikową oraz regulatorowa domena C-końca (Ryc. 1). Stopień homologii między SREBP-1a i SREBP-2 jest następujący, procent identyczności dla sekwencji zawierających kwaśne aminokwasy wynosi — 33 %, dla sekwencji bHLH-Zip — 71 % i dla C-końcowej domeny regulatorowej wynosi — 49 % (Ryc. 1) [18].

Domena N-końcowa SREBP po proteolitycznym odszczepieniu jest transkrypcyjnym czynnikiem rodziny suwaka leucynowego — basic-helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLH-Zip) [17-19, 21-23, 27-29, 32-36].

Motyw bHLH-Zip pośredniczy w dimeryzacji i translokacji dimeru do jądra komórkowego oraz wiązaniu go z regionami SRE.

IV. Mechanizm dwuetapowego procesu proteolizy białka SREBP

IV-1. SCAP — białko aktywujące proteolityczne rozszczepienie SREBP z udziałem proteaz S1P i S2P

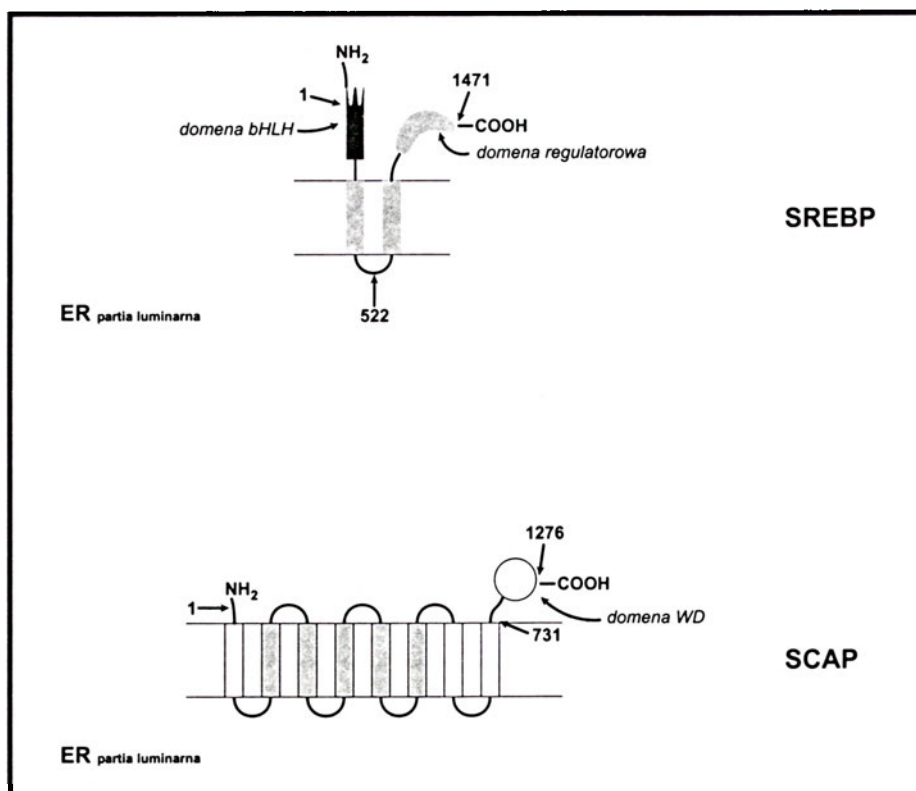
Proces proteolizy białek SREBP zachodzi z udziałem dwóch proteaz S1P i S2P (dane o specyficzności w dalszej części artykułu) oraz przy współudziale białka SCAP (ang. *cleavage activating protein*). Białko SCAP uczestniczy również w trans-

porcie białka SREBP o masie cząsteczkowej 125 kDa z błon ER do aparatu błon aparatu Golgiego.

SCAP jest integralnym N-glikozylowanym białkiem błonowym, zbudowanym z około 1276 aminokwasów, recyklicującym między ER i AG (Ryc. 2) [18, 21]. Po N-terminalnej, zlokalizowanej w cytosolu domenie SCAP, występują na przemian hydrofobowe i hydrofilne odcinki, które tworzą osiem transmembranowych fragmentów rozdzielonych krótkimi hydrofilnymi pętlami. Hydrofilna C-końcowa domena SCAP, zlokalizowana również w cytosolu (546 aminokwasów), zawiera pięć powtarzających się sekwencji WD, które pośredniczą w interakcjach białko-białko. Odcinek obejmujący pięć z ośmiu transmembranowych sekwencji białka SCAP (domeny transbłonowe 2-6, pomiędzy aminokwasami 280-446) jest domeną sensorową dla steroli. Domeny o podobnej strukturze występują również w takich białkach jak reduktaza HMG-CoA (pomiędzy aminokwasami 57-224 białka zbudowanego z 887 aminokwasów), białka NPC-1 (Nieman-Pick typ 1, pomiędzy aminokwasami 617-691 białka zbudowanego z 1278 aminokwasów) oraz receptorze morfogenezy Patched (pomiędzy aminokwasami 420-589 białka zawierającego 1434 aminokwasy). Wymienione odcinki sensorowe pozostają pod kontrolą steroidów, choć w reduktazie HMG-CoA nie wykazuje wrażliwości na sterole [17, 18, 21-23, 27-29, 32, 37].

Zamiana jednego aminokwasu asparaginy na argininę w obrębie domeny sensorowej SCAP unieczynnia jej rolę jako sensora steroli w komórce [22].

Wspomniana już zmiana asparaginy na argininę w SCAP znosi jego aktywujący wpływ na proteazę



Ryc. 2. Topologia struktury białka SREBP i SCAP w obrębie błon retikulum endoplazmatycznego (wg [21], zmodyfikowane).

S1P, a w konsekwencji tej zmiany aktywność S1P utrzymuje się na stałym poziomie.

Lipidy niesterolowe jak sfingomielina [38] oraz androgeny [39], oksysterole i nienasycone kwasy tłuszczowe [40] wpływają zarówno na proces transkrypcji białek SREBP jak i na aktywność proteazy S1P.

Szczególnie ciekawe choć nie w pełni wyjaśnione są efekty wywołane przez sfingomielinazę w wyniku działania której następuje translokacja cholesterolu z błon plazmatycznych do ER. W odpowiedzi na potraktowanie komórek sfingomielinazą (w warunkach hodowli tkankowych) zaobserwowano podwyższenie stężenia estrów cholesterolu z powodu aktywacji ACAT oraz zahamowanie syntezy cholesterolu w wyniku zmniejszenia aktywności reduktazy HMG-CoA; oprócz tego stwierdzono obniżenie się ilości dojrzałych form SREBP-68 w jądrach komórkowych, co jest rezultatem hamowania proteazy S1P(38). Oksysterole w szczególności w obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych są również silnymi inhibitorami procesu konwersji SREBP w czynniki transkrypcyjne SREBP-68 [40]. Z badań nad wpływem stopnia nienasylenia kwasów tłuszczowych na proces uwalniania białek SREBP-68 wynika, iż bardzo skutecznym inhibitorem jest kwas oleinowy C18:1 (Δ^9) [40]. Według innych autorów [43] najefektywniejsze w hamowaniu uwalniania białek SREBP-68-1c są wielonienasycone kwasy

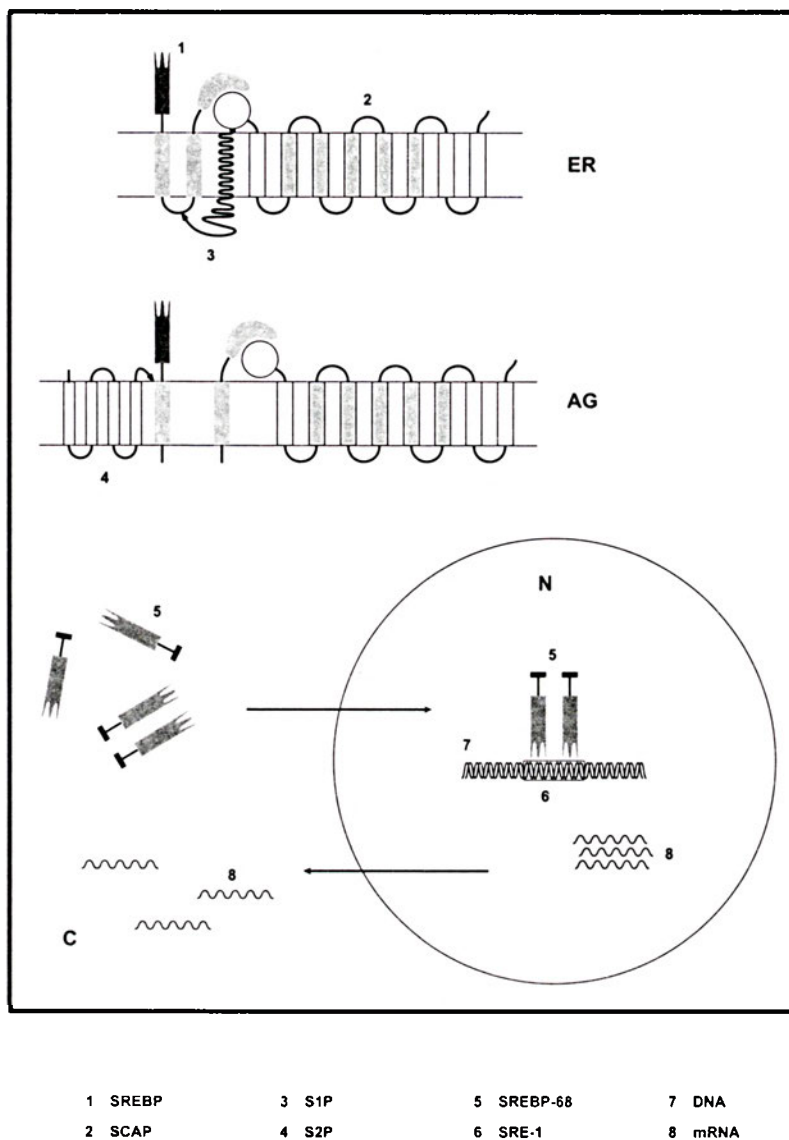
tłuszczowe, jak np. kwas arachidonowy C20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$) [41]. Efekty nienasyconych kwasów tłuszczowych dotyczą również regulacji tkankowo specyficznej ekspresji białek SREBP. W hepatocytach wywierają wpływ na ekspresję, natomiast w adipocytach pozostają bez wpływu.

Przypuszcza się również, iż proces proteolizy białek SREBP-1c pozostaje wyłącznie pod kontrolą nienasyconych kwasów tłuszczowych i jest niezależny od steroli. Proces aktywacji białek SREBP-1c regulowany jest także poprzez proces modyfikacji kowalencyjnej z udziałem kinazy MAP [41].

SREBP-1 i SREBP-2 w komórkach apoptotycznych mogą również ulegać proteolizie nieregulowanej przez sterole z udziałem proteaz cysteinowych CPP-32 i Mch-3 [16]. Znaczenie tych procesów nie zostało jeszcze wyjaśnione.

IV-2. Proces proteolizy białka SREBP błon ER I uwolnienie czynnika transkrypcyjnego SREBP-68

W warunkach niedoboru steroli w komórce białko SREBP błon ER wchodzi w interakcję z SCAP. Interakcja zachodzi pomiędzy C-końcową domeną regulatorową SREBP i domeną WD białka SCAP (Ryc. 3). Wytworzony kompleks SREBP-SCAP, według najnowszych doniesień [17] zostaje przetransportowany do błon AG, gdzie w dwuetapowym



Ryc. 3. Model mechanizmu proteolizy membranowego białka SREBP. Proteaza S1P rozpoznająca kompleks SREBP-SCAP rozcina pętlę SREBP w luminalnej części ER na dwa fragmenty. Druga proteaza S2P odcina N-terminalną partię SREBP z domeną bHLH (SREBP-68). Kolejnym etapem jest transport uwolnionego czynnika transkrypcyjnego SREBP-68 do jądra komórkowego. Dimer białka SREBP-68 aktywuje promotory SRE.

procesie proteolizy następuje uwolnienie transkrypcyjnie aktywnego N-końcowego fragmentu o masie 68 kDa (SREBP-68). Pierwsze rozszczepienie następuje w środku pętli białka SREBP w obrębie sekwencji: Arg-Ser-Val-**Leu-Ser** (RSVLS) (Ryc. 3) pomiędzy leucyną⁵²² i seryną⁵²³, katalizowane jest przez proteazę S1P, aktywowaną przez SCAP. Na tym etapie SREBP rozdzielone zostaje na dwie części, pozostaje jednak nadal związane z błoną Aparatu Golgiego (Ryc. 3). Według niektórych autorów proces ten zachodzi również w ER [17, 18, 21, 28, 42]. W kolejnym etapie, w błonach AG, druga proteaza - S2P uwalnia z połączenia z błoną N-końcowy fragment białka SREBP, tzn. właściwy, transkrypcyjnie czynny czynnik — SREBP-68 (Ryc. 3). Cięcie następuje w segmencie trans-membranowym, w obrębie sekwencji: Asp-Arg-Ser-Arg-Ile-Leu-**Leu-Cys** (DR-SRILLC) pomiędzy leucyną i cysteiną.

S2P jest hydrofobową, cynkową metaloproteazą, natomiast S1P jest proteazą typu subtylizyn o strukturze i właściwościach podobnych do subtylizyn bakteryjnych. Obecność S1P stwierdzono również w regionie pre-Golgi i jest ona proteazą odmienną od konwertaz prehormonów, które występują w obrębie AG i post-AG. Stąd możliwe jest, że pierwszy i drugi etap proteolizy zachodzi w regionie pre-Golgi. W/g Browna i Goldsteina [21] proteaza S1P występuje w formie nieaktywnej w ER i ulega aktywacji w regionie pre-Golgi (mechanizm aktywacji nieznany).

Uwolniona, transkrypcyjnie aktywna N-końcowa domena o masie 68 kDa (SREBP-68) zostaje przeniesiona do cytosolu, skąd migruje do jądra, gdzie jako dimer wiąże się z regionami SRE (Ryc. 3) i aktywuje szereg genów enzymów szlaku biosyntezy cholesterolu, lipogenezy, receptora LDL i metabolizmu węglowodanów, geny syntazy HMG-CoA (pierwszy

Tabela 2

Zmiany ekspresji i uczynniania białek SREBP pod wpływem metabolitów i hormonów [na podstawie 17, 28, 31].

SREBP	Czynnik	mRNA	Uczynnienie
SREBP-1a, 1c, 2	cholesterol	↓	↓
SREBP-1a, 1c, 2	oksysterole	bz	↓
SREBP-2	insulina/glukoza	bz	bz
SREBP-1c	insulina/glukoza	↑	↑
SREBP-1c	glukagon, cAMP	↓	↓
SREBP-2	hipolipidemiczne leki	↑	↑
SREBP-1	hipolipidemiczne leki	bz	↓
SREBP-1	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	bz	↓
SREBP-2	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	bz	bz

↑ — wzrost, ↓ — obniżenie, bz — bez zmian

wykryty), receptora LDL, reduktazy HMG-CoA, syntazy skwalenu, syntazy farnezylodifosforanu, syntazy kwasów tłuszczowych, karboksylazy-CoA, glicerylo-3-fosfoacylotransferazy, lipazy lipoproteinowej, kaweolin i leptyny [17, 24].

Aktywacja w/w genów wymaga jednak dodatkowo współdziałania SREBP-68 z innymi czynnikami transkrypcyjnymi [17, 21-23, 28], takimi jak NF-Y (ang. *nuclear factor Y*), Sp1 lub CREB (ang. *cAMP response element binding protein*). Dodatkowymi białkowymi koaktywatorami wymaganymi do aktywacji transkrypcji są CBP (ang. *CREB binding protein*), P-300 oraz ARC (ang. *activated recruited factor*) lub DRIP (ang. *vitamin D receptor interacting protein*) przy czym izoformy SREBP-1a i 1c oraz SREBP-2 wchodzi w interakcję z odrębnymi czynnikami transkrypcyjnymi [28], co daje możliwość specyficznych tkankowo modulacji ekspresji genów i precyzyjnej kontroli ich ekspresji przez czynniki wewnątrzkomórkowe.

Transkrypcyjne czynniki z sekwencją suwaka leucynowego (bHLH-Zip), takie jak: Myc, Max i USP (ang. *upstream stimulatory factor*) zawierają argininę w konserwatywnym regionie i wiążą się z ramką E DNA (5'-CANNTG-3') [43]. SREBP-68 są szczególnie białkami typu bHLH-Zip, ponieważ w miejscu argininy występuje tyrozyna [43] i w związku z tym wiążą się efektywnie tylko z SRE-1. Interesującym jest fakt, że choć SREBP-68 w warunkach *in vivo* wiążą się również z ramką E i wykazują wysokie powinowactwo do niej, jednak wszystkie promotory do tej pory opisane, wrażliwe na poziom steroli regulowane są tylko poprzez promotory zawierające

SRE. Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż interakcja z promotorami z ramką E, nie wywołuje dostatecznej zmiany konformacji wytworzonego kompleksu białko-DNA, dla uczynnienia transkrypcji [23, 24]. Najnowsze poglądy o oddziaływaniu czynników transkrypcyjnych SREBP-68 z promotorami z sekwencją typu SRE i ramką E przedstawione zostały w pracach szeregu pracach [22-24].

Wydaje się, iż ramka E-box jest rozpoznawana przez białka zawierające motyw suwaka leucynowego i uczynnia promotory odpowiedzialne za konstytutywną ekspresję genów szlaków biosyntezy niezależną od omawianych procesów regulowanych przez sterole z udziałem SREBP, SCAP, S1P i S2P.

Czynniki transkrypcyjne — SREBP-68 prawdopodobnie koewoluowały dla optymalizacji i uprecyzjonienia regulacji metabolizmu przemian cholesterolu, kwasów tłuszczowych i węglowodanów.

W artykule przedstawiono niedawno poznane podstawowe mechanizmy odbioru sygnałów o niedoborze cholesterolu oraz konwersji integralnych białek błon retikulum endoplazmatycznego SREBP w czynniki transkrypcyjne SREBP-68 uczestniczące w aktywacji genów z promotorami SRE.

Artykuł otrzymano 12 grudnia 2001
Zaakceptowano do druku 20 maja 2002

Piśmiennictwo:

1. Russell D (1992) *Cardiovasc Drugs Ther* 6: 103-110
2. Hinson D D, Chamblis K L, Toth M J, Tanaka R D, Gibson K M (1997) *J Lipid Res* 38: 2216-2223
3. Laufs U, La Fata V, Liao J K (1997) *J Biol Chem* 272: 31725-31729

4. Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quaranto P, Canavaesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A (1998) *Artherosclerosis* **137**: S101-S109
5. Farese R V, Herz J (1998) *Trends in Genetics* **14**: 115-120
6. Fu Q, Goodrum J F, Hayes C, Hostettler J D, Towns A D, Morell P (1998) *J Neurochem* **71**: 549-555
7. Mann R K, Beachy P A (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 188-202
8. Yokoyama S (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 231-244
9. Loirdighi N, Menard D, Delvin E, Levy E (1997) *Am J Physiol* **273**: G62-G67
10. Accad M, Farese R V (1998) *Current Biology* **8**: R601-R604
11. Brown M S, Goldstein J L (1986) *Science* **232**: 43-47
12. Fielding Ch J, Fielding P E (1997) *J Lipid Res* **38**: 1503-1521
13. Lopez D, Chambers Ch M, Ness G C (1997) *Arch Biochem Biophys* **343**: 118-122
14. Griffin M, Frazer A, Johnson A, Collins P, Owens D, Tomkin G H (1998) *Artherosclerosis* **138**: 313-318
15. Wieczorek B, Gniot-Szulżycka J (2000) *Kosmos* **49**: 191-206
16. Schoonjans K, Brendel C, Mangelsdorf D, Auwerx J (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 114-125
17. Edwards P A, Tabor D, Kast H R, Venkateswaran A (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 103-113
18. Brown M S, Goldstein J L (1997) *Cell* **89**: 331-340
19. Nogalska A, Świerczyński J (2001) *Postępy Biochemii* **47**: 160-168
20. Christenson L K, McAllister J M, Martin K O, Javit N B, Osborne T F, Strauss III J F (1998) *J Biol Chem* **273**, 30727-30735
21. Brown M S, Goldstein J L (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11041-11048
22. Edwards P A, Ericsson J (1999) *Annu Rev Biochem* **68**: 157-185
23. Athanikar J N, Osborne T F (1998) *Proc Natl Acad Sci* **95**: 4935-4940
24. Pahl H L (1999) *Physiological Reviews* **79**: 683-701
25. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs M R, Brown M S, Goldstein J L, Wang X (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 11603-11607
26. Tontonoz P, Kim J B, Graves R A, Spiegelman B M (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4753-4759
27. Rawson R B, DeBose-Boyd R, Goldstein J L, Brown M S (1999) *J Biol Chem* **274**: 28549-28556
28. Osborne T F (2000) *J Biol Chem* **275**: 32379-32382
29. Pai J, Guryev O, Brown M S, Goldstein J L (1998) *J Biol Chem* **273**: 26138-26148
30. Magaña M M, Koo S-H, Towle H C, Osborne T F (2000) *J Biol Chem* **275**: 4726-4733
31. Hannah V C, Ou J, Luong A, Goldstein J L, Brown M S (2001) *J Biol Chem* **276**: 4365-4372
32. Hua X, Sakai J, Brown M S, Goldstein J L (1996) *J Biol Chem* **271**: 10379-10384
33. Hua X, Sakai J, Ho Y K, Goldstein J L, Brown M S (1995) *J Biol Chem* **270**: 29422-29427
34. Cheng D, Espenshade P J, Slaughter C A, Jaen J C, Brown M S, Goldstein J L (1999) *J Biol Chem* **274**: 22805-22812
35. Yang T, Goldstein J L, Brown M S (2000) *J Biol Chem* **275**: 29881-29886
36. Sturley S L (2000) *Biochim Biophys Acta* **1529**: 155-163
37. Nohturfft A, DeBose-Boyd R A, Scheek S, Goldstein J L, Brown M S (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11235-11240
38. Scheek S, Brown M S, Goldstein J L (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 11179-11183
39. Swinnen J V, Ulrix W, Heyns W, Verhoeven G (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 12975-12980
40. Thewke D P, Panini S R, Sinensky M (1998) *J Biol Chem* **273**: 21402-21407
41. Mater M K., Thelen A P, Pan D A, Jump D B (1999) *J.Bio.Chem* **274**: 32725-32732
42. Duncan E A, Brown M S, Goldstein J L, Sakai J (1997) *J Biol Chem* **272**: 12778-12785
43. Parraga A, Belloso L L, Ferre-D'Amare A R, Burley S K (1998) *Structure* **4**: 661-672

Rola lipidów błony komórkowej w zjawisku oporności wielolekowej i jego modulacji

The role of cell membrane lipids in multidrug resistance and its modulation

KRYSTYNA MICHALAK¹, ANDRZEJ B. HENDRICH²

Spis treści:

- I. Oporność wielolekowa powstająca w wyniku działania transporterów usuwających leki z komórki
- II. Cechy budowy transporterów związanych z opornością wielolekową i ich lokalizacja w błonie komórkowej
- III. Hipoteza „odkurzacza molekularnego”
- IV. Rola fizycznego stanu błony w modulacji aktywności transportowej glikoproteiny P
 - IV-1. Błona jako środowisko dla dyfuzji leków
 - IV-2. Wpływ stanu fazowego lipidów błonowych na proces transportu leków
 - IV-3. Fenotiazyny jako przykład modulatorów oporności wielolekowej
- V. Zmiany w metabolizmie lipidów w komórkach opornych i wpływ modulatorów na ten metabolizm
 - V-1. Skład lipidowy błon komórek nowotworowych wykazujących oporność wielolekową
 - V-2. Wpływ modulatorów oporności wielolekowej na transport i metabolizm lipidów w komórkach
- VI. Proces chemouczulania a modyfikacja właściwości fazy lipidowej błony komórkowej
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: CDR1, CDR2 — transportery wielolekowe grzybów *Candida albicans*; CPZ — chlorpromazyne; DPPC — dipalmitoylofosfatydylocholina; DPPE — dipalmitoylofosfatydyloetanolamina; DMPC — dimirystoylofosfatydylocholina; DMPE — dimirystoylofosfatydyloetanolamina; LmrA — transporter wielolekowy bakterii *Lactococcus lactis*, bakteryjny homolog ludzkiej glikoproteiny P; MDR — oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*); MRP- białko związane z opornością wielolekową (ang. *multidrug resistance-associated protein*), PA — kwas fosfatydowy; P-gp — glikoproteina P; Pdr5 — transporter z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* związany z plejotropową lekoopornością tych komórek; PS — fosfatydyloseryna; SDS — siarczan dodecyłu sodu.

Contents:

- I. Multidrug resistance generated as a result of activity of transporters that extrude drugs out of cell
- II. Features of structure of multidrug resistance related transporters and their localization in cell membrane
- III. “Vacuum cleaner” hypothesis
- IV. Role of membrane physical state in modulation of P glycoprotein transport activity
 - IV-1. Membrane as a drug diffusion medium
 - IV-2. Influence of phase state of membrane lipids on process of drug transport
 - IV-3. Phenothiazines as an example of multidrug resistance modulators
- V. Alterations in lipid metabolism in resistant cells and influence of modulators on that metabolism
 - V-1. Membrane lipid composition of cell membranes of multidrug resistant cancer cells
 - V-2. Influence of drug resistance modulators on cellular lipid transport and lipid metabolism
- VI. Relation between chemosensitization and modification of properties of cell membrane lipid phase
- VII. Final remarks

I. Oporność wielolekowa powstająca w wyniku działania transporterów usuwających leki z komórki

Istnieje wiele różnorodnych molekularnych mechanizmów powstawania oporności na leki w komórkach bakterii, pasożytów, grzybów i nowotworów. Cechą charakterystyczną komórek przejawiających tzw. oporność wielolekową (ang. *multidrug resistance*, w skrócie — MDR) jest brak wrażliwości na bardzo wiele leków, różniących się znacznie strukturą chemiczną. Jedną z głównych przyczyn oporności wielolekowej w przypadku nowotworów, a także patogennych grzybów, bakterii i pasożytów, jest aktywny transport chemoterapeutyków z wnętrza komórki przez błonę komórkową do środowiska zewnątrzkomórkowego. Za ten proces odpowiadają białka nazywane wielolekowymi transporterami (ang. *multidrug transporters*). Ekspresja transporterów, zaliczanych

¹Prof. dr hab., ²dr, Katedra i Zakład Biofizyki, Akademia Medyczna we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław, e-mail: michalak@biofiz.am.wroc.pl

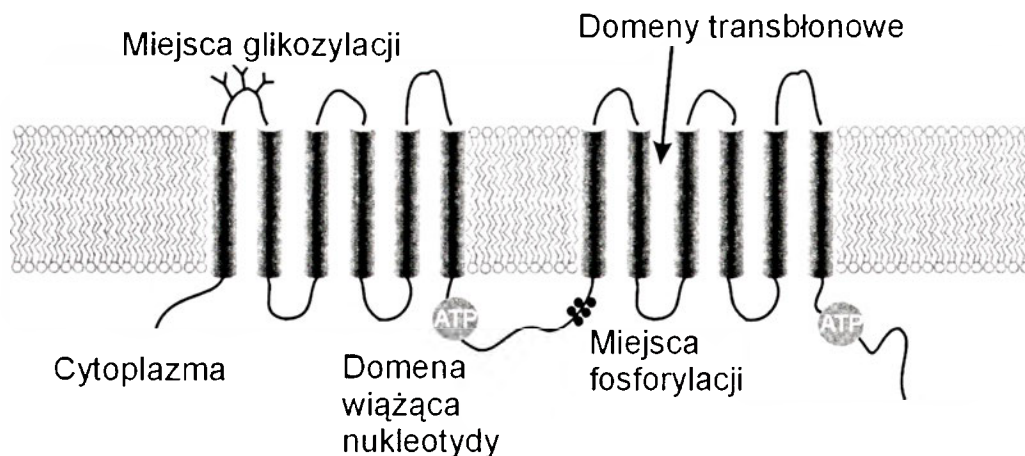
do nadrodziny białek ABC (ang. *ATP-binding cassette*), w błonie komórek opornych jest znacznie zwiększona. Głównymi tego typu transporterami zidentyfikowanymi w komórkach nowotworowych człowieka są glikoproteina P oraz białka typu MRP (białko związane z opornością wielolekową, ang. *multidrug resistance-associated protein*). Z kolei transportery CDR1 i CDR2 obecne w błonach patogennych drożdży *Candida albicans* przyczyniają się do ich oporności na leki przeciwgrzybicze. Transporter Pdr5p z drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* wykazuje w swojej budowie 56% identyczności sekwencji z białkiem CDR1 z *Candida albicans*. Oba białka (Pdr5p i CDR1) posiadają wiele substratów wspólnych z glikoproteiną P, co świadczy o ich funkcjonalnym podobieństwie. Transportery usuwające leki z różnych komórek, pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej a także w topologii, często nie tylko transportują te same substraty, ale również są podatne na działanie tych samych inhibitorów. Może to wskazywać na zbliżony mechanizm transportu i identyfikacji substratów przez różne transportery.

Transportery usuwające leki z komórek, ich substraty i inhibitory (modulatory oporności) oraz lipidy błonowe powiązane są wieloma wzajemnymi zależnościami funkcjonalnymi. Najwięcej prac na ten temat pochodzi z badań nad glikoproteiną P [1], odpowiadającą za najlepiej poznany typ oporności komórek nowotworowych (MDR1). W wielu z nich pokazano, że transportowane leki i modulatory oporności (chemouczulacze) mogą oddziaływać bezpośrednio z glikoproteiną P [2], wpływając na jej aktywność ATPazową. Przypuszcza się, że niektóre modulatory, takie jak werapamil lub cyklosporyna A są transportowane przez glikoproteinę P [3]. Z innych badań wynika jednak, że lipidowa faza błony ma kluczowe znaczenie zarówno dla oporności MDR wynikającej z działania glikoproteiny P, jak i dla modulacji tej oporności przez odpowiednie inhibitory [4]. Działanie chemouczulaczy może być związane zarówno z ich specyficznym wiązaniem z transporterami błonowymi, jak i z niespecyficzną adsorpcją do lipidowej części błony. Jednak rola lipidów w regulacji funkcji transporterów i procesie chemouczulania jest złożona i słabo poznana. Ponieważ substraty transporterów oraz modulatory oporności są na ogół hydrofobowe, a leki prawdopodobnie są przenoszone przez białko transportujące z dwuwarstwy lipidowej, a nie z fazy wodnej [5, 6], lipidowe otoczenie musi mieć ważny wpływ na oddziaływanie leków z glikoproteiną P. Określenie roli fazy lipidowej jest ważne dla zrozumienia mechanizmu działania i funkcji trans-

porterów związanych z MDR. Należy rozpatrzyć oddziaływanie glikoproteina P-lipidy błonowe oraz lipidy-leki (substraty i modulatory). Dotychczas najwięcej prac na temat możliwej roli fazy lipidowej błony komórkowej oraz poszczególnych rodzajów lipidów w zjawisku oporności wielolekowej przeprowadzono w układach modelowych: liposomach i proteoliposomach, w których rekonstruowano glikoproteinę P [7-9]. Chociaż układy takie są uproszczonym modelem błony biologicznej, to jednak badania nad dobrze zdefiniowanymi strukturami lipidowymi zawierającymi oczyszczoną glikoproteinę P, wnoszą ważne informacje na temat oddziaływań tego białka z lipidami. Lipidy o różnej strukturze i właściwościach mogą modulować działanie glikoproteiny P, a także mogą wpływać na wiązanie transportowanego leku z białkiem. Zróżnicowany skład lipidowy błon komórkowych w różnych typach komórek może powodować zależność aktywności glikoproteiny P od rodzaju tkanki. Odrębnym ciekawym zagadnieniem jest przypuszczalna rola glikoproteiny P w transporcie lipidów w komórce [10]. Taka funkcja glikoproteiny P wiązałaby to białko z wieloma procesami komórkowymi, z uwagi na udział lipidów i ich metabolitów w przekazywaniu sygnałów w komórce (np. szlak poprzez pochodne fosfatydyloinozytolu lub sfingolipidów).

II. Cechy budowy transporterów związanych z opornością wielolekową i ich lokalizacja w błonie komórkowej

Pewne fragmenty sekwencji aminokwasowej różnych białek błonowych korzystających z energii ATP przy usuwaniu leków z komórek wykazują znaczne podobieństwo strukturalne i najprawdopodobniej funkcjonalne. Ze względu na te podobieństwa omawiane transportery zaliczane są (razem z kilkuset innymi białkami) do jednej wspólnej nadrodziny białek ABC [11]. Cechami wspólnymi białek z tej nadrodziny jest występowanie w ich strukturze domen wiążących nukleotydy (ang. *nucleotide binding domain* — NBD) oraz obecność domen transbłonowych. Domeny takie posiada także w swojej strukturze glikoproteina P. Jak pokazano na rycinie 1, glikoproteina P zawiera dwie domeny wiążące ATP ulokowane w pętlach znajdujących się po cytoplazmatycznej stronie błony oraz dwie domeny transbłonowe, z których każda składa się z sześciu segmentów [12, 13]. Obecność domen transbłonowych wskazuje, że glikoproteina P (podobnie jak inne transportery) jest integralnym białkiem błonowym, a co za tym idzie



Ryc. 1. Schemat struktury glikoproteiny P jako przykład budowy wielolekowego transportera.

stan fizyczny otoczenia lipidowego może wpływać na jego zdolność do transportowania leków.

W transporterach usuwających leki z komórki, domeny zaangażowane w wiązanie leków są przypuszczalnie zlokalizowane w segmentach transbłonowych tych białek integralnych, jak to wykazano w przypadku glikoproteiny P [14]. W związku z tym jest bardzo prawdopodobne, że oddziaływanie leku z fazą lipidową będzie wpływać na oddziaływanie glikoproteiny P-lek, co z kolei będzie mieć istotne znaczenie dla transportu leku przez to białko.

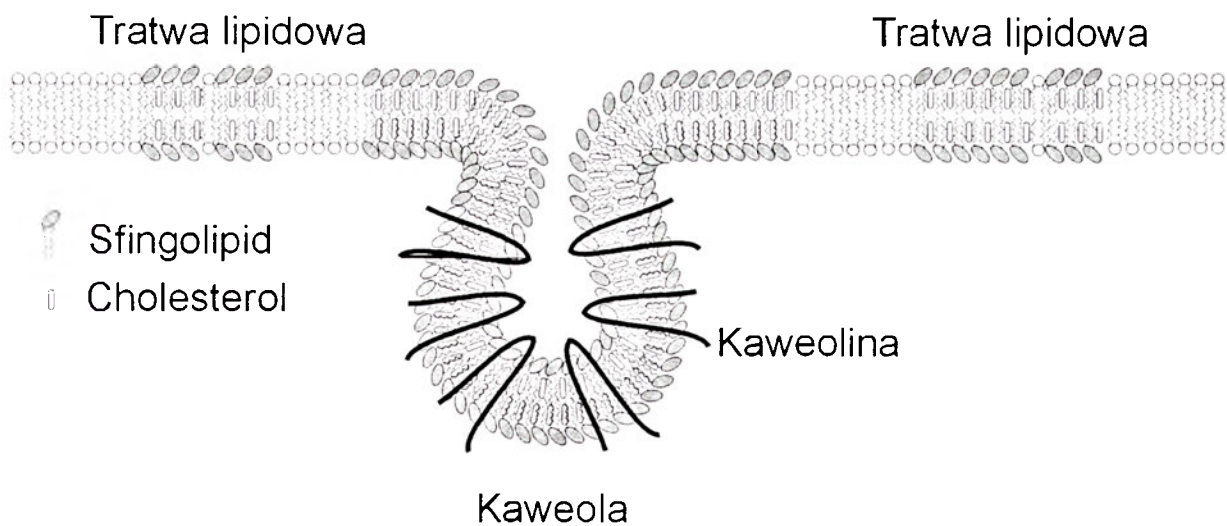
Prosta rola lipidów błonowych, jaką jest tworzenie amfipatycznej dwuwarstwy otaczającej komórki i organelle oraz blokującej przepływ hydrofilowych związków, nie wymagałaby tak dużej różnorodności lipidów, jaka występuje w błonach biologicznych. Badania prowadzone w ostatnich latach zaczynają wyjaśniać niektóre konsekwencje funkcjonalne heterogenności lipidów. Jedną z nich jest możliwość nieprzypadkowego mieszania się lipidów w dwuwarstwie i tworzenie lipidowych mikrodomen [15], wyraźnie różniących się składem od swojego otoczenia i odpornych na rozpuszczanie detergentami. Istnienie takich mikrodomen, zawierających dużą ilość cholesterolu i glikosfingolipidów [16] wykazano w błonach komórek wielu typów — np. erytrocytów [17], komórek nabłonka [18], komórek mięśniowych [19] czy neuronów [20]. Mikrodomeny mogą tworzyć w błonie tzw. „tratwy lipidowe” (ang. *lipid rafts*) oraz silnie zakrzywione wgłębienia zwane kaweolami [21]. Trwałość tych wgłębieni jest stabilizowana m.in. przez integralne białko błonowe zwane kaweoliną, które wiąże cholesterol i oddziałuje z innymi białkami obecnymi w kaweolach [22]. Schemat błony zawierającej zarówno „tratwy lipidowe”, jak i kaweole przedstawiony jest na rycinie 2. Przypuszcza się, że struktury tego typu mogą uczestniczyć zarówno w procesach przekazywania sygnałów, jak i w

gospodarce lipidowej [23, 24]. Mikrodomeny mogą być miejscem skupiania się białek zaangażowanych w określony proces [25, 26]. Istnieją też przesłanki by sądzić, iż glikoproteina P jest tego typu białkiem i znaczna jej część jest ulokowana w błonie właśnie w strukturach typu *caveolae* [27, 28].

III. Hipoteza „odkurzacza molekularnego”

Wiadomo, że glikoproteina P jest białkiem o szerokiej substratowej specyficzności [29]. Wydaje się, że jedyną wspólną cechą transportowanych substancji, jak też chemouczulaczy, jest ich stosunkowo duża hydrofobowość. Leki przeciwnowotworowe oraz leki stosowane do zwalczania chorób infekcyjnych, a także inhibitory transporterów związanych z MDR, należą najczęściej do związków o znacznej hydrofobowości i przemieszczają się przez błonę z zewnątrzkomórkowego do wewnątrzkomórkowego środowiska w wyniku biernej dyfuzji (na skutek istnienia gradientu ich potencjału chemicznego lub elektrochemicznego przez błonę) [30, 31].

Wiele dowodów eksperymentalnych wskazuje na to, że glikoproteina P rozpoznaje swoje substraty, gdy znajdują się one w błonie komórkowej. Dowodzi tego między innymi eksperyment, w którym pokazano przeniesienie energii z daunorubicyny (fluoryzujący substrat glikoproteiny P), na światłoczułą pochodną azydkową (azydek jodonaftalenu), którym znakowane było to białko transportujące [6]. O oddziaływaniu substratów z transporterem we wnętrzu błony świadczą również wyniki badań nad transportem znaczników fluorescencyjnych przez błony, w których występowały takie transportery jak glikoproteina P lub transporter LmrA bakterii *Lactococcus lactis*. Wykazano, że estry acetoksymetylowe niektórych znaczników fluorescencyjnych będące substratami badanych transporterów są usuwane z



Ryc. 2. Domeny lipidowe typu tratwa lipidowa oraz kaweola.

błon zanim osiągną cytoplazmę, w której byłyby hydrolizowane przez wewnątrzkomórkowe esterazy [32, 33]. Ostatnio wykryto ciekawe cechy struktury białka oporności wielolekowej w komórkach *Bacillus subtilis*, w trakcie badań nad czynnikiem transkrypcyjnym BmrR, który po związaniu leku indukuje ekspresję transportera Bmr. Stwierdzono, że cechą charakterystyczną struktury Bmr jest obecność dużej hydrofobowej kieszeni [34], co prawdopodobnie jest bardzo istotne dla możliwości rozpoznawania wielu strukturalnie różnych związków przez jedno białko.

Hydrofobowa natura substratów i eksperymentalne dowody, że rozpoznawanie substratu ma miejsce na poziomie transbłonowych segmentów glikoproteiny P prowadzi do hipotezy działania tego białka jako hydrofobowego „odkurzacza molekularnego”. Zgodnie z tą koncepcją, glikoproteina P (oraz najprawdopodobniej również inne transportery odpowiedzialne za MDR) „wyciąga” leki bezpośrednio z błony i transportuje je aktywnie na zewnątrz komórki [6]. Pomimo, że istnieje jeszcze kilka innych hipotez dotyczących sposobu działania glikoproteiny P, hipotezę odkurzacza molekularnego potwierdzają wyniki licznych najnowszych prac eksperymentalnych [35].

Na rycinie 3 przedstawiony jest schemat działania wielolekowego transportera oraz przypuszczalna rola, jaką mogą pełnić związki przyczyniające się do modulacji jego zdolności transportowej. Zgodnie z tym modelem cząsteczki leku, biernie przenikające przez błonę w kierunku cytoplazmy, są wiązane przez białko w obrębie hydrofobowej części dwuwarstwy lipidowej i następnie dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP są transportowane z powrotem na zewnątrz komórki. Zdolność transportowa białka może zostać zmniejszona hipotetycznie na kilka sposobów:

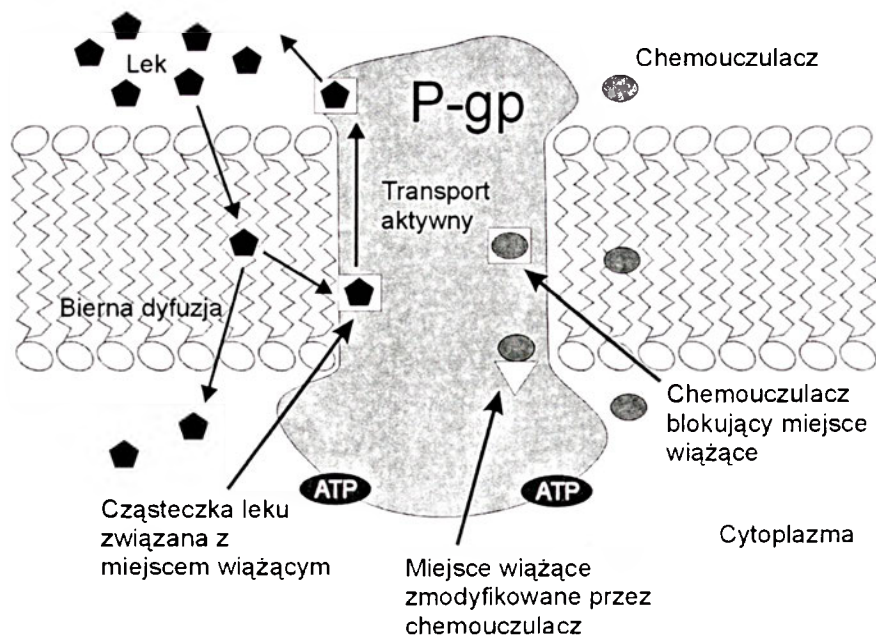
- wszelkie zmiany właściwości fazy lipidowej błony, traktowanej jako środowisko, w którym zachodzi dyfuzja leku, mogą zmieniać prawdopodobieństwo kontaktu lek-białko,
- zmiany właściwości środowiska lipidowego, w którym zanurzone jest białko mogą wpływać na jego zdolności transportowe,
- miejsca wiążące leki mogą zostać bezpośrednio zablokowane cząsteczkami związków działających jako chemouczulacze,
- cząsteczki chemouczulaczy mogą oddziaływać z białkiem transportującym i indukować zmiany konformacji białka, zmieniając jednocześnie jego zdolność do wiązania leków.

Hipoteza „molekularnego odkurzacza” pozwala na wyjaśnienie roli, jaką w modulacji oporności wielolekowej oraz w regulacji różnych funkcji wielolekowych transporterów pełni faza lipidowa błon. Jak pokazano poniżej, istnieje wiele faktów doświadczalnych bezpośrednio lub pośrednio potwierdzających słuszność tego modelu.

IV. Rola fizycznego stanu błony w modulacji aktywności transportowej glikoproteiny P

IV-1. Błona jako środowisko dla dyfuzji leków

Zarówno substraty glikoproteiny P jak i chemouczulacze mają bardzo często charakter lipofilowych słabych zasad. Przenikanie tego typu hydrofobowych cząsteczek przez błonę zależy od błonowego współczynnika podziału pomiędzy fazą wodną i lipidową. Dyfuzja i lokalizacja w błonie zależą od wielu parametrów, takich jak właściwości struktury lipidowej (typ główki polarnej, struktura łańcuchów kwasów tłuszczowych, stan fizyczny dwuwarstwy) i



Ryc. 3. Schemat działania „odkurzacza molekularnego”.

skład wodnego roztworu otaczającego dwuwarstwę. Zasadowe leki mogą ponadto występować w dwóch różnych formach — neutralnej i dodatnio naładowanej (protonowanej). Te dwie postacie cząsteczek prawdopodobnie mają różne współczynniki podziału i różną lokalizację w lipidowej dwuwarstwie. Stężenie każdej z form przy powierzchni błony zależy nie tylko od pH i jonowego składu fazy wodnej, ale również od właściwości biofizycznych granicy faz (interfazy), takich jak lokalna stała dielektryczna czy potencjał błonowy. W formie nienaładowanej związki te łatwo przenikają przez błonę lipidową, forma protonowana w niewielkim stopniu wnika do błony. Natomiast trwale naładowane leki kationowe mają często taką strukturę, że ładunek jest zdelokalizowany lub osłonięty lipofilowymi resztami, co ułatwia ich dyfuzję przez błonę.

Obserwowana wypadkowa szybkość transportu przez błonę zawierającą glikoproteinę P jest wynikiem dwóch procesów: aktywnego transportu do środowiska zewnętrznego oraz biernej dyfuzji zgodnie z gradientem stężenia. Rolę biernej dyfuzji leków w błonach komórek z opornością MDR potwierdza zależność pomiędzy lipofilnością cząsteczek a ich efektywnością w charakterze chemouczulaczy, co wykazano na przykładzie homologicznej serii prostych, aromatycznych związków [36]. W cytowanej pracy pokazano, że istnieje granica lipofilności, poniżej której komórki nie reagują na cząsteczki chemouczulacza.

Oddziaływanie chemouczulaczy z dwuwarstwami lipidowymi badano między innymi w przypadku fenotiazyn, leków należących do środków psychotropowych, będących równocześnie efektywnymi mo-

dulatorami MDR. Pokazano, że chloropromazyna (CPZ), amfipatyczny kationowy lek z tej grupy związków wbudowuje się w lipidową dwuwarstwę liposomów ze współczynnikiem podziału zależnym od długości acylowego łańcucha lipidu i zaburza ją w sposób zależny od fosfolipidowej grupy polarnej [37]. Wykazano również, że powierzchnia przypadająca w błonie na cząsteczkę fosfatydyloseryny (PS) ulega podwojeniu, gdy chloropromazyna wbudowuje się do liposomów. Wpływ chloropromazyny na błony utworzone z mieszaniny lipidów DPPC/DMPC, które nie noszą ładunku elektrycznego netto jest niewielki i wskazuje na słabe oddziaływanie chloropromazyny z nienaładowanymi cząsteczkami fosfolipidów [37].

Rola protonowania w oddziaływaniach modulatorów MDR z błonami badana była w przypadku innego reprezentanta fenotiazyn — trifluoperazyny. Wykazano, że postać neutralna tego leku, jako bardziej hydrofobowa, lepiej wbudowuje się w błony erytrocytów [38].

Chemouczulacze mogą wpływać na wiązanie substratów glikoproteiny P z błoną oraz na ich dyfuzję przez błonę. Wykazano to na przykładzie werapamilu (inhibitor glikoproteiny P), który zwiększa szybkość dyfuzji dokсорubicyny (substrat glikoproteiny P) przez błony liposomów [30]. Chemouczulacze mogą zatem zwiększać szybkość wpływu substratów glikoproteiny P do komórki na drodze biernej dyfuzji, co dzięki skróceniu czasu pobytu leku w błonie pozwala tym ostatnim na „ucieczkę” przed wypompowaniem przez ten transporter. Dzięki temu stężenie leku wewnątrz komórki staje się większe. Stwierdzono, że niektóre modulatory — kationowe leki lipofilne —

mają zdolność do indukowania przepływu barwnika (*Sulphan blue*) poprzez błony jednowarstwowych pęcherzyków formowanych z ujemnie naładowanych lipidów [39]. Indukowanie tego przepływu pod wpływem poszczególnych związków zwiększało się znacznie ze wzrostem współczynnika podziału oktanol/bufor. Zmianę przepuszczalności liposomów pod wpływem kilku chemouczulaczy (rezerpiny, werapamilu, chininy i kolchicyny) wykazano również badając wpływ tych substancji na bierny transport znacznika fluorescencyjnego — karboksylfluoresceiny [40]. Modulatory mogą indukować w błonach modelowych powstawanie lipidowej nie dwuwarstwowej fazy heksagonalnej H_{II} [41]. Wśród znanych wcześniej czynników, które wpływają na przejścia dwuwarstwa — struktury nie dwuwarstwowe są: temperatura, skład lipidowy, lokalne anestetyki i kationy dwuwartościowe. Wykazano, że chloropromazyna, chemouczulacz z grupy fenotiazyn, może indukować powstawanie fazy H_{II} w błonach modelowych zawierających kwas fosfatydowy (PA) [41].

Rozpatrując związek pomiędzy strukturą leków a ich zdolnością do wiązania się z białkami błonowymi, trzeba wziąć pod uwagę lokalne otoczenie lipidowe, w którym wiązanie takie zachodzi. Przy wyznaczaniu stałej dysocjacji K_d lek-białko transportujące należy rozważyć stężenie leku w dwuwarstwie lipidowej błony [42]. Obserwując wiązanie leków z oczyszczoną glikoproteiną P w obecności różnych fosfolipidów, stwierdzono, że w przypadku winblastyny stała dysocjacji K_d lek-białko transportujące zmienia się znacznie w zależności od otoczenia lipidowego [43]. Zmiany stałej K_d mogą odzwierciedlać różnice w zdolności leków do wbudowywania się do fazy lipidowej. Powinowactwo wiązania winblastyny z glikoproteiną P jest odwrotnie proporcjonalne do współczynnika podziału tego leku pomiędzy fazą wodną a lipidową. Glikoproteina P w rzeczywistości „widzi” swoje substraty umieszczone w lipidowej dwuwarstwie. Białko to może mieć stosunkowo niskie powinowactwo do swoich substratów, ale jest to kompensowane przez lipidową dwuwarstwę, która koncentruje leki, „prezentując” je białku.

W przypadku oddziaływań lek-błona małe modyfikacje w strukturze związków (substratów P glikoproteiny) należących do tej samej rodziny chemicznej mogą prowadzić do istotnej zmiany oddziaływań z lipidową dwuwarstwą, co zaobserwowano na przykład w przypadku antracyklin [44]. Różna lokalizacja i współczynnik podziału w błonie mogą z kolei zmieniać dostęp leku do miejsca wiązania z białkiem lub spowodować wiązanie się leku z innym fragmentem białka.

IV-2. Wpływ stanu fazowego lipidów błonowych na proces transportu leków

Z uwagi na zanurzenie wielolekowych transportatorów w środowisku lipidowym błony, oraz ze względu na hydrofobowość ich substratów, wydaje się oczywiste, że fosfolipidy muszą odgrywać ważną rolę w modulowaniu zarówno ATPazowej aktywności, jak i transportowych właściwości glikoproteiny P.

Integralne białka błonowe wymagają zwykle dla swojej funkcjonalnej aktywności minimalnej liczby zasocjowanych z nimi fosfolipidów. ATPazowa aktywność glikoproteiny P zostaje zniesiona przy całkowitym usunięciu jej lipidowego otoczenia za pomocą Tritonu X-100 lub deoksychololu [45]. Ponowne umieszczenie uprzednio wyizolowanej glikoproteiny P w otoczeniu różnych fosfolipidów przywraca aktywność tego białka w różnym stopniu, np. azolektyna — mieszanina fosfolipidów z ziaren soi przywraca 84% pierwotnej aktywności, fosfatydylocholina z żółtek jaja kurzego — 95%, a stosunkowo płynny w pokojowej temperaturze, syntetyczny lipid — dimirystylofosfatydylocholina (DMPC) — 62%. W przeciwieństwie do tego lipidy o wysokiej temperaturze topnienia takie jak: dipalmitylofosfatydylocholina (DPPC), dimirystylofosfatydyloetanolamina (DMPE) czy dipalmitylofosfatydyloetanolamina (DPPE) nie przywracają glikoproteinie P jej aktywności. W temperaturze pokojowej, a więc takiej w jakiej prowadzono powyższe eksperymenty, lipidy te znajdują się w stanie żelu i cechują się stosunkowo małą płynnością. Dane te wskazują, że glikoproteina P dla swojej aktywności ATPazowej potrzebuje w najbliższym otoczeniu obecności fosfolipidów charakteryzujących się dużą płynnością.

Wiadomo, że na płynność dwuwarstwy lipidowej duży wpływ mogą wywierać nawet sublimityczne ilości działających na nią detergentów. Już w latach siedemdziesiątych stwierdzono, że *Tween 80* może uczulać na leki komórki odporne [46]. Kilka niejonowych detergentów, w szczególności z grupy polioksyetylenów moduluje cytotoksyczność i/lub akumulację związków przeciwnowotworowych w opornych komórkach nowotworowych. Przyjmuje się, że w odwracaniu oporności MDR przez detergenty ma znaczenie ich wpływ na fazę lipidową błony, chociaż możliwe jest również specyficzne oddziaływanie z glikoproteiną P.

W innych badaniach [47] wykazano, że lipidy są zdolne nie tylko do przywracania katalitycznej aktywności po uprzedniej delipidacji detergentem, ale również do ochrony glikoproteiny P przed termiczną inaktywacją. Pokazano, że przed inaktywacją najle-

piej chronią fosfatydyloetanoloaminy (PE) z nasyconymi łańcuchami — dimirystylofosfatydyloetanoloamina (DMPE) i dipalmitylofosfatydyloetanoloamina (DPPE).

Aktywność glikoproteiny P wydaje się szczególnie wrażliwa na rodzaj i stan fizyczny dwuwarstwy lipidowej w całej objętości błony (nie tylko w najbliższym otoczeniu białka). Egzogenne fosfolipidy modułują ATPazową aktywność glikoproteiny P. Obserwowano inhibicję jej ATPazowej aktywności przy wzroście płynności lipidowej dwuwarstwy. Zależność ATPazowej aktywności glikoproteiny P od składu lipidowego w całej objętości błony może odzwierciedlać zmiany konformacyjne indukowane w transbłonowej części glikoproteiny P w danym środowisku lipidowym, przenoszone następnie do miejsc wiązania ATP. Wrażliwość ATPazowych domen glikoproteiny P na stan fazowy dwuwarstwy, w którą białko jest wbudowane [45] pozwala sądzić, że domeny te mogą być ściśle zasocjowane z dwuwarstwą lipidową. Zależność aktywności glikoproteiny P od płynności otaczającej ją dwuwarstwy lipidowej odbiega od zwykle obserwowanej dla innych transporterów. W przypadku wielu pomp i enzymów energia aktywacji jest mniejsza, gdy dwuwarstwa lipidowa, w której są zanurzone, znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej. Glikoproteina P natomiast efektywniej hydrolizuje ATP, gdy jest wbudowana w dwuwarstwę będącą w stanie żelu. Stan fazowy wpływa również na szybkość pompowania leków i jest ona większa w stanie żelu [45]. Wykazano, że dodanie związku upłynniającego dwuwarstwę (alkohol benzylowy) powoduje 2-4 krotne zmniejszenie zdolności glikoproteiny P do transportu daunorubicyny i winblastyny [48]. Wzrost zdolności transportowych glikoproteiny P w obecności mniej płynnych lipidów jest cechą zadziwiającą. Większość błonowych białek transportujących efektywniej działa w otoczeniu lipidów w fazie płynnej, a kilka z nich traci zdolność transportową, gdy lipidowa matryca jest w stanie żelu. Glikoproteina P jest zatem niezwykłym transporterem, którego funkcja jest modulowana przez lipidy w nieznanym dotąd sposób. Modulujący wpływ na aktywność glikoproteiny P może wywierać cholesterol. Lipid ten może wpływać na funkcję białka błonowego przez zmianę fizycznych właściwości lipidowej dwuwarstwy (w całej jej objętości) lub przez działanie przy interfacie lipid-białko. Inne transportery ABC zaangażowane w MDR np. w *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* są również wrażliwe na skład lipidowego otoczenia, a w szczególności na zawartość cholesterolu [49,50].

IV-3. Fenotiazyny jako przykład modulatorów oporności wielolekowej

Fenotiazyny oddziałują z receptorami komórek układu nerwowego, m.in. z receptorami dopaminowymi i receptorami serotoniny. Ostatnio wykazano również, że chloropromazyna silnie hamuje prądy postsynaptyczne wywołane wiązaniem kwasu γ -aminomasłowego (GABA) z jego receptorem [51]. Fenotiazyny oddziałują również z białkami tworzącymi kanały jonowe w błonach, na przykład z kanałami potasowymi i sodowymi. Oprócz tego jednak fenotiazyny, tioksanteny i związki podobne do nich strukturalnie są szczególnie silnymi modulatorami MDR, co wykazano w kilku opornych liniach komórek nowotworowych [52-54]. Istotny wpływ na zdolność hamowania przez nie transportowej aktywności glikoproteiny P mają następujące właściwości strukturalne: hydrofobowy trójcykliczny pierścień, dodatnio naładowana trzeciorzędowa amina oraz wprowadzenie reszty aminowej do formy cyklicznej [55, 56]. Analiza zdolności do redukcji oporności wielolekowej przez 232 fenotiazyny w opornych mysich komórkach białaczkowych P388/DOX potwierdziła istotność wymienionych cech strukturalnych [57]. Wykazano, że jedna z fenotiazyn — trifluoperazyna — oprócz tego, że hamuje aktywność pompowania leków przez glikoproteinę P w komórkach nowotworowych, jest również inhibitorem transportu rodamiны 6G (substrat glikoproteiny P) przez białko Pdr5p — funkcjonalny homolog glikoproteiny P z drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* [58]. Okazało się, że wiele związków mających zdolność odwracania oporności wielolekowej w komórkach nowotworowych, a także wiele leków przeciwnowotworowych, jest silnymi inhibitorami transportu rodamiны 6G przez Pdr5p. Wskazuje to na funkcjonalne podobieństwo pomiędzy glikoproteiną P a Pdr5p [58].

W przypadku modulowania oporności wielolekowej przez fenotiazyny i ich pochodne, a także inne chemouczulacze, ich wpływ na właściwości lipidowej fazy błony może mieć istotny wkład do molekularnych mechanizmów redukcji oporności wielolekowej. Fenotiazyny wywierają istotny wpływ na dwuwarstwę lipidową, jak wykazano to między innymi w badaniach własnych autorów pracy. Wpływają one na płynność lipidów błonowych w błonach modelowych i naturalnych [59], obniżają temperaturę i entalpię przejścia fazowego żel-ciekły kryształ oraz mogą indukować separację faz w układach lipidowych [60].

V. Zmiany w metabolizmie lipidów w komórkach opornych i wpływ modulatorów na ten metabolizm

V-1. Skład lipidowy błon komórek nowotworowych wykazujących oporność wielolekową

W komórkach linii wyselekcjonowanych poprzez ekspozycję na leki cytotoksyczne obserwuje się zmiany w składzie lipidowym błon plazmatycznych. Mogą to być zmiany w zawartości neutralnych lipidów, fosfolipidów lub kwasów tłuszczowych [61-63]. Trudno jednoznacznie określić, czy obserwowane modyfikacje struktury lipidów błonowych są związane z nadekspresją glikoproteiny P, czy też są niezależną konsekwencją procedury selekcyjnej poprzez ekspozycję komórek na leki [64]. Metabolizm lipidów w komórkach nowotworów różnych typów jest na ogół zaburzony, a rozwój oporności może pogłębiać te zaburzenia [65].

Zmiany w składzie lipidowym błon towarzyszące pojawieniu się oporności na leki są różne w różnych komórkach. Na przykład w komórkach P388 mysiej białaczki, wyselekcjonowanych za pomocą adriamycyny, stwierdzono zwiększone ilości fosfatydylocholine oraz sfingomieliney [66]. Użycie dipiridamolu zamiast adriamycyny prowadziło do zwiększenia ilości fosfatydyloseryny i zmniejszenia ilości fosfatydyloetanoloaminy w komórkach P388. W tym samym rodzaju komórek selekcjonowanych za pomocą daunomycyny stwierdzono natomiast zmniejszoną ilość fosfatydyloseryny [67].

Przy zastosowaniu jądrowego rezonansu magnetycznego ^1H NMR zaobserwowano różnice pomiędzy fragmentami widma pochodzącymi od lipidów w przypadku komórek K562 wrażliwych i opornych na działanie adriamycyny [64]. Natężenie sygnału pochodzącego od kwasów tłuszczowych było znacznie wyższe w komórkach wrażliwych niż w opornych. W komórkach opornych stwierdzono wzrost natężenia sygnałów pochodzących od fosfatydyloinozytolu i cholesterolu. Wzrost zawartości zarówno cholesterolu, jak i fosfolipidów wykryto także w lekoopornych białaczkowych limfoblastach T, wyselekcjonowanych za pomocą winblastyny [68].

W nowotworowych komórkach opornych na leki obserwuje się również znacznie zmieniony metabolizm ceramidów i glikolipidów (przede wszystkim glikosfingolipidów) w porównaniu z komórkami nie wykazującymi oporności [21,77], co również wpływa na występowanie różnic w składzie lipidowym błon komórek wrażliwych i opornych.

V-2. Wpływ modulatorów lekooporności na transport i metabolizm lipidów w komórkach

Chemouczulanie komórek opornych może prowadzić do zmian w ilości niektórych fosfolipidów w komórkach, jak to stwierdzono w komórkach P388 [66]. W reakcji na działanie leków odwracających oporność komórek, takich jak: werapamil, tamoksyfen i dipirydamol stwierdzono wzrost syntezy fosfatydylocholine w komórkach opornych i brak takich zmian w komórkach wrażliwych na leki.

Niektóre modulatory oporności wielolekowej wpływają na szlaki metaboliczne lipidów; przykładem takim mogą być tamoksyfen, werapamil i cyklosporyna A, które hamują glikozylację ceramidu. Zmiany w biosyntezie lipidów pod wpływem modulatorów dotyczą na ogół właśnie glikolipidów i sfingolipidów. PCS833, silny chemouczulacz będący pochodną cyklosporyny, aktywuje syntezę ceramidu i zwiększa jednocześnie wrażliwość komórek nowotworowych (KBV1) na winblastynę [69]. Chloropromazyna działając na komórki wywiera wpływ na enzymatyczne przemiany kwaśnych fosfolipidów. Jednak nie da się wytłumaczyć wszystkich obserwowanych zmian jedynie poprzez bezpośrednie oddziaływanie modulatora z enzymami katalizującymi poszczególne etapy przemian. Jest bardziej prawdopodobne, że chloropromazyna wpływa na fizyczne rozmieszczenie substratów w stosunku do enzymów w błonie, przy czym zjawisko to określane jest jako prezentacja substratu [37].

Na kolejne istotne powiązania pomiędzy występowaniem oporności z nadekspresją w błonie komórkowej glikoproteiny P a lipidami wskazuje zdolność glikoproteiny P do transportu lipidów [70]. Nie wiadomo, czy lipidy z długimi łańcuchami reszt kwasów tłuszczowych są transportowane przez glikoproteinę P, wykazano natomiast, że glikoproteina P transportuje krótkołańcuchowe analogi fosfolipidów, akumulując je w zewnętrznej warstwie dwuwarstwy lipidowej [71]. Glikoproteina P transportuje również krótkołańcuchowe analogi sfingomieliney i glukozylceramidu [77]. Podobne obserwacje poczyniono również w przypadku innych transporterów odpowiadających za oporność wielolekową np. w komórkach drożdży — w transport lipidów są prawdopodobnie zaangażowane transportery Pdr5, Yor1p, CDR1 [72].

Niektóre badania wskazują, że glikoproteina P może brać także udział w transporcie steroli z błony plazmatycznej do retikulum endoplazmatycznego, kontrolując estryfikację cholesterolu i jego biosynte-

zę [73, 74]. Sterole często są substratami glikoproteiny P bądź modulatorami MDR. Wykazano, że określone mutacje w strukturze glikoproteiny P prowadzą do utraty jej zdolności do rozpoznawania steroli i ich transportu [75, 76].

VI. Proces chemouczulania a modyfikacja właściwości fazy lipidowej błony komórkowej

Modulatory MDR działają często poprzez specyficzne hamowanie glikoproteiny P [3, 56]. Lipidowa faza błony nie może jednakże być pominięta w badaniach nad mechanizmem działania modulatorów. Chinidyna i *trans*-flupentiksol są bardziej aktywne jako modulatory MDR niż ich odpowiednie stereoizomery. Taką stereospecyficzność związków chiralnych przypisuje się zwykle specyficzności wiązania stereoizomerów z określonymi miejscami w łańcuchach peptydowych białek. Jednakże obydwa stereoizomery flupentiksolu (*trans*- i *cis*-) w równym stopniu hamują przyłączanie azydopiny do glikoproteiny P, co przemawia przeciwko różnym miejscom wiązania tych izomerów w cząsteczce transportera. Za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego i skaningowej kalorymetrii różnicowej wykazano natomiast, że *trans*- i *cis*-flupentiksol mogą oddziaływać z lipidami, fosfatydylocholiną i fosfatydyloseryną w sposób zależny od ich stereoizomerii [78]. Fakt ten przemawia za koniecznością uwzględnienia roli oddziaływania modulatorów MDR z lipidami w procesie chemouczulania komórek.

Modulatory oporności wielolekowej ze względu na swoją hydrofobowość wnikają do lipidowej dwuwarstwy błony i oddziałują z jej składnikami. Niezbędne jest dokładne poznanie lokalizacji modulatorów w błonie oraz dyfuzyjnych charakterystyk w badanym układzie. Łatwość wnikania do błony jest istotnym warunkiem rozpoznania substratów, czy też przypominających je inhibitorów, przez transportery związane z opornością wielolekową MDR. Wykazano na przykład korelację pomiędzy hydrofobowością modulatorów transportera Pdr5p a ich stężeniem hamującym do połowy aktywność tej pompy [58]. Wiele danych doświadczalnych wskazuje na związek pomiędzy hydrofobowością modulatorów z ich zdolnością do odwracania oporności wielolekowej komórek nowotworowych [79].

Nadekspresja glikoproteiny P wraz ze wszystkimi jej skutkami, jak na przykład zaburzenia w strukturze i funkcji błony, jest jedynie jednym z elementów plejotropowych zmian obserwowanych w opornych ko-

mórkach nowotworowych. Opracowanie strategii postępowania mającej na celu zwiększenie skuteczności chemioterapii wymaga zrozumienia molekularnych podstaw tych plejotropowych zmian w błonach komórek opornych. Należą tu m.in. zmiany przepuszczalności, składu lipidowego lub stanu fazowego lipidów błon komórkowych.

Rekonstytucja oczyszczonej glikoproteiny P w pęcherzykach lipidowych o określonym składzie wpływa na przejścia fazowe w znacznej liczbie otaczających ją lipidów, co pokazano metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej [43]. Ze wzrostem zawartości glikoproteiny P w błonie, następuje przesunięcie temperatury przejścia fazowego lipidów w stronę niższych temperatur oraz znaczne obniżenie kooperatywności topnienia lipidów, czyli zmniejszenie tej frakcji cząsteczek lipidowych, które jednocześnie podlegają przejściu fazowemu. Pokazano, że wbudowaniu P-gp do liposomów towarzyszy wzrost płynności błony i zwiększenie jej przepuszczalności. Efekty te są częściowo zmniejszane przez obecność w błonie cholesterolu — zwiększanie jego zawartości w błonie do 30% wagowych wywołuje zmniejszenie płynności dwuwarstwy lipidowej oraz jej przepuszczalności [80].

W przypadku silnie opornych komórek, w których glikoproteina P stanowi ponad 20% białka błonowego, zaburzenie fazy lipidowej wywołane jej obecnością wpływa silnie na biofizyczne właściwości lipidowej dwuwarstwy, co z kolei może zmieniać transportowe funkcje glikoproteiny P [43].

Stosując znaczniki fluorescencyjne, wykazano [82], że gęstość upakowania zewnętrznej monowarstwy lipidowej błony plazmatycznej jest znacznie większa w komórkach opornych niż w komórkach wrażliwych. Obecność glikoproteiny P prowadzi wprawdzie do zmiany upakowania lipidów błonowych, lecz nie zaobserwowano zmian całkowitej mikrolepkości błony.

Niektóre chemouczulacze zwiększają cytotoksyczność i akumulację czynników przeciwnowotworowych w określonych liniach komórkowych nie wykazujących oporności lub w komórkach z MDR nie wykazujących ekspresji glikoproteiny P. Takie działanie modulatorów można, przynajmniej częściowo, wiązać ze zmianami metabolizmu lipidowego lub/i niezależnymi zmianami właściwości błon np: płynności czy przepuszczalności. Wykazano, że zdolność niektórych związków do modulowania MDR jest skorelowana z ich zdolnością do indukowania wpływu rodamininy 6G z liposomów oraz hamowania wiązania tego znacznika z błoną, a także z ich zdolnością do oddziaływania z anionowym deter-

gentem SDS [83]. W wielu badaniach wykazano, że chemouczulacz mogą albo zwiększać albo zmniejszać uporządkowanie lipidów w błonach komórek z opornością MDR lub w izolowanych frakcjach błonowych.

Modyfikacja składu lipidowego błony może uczulać komórki odporne bez specyficznej inhibicji glikoproteiny P. Udowodniono, że związki lub warunki hodowli komórek, które modyfikują właściwości lipidowej dwuwarstwy, uczulają komórki odporne, przywracając akumulację przez nie leków [84]. Wykazano, że liposomy mogą przywracać akumulację winblastyny w komórkach opornych i przyjmuje się, że efekt ten pochodzi z modyfikacji lipidowego składu błony komórkowej w wyniku fuzji z liposomami.

Rolę stanu fizycznego lipidów błonowych w redukcji oporności wielolekowej w liniach komórek nowotworowych wykazano przy wykorzystaniu ważnej klinicznie klasy nietoksycznych surfaktantów, takich jak: *Solutol HS-15*, *Tween 40* lub *Cremophor EL*. Surfaktanty te obniżają płynność lipidów błonowych i może to być ważny mechanizm niwelowania oporności przez te polioksyetylenowe związki [85].

Zaobserwowano, że zdolność do zmiany biofizycznych właściwości błony przez niektóre substancje wiąże się często z inhibicją wzrostu komórek opornych w ich obecności [86]. Określone warunki hodowli i niektóre substancje są bardziej toksyczne dla komórek z opornością wielolekową niż dla wrażliwych linii rodzimych. Zjawisko to, nazwane hyper- lub kolateralną wrażliwością, wykryto w komórkach opornych w obecności werapamilu, lokalnych anestetyków, detergentów i długołańcuchowych nienasyconych kwasów tłuszczowych [81]. Ponieważ stwierdzono, że wśród tych związków są też takie, które nie oddziałują bezpośrednio z glikoproteiną P, można sądzić, że kolateralna wrażliwość może być spowodowana przez ich wpływ na przykład na przepuszczalność błony.

VI. Uwagi końcowe

Podsumowując, można stwierdzić, że istotna rola lipidowej fazy błony plazmatycznej w zjawisku oporności wielolekowej i jego modulacji wynika z kilku przyczyn:

— związki transportowane przez glikoproteinę P oraz modulatory oporności są substancjami o znacznej hydrofobowości, a ich transport do komórki zachodzi drogą biernej dyfuzji poprzez dwuwarstwę lipidową, zgodnie z gradientem po-

tencjału chemicznego lub elektrochemicznego [30, 31],

- zgodnie z hipotezą „molekularnego odkurzacza” leki usuwane są z komórki bezpośrednio z dwuwarstwy lipidowej błony plazmatycznej [5, 6],
- otoczenie lipidowe glikoproteiny P (i innych transporterów usuwających leki z komórki) jest czynnikiem regulującym aktywność ATPazową i transportową tego białka [87],
- oporność wielolekowa komórek nowotworowych wiąże się często ze zmienionym metabolizmem lipidów w komórce, co wpływa na zmianę składu lipidowego błon komórek opornych w porównaniu z komórkami wrażliwymi [64, 68].
- glikoproteina P bierze prawdopodobnie udział w transporcie lipidów, w tym cholesterolu, w komórce [75, 76].
- nadekspresja transporterów błonowych powodujących lekooporność może zmieniać biofizyczne właściwości błony, takie jak przepuszczalność lub płynność lipidów błonowych [88].
- istnieje związek pomiędzy rozmieszczeniem glikoproteiny P w błonie, a niedawno odkrytą strukturą domenową błon komórkowych, w której ważną rolę odgrywają m.in. glikosfingolipidy [21].
- modulatory oporności wielolekowej modyfikują biofizyczne właściwości błony komórkowej, takie jak przepuszczalność błon, płynność lipidów błonowych, właściwości przejść fazowych lipidów błonowych, co może być jednym z mechanizmów modulowania oporności wielolekowej [41].
- niektóre modulatory, takie jak werapamil czy chloropromazyna, wywierają wpływ na metabolizm lipidów komórkowych, co znajduje odzwierciedlenie w składzie błon plazmatycznych komórek opornych [89].

Badania dyfuzji w błonach modelowych oraz oddziaływania substratów glikoproteiny P i chemouczulaczy z lipidami, a także badania zależności pomiędzy funkcjonowaniem transportera leków a jego oddziaływaniem z fazą lipidową błony komórkowej, powinny przyczynić się do odkrycia sposobów redukcji oporności wielolekowej w różnych typach komórek, umożliwiając w przyszłości skuteczniejszą chemioterapię. Zagadnienia te są również istotne w przypadku oporności wielolekowej wywołanej nadekspresją w błonach komórek nowotworowych innych transporterów, na przykład typu MRP.

Podziękowanie

Niniejsza praca została sfinansowana z funduszy grantu KBN No. 6 P05A 01221.

Artykuł otrzymano 12 lutego 2001
Zaakceptowano do druku 20 maja 2002

Piśmiennictwo

- Gottesman MM, Ambudkar SV, Cornwell MM, Pastan I, German UA (1996) W: Schultz SG (red) *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*, Plenum Press, New York, 243-257
- Stein W (1997) *Physiol Rev* 77: 545-590
- Spoelstra EC, Westerhoff HV, Pinedo HM, Dekker H, Lankelma J (1994) *Eur J Biochem* 221: 363-373
- Ferte J (2000) *Eur J Biochem* 267: 277-294
- Altenberg GA, Vanoye CG, Horton JK, Reuss L (1994) *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 4564-4657
- Raviv Y, Pollard HB, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM (1990) *J Biol Chem* 265: 3975-3980
- Awasthi S, Sharma R, Awasthi YC, Belli JA, Frenkel P (1992) *Cancer Lett* 63: 109-116
- Urbatsch IL, Senior AE (1995) *Arch Biochem Biophys* 316: 135-140
- Romsicki Y, Sharom FJ (1998) *Eur J Biochem* 256: 170-178
- Bevers EM, Comfuris P, Dekkers DWC, Zwaal RFA (1999) *Biochim Biophys Acta* 1439: 317-330
- Bartosz G (1998) *Post Biochem* 44: 136-149
- Bosch I, Croop J (1996) *Biochim Biophys Acta* 1288: F37-F54
- Loo TW, Clarke DM (1999) *Biochim Biophys Acta* 1461: 315-325
- Loo TW, Clarke DM (1999) *J Biol Chem* 274: 35388-35392
- Fielding ChJ, Fielding PE (2000) *Biochim Biophys Acta* 1529: 210-222
- Brown DA, London E (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 240: 1-7
- Yu J, Fischman DA, Steck TL (1973) *J Supramol Struct* 3: 233-248
- Fiedler K, Kobayashi T, Kurzchalia TV, Simons K (1993) *Biochemistry* 32: 6365-6373
- Chang W-J, Ying Y-S, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, De Grunzburg J, Mumby SM, Gilman AG, Anderson RGW (1994) *J Cell Biol* 126: 127-138
- Moss DJ, White CA (1992) *Eur J Cell Biol* 57: 59-65
- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M (1998) *J Biol Chem* 273: 32380-32383
- Liscovitch M, Lavie Y (2000) *Trends Biochem Sci* 25: 530-534
- Harder T, Simons K (1997) *Curr Opin Cell Biol* 9: 534-542
- Wang TY, Silvius JR (2000) *Biophys J* 79: 1478-1489
- Brown DA, London E (1998) *J Membrane Biol* 164: 103-114
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11: 424-431
- Lavie Y, Fiucci G, Czarny M, Liscovitch M (1999) *Lipids* 34: S57-S63
- Demeule M, Jodoin J, Gingras D, Beliveau R (2000) *FEBS Lett* 466: 219-224
- Pawagi AB, Wang J, Silverman M, Reithmeier RAF, Deber CM (1994) *J Molec Biol* 235: 554-564
- Speelmans G, Staffhorst RWHM, de Wolf FA, de Kruijff B (1995) *Biochim Biophys Acta* 1238: 137-146
- Eytan GD, Regev R, Oren G, Assaraf YG (1996) *J Biol Chem* 271: 12897-12902
- Homolya L, Hollo Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM, Sarkadi B (1993) *J Biol Chem* 268: 21493-21496
- Bolhuis H, van Veen HW, Molenaar D, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN (1996) *EMBO J* 15: 4239-4245
- Zheleznova EE, Markham PN, Neyfakh AA, Brennan RG (1999) *Cell* 96: 353-362
- Lu P, Liu R, Sharom FJ (2001) *Eur J Biochem* 268: 1687-1697
- Dellinger M, Pressman BC, Calderon-Higginson C, Savaraj N, Tapiero H, Kolonias D, Lampidis TJ (1992) *Cancer Res* 52: 6385-6389
- Nerdal SA, Gundersen V, Thorsen H, Hoiland H, Holmsen H (2000) *Biochim Biophys Acta* 1464: 165-175.
- Malheiros S V, de Paula E, Meirelles NC (1998) *Biochim Biophys Acta* 1373: 332-340
- Castaing M, Brouant P, Loiseau A, Santelli-Rouvier Ch, Santelli M, Albert-Franco S, Mahamoud A, Barbe J (2000) *J Pharm Pharmacol* 52: 289-296
- Drori S, Eytan GD, Assaraf YG (1995) *Eur J Biochem* 228: 1020-1029
- Verkleij AJ, de Maagd R, Leunissen-Bijvelt J, de Kruijff B (1982) *Biochim Biophys Acta* 684: 255-262
- Mason RP, Rhodes DG, Herbette LG (1991) *J Med Chem* 34: 869-877
- Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y (1998) *Biochem Cell Biol* 76: 695-708
- Lampidis TJ, Kolonias D, Podona T, Israel M, Safa AR, Lothstein L, Savaraj NN, Tapiero H, Priebe W (1997) *Biochemistry* 36: 2679-2685
- Sharom FJ (1997) *Biochem Soc Trans* 25: 1088-1096
- Riehm J, Biedler L (1972) *Cancer Res* 32: 1195-1200
- Doige CA, Yu X, Sharom FJ (1993) *Biochim Biophys Acta* 1146: 65-72
- Sinicrope FA, Dudeja PK, Bissonnette BM, Safa AR, Brasitus TA (1992) *J Biol Chem* 267: 24995-25002
- Krishnamurthy SS, Prasad R (1999) *FEMS Microbiol Lett* 173: 475-481
- Kaur R, Backhawat AK (1999) *Microbiol* 145: 809-818
- Mozrzymas JW, Barberis A, Michalak K, Cherubini E (1999) *J Neuroscience* 19: 2474-2488
- Molnar J, Hever A, Fakla I, Fischer J, Ocsovski I, Aszalos A (1997) *Anticancer Res* 17: 481-486
- Molnar J, Szabo D, Mandi Y, Mucsi I, Fischer J, Varga A, Konig S, Motohashi N (1998) *Anticancer Res* 18: 3033-3038
- Motohashi N, Kurihara T, Kawase M, Hever A, Tanaka M, Szabo D, Nacsá J, Yamanaka W, Kerim A, Molnar J (1997) *Anticancer Res* 17: 3537-3543.
- Ford JM, Prozialeck WC, Hait WN (1988) *Molec Pharmacol* 35: 105-115
- Ford JM, Hait WN (1990) *Pharmacol Rev* 42: 155-199
- Ramu N, Ramu A (1992) *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 165-173
- Kołaczkowski M, Cybularz-Kołaczkowska A, Łuczyński J, Witek S, Goffeau A (1998) *Microbiol Drug Resistance* 4: 143-158
- Michalak K, Bobrowska-Hagerstrand M, Hagerstrand H, Poła A, Molnar J (1999) W: *6th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, 12-15 September 1999, Paris
- Hendrich AB, Wesolowska O, Michalak K (2001) *Biochim Biophys Acta* 1510: 414-425
- Alon N, Busche R, Tummler B, Riordan JR (1991) W: Roninson, IB (red), *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*. Plenum Press, New York, str.
- Wright LC, Dyne M, Holmes KT, Mountford CE (1985) *Biochim Biophys Res Commun* 133: 539-545

63. Ramu A, Glaubiger D, Weintraub H (1984) *Cancer Treat Rep* **68**: 637-641
64. Le Moyec L, Tatoud R, Degeorges A, Calabrese C, Bauza G, Eugene M, Calvo F (1996) *Cancer Res* **56**: 3461-3467
65. Kuliszkiwicz-Janus M, Baczyński S, Michalak K (1996) W: Podo F (red) *Eurospin Annual 1995-1996*, Roma, str. 224-226
66. Ramu A, Ramu N, Rosario LM (1991) *Biochem Pharmacol* **41**: 1455-1461
67. Escriba PV, Ferrer-Monteil AV, Ferragut JA, Gonzalez-Ros JM (1990) *Biochemistry* **29**: 2775-2782
68. May GL, Wright LC, Dyne M, Mackinnon WB, Fox RM, Mountford CE (1988) *Int J Cancer* **42**: 728-733.
69. Cabot MC, Giuliano AE, Han T, Liu Y (1999) *Cancer Res* **59**: 880-885
70. Higgins CF, Gottesman MM (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 18-21
71. Riggers RJ, van Helvoort A, Evers R, van Meer G (1999) *J Cell Science* **112**: 415-422
72. Dogra S, Krishnamurthy S, Gupta V, Dixit BL, Gupta CM, Sanglard D, Prasad R (1999) *Yeast* **15**: 111-121
73. Debry P, Nash EA, Neklason DW, Metherall JE (1997) *J Biol Chem* **272**: 1026-1031
74. Metherall JE, Li H, Waugh K (1996) *J Biol Chem* **271**: 2634-2640
75. Bosch I, Danussi-Joannopoulos K, Wu RL, Furlong ST, Croop J (1997) *Biochemistry*, **36**: 5685-5694
76. Vo QD, Gruol DJ (1999) *J Biol Chem* **274**: 20318-20327
77. Lavie Y, Cao H, Bursten SI, Giuliano AE, Cabot MC (1996) *J Biol Chem* **271**: 19530-19536
78. Pajeva IK, Wiese M, Cordes H-P, Seydel JK (1996) *J Cancer Res Clin Oncol* **122**: 27-40.
79. Barnes KM, Dickstein B, Cutler GB Jr, Fojo T, Bates SE (1996) *Biochemistry* **35**: 4820-4827
80. Rothie A, Theron D, Soceneantu L, Martin C, Traikia M, Berridge G, Higgins CF, Devaux PF, Callaghan R (2001) *Eur Biophys J* **30**: 430-442
81. Callaghan R, Riordan JR (1995) *Biochim Biophys Acta* **1236**: 155-162
82. Loe DW, Sharom FJ (1993) *Br J Cancer* **68**: 342-351
83. Wadkins RM, Houghton PJ (1993) *Biochim Biophys Acta* **1153**: 225-236
84. Warren L, Jardillier JC, Malarska A, Akeli MG (1992) *Cancer Res* **52**: 3241-3245
85. Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**: 309-315
86. Callaghan R, Stafford A, Epand RM (1993) *Biochim Biophys Acta* **1175**: 277-282
87. Regev R, Assaraf YG, Eytan DG (1999) *Eur J Biochem* **259**: 18-24
88. Rintoul DA, Center MS (1984) *Cancer Res* **44**: 4978-4980
89. Lavie Y, Cao HT, Volner A, Lucci A, Han TY, Geffen V, Giuliano AE, Cabot MC (1997) *J Biol Chem* **272**: 1682-1687

Receptory nukleotydydowe

Nucleotide receptors

EDYTA GENDASZEWSKA-DARMACH

Spis treści:

- I. Klasyfikacja receptorów nukleotydydowych
- II. Źródła zewnątrzkomórkowych nukleotydydów
- III. Agonisty i antagonisty receptorów nukleotydydowych
- IV. Przekazywanie sygnałów za pośrednictwem receptorów nukleotydydowych
- V. Rozmieszczenie receptorów nukleotydydowych — znaczenie fizjologiczne
 - V-1. Układ sercowo-naczyniowy
 - V-2. Układ oddechowy
 - V-3. Układ nerwowy
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AMPS — adozyno-5'-tiofosforan; Bz-ATP — 2' lub 3'-O-(4-benzoilbenzoil)ATP; CFTR — transbłonowy regulator mukowiscydozy; GPCR — receptor błonowy sprzężony z białkami G; IL — interleukina; IP₃ — inozytolo-1,4,5-trifosforan; IUPHAR — Międzynarodowa Unia Farmakologiczna; KN-62 — 1-[N,O-bis(5-izochinolinosulfonylo)-N-metylo-L-tyrozylo]-4-fenylpiperazyna; LGIC — kanały jonowe regulowane przez ligandy; LPS — lipopolisacharyd; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez czynniki mitogenne; α,β -MeATP — α,β -metylenoATP; 2-MeSATP — 2-metylotioATP; MRS 2179 — N⁶-metylo-2'-deoksyadenozyno-3',5'-bisfosforan; NECA — 5'-N-etylokarboksamidoadenozyna; NOS — syntaza tlenu azotu; PLA2 — fosfolipaza A2; PLC — fosfolipaza C; PPADS — fosforan 2',4'-disulfonylo-6-azofenylpirydoksalu; TNF — czynnik martwicy nowotworu; TNP-ATP — 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenylo)ATP.

I. Klasyfikacja receptorów nukleotydydowych

Nukleotydy obecne wewnątrz komórek odgrywają kluczową rolę w procesach metabolicznych, syntezie kwasów nukleinowych oraz regulacji aktywności wielu enzymów. Nukleotydy i nukleozydy uczestniczą również w przekazywaniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki za pośrednictwem specyficznych receptorów. Najwięcej danych dotyczy aktywności trifosforanu adozyny,

Contents:

- I. Classification of nucleotide receptors
- II. Sources of extracellular nucleotides
- III. Agonists and antagonists of nucleotide receptors
- IV. Signal transduction mediated by nucleotide receptors
- V. Distribution of nucleotide receptors — physiological significance
 - V-1. Cardiovascular system
 - V-2. Pulmonary system
 - V-3. Nervous system
- VI. Summary

który jest uwalniany do środowiska zewnątrzkomórkowego m. in. przez neurony, płytki krwi oraz komórki śródbłonka i reguluje takie procesy biologiczne, jak agregacja płytek krwi, przewodność nerwowa, czynności serca czy skurcze mięśni. ATP występujący w środowisku zewnątrzkomórkowym może być ligandem receptorów P2, lub może podlegać szybkiej degradacji przez ekto-ATPazy i ektonukleotydyazy. Ostatecznym produktem tych przemian jest adozyna — ligand receptorów klasy P1 [1]. W 1999 roku wykazano, że ATP może być również wykorzystywany jako dawca grup fosforanowych w procesie katalizowanym przez ektokinazy [2]. W końcu lat osiemdziesiątych okazało się, że uwalniane nukleotydy urydylowe mogą także aktywować receptory P2 [3]. Co więcej, zidentyfikowano również receptory, które mogą być aktywowane przez wszystkie naturalnie występujące trifosforany nukleozydów [4, 5]. Od kilku lat zaczęły pojawiać się prace o podobnym działaniu modyfikowanych mononukleotydydów. Zaobserwowano, że 2-heksylo-AMP może pełnić funkcję agonisty receptora klasy P2Y szczurzych komórek glejaka i erytrocytów indyka [6]. Receptory pewnego typu (P2Y₁₁) obecne m. in. na powierzchni komórek linii HL 60 [7], ludzkich komórek gwiazdki 1321N1 i komórek chomika CHO-K1 [8] mogą natomiast podlegać aktywacji przez adozyno-5'-tiofosforan (AMPS). Przeprowadzone badania sugerują, że także deoksyadenozyno-5'-tiofosforan, deoksyguanozyno-5'-tiofosforan i tymidyno-5'-tiofosforan mogą wpływać na prolifera-

Mgr, Polska Akademia Nauk, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, e-mail: edyta@bio.cbmm.lodz.pl

rację komórek poprzez interakcje z receptorami nukleotydowymi [9].

W 1978 roku Burnstock zaproponował klasyfikację receptorów purynergicznych, wyróżniając dwie główne klasy: receptory P1 aktywowane przez adenylinę i receptory P2, wykazujące powinowactwo do ATP lub ADP [10]. Obecna klasyfikacja receptorów nukleotydowych P2 opiera się przede wszystkim na kryterium struktury pierwszorzędowej. Wyparła ona stosowany do niedawna podział uwzględniający jedynie charakterystykę farmakologiczną (powinowactwo do określonych ligandów nukleotydowych). Zgodnie z zaleceniami Komitetu do spraw Nazewnictwa Receptorów i Klasyfikacji Leków Międzynarodowej Unii Farmakologicznej (ang. *International Union of Pharmacology* — IUPHAR) wyróżnia się dwie grupy receptorów P2: sprzężone z białkami G receptory P2Y oraz jonotropowe receptory P2X. Dotychczas sklonowano cDNA sześciu ludzkich receptorów P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ i P2Y₁₂) oraz siedmiu receptorów P2X (P2X₁₋₇) pochodzących z komórek innych ssaków (Tabela 1). Liczby (1-n) oznaczają kolejność klonowania cDNA poszczególnych receptorów. Do grupy receptorów P2Y zalicza się receptory aktywowane przez trifosforany nukleozydów (P2Y₁ — P2Y₁₁), receptory obecne na płytkach krwi aktywowane selektywnie przez ADP (P2Y₁₂) oraz receptory aktywowane przez diadenozynotetrafosforan (P2Y_{AP4A}) (nazwy pisane kursywą oznaczają, że dotychczas nie sklonowano cDNA tych receptorów). W literaturze można jeszcze spotkać poprzednie nazwy receptorów, kiedy nie znano sekwencji DNA kodujących receptory poszczególnych typów tzn. P2U (obecnie P2Y₂), P2Z (obecnie P2X₇), P2Y_{ADP}, P2Y_{AC}, P2Y_{CYC}, P2T_{AC} (obecnie P2Y₁₂) oraz P2D (obecnie P2Y_{AP4A}). Poza tym, zgodnie z zaleceniami IUPHAR mała litera umieszczona przed nazwą receptora wskazuje pochodzenie receptora: h — ludzki, m — mysz, r — szczurzy, b — bydłocy, t — wyizolowany z indyka, c — z kurczęcia, x — z *Xenopus laevis*.

II. Źródła zewnątrzkomórkowych nukleotydów

Stężenie ATP w środowisku zewnątrzkomórkowym utrzymuje się na bardzo niskim poziomie, mimo wysokiego stężenia tego nukleotydu w cytoplazmie (3-5 mM). Wynika to z faktu, że dwuwarstwowa lipidowa błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla ATP i MgATP (podstawowa forma w cytoplazmie). Nukleotydy mogą być uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego w wyniku uszkodze-

nia i nagłej śmierci komórki, co zdarza się przy pęknięciu naczyń krwionośnych lub innych urazach tkanek. Poza tym są one uwalniane w procesach nie związanych z lizą komórki: w wyniku egzocytozy nukleotydów nagromadzonych w ziarnistościach i pęcherzykach wydzielniczych lub w wyniku transportu przez kanały i pory błony komórkowej. Uwolnione na zewnątrz komórki nukleotydy są szybko hydrolizowane przez ekto-ATPazy, a następnie ektonukleotydu. Dlatego podwyższone stężenie zewnątrzkomórkowych nukleotydów jest zjawiskiem przejściowym i ma miejsce po zadziałaniu określonych czynników stymulujących. Większość agonistów aktywujących płytki krwi (m.in. trombina, epinefryna, kolagen, ADP) powoduje również degranulację ich ziarnistości i w konsekwencji wzrost stężenia ATP w surowicy do około 50 μM [1]. Stwierdzono, że ATP może być również uwalniany do środowiska zewnętrznego bezpośrednio z cytoplazmy. W przypadku komórek śródbłonna naczyń krwionośnych ma to miejsce pod wpływem m.in. stresu fizjologicznego (np. niedotlenienie) i związków chemicznych (trypsyna, trombina, epinefryna), a nawet stresu mechanicznego [11].

III. Agonisty i antagonisty receptorów nukleotydowych

Głównym problemem w badaniach nad charakterystyką farmakologiczną receptorów nukleotydowych jest brak wysoce specyficznych agonistów i antagonistów oraz jednoczesne występowanie receptorów różnych podklas na tych samych komórkach.

Biorąc pod uwagę właściwości farmakologiczne, można wyróżnić trzy duże klasy receptorów P2X. Są to po pierwsze receptory P2X₁ i P2X₃, które charakteryzuje wysokie powinowactwo do ATP (EC₅₀ ≈ 1 μM), po drugie receptory P2X₂, P2X₄, P2X₅ i P2X₆ o mniejszym powinowactwie do ATP (EC₅₀ ≈ 10 μM), po trzecie receptory o bardzo niskim powinowactwie do ATP (EC₅₀ ≈ 300-400 μM), jak np. receptor P2X₇ [12]. Z kolei receptory P2Y wykazują zróżnicowane powinowactwo do nukleotydów purynowych i pirymidynowych. P2Y₁, podobnie jak P2Y₁₁ i P2Y₁₂, jest określany jako purynospecyficzny receptor adeninowy. Receptor P2Y₂ posiada podobną selektywność w stosunku do ATP i UTP. Receptorami pirymidynospecyficznymi są p2y₃ i P2Y₆ wykazujące wysokie powinowactwo do UDP, a także receptor P2Y₄ aktywowany preferencyjnie przez UTP [13, 14]. Z kolei receptor p2y₈, wyizolowany z *Xenopus laevis* [5], a także ptasi receptor tp2y [4] mogą być aktywowane z podobną selektywnością

Tabela 1

Wykaz receptorów P2 i właściwości farmakologiczne [20]

Typ receptora	Poprzednia nazwa	Pochodzenie wyizolowanego receptora /liczba aminokwasów w białku	Główne ligandy
P2X ₁		człowiek (hP2X ₁)/h399 szczur (rP2X ₁)/r399 mysz (mP2X ₁)/m399	BzATP>2-MeSATP>ATP>α,β-MeATP
P2X ₂		szczur (rP2X ₂)/r472	2-MeSATP>ATP
P2X ₃		człowiek (hP2X ₃)/h397 szczur (rP2X ₃)/r397	BzATP>2-MeSATP>ATP>α,β-MeATP
P2X ₄		człowiek (hP2X ₄)/h388 szczur (rP2X ₄)/r388 mysz (mP2X ₄)/m388	ATP>2-MeSATP>α,β-MeATP
P2X ₅		człowiek (hP2X ₅)/h422 szczur (rP2X ₅)/r455	ATP>2-MeSATP>ADP
P2X ₆		człowiek (hP2X ₆)/h431 szczur (rP2X ₆)/r379 mysz (mP2X ₆)/m379	ATP>2-MeSATP>ADP
P2X ₇	P2Z	człowiek (hP2X ₇)/h595 szczur (rP2X ₇)/r595	BzATP>ATP
P2Y ₁		człowiek (hP2Y ₁)/h373 szczur (rP2Y ₁)/r373 mysz (mP2Y ₁)/m373 kurczak (cP2Y ₁) krowa (bP2Y ₁) indyk (tP2Y ₁)	2-MeSATP>ATP=ADP
P2Y ₂	P2U	człowiek (hP2Y ₂)/h377 szczur (rP2Y ₂)/r374 mysz (mP2Y ₂)/m373	ATP=UTP>2-MeSATP
p2y ₃ *		kurczak (cp2y ₃ /c328)	ADP>UTP>ATP?
P2Y ₄		człowiek (hP2Y ₄)/h365 szczur (rP2Y ₄)/r361	UTP=UDP>ATP=ADP
P2Y ₆		człowiek (hP2Y ₆)/h328 szczur (rP2Y ₆)/r328	UTP>ADP=2-MeSATP>ATP
p2y ₈ *		<i>Xenopus laevis</i> (xp2y ₈ /x532)	ATP=ITP=UTP=CTP
P2Y ₁₁		człowiek (hP2Y ₁₁)/h371	ATP>2-MeSATP>ADP
P2Y ₁₂	P2Y _{ADP} , P2Y _{AC} , P2T _{AC} , P2Y _{CYC}	człowiek (hP2Y ₁₂)/h342	ADP
P2Y _{Ap4A} **	P2D	człowiek (hP2Y _{Ap4A})	A _{P4A}

*Zgodnie z zaleceniami IUPHAR, małymi literami oznaczono receptory, których charakterystykę ustalono na podstawie klonowania cDNA nie pochodzącego z komórek ssaków (brak danych na temat występowania w komórkach ludzkich i pełnionej funkcji).

**Receptory pisane kursywą oznaczają, że ustalono ich właściwości farmakologiczne, ale do tej pory nie sklonowano cDNA

przez wszystkie trifosforany nukleozydów. Receptor p2y₇ został niedawno zidentyfikowany jako receptor leukotrienu B₄ i *de facto* nie należy go zaliczać do grupy receptorów nukleotydotowych, podobnie jak receptorów p2y₅, P2Y₉ i P2Y₁₀ [15, 16].

W badaniach nad funkcjonowaniem receptorów nukleotydotowych zazwyczaj wyko-rzystywane są analogi ATP i UTP. Są to m. in. 2'- lub 3'-O-(4-benzoilbenzoił)-ATP (Bz-ATP), α,β-metylenoATP (α,β-MeATP) lub 2-metylotioATP (MeSATP). Nadal jednak brak jest związków, które działałyby w spo-

sób selektywny na receptory podklas P2X lub P2Y. Bz-ATP, który do niedawna stosowany był jako selektywny agonista receptora P2X₇ (EC₅₀ ≈ 18 μM), okazał się także skuteczny w aktywowaniu receptorów P2X₁ (EC₅₀ ≈ 1,9 nM) i P2X₃ (EC₅₀ ≈ 98 nM) [12].

Wśród antagonistów receptorów nukleotydotowych najbardziej rozpowszechnionymi są suramina (lek stosowany w leczeniu trypanosomii), PPADS (sól sodowa fosforanu 2',4'-disulfono-6-azofenylopirydoksalu) oraz barwniki takie jak reaktywny błękit 2,

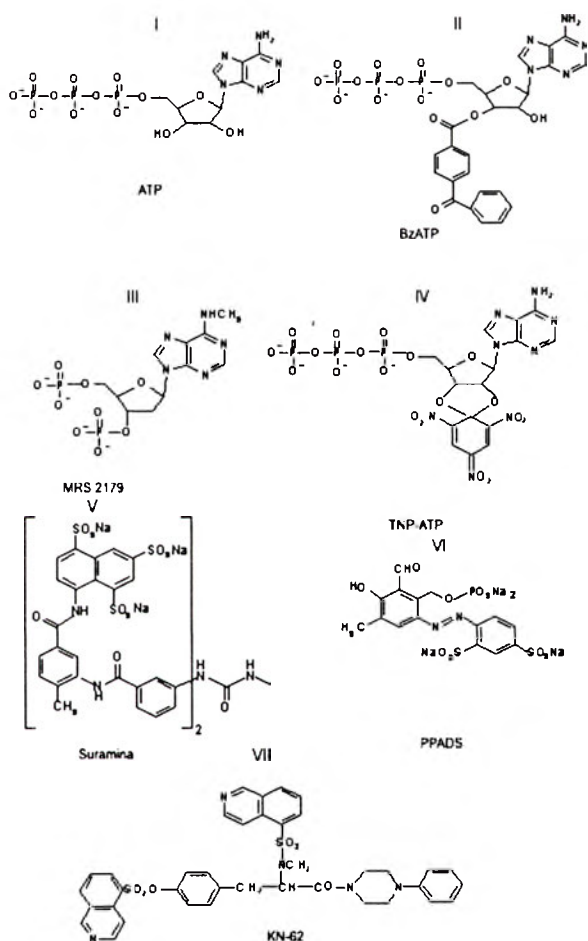
błękit trypanu, reaktywna czerwień. Jednakże związki te nie wykazują na tyle wysokiej selektywności, aby mogły być wykorzystywane do selekcji poszczególnych podklas receptorów nukleotydydowych. Suramina jest antagonistą zarówno receptorów P2X, jak i P2Y, a poza tym hamuje aktywność innych receptorów (nikotynowego, glutaminianowego, GABA i 5-hydroksytryptaminy) [17]. Z kolei PPADS — niekompetycyjny inhibitor receptorów

P2X_{2/3}. TNP-GTP wykazuje podobne właściwości, co sugeruje, że w oddziaływaniach z białkiem receptorowym adenina nie odgrywa kluczowej roli, w przeciwieństwie do grup fosforanowych (TNP-ATP>TNP-ADP>TNP-AMP) [12]. Badając różne pochodne 3',5' oraz 2',5' bisfosforanów adenylozyny stwierdzono, że modyfikacje w pozycji 2' i 3' deoksyribozy nie zmieniają znacząco właściwości tych związków [6]. 3',5'-bisfosforan 2'-deoxyadenozyny z grupą metylową w pozycji N⁶ wykazywał natomiast około 17-krotnie silniejsze właściwości antagonistyczne. Związek ten, oznaczony jako MRS 2179 ma stałą K_i ≈ 100 nM [18]. Wprowadzenie w pozycji N⁶ większych grup alkilowych (etylowej lub propylowej) lub grupy benzoilowej osłabia działanie MRS 2179 [6].

Ze względu na brak wystarczająco selektywnych agonistów i antagonistów receptorów nukleotydydowych, w badaniach nad ich funkcjonowaniem i właściwościami farmakologicznymi bardzo pomocne mogą być specyficzne przeciwciała. Jednak dostępność takich przeciwciał również jest ograniczona. Tylko nieliczne laboratoria dysponują poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko receptorom P2X₁, P2X₄ oraz P2X₇ [17]. Dotychczas wyizolowano i scharakteryzowano tylko jedno przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie ludzkiego receptora P2X₇ [19].

IV. Przekazywanie sygnałów za pośrednictwem receptorów nukleotydydowych

Receptory P2X, których liczba aminokwasów waha się od 379 do 595, zawierają dwie transmembranowe hydrofobowe domeny oddzielone przez obszerny region znajdujący się na zewnątrz komórki. W części zewnątrzkomórkowej znajduje się 10 reszt cysteinowych i od 2 do 6 miejsc glikozylacji. Zarówno N-, jak i C-końce receptorów P2X znajdują się po stronie cytoplazmatycznej błony komórkowej [17]. Wszystkie receptory P2X występują w formie struktur składających się z wielu podjednostek (7 podstawowych zostało już sklonowanych), przy czym podjednostki te mogą być identyczne (np. P2X₁ w mięśniach gładkich) lub różne (np. P2X_{2/3} w zwoju dolnym nerwu błędnego). Podjednostki receptora P2X₇ w wyniku agregacji tworzą pory przepuszczalne dla cząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej [20]. Pory są na tyle duże, że mogą przez nie przenikać nawet barwniki takie jak bromek etydyne (394 Da), LY (550 Da) czy YO-PRO-1 (629 Da) [17, 19].



Ryc.1. Wzory strukturalne niektórych agonistów (I i II) oraz antagonistów receptorów nukleotydydowych (III-VII)

P2X może również znosić odpowiedź komórkową wywołaną za pośrednictwem niektórych receptorów P2Y [12]. W i l e y i w s p. wprowadzili nowy, selektywny bloker receptora P2X₇ oznaczony jako KN-62 (1-[N,O-bis(5-izochinolinosulfonylo)-N-metylo-L-tyrozylo]-4-fenylopiiperazyna), znany wcześniej jako inhibitor kinazy zależnej od kalmoduliny, działający w stężeniach nanomolarnych (IC₅₀ ≈ 9-13 nM) [12, 17]. Selektywnym antagonistą receptora P2X₇ jest również błękit Coomassie [17]. Z kolei TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenylo)ATP) jest przykładem antagonisty receptorów P2X₁, P2X₂ i

Receptory P2X wiążąc specyficzne ligandy stają się jednocześnie kanałami jonowymi (ang. *Ligand-Gated Ion Channels* — LGIC). Aktywacja receptorów P2X przez ATP i UTP jest związana z szybkim wzrostem stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Wzrost ten może być wynikiem napływu jonów Ca^{2+} bezpośrednio ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez kanały receptorowe [1]. Inną przyczyną wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} jest wtórna aktywacja kanałów wapniowych zależnych od napięcia. Związanie przez receptor P2X agonisty powoduje bowiem depolaryzację błony komórkowej [1]. Pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych wzrost stężenia wap-

(TM1 — TM7). Liczba aminokwasów receptorów P2Y człowieka waha się od 328 do 377, a masa cząsteczkowa po glikozylacji od 41 do 53 kDa. N-koniec białka znajduje się na zewnątrz komórki, natomiast C-koniec występuje po stronie cytoplazmatycznej [17]. Aktywacja receptorów P2Y moduluje aktywność zarówno białek G_q , jak również G_s i G_i . Białka G podrodziny G_q aktywują fosfolipazę C typu β , która katalizuje powstawanie 1,4,5-trifosforanu inozytolu z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu. Trifosforan inozytolu (IP_3) otwiera IP_3 -zależny kanał wapniowy siateczki śródplazmatycznej. Następuje wypływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy i wzrost stężenia jonów

Tabela 2

Odpowiedź komórki na stymulację receptora nukleotydogo

Nazwa receptora	Bezpośrednia odpowiedź komórki	Wtórna odpowiedź komórki
P2X ₁	Kanał dla $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	Napływ Ca^{2+} , depolaryzacja błony
P2X ₂	Kanał dla Na^+/K^+	Depolaryzacja błony
P2X ₃	Kanał dla $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	Napływ Ca^{2+} , depolaryzacja błony
P2X ₄	Kanał dla Na^+/K^+	Depolaryzacja błony
P2X ₅	Kanał dla $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	Napływ Ca^{2+} , depolaryzacja błony
P2X ₆	Kanał dla $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$	Napływ Ca^{2+} , depolaryzacja błony
P2X ₇	Kanał dla Na^+/K^+	Depolaryzacja błony
P2Y ₁	Aktywacja białek $G_{q/11}$	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$
P2Y ₂	Aktywacja białek $G_{q/11}$, G_{13}	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ i inhibicja cykazy adenylanowej
p2y ₃	Aktywacja białek $G_{q/11}$	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$
P2Y ₄	Aktywacja białek $G_{q/11}$	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$
P2Y ₆	Aktywacja białek $G_{q/11}$	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$
p2y ₈	Brak danych	Ca^{2+}
P2Y ₁₁	Aktywacja białek G_s , $G_{q/11}$	Aktywacja $\text{PLC}\beta \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ i aktywacja cykazy adenylanowej
P2Y ₁₂	Aktywacja białek $G_{i/o}$	Inhibicja cykazy adenylanowej
P2Y _{AP3A}	Brak danych	Brak danych

nia w cytoplazmie (od około 100 nM do około 1 μM) uruchamia wiele procesów regulujących funkcje komórki. Odbiorcami sygnału wapniowego są m. in. kinazy białkowe typu C, kinazy zależne od kalmoduliny, fosfolipazy C, D i A_2 . Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia mają również wpływ na aktywację lub inhibicję kanałów jonowych (np. kanału dla jonów K^+) i w konsekwencji na zmianę potencjału błonowego i pobudliwości komórki.

Receptory P2Y są przykładem najliczniejszej rodziny receptorów błonowych sprzężonych z białkami G (ang. *G Protein Coupled Receptors* — GPCR). Receptory P2Y są integralnymi białkami błonowymi zawierającymi jeden łańcuch polipeptydowy tworzący siedem helikalnych domen transmembranowych

wapnia [1]. Konsekwencją aktywacji receptorów P2Y związanych z białkami G_i jest obniżenie poziomu cAMP w cytoplazmie [21, 22], natomiast w wyniku aktywacji receptorów P2Y związanych z białkami G_s poziom cAMP zostaje podwyższony [7, 23].

Ogromna różnorodność efektów wywoływanych przez nukleotydy i nukleozydy może świadczyć o występowaniu większej liczby receptorów P1 (receptorów adenozyliny) i P2 (receptorów nukleotydogo) niż wynikałoby z ilości sklonowanych cDNA. Wiadomo, że cząsteczki receptorów P2X składają się z wielu podjednostek, przy czym podjednostki receptorów różnych podklas mogą być identyczne (homomery) lub różne (heteromery). Do tej pory sklonowano siedem podjednostek receptorów P2X (P2X₁₋₇)

mogących asocjować ze sobą, tworząc heteromeryczne receptory P2X. Obecnie wiadomo o występowaniu czterech heteromerów P2X: P2X_{2/3}, P2X_{4/6}, P2X_{1/5}, P2X_{2/6} [24].

Yoshioka, Saitoh i Nakata wykazali możliwość tworzenia na drodze asocjacji dimerów składających się z receptora adenozyliny A₁ i receptorów nukleotydowych P2Y₁ lub P2Y₂ (mniej niż 5% homologii w sekwencji aminokwasowej) [25]. Kompleks A₁/P2Y₁ wykazuje odmienne właściwości farmakologiczne w stosunku do receptorów A₁ i P2Y₁. Związki, będące agonistami lub antagonistami receptora adenozyliny wykazują znikome powinowactwo do powstałego heteromeru, podczas gdy agonista receptora P2Y₁ (ADPβS) — zwiększone około 400 razy. W wyniku asocjacji receptorów A₁ i P2Y₁ zmienia się nie tylko powinowactwo ligandów, ale również uruchamiane mechanizmy przetwarzania sygnału błonowego. Przyłączenie agonisty do receptora A₁ powoduje zmianę jego konformacji, co pozwala na oddziaływanie z białkiem G_{i/o} hamującym aktywność cykazy adenylanowej. Z kolei receptor P2Y₁ jest związany z białkiem G_q, aktywującym fosfolipazę C. W komórkach wykazujących ekspresję receptora A₁/P2Y₁, ADPβS powoduje obniżenie stężenia cAMP (aktywacja białek G_i), nie mając wpływu na aktywność fosfolipazy C. Rezultaty te wskazują, że tworzenie heteromeru z receptora A₁ i P2Y₁ zmienia funkcjonalne właściwości na korzyść aktywacji cykazy adenylanowej. Możliwość asocjacji różnych receptorów GPCR może wyjaśniać nietypowe właściwości przypisywane przez wielu autorów receptorom nukleotydowym np. stwierdzony przez Okadę i w s.p. wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie neuronów pod wpływem adenozyliny [26]. Podobnie Fernandez i w s.p. wykazali, że ATP, ATPγS i AMP aktywują receptor P2Y w sposób zależny od 8-cyklopentylteofiliny, lecz niezależny od suraminy i PPADS [27].

Wielu autorów sugeruje również występowanie niesklonowanych do tej pory receptorów nukleotydowych. Stwierdzono, że uwalnianie noradrenaliny z tętnicy ogonowej szczura zachodzi zarówno pod wpływem 2-chloroadenozyliny, jak i ATP [28]. Również działanie ATP i adenozyliny wywołujące zwiotczenie mięśni tętnicy piersiowej królika należy przypisać receptorom innym niż P1 i P2 [29], podobnie jak stymulowane przez ATP i 2-chloroadenozyne uwalnianie norepinefryny z nerwów adrenergicznych tętnicy usznej królika [28]. Saitoh i Nakata wyizolowali białko pochodzące z mózgu szczura, wykazujące powinowactwo do 5'-N-etylokarboksyamidoade-

nosine — NECA) [30]. Specyficzność wiązania ligandów zapisano następująco: 5'-N-etylokarboksyamidoadeozyna = ADPβS > cAMP = β,γ-MeATP > A_{P4}A > α,β-MeATP > 5'-deoksy-5'-metylotioadeozyna. Kolejność wiązania ligandów przez białko wyizolowane z mózgu szczura odpowiada aktywacji białka receptorowego opisanego przez Chinelato i w s.p. i aktywowanego w następującej kolejności przez ligandy: 5'-N-etylokarboksyamidoadeozyna > adenozylina > ATP [29]. Uwalnianie noradrenaliny z nerwów adrenergicznych tętnicy ogonowej szczura jest stymulowane przez 2-chloroadenozyne > ATP > adenozyne [28], a indukcja prądu K⁺ w pęcherzykowych oocytach *Xenopus laevis* w równym stopniu zależy od adenozyliny, ATP i β,γ-MeATP [31]. Receptory aktywowane zarówno przez ATP i adenozyne zaliczane są obecnie do nowej klasy receptorów P3 lub tzw. białek P3LP (ang. *P3 purinoreceptor-like proteins* — P3LP). Aktywacja receptorów P3 moduluje aktywność białek G_s, czego konsekwencją jest wzrost stężenia cAMP w cytoplazmie [31, 32]. Takiej aktywacji nie wywołują związki będące antagonistami receptorów P1 (1,3-dipropyl-8-(2-amino-4-chlorofenyl)ksantyna i P2 (suramina), a także 2-MeSATP i UTP (agonisty receptorów P2Y) [29]. Antagonistyczne działanie wobec receptora P3 wykazuje 8-(p-sulfofenyl)teofilina. Dopóki nie zostanie sklonowany cDNA hipotetycznego receptora P3, nie można jednak wykluczyć, że efekty przypisywane temu białku są wywołane asocjacją receptorów P2Y i P1.

V. Rozmieszczenie receptorów nukleotydowych — znaczenie fizjologiczne

Nukleotydy obecne w środowisku zewnątrzkomórkowym wpływają na funkcjonowanie komórek wielu typów za pośrednictwem receptorów P2. Wykazano, że nukleotydy działają jako międzykomórkowe przekaźniki informacji w procesach związanych ze skurczem mięśni gładkich, przekazywaniem sygnałów nerwowych i regulowaniem funkcji układu krwionośnego. W ciągu ostatnich 10 lat okazało się, że trifosforany i difosforany nukleozydów stanowią jedno z najbardziej rozpowszechnionych cząsteczek sygnałowych.

V-1. Układ sercowo-naczyniowy

Od 1961 roku wiadomo, że ADP powoduje agregację płytek krwi [33]. Na poziomie komórkowym objawia się to wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺, aktywacją fosfolipazy C i inhibi-

cją cyklazy adenylanowej. Poza tym ADP wywołuje zmianę kształtu płytek krwi i aktywację receptorów fibrynogenu [15, 33]. Do niedawna sądzono, że wszystkie przedstawione efekty są wywoływane za pośrednictwem jednego receptora nukleotydowego P_{2T}. Okazało się jednak, że na powierzchni tych komórek występują trzy rodzaje receptorów nukleotydowych (Tabela 3). Receptor P_{2Y}₁ odpowiedzialny jest za uwalnianie Ca²⁺ ze struktur komórkowych poprzez aktywację fosfolipazy C. Jonotropowy receptor P_{2X}₁ pośredniczy w napływie jonów wapniowych ze środowiska zewnętrznego, natomiast receptor P_{2Y}₁₂, sklonowany niedawno przez H o l l o p e t e r a i w s p. [34], wpływa na zahamowanie aktywności cyklazy adenylanowej. Receptor P_{2Y}₁₂, związany z białkiem G_i najprawdopodobniej nie bierze udziału w indukowanej przez ADP zmianie kształtu płytek krwi, natomiast wraz z receptorem

lują powstawanie pęcherzyków pinocytowych [17]. Mimo obecności na tych komórkach zarówno receptorów P_{2Y}, jak i P_{2X}₇, różnice w wartościach EC₅₀ dla ATP (odpowiednio 50-70 μM i 250-400 μM) wskazują, że łatwiej i częściej aktywowane są receptory P_{2Y} [17]. ATP i inne nukleotydy aktywują makrofagi w odpowiedzi na uszkodzenia tkanek lub inwazję bakteryjną: stymulują wytwarzanie nadtlenków i czynników o charakterze humoralnym, takich jak TNF-α i interleukina 1β (IL-1β), chociaż molekularny mechanizm tego zjawiska nie jest poznany. Wiadomo, że pod wpływem bakteryjnego lipopolisacharydu makrofagi, w przeciwieństwie do monocytów krwi obwodowej, wytwarzają wysokocząsteczkową (31-34 kDa), nieaktywną biologicznie formę pro-IL-1β. W 1992 roku P e r r e g a u x i w s p. stwierdzili, że ATP (poprzez wiązanie się z receptorem P_{2X}₇), podobnie jak nigerycyna, powoduje ob-

Tabela 3

Znaczenie fizjologiczne receptorów nukleotydowych obecnych na płytkach krwi [17, 34]

Charakterystyka receptora/odpowieź komórki	Receptor P _{2Y} ₁₂	Receptor P _{2Y} ₁	Receptor P _{2X} ₁
Napływ jonów Ca ²⁺ ze środowiska zewnętrznego (aktywacja kanałów jonowych)	-	-	+
Uwalnianie jonów Ca ²⁺ z siateczki śródplazmatycznej (aktywacja fosfolipazy C)	-	+	?
Inhibicja cyklazy adenylanowej	+	-	-
Synteza IP ₃	-	+	-
Powinowactwo do ATP	+	+	-
Powinowactwo do ADP	+	+	+
Udział w zmianie kształtu płytek krwi	-	+	-
Udział w agregacji płytek krwi	+	+	-

P_{2Y}₁ ma wpływ na ich agregację. Związki będące antagonistami tego receptora (tiklopidyna, klopido-grel) znoszą efekt inhibicji cyklazy adenylanowej i częściowo przeciwdziałają agregacji płytek krwi [15, 17]. Mimo wyizolowania mRNA receptora P_{2X}₁ z płytek krwi nie stwierdzono jego znaczącego udziału ani w agregacji tych komórek, ani w zmianie ich kształtu [33].

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy uwalniane np. w wyniku uszkodzenia naczyń krwionośnych wywierają wpływ nie tylko na płytki krwi, ale również na inne komórki krwi (monocyty /makrofagi, limfocyty, erythrocyty, komórki dendrytyczne) oraz na komórki śródbłonna. Już pod koniec lat sześćdziesiątych C o h n i P a r k s stwierdzili, że nukleotydy adenino-we dodane do hodowli mysich makrofagów stymu-

nizienie stężenia jonów K⁺ w cytoplazmie, co z kolei uaktywnia enzym przekształcający nieaktywną formę interleukiny pro-IL-1β do formy dojrzałej IL-1β (17 kDa) [35]. ATP może również stymulować wydzielanie interleukiny 1β poprzez aktywację egzocytozy pęcherzyków (późnych endosomów i lizosomów) zawierających tę cytokinę [17].

Innym enzymem pośredniczącym w lizie makrofagów, który podlega regulacji przez zewnątrzkomórkowe trifosforany nukleozydów jest indukowalna syntaza tlenu azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase* — iNOS). ATP i UTP podane wraz z lipopolisacharydem wywołują silniejszą stymulację aktywności indukowalnej syntazy tlenu azotu niż sam LPS [17]. Nukleotydy uczestniczą nie tylko w procesie fagocytozy czynników chorobotwórczych. Oka-

zało się, że nukleotydy są toksyczne dla zainfekowanych makrofagów, a w procesie tym bierze udział receptor P2X₇ (cytotoksyczny wpływ ATP zostaje zniesiony po zablokowaniu tego receptora). Stwierdzono, że ATP indukuje lizę makrofagów zainfekowanych przez prątki *Mycobacterium* za pośrednictwem receptora P2X₇ [36]. Aktywność antybakteryjna trifosforanu adenozyliny może więc mieć istotne znaczenie nie tylko w leczeniu gruźlicy, ale również innych infekcji bakteryjnych.

Na powierzchni ludzkich limfocytów B występują receptory P2X i P2Y. Te ostatnie ulegają aktywacji nie tylko przez ATP i UTP, lecz również przez pozostałe trifosforany nukleozydów (GTP, CTP i ITP) [17]. Nadekspresję receptora P2X₇ stwierdzono w komórkach przewlekłej białaczki leukocytarnej [17]. Ludzkie limfocyty T, pochodzące z krwi obwodowej wykazują ekspresję receptorów P2X₁, P2X₄ i P2X₇, ale do tej pory nie zidentyfikowano na ich powierzchni receptorów P2Y [17]. Obecność receptorów P2Y₁ i P2Y₂ udokumentowano natomiast w przypadku mysich tymocytów, które ulegają apoptozie pod wpływem ATP.

Nukleotydy uwalniane z płytek krwi, neuronów i uszkodzonych komórek regulują również aktywność komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Na powierzchni ludzkich komórek śródbłonna żyły pepowinowej stwierdzono obecność receptorów czterech podklas P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ i P2Y₆ [37]. ATP i ADP, za pośrednictwem receptorów P2Y₁ i P2Y₂, stymulują wydzielanie tlenu azotowego oraz prostacykliny (PGI₂) poprzez aktywację odpowiednio syntazy tlenu azotowego (NOS) i fosfolipazy A₂ [38, 39]. Związki te rozszerzają naczynia krwionośne i hamują agregację płytek krwi. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy zwiększają także adhezję neutrofilii do komórek śródbłonna.

Stymulacja receptorów P2Y występujących na powierzchni komórek śródbłonna prowadzi również do fosforylacji reszty tyrozyny dwóch izoform (p42 i p44) kinazy białkowej aktywowanej przez czynniki mitogenne (ang. *mitogen-activated protein kinase* — MAPK) [40]. Chociaż rola białek G w procesach aktywujących kinazy MAP jest słabo poznana, aktywacja ta jest niezbędna dla indukowanej przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy produkcji prostaglandyny I₂ [40].

W warunkach fizjologicznych ATP wydzielany z neuronów współczulnych reguluje napięcie naczyń krwionośnych poprzez oddziaływanie na komórki mięśni gładkich. Kiedy śródbłonek naczyń zostanie uszkodzony ATP, ADP i UTP uwalniane z płytek

krwi mogą bezpośrednio wpływać na komórki mięśni gładkich powodując ich skurcz i w efekcie hamując krwotok. W procesie tym uczestniczą zarówno receptory jonotropowe (głównie P2X₁), jak i metabotropowe (P2Y₂, P2Y₄ i P2Y₆) [15]. Ich aktywacja powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺, które odgrywają kluczową rolę w zależności od nukleotydu skurczu mięśni. W przypadku komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych ATP (za pośrednictwem receptora P2Y₂) jest również czynnikiem stymulującym syntezę DNA i białek, ekspresję genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (m. in. protoonkogenu *c-fos*) [41]. W proliferacji komórek mięśni gładkich może również uczestniczyć receptor P2Y₄, którego stymulacja przez ATP powoduje z kolei aktywację kaskady kinaz MAP [15].

V-2. Układ oddechowy

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy mogą wpływać na funkcjonowanie komórek wielu typów górnych dróg oddechowych oraz płuc. ATP i UTP stymulują transport jonów Cl⁻ w komórkach nabłonkowych zarówno u osób zdrowych, jak i chorych z torbielowatym zwłóknieniem tych komórek (mukowiscydoza). Wynikiem aktywacji receptora P2Y₂, występującego na powierzchni komórek nabłonkowych, jest wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytoplazmie. Wzrost ten jest niezbędny do aktywacji kanału transportującego jony chlorkowe. Transbłonowy regulator mukowiscydozy (ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator* — CFTR) jest aktywowany przy niskim stężeniu jonów Ca²⁺. U chorych pacjentów białko CFTR jest zmutowane i ulega aktywacji przy znacznie wyższym stężeniu jonów wapnia. Wymagany wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie ma miejsce po podaniu chorym UTP. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy powodują również wzrost wydzielania mucyny przez komórki kubkowe, a następnie jej transport oraz wydzielanie surfaktantu (substancji lipidowej pokrywającej cienką warstwę powierzchnię nabłonka oddechowego) przez komórki pęcherzyków płucnych drugiego rzędu. Z tych względów ATP, a zwłaszcza UTP (uracyl — produkt rozpadu UTP — w przeciwieństwie do adenozyliny nie wywołuje efektów ubocznych) znalazły zastosowanie w terapii chorób układu oddechowego [12, 39]. Obecnie UTP jest podawany w postaci aerozolu chorym na mukowiscydozę, jak również pacjentom cierpiącym na przewlekłe zapalenie oskrzeli.

V-3. Układ nerwowy

Wpływ ATP obserwowano zarówno w przypadku komórek nerwowych, jak i glejowych. Stwierdzono, że może on odgrywać rolę neuroprzekaźnika w połączeniach synaptycznych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. W zależności od typu komórek wywołuje stymulację (neurony przedzwojowe) lub inhibicję (synapsy nerwowo-mięśniowe) wydzielania acetylocholino. Neurony hipokampa z kolei pod wpływem ATP wydzielają glutaminian [1]. ATP bierze udział w przekazywaniu informacji od receptorów bodźców bólowych (nocyceptywnych) w przypadku zespołów zaburzeń neurotroficznych, migreny czy bólów nowotworowych. Podanie ATP powoduje powstanie bólu w miejscu iniekcji, a także ułatwia nocyceptywną odpowiedź na inne szkodliwe czynniki. Efekt ten jest znoszony przez związki będące antagonistami receptorów P2 (suramina, PPADS). Stwierdzono, że receptor P2X₃, którego podwyższoną ekspresję wykryto w nocyceptywnych neuronach czuciowych może w znaczący sposób przyczyniać się do indukcji odczuć bólowych. Z tego względu związki będące antagonistami receptora P2X₃ mogą być rozważane jako potencjalne leki przeciwbólowe [12].

VI. Podsumowanie

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy odgrywają istotną rolę w modulowaniu aktywności poszczególnych komórek, tkanek, a nawet całego organizmu. Mimo że od dawna wiadano o działaniu tych związków za pośrednictwem specyficznych receptorów obecnych na powierzchni prawie wszystkich komórek organizmu, dopiero analiza struktury cDNA i możliwość klonowania w liniach komórkowych nie wykazujących ekspresji żadnego receptora P2, pozwoliła na ustalenie charakterystyki farmakologicznej receptorów poszczególnych podklas. Obecnie prowadzone badania mają na celu zidentyfikowanie poszczególnych elementów i mechanizmów związanych z przekazywaniem sygnałów za pośrednictwem receptorów nukleotydydowych. Coraz bardziej realne wydaje się zastosowanie agonistów i antagonistów receptorów P2 w leczeniu procesów zapalnych, zakrzepów naczyń krwionośnych, schorzeń układu oddechowego i nerwowego, a nawet w terapii nowotworów. Wykazano, że trifosforany nukleotydów mogą powodować inhibicję wzrostu komórek nowotworowych pewnych typów (np. komórek raka prostaty), a nawet ich liżę. Prowadząc drugą fazę badań klinicznych stwierdzono, że podawanie ATP pacjen-

tom z zaawansowanym rakiem płuc prowadzi do zahamowania wzrostu guza i utraty wagi ciała, a także zmniejsza stopień ogólnego wyniszczenia organizmu [42]. Badaniom nad ligandami receptorów nukleotydydowych wykazującymi działanie terapeutyczne powinny jednak towarzyszyć badania nad białkami innymi niż receptory P2, lecz zależnymi od obecności ATP. Aktywność takich enzymów jak ekto-ATPazy, ektonukleotydyazy, kinazy białkowe oraz kanały potasowe regulowane przez ATP może się bowiem zmieniać pod wpływem antagonistów receptorów nukleotydydowych.

Podziękowania

Dziękuję doc. dr hab. Marii Koziółkiewicz za pomoc w opracowaniu niniejszego przeglądu.

Artykuł otrzymano 18 lutego 2002
Zaakceptowano do druku 21 marca 2002

Piśmiennictwo

1. Dubyak GR, El-Moatassim C (1993) *Am J Physiol* **265**: C577-C606
2. Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV (1999) *Trends Pharmacol Sci* **20**: 453-459
3. Communi D, Boeynaems JM (1997) *Trends Pharmacol Sci* **18**: 83-86
4. Boyer JL, Delaney SM, Villanueva D, Harden TK (2000) *Mol Pharmacol* **57**: 805-810
5. Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whitlock N, Burnstock G (1997) *J Biol Chem* **272**: 12583-12590
6. Camaioni E, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK, Jacobson KA (1998) *J Med Chem* **41**: 183-190
7. Conigrave AD, Lee JY, van der Weyden L, Jiang L, Ward P, Tasevski V, Luttrell BM, Morris MB (1998) *Br J Pharmacol* **124**: 1580-1585
8. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM (1999) *Br J Pharmacol* **128**: 1199-1206
9. Koziółkiewicz M, Gendaszewska E, Maszewska M, Stein CA, Stec WJ (2001) *Blood* **98**: 995-1002
10. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M (1997) *Trends Pharmacol Sci* **18**: 79-82
11. Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G (2000) *Br J Pharmacol* **129**: 921-926
12. Williams M, Jarvis MF (2000) *Biochem Pharmacol* **59**: 1173-1185
13. Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM (1997) *J Biol Chem* **272**: 31969-31973
14. Murthy KS, Makhlouf GM (1998) *J Biol Chem* **273**: 4695-4704
15. Kunapuli SP, Daniel JL (1998) *Biochem J* **336**: 513-523
16. Ralevic V, Burnstock G (1998) *Pharmacol Rev* **50**: 413-492
17. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001) *Blood* **97**: 587-600
18. Moro S, Guo D, Camaioni E, Boyer JL, Harden K, Jacobson KA (1998) *J Med Chem* **41**: 1456-1466
19. Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois MH, Humphrey PPA (1998) *Blood* **92**: 3521-3528
20. Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement. *Trends Pharmacol Sci* (1999)

21. Murayama T, Yakushi Y, Watanabe A, Nomura Y (1998) *Eur J Pharmacol* **348**: 71-76
22. Murthy KS, Makhlof GM (1998) *Mol Pharmacol* **54**: 122-128
23. Puceat M, Bony C, Jaconi M, Vassort G (1998) *FEBS Lett* **431**: 189-194
24. King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G (2000) *J Neurosci* **20**: 4871-4877
25. Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7617-7622
26. Ikeuchi Y, Nishizaki T, Mori M, Okada Y (1996) *Eur J Pharmacol* **304**: 191-199
27. Mendoza-Fernandez V, Andrew RD, Barajas-Lopez C (2000) *J Pharmacol Exp Ther* **293**: 172-179
28. Umino T, Yoshioka K, Saitoh Y, Minakawa N, Nakata H, Matsuda A (2001) *J Med Chem* **44**: 208-214
29. Chinellato A, Ragazzi E, Pandolfo L, Froidi G, Caparotta L, Fassina G (1994) *Pharm Pharmacol* **46**: 337-341
30. Yoshioka K, Matsuda A, Nakata H (2001) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**: 278-284
31. King BF, Wildman SS, Townsend-Nicholson A, Burnstock G (1998) *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 1005-1011
32. Matsuoka I, Zhou Q, Ishimoto H, Nakanishi H (1995) *Mol Pharmacol* **47**: 855-62
33. Kunapuli SP (1998) *Trends Pharmacol Sci* **19**: 391-394
34. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001) *Nature* **409**: 202-207
35. Perregaux D, Barberia J, Lanzetti AJ, Geoghegan K F, Carty TJ, Gabel CA (1992) *J Immunol* **149**: 1294-1303
36. Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS (1997) *Immunity* **7**: 433-444
37. Jin J, Dasari VR, Sistare FD, Kunapuli SP (1998) *Br J Pharmacol* **123**: 789-794
38. Boeynaems JM, Pearson JD (1990) *Trends Pharmacol Sci* **11**: 34-37
39. Boarder MR, Weisman GA, Turner JT, Wilkinson G F (1995) *Trends Pharmacol Sci* **16**: 133-139
40. Patel V, Brown C, Goodwin A, Wilkie N, Boarder MR (1996) *Biochem J* **320**: 221-226
41. Malam — Souley R, Campan M, Gadeau AP, Desgranges C (1993) *Am J Physiol* **264**: C783-C788
42. Burnstock G, Williams M (2000) *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 862-869

Adenozyna — neuroprzekaznik i neuromodulator w centralnym układzie nerwowym

Adenosine — neurotransmitter and neuromodulator in central nervous system

MAŁGORZATA ROMANOWSKA¹, MICHAŁ KOMOSZYŃSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Stężenie adenozyny w komórce i przestrzeniach międzykomórkowych
 - II-1. Metabolizm adenozyny w komórce
 - II-2. Źródła ektoadenozyny
- III. Receptory adenozynowe w centralnym układzie nerwowym
- IV. Regulacja stężenia ektoadenozyny
 - IV-1. Transport adenozyny przez błonę komórkową
 - IV-1.1. Transport bierny nośnikowy
 - IV-1.2. Transport aktywny
 - IV-2. Lokalizacja i funkcja deaminazy ektoadenozyny w centralnym układzie nerwowym
 - IV-2.1. Lokalizacja deaminazy adenozyny w strukturach mózgu
 - IV-2.2. Udział deaminazy adenozyny w regulacji stężenia ektoadenozyny
- V. Funkcje adenozyny w centralnym układzie nerwowym
 - V-1. Regulacja wydzielania neuroprzekazników z udziałem receptorów adenozynowych A₁
 - V-2. Regulacja wydzielania neuroprzekazników za pośrednictwem receptorów A_{2A}, A_{2B} i A₃.
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: CGS 21680 — 2-[p-(2-karbo-nylo-etylo)-fenyloetyloamino]-5'-N-etylokarboksamidoadenozyna; CSC-8-8-(3-chlorostyrylo)kofeina; DMPX — 1,3-dimetylo-7-propyloksantyna; IB-MECA-N⁶-(3-jodobenzyl)-adenozyno-5'-N-metylokarboksamid; NBMPR — nitrobenzylotioinozyna; P1 — receptory adenozynowe; P2 — receptory nukleotydowe; ADA — deaminaza adenozyny; ADA-BP — białko wiążące deaminazę adenozyny (ang. *Adenosine Deaminase Binding Protein*); Ado — adenozyna, Ino — inozyna.

¹Mgr, ²prof. dr hab., Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biochemii, 87-100 Toruń, ul. Gagarina 9, tel. (0-56) 6114520, e-mail: malgrom@biol.uni.torun.pl, michkom@dove.boa.uni.torun.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Intra- and extracellular concentration of adenosine
 - II-1. Intracellular metabolism of adenosine
 - II-2. Sources of ecto-adenosine
- III. Adenosine receptors in central nervous system
- IV. Regulation of extracellular adenosine concentration
 - IV-1. Adenosine transport across the cell membrane
 - IV-1.1. Equilibrative nucleoside transport
 - IV-1.2. Active transport of nucleoside
 - IV-2. Localization and function of ectoadenosine deaminase (ADA) in central nervous system
 - IV-2.1. Distribution of adenosine deaminase in the brain regions
 - IV-2.2. Participation of adenosine deaminase in the control of ectoadenosine concentration
- V. Functions of adenosine in the central nervous system
 - V-1. Regulation of neurotransmitters secreting by A₁ adenosine receptors
 - V-2. Regulation of neurotransmitters secreting by adenosine receptors A_{2A}, A_{2B} i A₃.
- VI. Concluding remarks.

I. Wstęp

Nukleozydy i nukleotydy purynowe (adenozyna, ADP, ATP, polifosforany adenozyny) oraz pirymidynowe (UDP, UTP) obecne w przestrzeniach międzykomórkowych i płynach ustrojowych mogą funkcjonować jako cząsteczki sygnałowe. Związki te, wiążąc się ze zlokalizowanymi na powierzchni błon komórkowych specyficznymi receptorami adenozynowymi — P1 i nukleotydowymi — P2, określanymi dawniej jako purynergiczne, aktywują w komórkach wiele reakcji fizjologicznych [1, 2]. Ich wynikiem są zmiany powstające natychmiast po aktywacji receptorów (egzocytoza, zmiana stężenia wtórnych przekazników) lub pojawiające się i trwające przez dłuższy okres czasu (zmiana ekspresji genów i szybkości proliferacji komórek). W komórkach są wszystkie elementy niezbędne do przekazywania sygnału z

udziałem adenozyne: 1) adenozyne (cząsteczka sygnałowa), 2) białkowe transportery tego nukleozydu przez błonę komórkową, 3) substraty i enzymy niezbędne do produkcji adenozyne w przestrzeniach międzykomórkowych, 4) receptory adenozynowe (purynoreceptory P1) oraz 5) enzymy — deaminaza adenozyne i/lub białka (transportery adenozyne) niezbędne do inaktywacji sygnału. Udział adenozyne w regulacji aktywności metabolicznej komórek mięśnia sercowego wykazano po raz pierwszy już w 1929 roku [3]. Jednym z najwcześniejszych doniesień o wpływie nukleozydu na układ nerwowy było stwierdzenie, że adenozyne stymuluje syntezę cAMP w komórkach kory mózgowej świnki morskiej, a powstawanie wtórnego przekaźnika sygnału jest blokowane w obecności metyloksantyn [4]. Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że adenozyne uczestniczy w regulacji metabolizmu układu nerwowego, krwionośnego, immunologicznego, oddechowego i wydalniczego [1, 2].

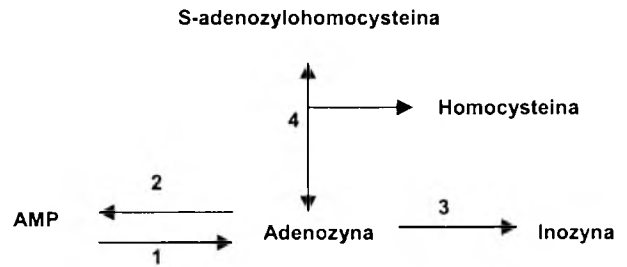
Celem artykułu jest omówienie wyników badań mechanizmów przekazywania informacji z udziałem adenozyne w centralnym układzie nerwowym. W artykule dużo miejsca poświęcono również udziałowi tego nukleozydu w ochronie tkanek w okresie niedotlenienia i niedokrwienia, a także deaminazie ektoadenozyne (ADA), która jak wskazują rezultaty badań, może być odpowiedzialna za inaktywację sygnału adenozynowego.

II. Stężenie adenozyne w komórce i przestrzeniach międzykomórkowych

Stężenie wewnątrzkomórkowej i pozakomórkowej adenozyne jest wynikiem procesów syntezy, transportu przez błonę komórkową oraz degradacji. W warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej adenozyne w mózgu jest nanomolowe, a w warunkach stresowych takich jak niedotlenienie i niedokrwienie, jak również po depolaryzacji błony komórkowej pod wpływem bodźców elektrycznych czy chemicznych wzrasta do poziomu mikromolowego [5-9].

II-1. Metabolizm adenozyne w komórce

Istnieją dwa główne źródła wewnątrzkomórkowej adenozyne (Ryc. 1). Podstawowym jej źródłem w komórce jest hydroliza nukleotydów adeninowych. Wiele badań wskazuje, że wywołane niedotlenieniem zmiany w metabolizmie komórki powodują spadek stężenia wewnątrzkomórkowego ATP. Ich efektem jest wzrost ilości ADP, AMP i Ado [10].



Ryc. 1. Przemiany adenozyne w komórce. 1 — 5'-nukleotydaza, 2 — kinaza adenozyne, 3 — deaminaza adenozyne, 4 — hydrolaza S-adenozylhomocysteiny.

Wewnątrzkomórkowa Ado może ulegać deaminacji do inozyny (Ino) i jonów amonowych w reakcji katalizowanej przez deaminazę adenozyne, lub z udziałem kinazy adenozyne może być fosforylowana do AMP. Rezultaty badań wskazują, że K_m kinazy adenozyne względem Ado jako substratu jest o 1-2 rzędy wielkości mniejsze niż K_m deaminazy. Z tego względu uważa się, że w warunkach fizjologicznych większą rolę w degradacji komórkowej Ado gra kinaza, podczas gdy rola deaminazy może wzrastać w warunkach zwiększonego stężenia nukleozydu [11].

W komórce adenozyne może powstawać również w wyniku przemiany S-adenozylhomocysteiny (SAH) z udziałem hydrolazy S-adenozylhomocysteiny (SAHH). Reakcja katalizowana przez tę hydrolazę jest reakcją odwracalną syntezy S-adenozylhomocysteiny [10]. W mózgu hydrolaza S-adenozylhomocysteiny jest obecna zarówno w neuronach, jak i w komórkach glejowych [12]. Wydaje się, że znaczenie SAHH w przemianach adenozyne jest nieduże, ponieważ stężenie SAH wewnątrz komórki jest niskie.

II-2. Źródła ektoadenozyne

Wysunięto kilka hipotez mówiących o pochodzeniu zewnątrzkomórkowej adenozyne [10]. Źródłem tego nukleozydu w przestrzeniach pozakomórkowych może być:

- egzocytoza,
- transport z udziałem przekaźników białkowych obecnych w błonach komórkowych
- hydroliza zewnątrzkomórkowych nukleotydów adeninowych (ATP, cAMP, polifosforanów adenozyne) przez ektoenzymy,
- liza komórek.

Precyzyjne określenie udziału białkowych przekaźników nukleotydów w transporcie adenozyne na zewnątrz komórki jest trudne, ponieważ transport

adenozyny zarówno do, jak i z komórki odbywa się zgodnie z gradientem stężeń tego związku po obu stronach błony komórkowej. Najlepiej poznanym źródłem ektoadenozyny jest hydroliza ektonukleotydów. ATP, podobnie jak inne neuroprzekaźniki, pojawia się w szczelinie synaptycznej w wyniku egocytozy zależnej od jonów Ca^{2+} [13-15]. Obecność ektoenzymów hydrolizujących zewnątrzkomórkowy ATP do ADP, AMP i adenozyne stwierdzono we wszystkich dotychczas badanych strukturach układu nerwowego. W procesie tym uczestniczą następujące ektohydrolazy: ATPaza [EC 3.6.3], ATP difosfohydrolaza [EC 3.6.1.5] oraz 5'-nukleotydaza [EC 3.1.3.5] [16]. Hydrolizę zewnątrzkomórkowego ATP prowadzącą do powstawania adenozyne obserwowano między innymi w płycie nerwowo-mięśniowej [15], cholinergicznym synapsach prądkowia [17] i hipokampu [18] oraz skrawkach hipokampu i kory mózgowej [15]. Wydaje się, iż degradacja ATP przez ektoenzymy jest podstawowym źródłem tego nukleozydu poza komórką.

Innym źródłem zewnątrzkomórkowej adenozyne może być degradacja pozakomórkowego cAMP [19] i polifosforanów adenozyne [16]. Hydrolizę pozakomórkowego cAMP do adenozyne przez ektofosfodiesterazę obserwowano w hipokampie, korze mózgowej i synaptosomach rdzenia kręgowego [10].

III. Receptory adenozynowe w centralnym układzie nerwowym

W centralnym układzie nerwowym obecne są wszystkie podtypy receptorów P1 — A_1 , A_{2A} , A_{2B} , i A_3 [2].

Receptory A_1 charakteryzujące się wysokim powinowactwem do adenozyne mogą być aktywowane przez nanomolowe stężenie tego związku poza komórką [2]. Obecność tych receptorów wykryto w pre- i postsynaptycznych błonach neuronów takich struktur jak kora mózgowa, hipokamp, wzgórze, mózdzek, prądkowie i rdzeń kręgowy [2, 20].

Receptory A_{2A} sklonowano przy użyciu biblioteki cDNA hipokampu człowieka [21], mózgu szczura [22] i mózgu świnki morskiej [23]. Receptory te podobnie jak A_1 mają duże powinowactwo do adenozyne. Do niedawna, stosując techniki o niskiej czułości sądzono, że w centralnym układzie nerwowym receptory A_{2A} występują tylko w rejonach bogatych w unerwienie dopaminergiczne. W neuronach prądkowia receptory A_{2A} występują razem z receptorami D_2 [24]. Nowe badania stosujące metodę RT-PCR, która charakteryzuje się większą czułością, wykazały niewielką ilość mRNA receptora A_{2A} w hipokampie, ko-

rze mózgowej, mózdzku, wzgórzu i podwzgórzu [20].

Receptory A_{2B} sklonowano przy wykorzystaniu biblioteki cDNA hipokampu człowieka [25] i mózgu szczura [26]. Stosując RT-PCR stwierdzono we wszystkich badanych strukturach mózgu szczura niski poziom mRNA tego receptora [20]. Receptory A_{2B} wymagają do swojej aktywacji wysokich, mikromolowych stężeń adenozyne. Uważa się więc, że odgrywają większą rolę w warunkach patologicznych, podczas których stężenie pozakomórkowej adenozyne wzrasta. Rezultaty badań innych autorów sugerują, że receptory te mogą być również aktywowane przez fizjologiczne stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyne [27]. Funkcje receptora A_{2B} w układzie nerwowym nie zostały poznane. W przeciwieństwie do receptorów A_1 i A_{2A} trudności w badaniu tego podtypu receptora wynikają przede wszystkim z braku selektywnych ligandów.

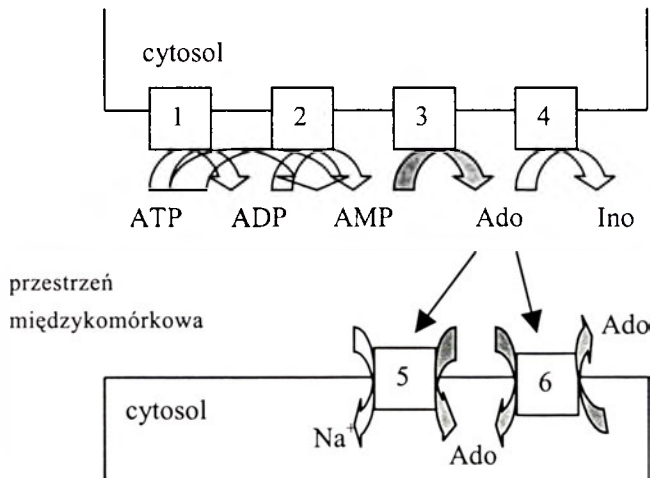
Receptor A_3 jest najpóźniej zidentyfikowanym receptorem P1. Został sklonowany przy wykorzystaniu biblioteki cDNA prądkowia szczura [28] i człowieka [29]. Podobnie jak receptor A_{2B} wymaga do aktywacji wysokich, mikromolowych stężeń Ado. Z udziałem RT-PCR stwierdzono obecność niewielkiej ilości mRNA tego receptora w wielu rejonach mózgu szczura, m. in. w korze mózgowej, hipokampie, prądkowiu, wzgórzu, podwzgórzu i mózdzku [20].

IV. Regulacja stężenia ektoadenozyny

Adenozyna może być usuwana z przestrzeni pozakomórkowych w wyniku transportu do komórki poprzez przenośniki białkowe transportujące nukleozydy i dopiero wewnątrz komórki metabolizowana z udziałem wewnątrzkomórkowej kinazy adenozyne i deaminazy adenozyne lub może ulegać deaminacji poza komórką w wyniku reakcji katalizowanej przez deaminazę ektoadenozyny [10]. Adenozyna byłaby więc cząsteczką sygnałową, której stężenie w przestrzeni pozakomórkowej regulowałyby dwa różne mechanizmy: 1) degradacja przez ektoenzym i 2) transport do komórki i przemiany nukleozydu dopiero w jej wnętrzu (Ryc. 2).

IV-1. Transport adenozyne przez błonę komórkową

Nukleozydy są cząsteczkami, które, między innymi ze względu na rozmiar i hydrofilność, nie mogą swobodnie przenikać przez błony plazmatyczne. Rezultaty badań wskazują, że pojedyncze neurony piramidalne regionu CA1 hipokampu szczura są zdolne do uwalniania adenozyne na zewnątrz, jeśli wzrasta



Ryc. 2. Źródła ektoadenozyny. 1 — ekto-ATPaza, 2 — ektoATPdifosfohydrolaza, 3 — ekto-5-nukleotydaza, 4 — kompleks deaminazy ektoadenozyny i białka wiążącego (ADA-BP), 5 i 6 — przenośniki białkowe nukleozydów, Ado — adenozyzna, Ino — inozyzna

jej stężenie w komórce [30]. Wyniki tych badań sugerują, że w błonach komórkowych neuronów muszą funkcjonować przenośniki białkowe, które transportują adenozyznę.

W komórkach ssaków transport nukleozydów odbywa się zgodnie z gradientem stężeń drogą transportu biernego nośnikowego (ang. *equilibrative nucleoside transport*) lub aktywnego symportu z jonami sodu (ang. *sodium-dependent concentrative nucleoside transport*), gdzie nukleozydy transportowane są wbrew gradientowi stężeń [31]. Oba rodzaje transportu nukleozydów występują również w komórkach mózgu [31].

IV-1.1. Transport bierny nośnikowy

Transport nukleozydów przez błonę komórkową może odbywać się zgodnie z gradientem stężenia przenoszanej cząsteczki. Jest to sposób przenikania substancji przez błony określany jako bierny transport nośnikowy lub dawniej jako dyfuzja ułatwiona [31-33]. Przenośniki nukleozydów działające według zasad transportu biernego nośnikowego są obecne w komórkach wielu typów i wykazują małą selektywność wobec przenoszonych cząsteczek. Transportują zarówno nukleozydy purynowe, jak i pirymidynowe [31]. W transportie biernym nośnikowym nukleozydów uczestniczą dwa typy nośników białkowych: 1) *es* (ang. *equilibrative sensitive*) — wrażliwy na działanie inhibitora transportu nukleozydów — nitrobenzylotioinozyny (NBMPR) oraz 2) *ei* (ang. *equilibrative insensitive*) — niewrażliwy na NBMPR [32]. W centralnym układzie nerwowym obecność białek transportujących nukleozydy na zasadzie transportu biernego stwierdzono między innymi w synaptosomach kory mózgu szczura [34] i świniki morskiej [35] oraz w błonach komórkowych

komórek glejowych [36]. Komórki mogą zawierać jednocześnie obydwa typy białek przenośnikowych, czego przykładem mogą być synaptosomy z mózgu świniki morskiej [31].

IV-1.2. Transport aktywny

Przenośniki białkowe uczestniczące w symporcie nukleozydów (kotransporcie) z jonami Na⁺ transportują nukleozydy tylko do wnętrza komórki [31, 37-39]. Dotychczas opisano i scharakteryzowano w komórkach ssaków 5 typów przenośników nukleozydów wykorzystujących gradient jonów Na⁺ [38]. Są to przenośniki: N1 (selektywny dla puryn, ale transportuje również urydynę), N2 (selektywny dla pirymidyn, ale transportuje także adenozyznę), oraz przenośniki N3, N4 i N5, które charakteryzują się niską specyficznością w stosunku do przenoszonych cząsteczek [38]. Dotychczas niewiele wiadomo o aktywnym symporcie adenozyzny w układzie nerwowym i znaczeniu tego procesu dla przekazywania informacji z udziałem receptorów P1. Obecność mRNA kodującego przenośnik typu N2 wykazano we wszystkich przebadanych strukturach mózgu szczura, m.in. w splocie naczyniówkowym, tylnym podwzgórzu, korze mózgowej, hipokampie, mózdzku oraz pniu mózgu. W mózgu szczura stwierdzono również obecność mRNA kodującego przenośnik białkowy typu N1 [40]. Do tej pory brak jest informacji na temat występowania tego rodzaju przenośników w rejonie szczeliny synaptycznej.

IV-2. Lokalizacja i funkcje deaminazy ektoadenozyny w centralnym układzie nerwowym

Jednym z enzymów, który reguluje stężenie adenozyzny w komórce i przestrzeniach pozakomórko-

wych jest deaminaza adenozyiny (ADA) [EC.3.5.4.4]. Deaminaza adenozyiny uczestniczy w regulacji stężenia wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej adenozyiny i deoksyadenozyiny. Większość badań poświęconych lokalizacji komórkowej i subkomórkowej tego enzymu w układzie nerwowym dotyczy form rozpuszczalnych [41,42]. Do dnia dzisiejszego nie udało się wyizolować i oczyścić do homogenności enzymu z błon komórkowych komórek nerwowych lub glejowych.

IV-2.1. Lokalizacja deaminazy adenozyiny w strukturach mózgu

Aktywność deaminazy adenozyiny w obrębie układu nerwowego jest niższa niż w komórkach innych tkanek. Regionami mózgu o największej aktywności deaminazy adenozyiny u szczura, myszy oraz świnki morskiej są przednie i tylne podwzgórze, opuszka węchowa i wzgórek górny blaszki czworaczej. Najniższą aktywność enzymu stwierdzono w prążkowie, korze mózgowej i hipokampie [43]. Badano również subkomórkową lokalizację aktywności enzymu między innymi w korze mózgowej, mózdzku, hipokampie i podwzgórze szczura [43,44]. W badaniach tych stwierdzono, że większość aktywności deaminazy adenozyiny związana jest z frakcją cytosolową i tylko około 25% aktywności tego enzymu znajduje się w frakcji błon komórkowych [43, 45].

IV-2.2. Udział deaminazy adenozyiny w regulacji stężenia ektoadenozyiny

Deaminaza ektoadenozyiny uwalnia receptory P1 od naturalnego liganda — adenozyiny przynajmniej w niektórych obszarach mózgu [17]. Udział deaminazy ektoadenozyiny w metabolizmie pozakomórkowego ATP i adenozyiny został stwierdzony między innymi w immunologicznie oczyszczonych synapsach cholinergicznym prążkowie [17]. Po stymulacji neuronu obserwowano w tej strukturze uwalnianie acetylocholino i ATP. ATP był następnie hydrolizowany przez szereg ektoenzymów do ADP, AMP oraz adenozyiny. Produkt hydrolizy — adenozyina uczestniczyła w presynaptycznej inhibicji wydzielania acetylocholino. W obszarze synaps obserwowano również deaminację adenozyiny do inozyiny. Powyższe obserwacje sugerują udział deaminazy adenozyiny w uwalnianiu purynoreceptorów P1 od naturalnego agona [17]. Ci sami autorzy stwierdzili również niską aktywność deaminazy adenozyiny w cholinergicznym synapsach kory mózgowej i hipokampu [17, 18].

Interesującą jest obserwacja, że występująca na powierzchni błony komórkowej deaminaza adenozyiny

nie jest glikoproteina i nie zawiera peptydu sygnałowego kierującego ją do błony komórkowej [46]. Nie wiadomo więc, w jaki sposób enzym może pojawiać się na zewnątrz komórki, czy odbywa się to w wyniku sekrecji czy lizy [16, 46, 47]. Znany jest natomiast sposób umocowania enzymu w błonie komórkowej. Deaminaza adenozyiny może ulec asocjacji z białkami wiążącymi deaminazę adenozyiny — ADA-BP (ang. *ADA-Binding Protein*) i utworzyć kompleksy o dużej masie cząsteczkowej. Część białek należących do ADA-BP to integralne białka błonowe, z udziałem których enzym może zostać związany z strukturą błony komórkowej. Są znane dwa takie białka: białko CD26 identyczne z dipeptydylopeptydazą IV oraz receptor A_{2B} limfocytów T [46]. Stosując przeciwciała dowiedziono, że deaminaza adenozyiny i receptory A_1 mają identyczną lokalizację (kolokalizację) w strukturze błon komórek mięśni gładkich DDT₁MF-2 oraz membran neuronów kory mózgowej szczura [48-53]. W 1996 roku S a u r a i in. wykazali, że deaminaza adenozyiny występuje w kolokalizacji z receptorami A_1 błon plazmatycznych kory mózgu wieprzowego [49]. Było to pierwsze doniesienie o kolokalizacji w błonach plazmatycznych mózgu ektoenzymu i receptora, którego naturalny agon jest jednocześnie substratem enzymu. W późniejszym doniesieniu ci sami autorzy stwierdzają wspólną internalizację w komórkach deaminazy adenozyiny i receptorów A_1 [52, 53]. Autorzy sądzą, że receptory A_1 występują w dwu stanach charakteryzujących się różnym powinowactwem do adenozyiny. Receptor o wysokim powinowactwie do adenozyiny ($K_d=0.1-0.2$ nM) to receptor związany z białkiem G, natomiast receptor niezwiązany z białkiem G ma niższe powinowactwo ($K_d=1-2$ nM). Wykazano, że w nieobecności deaminazy adenozyiny receptory te posiadają niskie powinowactwo do adenozyiny. Badania te sugerują więc, że w komórce oprócz funkcji katalitycznej, jaką jest deaminacja zewnątrzkomórkowej adenozyiny, deaminaza adenozyiny, zwiększając powinowactwo receptora do białka G pełni funkcję pozaenzymatyczną [52, 53]. Limfocyty z udziałem białka CD26 i deaminazy adenozyiny mogą wiązać się z komórkami zrębu tkanki limfatycznej [46]. Ta obserwacja oraz interakcja i kolokalizacja deaminazy adenozyiny zarówno z receptorami A_1 i białkiem CD26 stała się podstawą hipotezy, że ADA podczas tworzenia się struktur nerwowych może pełnić również funkcję cząsteczki ułatwiającej adhezję komórek neuron/neuron, neuron/komórka glejowa, komórka glejowa/komórka glejowa podczas tworzenia się struktur nerwowych [46, 47].

V. Funkcje adenozy w centralnym układzie nerwowym

Badania roli adenozy w układzie nerwowym dotyczą jej funkcji jako:

- 1) neuromodulatora biorącego udział w przekazywaniu sygnału nerwowego
- 2) cząsteczki odgrywającej istotną rolę w ochronie neuronów w sytuacjach stresowych
- 3) związku o charakterze parakrynowym uczestniczącym w procesach proliferacji i apoptozy komórek wielu typów [2, 54].

Jedną z głównych funkcji adenozy w centralnym układzie nerwowym jest regulacja wydzielania neuroprzekazników [55, 56]. Neuromodulator może wpływać na wydzielanie i efekty fizjologiczne mediatorów synaptycznych za pośrednictwem receptorów pre-, post- i pozasynaptycznych [57]. W modulację wydzielania neuroprzekazników w szczelinie synaptycznej są zaangażowane przede wszystkim receptory A_1 i A_{2A} . Niewiele zaś na razie wiadomo o udziale w tym procesie receptorów A_{2B} i A_3 [2].

V-1. Regulacja wydzielania neuroprzekazników z udziałem receptorów adenozy A_1

W obrębie centralnego układu nerwowego za pośrednictwem receptorów A_1 adenoza hamuje wydzielanie przez neurony: acetylocholiny [15, 58], noradrenaliny [59, 60] dopaminy [61], glutaminianu [62], serotoniny [63] i GABA [64, 65].

W warunkach fizjologicznych stężenie pozakomórkowej Ado wynosi 0,3-300 nM. W sytuacjach stresowych typu niedotlenienie, niedokrwienie, hipoglikemia lub nadmiar dwutlenku węgla we krwi (hiperkapnia) może wzrosnąć nawet stukrotnie, do poziomu mikromolowego [66]. Podczas niedokrwienia mózgu następuje uwalnianie nadmiernych ilości neuroprzekazników pobudzających (głównie aminokwasów- glutaminianu i asparaginianu) oraz osłabienie wychwytu glutaminianu przez astrocyty. Jakkolwiek brak jest dowodów to fakt, że ATP jest magazynowane w pęcherzykach synaptycznych wraz z innymi pobudzającymi neurotransmiterami, może sugerować, że aktywacja presynaptycznych receptorów A_1 ogranicza również wydzielanie ATP — prekursora adenozy. Efektem tych procesów jest nadmierna aktywacja receptorów glutaminianergicznych zarówno metabotropowych jak i jonotropowych (w tym również receptorów NMDA). Prowadzi to do niekontrolowanej depolaryzacji neuronów i przedłużającej się ich aktywności. Nadmierna i przedłużająca się aktywacja receptorów glutaminianergicz-

nych powoduje degenerację komórek nerwowych. Jest to zjawisko określane jako ekscytotoksyczność. Główną i destrukcyjną rolę przypisuje się w tym procesie jonom Ca^{2+} . Wysokie stężenie jonów wapnia w cytoplazmie uruchamia procesy prowadzące do degeneracji neuronów, w wyniku tworzenia wolnych rodników i nadtlenków oraz aktywacji niszczących strukturę komórki proteaz, nukleaz i fosfolipaz [66-69]. W tych warunkach podstawową funkcją adenozy jest hamowanie aktywności neuronów przez zmniejszanie ilości neuroprzekazników pobudzających. Zapobiega to degradacji neuronów. W tym procesie uczestniczą głównie receptory A_1 związane z błoną presynaptyczną. Autorzy rozważają następujące mechanizmy hamowania presynaptycznego:

- otwieranie presynaptycznych kanałów K^+ prowadzące do hiperpolaryzacji neuronów i zahamowania wpływu jonów Ca^{2+} przez kanały bramkowane napięciem [10],
- zamykanie kanałów wapniowych w błonach presynaptycznych prowadzące do bezpośredniego hamowania egzocytozy uwarunkowanej jonami Ca^{2+} [70, 71],
- oddziaływanie na egzocytozę pęcherzyków synaptycznych, ale bez wpływu na przemieszczanie się jonów Ca^{2+} [72].

Dodatkowo aktywacja postsynaptycznych receptorów A_1 może powodować zmniejszanie pobudliwości błony postsynaptycznej oraz hiperpolaryzację poprzez zwiększanie przewodności błony komórkowej dla jonów K^+ i zmniejszanie przewodności dla jonów Ca^{2+} [73,74]. Adenoza za pośrednictwem receptorów A_2 stymuluje na poziomie pozasynaptycznym powstawanie glukozy w astrocytach w procesie glikogenolizy oraz zwiększa dopływ krwi do rejonów mózgu objętych niedotlenieniem/niedokrwieniem poprzez rozszerzanie naczyń krwionośnych i hamowanie agregacji płytek krwi [66, 75, 76].

V-2. Regulacja wydzielania neuroprzekazników za pośrednictwem receptorów A_{2A} , A_{2B} i A_3

Przypuszcza się, że jedną z głównych funkcji receptorów A_3 w mózgu jest regulacja aktywności receptorów A_1 [10]. Stwierdzono, że aktywacja receptorów A_3 w hipokampie szczura powoduje odczulenie receptorów A_1 , których aktywność hamuje wydzielanie neuroprzekazników pobudzających [77]. Stwierdzono również, że poprzedzający niedokrwienie mózgu różnicowany czas stymulacji *in vivo* receptorów A_3 hipokampu przez selektywny agon —

IB-MECA (N⁶-(3-jodobenzylo)-adenozyno-5'-N-metylokarboksamid) wywiera istotny wpływ na przeżywalność neuronów i przepływ krwi w naczyniach. Krótkotrwała stymulacja tego podtypu receptorów wywołuje zwiększenie uszkodzeń neuronów i zmniejszenie przepływu krwi, natomiast długotrwała stymulacja powoduje prawdopodobnie ich odczulenie. Prowadzi to do zwiększenia krążenia krwi i zmniejszenia zmian neuropatologicznych [78]. Wydaje się więc, że w przeciwieństwie do receptorów A₁, które w warunkach stresowych pełnią funkcje ochronne wobec neuronów, receptory A₃ mogą indukować śmierć komórek [69, 78].

Adenozyna i inne agony receptorów A_{2A} zwiększają uwalnianie neurotransmitterów w obrębie centralnego i obwodowego układu nerwowego [2]. W hipokampie stwierdzono obecność receptorów presynaptycznych A₁ hamujących, jak i presynaptycznych receptorów A_{2A} zwiększających uwalnianie acetylocholin [58]. C u n h a i inni stwierdzili również, że uwalnianie acetylocholin w różnych regionach hipokampu może być regulowane przez odmienne podtypy receptorów P₁. Selektyny agon receptora A_{2A} — CGS-21680 powoduje zwiększanie wydzielania [H³]-acetylocholin podczas stymulacji elektrycznej w regionie CA3 i w obszarze "dentate gyrus" hipokampu. W obszarze CA1 były obecne tylko receptory A₁ związane z hamowaniem wydzielania acetylocholin [58]. Podobnie CGS21680 zwiększał wydzielanie [H³]-acetylocholin z synaptosomów hipokampu i prądkowia [79, 80]. Ten efekt w synaptosomach hipokampu znosił nieselektywny antagonist receptorów A₂ — DMPX (1,3-dimetylo-7-propyloksantyna) oraz antagonist receptorów A_{2A} — CSC (8-8-(3-chlorostyrylo)kofeina) [79]. Bardzo interesującym wydaje się fakt, że adenozyna, która stymuluje receptory A₁ oraz A_{2A} w szczelinie synaptycznej hipokampu może pochodzić z różnych puli nukleozydu. Wydaje się, że podczas stymulacji prądem o dużej częstotliwości (100 Hz) adenozyna w szczelinie synaptycznej pochodzi głównie z hydrolizy pozakomórkowego ATP. Ta pula pozakomórkowej adenozyny stymuluje głównie receptory A_{2A}, podczas gdy adenozyna aktywująca receptory A₁ jest uwalniana bezpośrednio przez komórkę [15, 81].

Receptory A_{2A}, podobnie jak receptory A₁, modulują tak uwalnianie acetylocholin jak i wydzielanie innych neuroprzekaźników. Selektyny agon receptorów A_{2A} z GABAergicznymi neuronami łączącymi prądkowie z kompleksem gałki bladej — CGS-21680 zwiększa uwalnianie GABA spowodowane stymulacją elektryczną [82]. Nie jest do końca poznany mechanizm, dzięki któremu agony presy-

naptycznego receptora A_{2A} mogą zwiększać wydzielanie neuroprzekaźników. Sądzi się, że w przeciwieństwie do presynaptycznych receptorów A₁, które hamują wydzielanie neuroprzekaźników zamykając kanały wapniowe, receptory A_{2A} otwierają kanały wapniowe w błonach komórkowych neuronów oraz promują egzocytotę zależną od jonów wapnia [83, 84]. Receptory A_{2A} aktywują cyklazę adenylanową. Brak jednak dowodów czy związana z receptorami A_{2A} aktywacja kanałów wapniowych w błonach presynaptycznych regionu CA3 hipokampu szczura wymaga udziału cAMP i kinazy białkowej A, kinazy białkowej C lub tylko białka G [84]. Na powierzchni różnych typów komórek ekspresji może ulegać więcej niż jeden podtyp receptora P₁. Taka sytuacja zachodzi między innymi w przypadku receptorów A₁ i A_{2A} błon presynaptycznych regionu CA3 hipokampu szczura oraz zakończeń nerwowych prądkowia [58,85]. Wiadomo, że receptory A_{2A} z zakończeń nerwowych prądkowia regulują powinowactwo receptorów D₂ do agona [86]. Okazuje się, że selektywny agon receptorów A_{2A} — CGS21680 może powodować również odczulenie i zmniejszenie powinowactwa receptorów A₁ do agona. W proces ten jest zaangażowana kinaza białkowa C [85].

Udział receptorów A_{2B} w regulacji egzocytoty neuroprzekaźników nie jest do końca wyjaśniony. Niektóre badania wskazują na udział tego podtypu receptora w modulacji wydzielania neuroprzekaźników w pniu mózgu i hipokampie [27, 87].

VI. Podsumowanie

Ektopuryny i ich receptory występują w przestrzeniach międzykomórkowych każdej tkanki i narządu ssaków. Regulują wiele procesów fizjologicznych, a zmiany w ich metabolizmie lub stężeniu mogą być przyczyną procesów patofizjologicznych [88]. Trudno przecenić rolę ektoadenozyny w regulacji metabolizmu centralnego układu nerwowego, układu krwionośnego czy nerek. Puryny są stosowane w hamowaniu rozwoju chorób Parkinsona i Alzheimera a także w terapii przeciwbólowej [89,90]. Nukleozyd ten używany jest w leczeniu schorzeń serca i naczyń krwionośnych. Adenozyna jest lekiem stosowanym w terapii zawałów, a jego analogi używane jako czynnik antyagregacyjny [76]. Adenozyna i agony receptorów P₁ są lekami stosowanymi w leczeniu chorób nerek i układu oddechowego, leczeniu astmy [88]. Z tych też powodów poznanie mechanizmu przekazywania sygnałów z udziałem adenozyny i purynoreceptorów P₁ ma ogromne znaczenie praktyczne. Jednak mimo intensywnych i wieloletnich badań

nie wyjaśniono szeregu istotnych spraw związanych z przenoszeniem sygnałów z udziałem receptorów P1. Brakuje bezpośrednich dowodów wskazujących na źródła tego nukleozydu i nie poznany jest mechanizm eksportu adenozyiny poza komórkę, a rola deaminazy ektoadenozyiny również w tych procesach budzi kontrowersje. Wykazano bowiem, że w wielu rejonach mózgu aktywność deaminazy jest bardzo niska, a inne są jej pozbawione [17, 18]. Z naszych badań nad enzymami metabolizującymi ektopuryny w naczyniach krwionośnych człowieka wynika, iż aktywność deaminazy ektoadenozyiny stanowi niewielki procent aktywności innych ektohydrolaz nukleotydów purynowych [91]. Skutkiem tego we krwi utrzymuje się stały wysoki poziom tego nukleozydu. Podobne obserwacje dotyczą synaptosomów kory mózgu świni (*personal communication* — Kukulski). Być może nieproporcjonalnie niska aktywność deaminazy ektoadenozyiny (w porównaniu z innymi ektohydrolazami nukleotydów) w korze mózgu i w endotelium naczyń krwionośnych związana jest z ochronną funkcją tego nukleozydu. Ten problem oraz mechanizm eksportu adenozyiny do przestrzeni pozakomórkowej wymaga dalszych badań.

Artykuł otrzymano 5 lipca 2001

Zaakceptowano do druku 29 kwietnia 2002

Piśmiennictwo.

- Burnstock G (1979) W: Baer HP, Drummond GI (red) *Physiological and regulatory function of adenosine and adenine nucleotides*. Raven Press, New York, str. 3-32
- Ralevic V, Burnstock G (1998) *Pharmacol Rev* 3: 413-492
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) *J Physiol (London)* 68: 213-237
- Sattin A, Rall TW (1970) *Mol Pharmacol* 6: 13-23
- Lloyd HGE, Lindstrom K, Fredholm BB (1993) *Neurochem Int* 23: 173-185
- Latini S, Bordini F, Pedata F, Corradetti R (1999) *Brit J Pharmacol* 127: 729-739
- Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT (2000) *Brain Res* 872: 44-53
- Kobayashi S, Zimmermann H, Millhorn DE (2000) *J Neurochem* 74: 621-632
- Dunwiddie TV, Diao L (2000) *Neurosci* 95: 81-82
- Brundege JM, Dunwiddie TV (1997) *Advances in Pharmacology* 39: 353-391
- Arch JR, Newsholme EA (1978) *Biochem J* 174: 965-977
- Ceballos G, Tuttle JB, Rubio R (1994) *J Neurochem* 62: 1144-1153
- Zimmermann H (1994) *Trends Neurosci* 17: 420-426
- Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM (1996) *J Neurochem* 67: 2180-2187
- Ribeiro JA, Cunha RA, Correia-de-Sa P, Sebastiao AM (1996) *Prog Brain Res* 109: 231-241
- Zimmermann H (1996) *Drug Dev Res* 39: 337-352
- Richardson PJ, Brown SJ, Bailes EM, Luzio JP (1987) *Nature* 327: 232-234
- Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1992) *J Neurochem* 59: 657-666
- Gereaux RW, Conn PJ (1994) *Neuron* 12: 1121-1129
- Dixon KA, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJS, Richardson PJ, Freeman TC (1996) *Brit J Pharmacol* 118: 1461-1468
- Furlong TJ, Pierce KD, Selbie LA, Shine J (1992) *Mol Brain Res* 15: 62-66
- Chern Y, King K, Lai HL, Lai HT (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 185: 304-309
- Meng F, Xie GX, Chalmers D, Morgan C, Watson SJ, Akil H (1994) *Neurochem Res* 19: 613-621
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999) *Prog Neurobiol* 59: 355-396
- Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 187: 86-93
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds J D, Reppert SM (1992) *Mol Endocrinol* 6: 384-393
- Kessey K, Mogul DJ (1998) *Neurosci* 84: 59-69
- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7432-7436
- Salwatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10365-10369
- Brundege JM, Dunwiddie TM (1998) *Neuro Report* 9: 3007-3011
- Griffith DA, Jarvis SM (1996) *Bioch Biophys Acta* 1286: 153-181
- Deckert J, Morgam FF, Marangos PJ (1988) *Life Sci* 42: 1331-1345
- Gu JG, Foga IO, Parkinson FE, Geiger JD (1995) *J Neurochem* 64: 2105-2110
- Bender AS, Wu PH, Phillis JW (1980) *J Neurochem* 33: 629-640
- Barberis C, Minn A, Gayet J (1981) *J Neurochem* 36: 347-354
- Thampy KG, Barnes EM (1983) *J Neurochem* 40: 874-879
- Wu X, Yuan G, Brett CM, Hui AC, Giacomini KM (1992) *J Biol Chem* 267: 8813-8818
- Wang J, Schaner ME, Thomassen S, Su SF, Piquette-Miller M, Giacomini KM (1997) *Pharmac Res* 14: 1524-1532
- Cass EC, Young JD, Baldwin SA (1998) *Biochem Cell Biol* 76: 761-770
- Anderson CM, Xiong W, Young JD, Cass CE, Parkinson FE (1996) *Brain Res Mol Brain Res* 42: 358-361
- Centelles JJ, Franco R, Bozal J (1988) *J Neurosci Res* 19: 258-267
- Szarójan SG, Antonyan AA, Mardanyan SS (1994) *Biokhimiya* 59: 239-245
- Yamamoto T, Geiger JD, Daddona PE, Nagy JI (1987) *Brain Res Bull* 19: 473-484
- Pull I, McIlwan H (1974) *Biochem J* 144: 37-41.
- Trams EG, Lauter CJ (1975) *Biochem J* 152: 681-687
- Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J (1998) *Immunol Rev* 161: 27-42
- Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C (1997) *Prog Neurobiol* 52: 283-294
- Nagy JI, Yamamoto T, Uemura H, Schrader P (1996) *Neurosci* 73: 459-471
- Saura C, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R (1996) *J Neurochem* 66: 1675-1682
- Ruiz MA, Escriche M, Lluís C, Franco R, Martín M, Andres A, Ros M (2000) *J Neurochem* 75: 656-664
- Herrera C, Casado V, Ciruela P, Schofield P, Mallol J, Lluís C, Franco R (2001) *Mol Pharmacol* 59: 127-134
- Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R (1996) *FEBS Letters* 380: 219-223
- Saura CA, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R (1998) *J Biol Chem* 273: 17610-17617
- Jacobson KA, Hoffmann C, Cattabeni F, Abbracchio MP (1999) *Apoptosis* 4: 197-211
- Dunwiddie TV, Hoffer BJ (1980) *Br J Pharmacol* 69: 59-68
- Phyllis JW, Wu PH (1981) *Prog Neurobiol* 16: 187-193
- Burnstock G (1998) W: Turner JT, Weisman GA, Fedan JS (red) *The P2 nucleotide receptors*. Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 3-40

58. Cunha RA, Milusheva E, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastiao AM (1994) *J Neurochem* **63**: 207-214
59. von Kugelgen I, Spath L, Starke K (1992) *Nahrung-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **346**: 187-196
60. Jackisch R, Fehr R, Hertting G (1985) *Neuropharmacology* **24**: 499-507
61. Michaelis ML, Michaelis EK, Myers SL (1979) *Life Sci* **24**: 2083-2092
62. Dolphin AC, Forda SR, Scott RH (1983) *J Physiol (London)* **373**: 47-61
63. Feuerstein TJ, Hertting G, Jackisch R (1985) *Eur J Pharmacol* **107**: 233-242
64. Wu Y, Mercuri NB, Johnson SW (1995) *J Pharmacol Exp Ther* **273**: 576-581
65. Ulrich D, Huguenard JR (1995) *Neuron* **15**: 909-918
66. Dragunow M, Faull RLM (1988) *Trends Pharmacol Sci* **9**: 193-194
67. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992) *Trends Pharmacol Sci* **13**: 439-445
68. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992) *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* **4**: 346-369
69. Abbracchio MP, Ceruti S, Brambilla R, Franceschi C, Mallorni W, Jacobson K, von Lubitz DKJE, Catabeni F (1997) *Annals of the New York Academy of Science* **825**: 11-22
70. Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K (1997) *Annals of the New York Academy of Science* **825**: 1-10
71. Ambrosio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM (1997) *Eur J Pharmacol* **340**: 301-310
72. Wu LG, Saggau P (1994) *Neuron* **12**: 1139-1148
73. Scholz KP, Miller RJ (1992) *Neuron* **8**: 1139-1150
74. Thompson SM, Haas HL, Gahwiler BH (1992) *J Physiol (London)* **451**: 347-363
75. Gerber U, Greene RW, Haas RW, Stevens DR (1989) *J Physiol (London)* **417**: 567-578
76. Picano E, Abbracchio MP (2000) *Brain Res Bull* **52**: 75-82
77. Dunwiddie TV, Diao L, Kim H, Jiang JL, Jacobson KA (1997) *J Neurosci* **17**: 607-614
78. von Lubitz DKJE, Popik P, Carter MF, Jacobson KA (1994) *Eur J Pharmacol* **163**: 59-67
79. Cunha RA, Johansson B, Fredholm BB, Ribeiro JA, Sebastiao AM (1995) *Neurosci Lett* **196**: 41-44
80. Kirkpatrick KA, Richardson PJ (1993) *Br J Pharmacol* **110**: 949-954
81. Ribeiro JA, de Mendonca A, Correia-de-Sa P, Cunha RA, Sebastiao AM (1996) *Drug Dev Res* **39**: 353-360
82. Mayfield RD, Suzuki F, Zahniser NR (1993) *J Neurochem* **60**: 2334-2337
83. Gubitza AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ (1996) *J Neurochem* **67**: 374-381
84. Goncalves ML, Cunha RA, Ribeiro JA (1997) *Neurosci Lett* **238**: 73-77
85. Dixon AK, Widdowson L, Richardson PJ (1997) *J Neurochem* **69**: 315-321
86. Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K (1997) *Trends Neurosci* **20**: 482-487
87. Umemiya M, Berger AJ (1994) *Neuron* **13**: 1439-1446
88. Windscheif U (1996) *J Pharm Pharmacol* **48**: 993-1011
89. Kaiser SM, Quinn RJ (1999) *DDT* **4**: 542-551
90. Müller CH (2000) *Drugs of the Future* **25**: 1043-1052
91. Łęcka J, Molski S, Komoszyński M (2000) W: Vanduffel L, [2] Lemmens R (red) *Ecto-ATP-ases and Related Nucleotidases*. Shaker Publishing, Maastricht, The Netherlands, str. 167-174

Recenzja książki „Wybrane zagadnienia z biochemii ogólnej z ćwiczeniami”

Autorzy: Maria Gałka-Walczak, Teresa Kędryna i Barbara Ostrowska
Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2001

Przedstawiona do recenzji książka jest zbiorem ćwiczeń studenckich zgrupowanych w 29 rozdziałach. Każdy z tych rozdziałów, nazywanych w książce: Ćwiczeniem, zawiera obszerny wstęp teoretyczny. Całość mieści się na 450 stronach. Ostatni, 30 rozdział poświęcony jest statystycznemu opracowaniu wyników doświadczalnych. Książka ta, zgodnie z zamiarem Autorów, jest przeznaczona głównie dla studentów Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz dla studentów innych wydziałów medycznych; Lekarskiego, Stomatologicznego i Farmaceutycznego. To w sposób oczywisty zdecydowało o doborze proponowanych ćwiczeń; duża ich część to ćwiczenia analityczne jakościowe (np. reakcje charakterystyczne aminokwasów, próby redukcyjne dla monosacharydów i disacharydów, reakcje charakterystyczne dla bilirubiny) oraz ilościowe (np. oznaczanie glukozy, cholesterolu, HDL, kreatyniny, mocznika, triacylogliceroli, poziomu elektrolitów w surowicy krwi; oznaczanie glukozy, kwasu moczowego w moczu). Ćwiczenia te są stosunkowo proste i tworzą klasyczny zestaw, odpowiedni dla wstępnego kursu biochemii, a właściwie analityki biochemicznej. W przyszłości warto może zastanowić się nad wzbogacaniem podobnych opracowań w coraz nowocześniejsze techniki stosowane w laboratorium biochemicznym, nawet kosztem opisu niektórych tradycyjnych ćwiczeń analitycznych. Nie znaczy to, że w omawianym skrypcie nie ma ćwiczeń nowoczesnych, dotyczących metod współcześnie stosowanych w analityce medycznej.

Teoretyczne wprowadzenia do każdego ćwiczenia zdecydowanie ułatwiają zrozumienie części praktycznej. Są one bardzo obszerne, często bardzo szczegółowe i przypominają raczej opracowania podręcznikowe, niż krótkie wstępy do ćwiczeń zazwyczaj spotykane w zestawach ćwiczeń dla studentów. To duży walor recenzowanej książki. Nie udało się jednak Autorkom uniknąć błędów i niejasności. I tak na przykład: na stronach 143 i 156 (tutaj tłustym drukiem) napisano, że „przy stężeniach substratu,

przekraczających stężenia enzymu, reakcja enzymatyczna przebiega jako reakcja pierwszego rzędu w stosunku do enzymu oraz jako reakcja zerowego rzędu w stosunku do substratu”. Tymczasem, jednym z założeń przy wyprowadzaniu równania Michaelisa-Menten jest to, że stężenie substratu jest znacznie wyższe niż stężenie enzymu. Stopień wysycenia enzymu substratem zależy nie tylko od stężenia tego ostatniego, ale od powinowactwa enzymu do substratu. Reakcja staje się zerowego rzędu w stosunku do substratu, wtedy gdy jego stężenie znacznie (wielokrotnie) przekracza wartość K_m a szybkość początkowa reakcji zbliży się do szybkości maksymalnej. Dalsza część wywodu dotyczącego kinetyki enzymatycznej jest poprawna, a zatem niezrozumiałe jest umieszczenie tego niefortunnego stwierdzenia. Na stronie 230 umieszczono informację, że „fruktozo-2,6-difosforan (nawiasem mówiąc jest to bisfosforan, podobnie jak fruktozo-1,6-difosforan i 1,3-difosfoglicerynian ze str. 305, 306 są bisfosforanami) ... jest wytwarzany tylko w wątrobie, ...” co nie jest prawdą, ponieważ tworzy się on także w mięśniu sercowym. Jego powstawanie katalizuje również fosfofruktokinaza II, różniąca się od enzymu wątrobowego pod względem regulacji aktywności. W Ćwiczeniu 18 poświęconym cukrom napisano, że „większość monosacharydów ma właściwości redukujące”. Sądzę, że należało by podać przykład takiego cukru prostego, który nie wykazuje właściwości redukujących. W tym samym rozdziale opis budowy cząsteczki glikogenu jest niejasny. Nie wynika z niego, które wiązania tworzą rozgałęzienia, a które łańcuch główny. Ponadto występowanie w glikogenu wiązania 1-3 nie jest powszechnie opisywane w podręcznikach, a zatem warto może podać źródło tej informacji. Termin „dehydrogenaza pirydynowa” (str. 304) nie wydaje się poprawny. Skrót acetylokoenzymu A jest acetyloCoA, a nie acetyloKoA. Uważam, że w opracowaniach przeznaczonych dla studentów, należy szczególnie zwracać uwagę na stosowanie nazewnictwa zgodnego z ogólnymi zaleceniami.

Ponadto: na stronie 53, przy okazji omawiania metod oznaczania białka podano nazwę błękit kumazyny. Oczywiście chodzi tu o błękit Coomassie, niekiedy w żargonie laboratoryjnym zwany „kumazyną”. Błękit kumazyny wydaje mi się określeniem dość niefortunnym. Opis mechanizmu działania enzymów allosterycznych umieszczony na stronie 167 jest niejasny i dla osoby nie znającej tego zagadnienia – zupełnie niezrozumiały. Podobnie, mało precyzyjny wydaje się opis syntezy ATP na str. 304. Na stronie 189 napisano, że: „... peroksydaza występuje w komórkach różnych tkanek, na przykład tarczycy, błony śluzowej jelita, w płucach oraz w trzustce”. Sadzę, że zrzędniej jest zastąpić słowo „tkanka” terminem „narząd”.

Mimo tych uwag, omawiana książka stanowi niewątpliwie bogate źródło ogólnej wiedzy biochemicznej przydatnej studentom kierunków medycznych oraz obszerny zbiór opisów doświadczeń jakie wykonuje się w pracowniach studenckich, nie tylko w uczelniach o profilu farmaceutycznym czy lekarskim. Dlatego przedstawione mi opracowanie powinno wzbudzić zainteresowanie studentów i nauczycieli akademickich prowadzących zajęcia z biochemii ogólnej na uniwersyteckich wydziałach biologicznych oraz w wyższych szkołach rolniczych.

Krzysztof Zabłocki

Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

Wskazówki dla Autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail

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

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

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

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

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

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

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

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

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze konto w PBK XIII Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego PTBioch. została zmieniona wysokość składki członkowskiej. W roku 2002 wynosi ona:

dla Członków rzeczywistych 70.- zł.

dla Członków studentów 35.- zł

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską za rok 2002, otrzymają bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Małżeństwa mogą opłacać: 70.- + 45.- = 115.-zł, otrzymają wówczas jeden egzemplarz „Postępów Biochemii”.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 25.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2002 100.- zł.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

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

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego