

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 48, NR 4, 2002

Profesor Zofia Kasprzyk – wspomnienie	
Segregacja materiału genetycznego	242
Macierz jądrowa	252
Import białek do mitochondriów	262
Nadrodzina lipoksygenaz.	275
Budowa i rola białka tau	287
Prolaktyna – hormon przysadkowy.	296
Galanina	306
Oznaczanie hormonów techniką HPLC	317



PROFESOR ZOFIA KASPRZYK (1917-2002)

Profesor doktor Zofia Kasprzyk urodziła się w podkrakowskich Bronowicach Małych 2 lutego 1917 roku. W 1936 roku podjęła studia na Wydziale Rolniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tam też rozpoczęła swą pracę dyplomową pod kierunkiem prof. Michała Korczewskiego, w Zakładzie Fizjologii Roślin. Wybuch wojny spowodował przerwanie studiów, okupant bowiem zawiesił działanie wyższych uczelni i szkół stopnia licealnego. Wkrótce po wojnie Zofia Kasprzyk podjęła swe studia. Tytuł zawodowy magistra inżyniera rolnika uzyskała w roku 1945 na podstawie pracy pt. "Wpływ wędnięcia na pobieranie azotu i syntezę białka w liściach tytoniu", wykonanej pod kierunkiem swego przedwojennego opiekuna naukowego. Równolegle z finalizowaniem pracy magisterskiej w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego rozpoczęła studia w kierowanym przez prof. Kazimierza Bassalika Zakładzie Fizjologii Roślin Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Warszawskiego. Studia te ukończyła w 1949 roku uzyskując tytuł magistra biologii. W roku 1948, a więc jeszcze przed uzyskaniem magisterium, rozpoczęła pracę w Zakładzie Biochemii Głównego Instytutu Chemii Przemysłowej w Warszawie, pod kierunkiem prof. Ireny Chmielewskiej. Tam też przygotowała rozprawę doktorską pt. "Substancje czynne nagietka" obronioną w roku 1951 na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Warszawskiego. W roku 1956 przyznany Jej został tytuł docenta na podstawie prac wykonanych w Głównym Instytucie Chemii Przemysłowej, mających charakter aplikacyjny i w związku z tym tylko w niewielkiej części publikowanych. W 1953 roku, jeszcze w okresie zatrudnienia w Instytucie Chemii Przemysłowej, uruchomiła i poprowadziła, w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego, pierwszą w historii Uniwersytetu Warszawskiego pracownię z biochemii dla studentów biologii. Uczestniczyła też później, pod kierunkiem prof. Ireny Chmielewskiej, w organizacji Katedry Biochemii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego, uruchomionej ostatecznie w 1958 roku.

Ważnym epizodem w biografii naukowej Zofii Kasprzyk był dwuletni staż naukowy, w latach 1958-60, w słynnym Radiation Laboratory Uniwersytetu Kalifornijskiego w Berkeley, kierowanym przez późniejszego noblistę, prof. Melvina Calvina, gdzie uczestniczyła w badaniach nad cyklem fotosyntetycznej asymilacji CO₂. Po powrocie z USA, od roku 1964, kierowała jednym z Zakładów Katedry Biochemii UW, przekształconej w 1968 roku w Instytut Biochemii UW. Zakładem tym, który od 1976 roku nosi nazwę Zakładu Biochemii Roślin, kierowała aż do przejścia w 1987 roku na emeryturę. W roku 1967 uzyskała tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego a w roku 1974 tytuł profesora zwyczajnego.

Biochemia roślin była wielką pasją Pani Profesor. Najważniejszym wątkiem badań prowadzonych przez Nią i Jej współpracowników były badania struktury chemicznej, lokalizacji wewnątrzkomórkowej, biosyntezy, transportu i funkcji biologicznych terpenoidów roślinnych, a ulubioną rośliną modelową w tych badaniach był nagietek lekarski (*Calendula officinalis*) – roślina nadzwyczaj bogata w różnego rodzaju substancje natury terpenoidowej. Symboliczną wymowę ma fakt, że pierwsza z Jej prac eksperymentalnych ogłoszona w 1951 roku w "Pracach Badawczych Głównego Instytutu Chemii Przemysłowej" nosiła tytuł "Substancje czynne nagietka (*Calendula officinalis*)" a ostatnia, opublikowana w roku 1989, a więc już po przejściu na emeryturę, umieszczona w cenionym, międzynarodowym czasopiśmie "Steroids", była zatytułowana "Distribution of oleanolic acid glycosides in vacuoles and cell walls isolated from protoplasts and cells of *Calendula officinalis*". Pomiedzy tą pierwszą a ostatnią pracą opublikowaną przez Panią Profesor mieści się około 70 innych prac doświadczalnych, w ogromnej większości poświęconych terpenoidom roślin rodziny *Compositae*, a przede wszystkim terpenoidom nagietka lekarskiego, opublikowanych w większości w prestiżowych czasopismach międzynarodowych, m.in. w *Phytochemistry*, *Nature*, *Physiologia Plantarum*, *Steroids*, *Tetrahedron*. Początkowo prace te dotyczyły głównie występowania, budowy chemicznej oraz metod izolowania i oznaczania różnego rodzaju substancji terpenoidowych, później punkt ciężkości przesunął się w kierunku wyjaśniania szlaków biosyntezy i przemian tych związków a jeszcze później w kierunku badań dotyczących subkomórkowej lokalizacji tych substancji oraz ich transportu wewnątrz- i międzykomórkowego. Wierność problematyce terpenoidów roślinnych i konsekwencja w rozwijaniu i unowocześnianiu tych badań sprawiła, że kierowane przez Panią Profesor laboratorium stopniowo zyskiwało sobie opinię jednego z ważniejszych w świecie ośrodków prowadzących prace w tym zakresie.

Bardzo owocna była również działalność dydaktyczna profesor Zofii Kasprzyk. Wychowała całą rzeszę biochemików. Pod Jej kierunkiem wykonało prace magisterskie 107 studentów. Wypromowała 8 doktorów. Wielu Jej wychowanków zajmuje obecnie stanowiska profesorskie w różnych uczelniach wyższych i innych instytucjach naukowych w kraju i zagranicą. Niektórzy z nich kontynuują problematykę naukową zapoczątkowaną przez Panią Profesor.

Profesor Zofia Kasprzyk zmarła nagle w Warszawie 24 lipca 2002, w wieku 85 lat. W naszej pamięci pozostanie nie tylko jako wybitny naukowiec, lecz także jako mądry i szlachetny Człowiek, mądry doradca, życzliwy swoim studentom i współpracownikom opiekun.

Uczniowie i współpracownicy

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
BARBARA CZARTORYSKA
(Warszawa)
ANNA GOCLAWSKA (Warszawa)
MICHAŁ HETMAN (Warszawa)
MAŁGORZATA LOBOCKA
(Warszawa)
JOLANTA SOTOWSKA-
BROCHOCKA (Warszawa)
EWA ŚWIEŻEWSKA (Warszawa)
PIOTR WIDLAK (Gliwice)
KRZYSZTOF ZABŁOCKI
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Profesor Zofia Kasprzyk — wspomnienie
Professor Zofia Kasprzyk — obituary

Segregacja materiału genetycznego u Prokaryota

DNA Segregation in Prokaryota

DAGMARA JAKIMOWICZ, JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA . . . 242

Rola macierzy jądrowej w przestrzennej organizacji procesów jądrowych

The role of the nuclear matrix in the spatial organization of the nuclear events

ROBERT LENARTOWSKI, ANNA GOC 252

Import białek do mitochondriów

Import of protein into mitochondria

DOROTA PIĘKNA-PRZYBYLSKA, HALINA AUGUSTYNIAK 262

Nadrodzina lipoksygenaz — struktura i funkcje w metabolizmie

The lipoxygenase superfamily — structure and functions in metabolism

BARBARA DOŁĘGOWSKA, DARIUSZ CHLUBEK 275

Budowa i rola białka tau

Tau protein, structure and roles

MARTA BAKSALERSKA-PAZERA, GRAŻYNA NIEWIADOMSKA 287

Prolaktyna (PRL) — wielofunkcyjny, przysadkowy hormon peptydowy

Prolactin (PRL) — a pituitary peptide hormone of multiple functions

JOANNA MICHALIK, ZBIGNIEW BARTOSZEWICZ 296

Biologiczna aktywność galaniny i jej znaczenie w procesach fizjologicznych i patologicznych

Biological action of galanin and its significance in physiological and pathological processes

JAROSŁAW RUCZYŃSKI, PIOTR REKOWSKI 306

Oznaczanie hormonów w osoczu krwi techniką HPLC

Determination of hormones in plasma by HPLC techniques

MAGDALENA GOZDOWSKA, EWA KULCZYKOWSKA 317

Sprawozdania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. . .

325

Roczny spis treści.

331

Segregacja materiału genetycznego u Prokaryota

DNA segregation in Prokaryota

DAGMARA JAKIMOWICZ^{1,a,b}, JOLANTA ZAKRZEWSKA-
CZERWIŃSKA^{2,a}

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Segregacja plazmidów do potomnych komórek
 - II-1. Sekwencja *parS*
 - II-2. Białko ParA
 - II-3. Białko ParB
 - II-4. Mechanizm segregacji plazmidu P1 do potomnych komórek
- III. Segregacja chromosomów do potomnych komórek
 - III-1. Rozmieszczenie sekwencji *parS* na chromosomie
 - III-2. *Bacillus subtilis*
 - III-3. *Caulobacter crescentus*
 - III-4. *Escherichia coli*
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Plasmid segregation
 - II-1. *parS* sequences
 - II-2. ParA protein
 - II-3. ParB protein
 - II-4. Mechanism of P1 plasmid segregation
- III. Chromosome segregation
 - III-1. Distribution of *parS* sequences
 - III-2. *Bacillus subtilis*
 - III-3. *Caulobacter crescentus*
 - III-4. *Escherichia coli*
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: HTH — helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*); IHF — zasadowe białko „histonopodobne” (ang. *Integration Host Factor*); *oriC* — region inicjacji replikacji chromosomu (ang. *origin of chromosomal replication*); *parS* — sekwencje centromerowe (ang. *partition sequences*); pz — par zasad; *ter* — region terminacji replikacji.

I. Wstęp

Podział każdej komórki pro- i eukariotycznej musi być poprzedzony podwojeniem materiału genetycznego oraz jego segregacją do nowopowstających komórek. Replikacja kolistego chromosomu bakteryjnego rozpoczyna się w ściśle określonym miejscu na chromosomie – *oriC* (ang. *origin of chromosomal*

replication) i postępuje dwukierunkowo do miejsca terminacji (*ter*), które jest położone naprzeciw *oriC* [1]. Wszystkie etapy replikacji chromosomu prokariotycznego: inicjacja, elongacja oraz terminacja są stosunkowo dokładnie zbadane. Jednakże w przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, mechanizm segregacji chromosomów bakteryjnych do komórek potomnych nie został jeszcze dobrze poznany. Wiadomo, że komórki bakteryjne nie mają aparatu mitotycznego, charakterystycznego dla komórek eukariotycznych, tzn. nie odkryto u bakterii żadnego odpowiednika eukariotycznego wrzeciona podziałowego. Do niedawna uważano, że segregacja bakteryjnych chromosomów jest procesem pasywnym, niewymagającym nakładu energii. Prawie 40 lat temu, Jacob i wsp. [2] przedstawili hipotezę, która zakładała, że chromosomy wiążą się z błoną komórkową lub ścianą komórkową, po czym rozdzielane są w wyniku wzrostu komórki. Obecnie wiadomo, że segregacja chromosomów do komórek potomnych u *Prokaryota* zachodzi w sposób aktywny, co potwierdzono zarówno dla organizmów

¹Dr; ²prof. dr hab., ^aInstytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, tel.: 071 373 22 74; fax: 071 373 25; e-mail: zakrzew@immunno.iitd.pan.wroc.pl, ^bJohn Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH

Gram-dodatnich (na przykładzie *Bacillus subtilis*), jak i Gram-ujemnych (na przykładzie *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*). Pierwsze prace dotyczące tego zagadnienia ukazały się zaledwie kilka lat temu. Koronnym doświadczeniem, dzięki któremu wykazano, że segregacja prokariotycznych chromosomów jest procesem aktywnym, była subkomórkowa lokalizacja poszczególnych regionów chromosomu w trakcie replikacji i podziału komórki bakteryjnej. W tym celu przygotowano mutanty, w których w różne regiony chromosomu wprowadzono sekwencje operatorową O_{lac} , po czym transformowano je plazmidem zawierającym fuzyjny gen *lacI-gfp*, kodujący represor operonu laktozowego LacI w fuzji z zielonym białkiem fluorescencyjnym GFP (ang. *green fluorescent protein*) [3, 4]. Fuzyjne białko LacI-GFP wiąże się do sekwencji operatorowej wprowadzonej w dany region chromosomu. Mikroskopia fluorescencyjna wykazała, że fragmenty DNA zawierające sekwencje operatorowe zlokalizowane w pobliżu nowozreplikowanych regionów *oriC* są przemieszczane z centrum komórki w stronę przeciwnych biegunów komórki. Natomiast położenie sekwencji O_{lac} wprowadzonych w region terminacji replikacji (*ter*) ulega nieznacznej zmianie w trakcie replikacji chromosomu i po jej zakończeniu; sekwencje te pozostają w centrum komórki bakteryjnej. Proces aktywnej segregacji chromosomów bakteryjnych przypomina więc mitozę w tym, że regiony *oriC* powstałe w trakcie replikacji chromosomu i pierwotnie umiejscowione w centrum (*B. subtilis*) lub na jednym z biegunów (*E. coli*) komórki macierzystej są przed podziałem komórkowym aktywnie przemieszczane w przeciwnych kierunkach, w pobliże biegunów komórki — centrów przyszłych komórek.

Tabela 1

Kluczowe elementy odpowiedzialne za segregację wybranych plazmidów i chromosomów do komórek potomnych

Plazmid chromosom	Sekwencja centromerowa	Białko wiążące centromer	Białko wykazujące aktywność ATP-zową
P1	<i>parS</i>	ParB	ParA
F	<i>sopC</i>	SopB	SopA
RK2	O_n3	KorB	IncC
R1/R100	<i>parC</i>	ParR	ParM
NR1	–	StbA	StbB
<i>B. subtilis</i>	<i>parS</i>	SpoOJ	Soj
<i>C. crescentus</i>	<i>parS</i>	ParB	ParA
<i>S. coelicolor</i>	<i>parS</i>	ParB	ParA

Późniejsze badania wykazały, że pomimo podobieństwa mechanizmów segregacji chromosomów do potomnych komórek organizmów należących do odrębnych filogenetycznie grup, istnieją pewne istotne różnice zwłaszcza pomiędzy *E. coli* a pozostałymi analizowanymi organizmami (*B. subtilis*, *C. crescentus* i *S. coelicolor*) (p. III-4).

U bakterii, proces segregacji zreplikowanego DNA został najlepiej poznany na przykładzie plazmidów i dlatego na wstępie zostanie on szerzej omówiony. Wiedza na temat segregacji plazmidów do potomnych komórek w znaczny sposób ułatwiła zrozumienie analogicznego procesu dotyczącego segregacji bakteryjnych chromosomów.

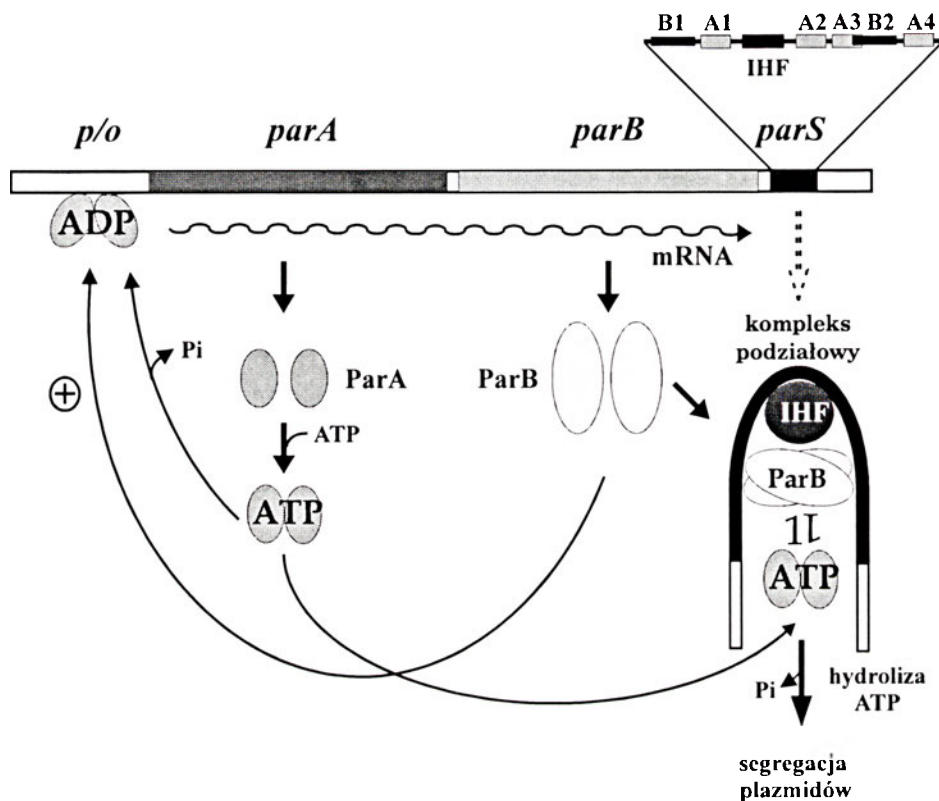
II. Segregacja plazmidów do potomnych komórek

Plazmidy występujące w kilku kopiach w komórce są dogodnym modelem do badania mechanizmów segregacji prokariotycznego materiału genetycznego do komórek potomnych. Najważniejszymi elementami odpowiedzialnymi za rozdział plazmidów, są krótkie sekwencje DNA, często nazywane prokariotycznymi centromerami oraz dwa białka [5, 6]. Jedno z nich wiąże specyficznie sekwencje centromerowe, natomiast drugie wykazuje aktywność ATP-azową, która jest niezbędna w procesie segregacji. W zależności od rodzaju plazmidu, białka te i sekwencje centromerowe są oznaczane różnymi symbolami (Tabela 1).

Mechanizm rozdziału plazmidów najlepiej wyjaśniono na przykładzie plazmidu P1 (profaga) w komórkach *E. coli* [4, 6]. Plazmid ten występuje w jednej lub dwóch kopiach na komórkę. Za jego segregację do komórek potomnych są odpowiedzialne białka

ParA-ATP-aza i ParB, wiążące sekwencję centromerową (ang. *partition*) oraz sekwencja *parS*. Geny *parA* i *parB*, kodujące odpowiednio białka ParA i ParB są zorganizowane w operon. W regionie promotorowym operonu (*parOP*) jest zlokalizowana sekwencja, do której specyficznym wiąże się białko ParA (ryc. 1). Natomiast za operonem znajduje się centromer *parS* wiązany przez białko ParB (Ryc. 1).

wiążąc się do regionu promotorowego tego operonu (Ryc. 1). Wykazano, że białko ParB stymuluje przejście postaci ParA-ATP w postać ParA-ADP [7]. Hydroliza ATP prawdopodobnie zwiększa zdolność tego białka do wiązania się z DNA, powodując, że staje się ono represorem wrażliwym na poziom stężenia białka ParB. Natomiast postacią aktywną w procesie segregacji plazmidu do komórek potomnych



Ryc. 1. Regulacja ekspresji operonu *parAB* plazmidu P1, wg Bouett i Funnel [7]. Powyżej przedstawiono schematycznie organizację centromeru *parS*, zaznaczając sekwencje A i B oraz miejsce wiązania białka IHF. Poniżej przedstawiono nukleoproteinowy kompleks odpowiedzialny za segregację plazmidu do komórek potomnych.

II-1. Sekwencja *parS*

Długość centromeru *parS* plazmidu P1 wynosi około 80 pz, a w jego obrębie wyróżniono cztery asymetrycznie rozmieszczone 7-merowe sekwencje A oraz dwie 6-merowe sekwencje B (Ryc. 1, Tabela 2) [7]. Pomiędzy nimi jest zlokalizowana sekwencja specyficznym wiążąca zasadowe białko IHF.

II-2. Białko ParA

Białko ParA plazmidu P1 składa się z 398 aminokwasów i, tak jak inne białka z tej rodziny, wykazuje aktywność ATP-azową [5, 6]. ParA występuje w postaci związanej z ADP lub ATP. Wiązanie i hydroliza ATP wpływa na konformację oraz stabilność białka ParA. Białko ParA występuje w postaci dimeru i to zarówno wtedy, gdy jest związane z ATP, jak i ADP. ParA-ADP pełni funkcję represora operonu *parAB*

jest ParA-ATP. Białko ParA-ATP nie wiąże się do regionu *parS*, ale przez oddziaływanie z ParB wchodzi w skład nukleoproteinowego kompleksu, który uczestniczy w segregacji plazmidu P1 do komórek potomnych.

II-3. Białko ParB

Białko ParB plazmidu P1 składa się z 333 aminokwasów. W roztworze występuje w postaci dimeru. Za tworzenie dimerów jest odpowiedzialna C-końcowa domena białka ParB (Ryc. 2). Jednakże w białku tym nie stwierdzono obecności żadnych znanych motywów strukturalnych uczestniczących w dimeryzacji, np. zamka leucynowego. N-koniec ParB oddziałuje z białkiem ParA. Region ten jest również odpowiedzialny za oligomeryzację białka ParB. W środkowym regionie białka znajduje się motyw HTH (helisa-skręt-helisa) (Ryc. 2). Region ten specyficznym

Tabela 2

Sekwencje centromerowe wybranych plazmidów i chromosomów

Plazmid	Sekwencja centromerowa
P1 (<i>parS</i>)	<pre> B1 A1 ┌───┐ ┌───┐ TTCGCCATTCAAAATTTCATTTAACTGACTGTTTTTAAAGTAAATTACT └───┘ └───┘ IHF A2 A3 B2 A4 ┌──┐ ┌──┐ ┌──┐ ┌──┐ CTAAAATTTCAPGGTGAAATCGCCNCCATTTCACCTTGG └──┘ └──┘ └──┘ └──┘ </pre>
F1 (<i>sopC</i>)	<pre> ←-----→ GGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCACTCGTATCGTC </pre>
RK2 (<i>O_B3</i>)	<pre> TTTAGCSGCTAAA ←-----→ </pre>
Chromosom	Sekwencja konsensowa centromerów
<i>B. burgdorferi</i>	TGTTCCACGTGAACA
<i>B. subtilis</i>	TGTTNCACGTGAAACA
<i>C. crescentus</i>	tGTTNCACGTGAAACa
<i>M. tuberculosis</i>	TGTTTCACGTGAAACA
<i>S. coelicolor</i>	tGTTTCACGTGAAACa
<i>S. pyogenes</i>	TGATTCACGTGAAACA

Strzałkami przerywanymi i ciągłymi zaznaczono odpowiednio sekwencje powtórzone i odwrotnie powtórzone.

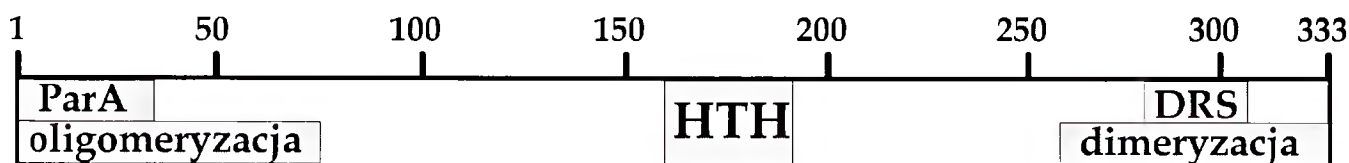
nie rozpoznaje i wiąże sekwencje A centromeru *parS*. W C-końcowej domenie dimeryzującej dodatkowo występuje miejsce DRS (ang. *discriminator recognition sequence*), odpowiedzialne za rozpoznawanie sekwencji B w obrębie *parS* (Ryc. 2) [8]. Nie wiadomo czy DRS oddziałuje bezpośrednio z sekwencją B, czy też zapewnia taką konformację białku ParB, dzięki której wiąże się ono do *parS*.

II-4. Mechanizm segregacji plazmidu P1 do potomnych komórek

W segregacji plazmidu P1, poza parą białek ParA i ParB, bierze również udział białko IHF. Białka ParB i IHF wiążą się do DNA w sposób kooperatywny, przy czym IHF wiąże centralny region *parS*, natomiast ParB oddziałuje z sekwencjami A i B, które otaczają miejsce wiązania IHF. Białko IHF powoduje

zagięcie DNA przybliżając do siebie sekwencje A i B dzięki temu, powinowactwo białka ParB do DNA zwiększa się około 1000 razy. W ten sposób powstaje kompleks podziałowy (ang. *partition complex*) zbudowany prawdopodobnie z rdzenia białkowego owiniętego przez DNA (Ryc. 1) [9]. W skład tego kompleksu — oprócz białek ParB i IHF — wchodzi również białko ParA [7], które oddziałuje z ParB [10]. Analiza mikroskopowa z zastosowaniem białka LacI-GFP (p. I) wiążącego się do sekwencji *O_{lac}* wprowadzonej w sąsiedztwo *parS* wykazała, że w mniejszych komórkach ogniska fluorescencji obserwowane były głównie w centrum komórki [4]. Natomiast w komórkach o większych rozmiarach ogniska te były zlokalizowane w 1/4 i 3/4 długości komórki.

Ostatnio zaobserwowano, że białko ParB ma zdolność do wyciszania transkrypcji genów sąsiadujących z centromerem *parS* [11]. Białko to po



Ryc. 2. Domenowa struktura białka ParB odpowiedzialnego za segregację plazmidu P1 wg Surtees i Funnel [9]. DRS — motyw odpowiedzialny za rozpoznawanie sekwencji B centromeru *parS*, HTH — helisa-skręt-helisa, motyw wiążący sekwencje A centromeru *parS*, ParA — miejsce oddziaływania z białkiem ParA.

związaniu się z *parS* oddziałuje pośrednio lub bezpośrednio z DNA pozacentromerowym blokując tym samym dostęp innym białkom, np. polimerazie RNA. Stosując immunoprecypitację *in vivo* oraz przeciwciała skierowane przeciwko ParB, wyizolowano kompleksy tego białka z sekwencjami DNA oddalonymi nawet o parę tysięcy pz od *parS*. Prawdopodobnie wiązanie białka ParB z sekwencjami centromerowymi zapoczątkowuje wiązanie dodatkowych cząsteczek tego białka do pozacentromerowych sekwencji DNA. Jednakże nie udało się uzyskać *in vitro* kompleksów ParB z sekwencjami DNA, sąsiadującymi z *parS*. Świadczy to prawdopodobnie o tym, że ParB oddziałuje pośrednio z tymi sekwencjami z udziałem dotychczas nieznanego białka.

Sekwencje plazmidowych centromerów są zróżnicowane (Tabela 2). Białko SopB plazmidu F wiąże 12 powtórzonych sekwencji każda o długości 43 pz [12]. W każdym z tych odcinków wyróżnić można dwie sekwencje powtórzone oraz jeden palindrom (Tabela 2). Centromer *O_β3* plazmidu RK2 ma również charakter palindromu. Jego długość wynosi 13 pz [13]. W przeciwieństwie do plazmidu P1, wiązanie białek SopB i KorB do centromerów nie wymaga obecności białka IHF.

III. Segregacja chromosomów do potomnych komórek

Pierwsze badania nad rozdziałem chromosomów bakteryjnych do komórek potomnych dotyczyły *E. coli* [4, 14], *Bacillus subtilis* [3, 15-17] i *Caulobacter crescentus* [18, 19]. W przypadku *B. subtilis*, *C. crescentus* i *Streptomyces coelicolor* [20] zidentyfikowano główne elementy odpowiedzialne za rozdział chromosomów: (i) 14-16-nukleotydowe palindromowe sekwencje *parS*, (ii) dwa białka: Soj i Spo0J u *B. subtilis* oraz ParA i ParB u *C. crescentus*, charakteryzujące się wysokim stopniem homologii w stosunku do plazmidowych białek ParA i ParB. W genomach innych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych organizmów stwierdzono również obecność homologicznych genów, które kodują potencjalne białka należące do rodziny białek ParA, B. Natomiast, u *E. coli* i *Haemophilus influenzae* geny takie nie występują.

W przeciwieństwie do plazmidów delekcje chromosomalnych genów *parA* i *parB* — z wyjątkiem — *C. crescentus* [18] nie dają wyraźnych efektów fenotypowych. Pomimo występujących zaburzeń w segregacji chromosomu przeżywa znaczny odsetek komórek *B. subtilis* [21] i *S. coelicolor* [20]. Może to wskazywać, że białka te są jedynie elementami więk-

szej maszynierii segregacyjnej. Obecnie sugeruje się, że ich rola ogranicza się do prawidłowej lokalizacji regionu *oriC* po replikacji, a za transport chromosomu i jego kondensację odpowiadają inne białka (np. SMC, ang. *structural maintenance of chromosomes*).

Dotychczas ukazało się zaledwie kilka prac przeglądowych dotyczących segregacji potomnych chromosomów [22-26].

W przedstawionych poniżej modelach segregacji chromosomów dla uproszczenia opisano segregację chromosomów w komórkach wolnorosnących. Jednakże należy pamiętać, że inicjacja replikacji zależy od szybkości wzrostu komórek. Przy szybkim tempie wzrostu komórek, inicjacja drugiej rundy replikacji może rozpocząć się jeszcze przed zakończeniem pierwszej rundy. W takim przypadku komórki potomne otrzymają chromosomy, które są już częściowo zreplikowane.

III-1. Rozmieszczenie sekwencji *parS* na chromosomie

Obecność sekwencji *parS* stwierdzono u wielu bakterii, głównie Gram-dodatnich (Tabela 2). Są to 14-16 nukleotydowe palindromowe sekwencje. W przeciwieństwie do sekwencji plazmidowych centromerów charakteryzują się wysoką homologią (Tabela 2). Liczba sekwencji *parS* jest różna dla różnych gatunków bakterii i waha się od dwóch u *Mycobacterium tuberculosis* [27] do 21 u *S. coelicolor* A3(2) [20] (Ryc. 3). Sekwencje *parS* są przeważnie umiejscowione w okolicy regionu *oriC*. U *C. crescentus* 6 sekwencji *parS* zlokalizowanych jest na odcinku o długości około 5 kpz, pomiędzy operonem *parAB* a regionem *oriC* (Ryc. 3). U *S. coelicolor* A3(2) większość sekwencji *parS* położonych jest w środku liniowego chromosomu w pobliżu regionu *oriC* (Ryc. 3). Ośiem sekwencji *parS* *B. subtilis* jest rozmieszczonych centrycznie wokół *oriC*, ale w przeciwieństwie do innych bakterii na stosunkowo długim odcinku — około 800 kpz, co stanowi 20% chromosomu (Ryc. 3) [27].

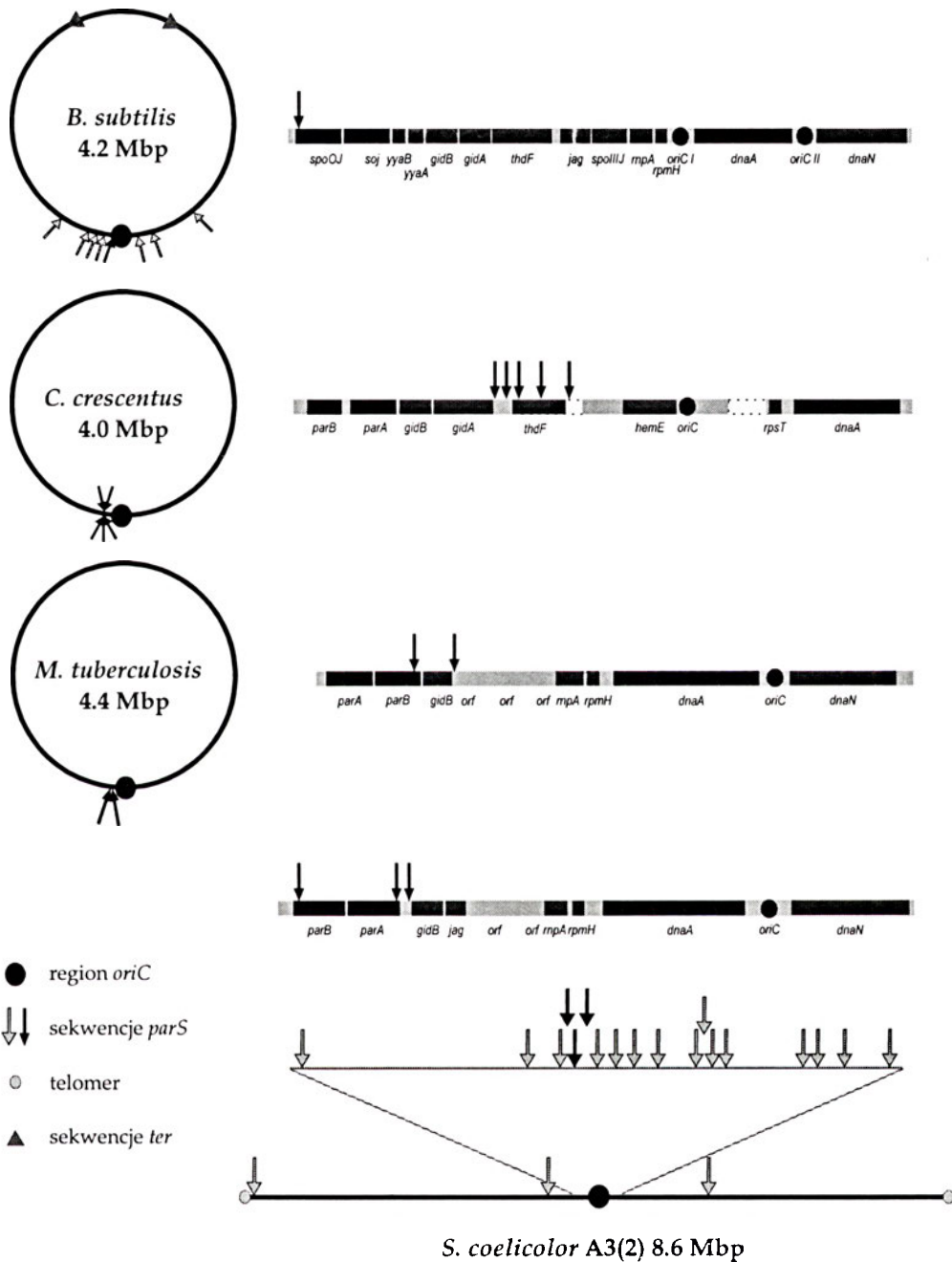
III-2. *Bacillus subtilis*

Segregacja chromosomu *B. subtilis* zachodzi z udziałem białek Spo0J i Soj, zarówno podczas wzrostu wegetatywnego, jak i wytwarzania endospor. Białka te są kodowane przez geny położone w operonie *spo0J/soj* leżącym w pobliżu regionu *oriC* (Ryc. 3) [28]. Białka Spo0J i Soj wykazują wysoki stopień homologii w stosunku do plazmidowych białek ParA i ParB. Za pomocą immunoprecypitacji

in vivo wykazano, że białko SpoOJ wiąże silnie 5 sekwencji *parS* [27]. Białko Soj oddziałuje ze SpoOJ [29] i ma aktywność ATP-azy [30, 31].

Oprócz udziału w segregacji chromosomu, białka Soj i SpoOJ (ang. *sporulation protein*) pełnią funkcje regulatorów sporulacji. Soj jest negatywnym regulatorem promotorów odpowiedzialnych za ekspre-

Konstrukcja szczepu *B. subtilis*, w którym gen *spoOJ* lub *soj* został zastąpiony odpowiednio fuzyjnym genem *spoOJ-gfp* lub *soj-gfp*, umożliwiła wewnątrzkomórkową lokalizację białka SpoOJ oraz jego kompleksów z sekwencjami *parS* [15, 31, 32]. Zaobserwowano również, że białko Soj pulsowo przemieszcza się pomiędzy biegunami komórki [31].



Ryc. 3. Rozmieszczenie sekwencji *parS* na chromosomach wybranych bakterii. Po lewej stronie oraz na dole ryciny przedstawiono schematycznie lokalizacje sekwencji *parS* na kółkach zamkniętych chromosomach: *B. subtilis*, *C. crescentus* i *M. tuberculosis* oraz liniowym chromosomie *S. coelicolor* A3(2). Po prawej stronie przedstawiono organizację regionów *parAB-oriC* wymienionych mikroorganizmów. Czarnymi strzałkami zaznaczono sekwencje *parS* występujące w regionach *parAB-oriC*, natomiast szarymi sekwencje z poza tych regionów.

sję genów zaangażowanych w wytwarzanie endospor. Mutanty delecyjne genu *spoOJ* nie sporulują. Wykazano, że SpoOJ hamuje represorową funkcję białka Soj umożliwiając tym samym inicjację sporulacji [30].

Oddziaływanie Soj z białkiem SpoOJ, związanym z DNA jest niezbędne do powstawania dużych nukleoproteinowych agregatów. Zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej pozwoliło prześledzić pozycje nukleoproteinowych kompleksów SpoOJ-*parS* i re-

gionu *oriC* w komórce w czasie cyklu komórkowego i zaproponować model segregacji chromosomów u *B. subtilis* (Ryc. 4A) [3, 15-17]. Proces segregacji rozpoczyna się w podczas replikacji chromosomu, zaraz po inicjacji replikacji. Cząsteczki białka SpoOJ wiążą się do sekwencji *parS*, zlokalizowanych w pobliżu nowozreplikowanych regionów *oriC*. Badania *in vitro* wykazały, że wiązanie to ma charakter kooperatywny. W centrum komórki tworzą się nukleoproteinowe kompleksy uwidocznione w mikroskopii fluorescencyjnej jako dwa ogniska. Następnie kompleksy te wraz z potomnymi regionami *oriC* przesuują się w stronę przeciwległych biegunów komórki. Komórka wydłuża się, a nowozreplikowane potomne regiony chromosomu sukcesywnie przesuują się w kierunku biegunów komórki. Chromosomy potomne ulegają kondensacji, a w płaszczyźnie podziału komórki tworzy się przegroda oddzielająca zreplikowane chromosomy [17]. Jest ona zbudowana z białka FtsZ, które jest bakteryjnym homologiem tubuliny. W późniejszej fazie przegroda zanika i powstają dwie komórki potomne.

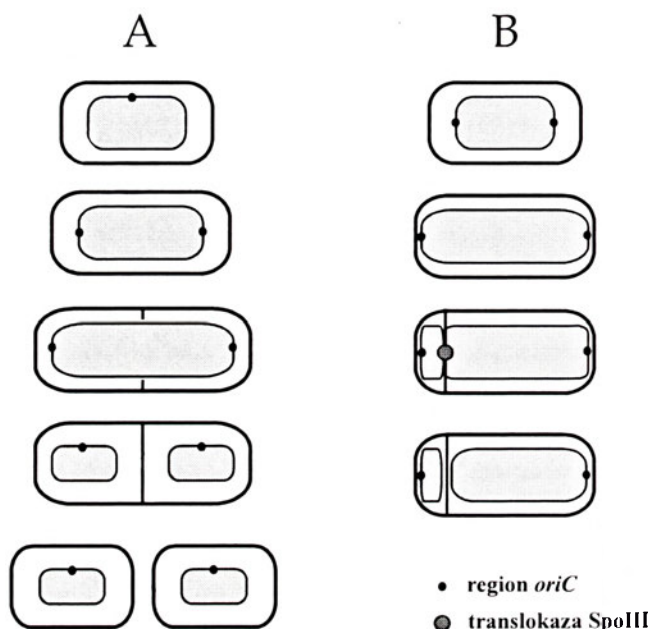
U mutantów z delecją genów *spo0J* i *soj* zaobserwowano zaburzoną wewnątrzkomórkową lokalizację regionów *oriC*. Następstwem tego było powstawanie komórek potomnych pozbawionych chromosomów; około 1-2% komórek nie miało chromosomu; 100 razy więcej niż w niezmutowanych komórkach [21].

U *B. subtilis* wykazano, że sekwencje centromerowe *parS* sklonowane w plazmidy działają na nie stabilizująco, umożliwiając precyzyjne przekazanie kopii zreplikowanych plazmidów do komórek potomnych.

B. subtilis wytwarza formy przetrwalne — endospory, zdolne do przetrwania okresów głodu czy suszy. Proces wytwarzania endospor jest złożony i wieloetapowy. Rozpoczyna się on asymetrycznym podziałem komórki; wewnątrz komórki macierzystej powstaje endospora. Poprzedza go replikacja chromosomu; jeden z potomnych chromosomów pozostaje w komórce macierzystej, natomiast drugi jest przekazywany do prespory. Główną różnicę pomiędzy podziałem chromosomu do prespory, a podziałem wegetatywnym stanowi miejsce tworzenia przegrody (Ryc. 4A,B).

Chromosom w trakcie transportu do prespory musi zostać odpowiednio „upakowany” tak, by mógł zmieścić się w presporze, która jest znacznie mniejsza od komórki macierzystej (Ryc. 4B). Białkiem odpowiedzialnym za translokację potomnego chromosomu do prespory jest SpoIIIE [33-35]. Białko to tworzy kanał wewnątrz przegrody, przez który chro-

mosom jest aktywnie przemieszczany do endospor (Ryc. 4B). Pierwotnie białku temu przypisywano jedynie funkcję regulatora ekspresji genów zaangażowanych w sporulację. Funkcja białek Soj, SpoOJ w przekazywaniu potomnego chromosomu do prespory została określona na podstawie badań mutant-



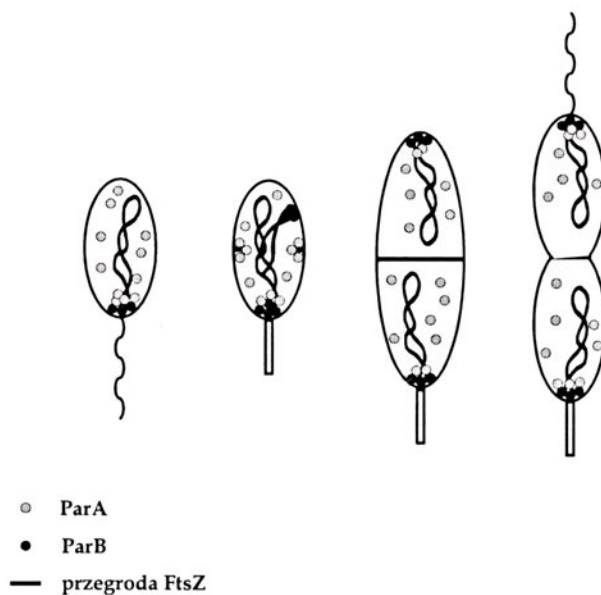
Ryc. 4. Segregacja chromosomów do komórek potomnych u *Bacillus subtilis* wg Lin i wsp. [17]. Kolorem szarym schematycznie zaznaczono chromosom. A. Komórki wegetatywne; B. Wytwarzanie endospor.

tów delecyjnych genów kodujących te białka. Mutanty delecyjne *soj/spoOJ* wykazują zaburzoną zawartość DNA w endosporze, prawdopodobnie na skutek niewłaściwej lokalizacji regionu *oriC* podczas tworzenia prespory.

III-3. *Caulobacter crescentus*

C. crescentus charakteryzuje się bardziej złożonym niż u innych bakterii cyklem rozwojowym. Cykl ten polega na kolejnym występowaniu osiadłej komórki z łodyżką i powstającej z niej komórki ruchliwej, urzęsionej (Ryc. 5). Z komórki osiadłej w wyniku niesymetrycznego podziału powstaje ruchliwa urzęsiona komórka oraz osiadła komórka łodyżkowa. Powstała komórka urzęsiona osiedla się, wytwarza łodyżkę i cały cykl się powtarza. Replikacja chromosomu zachodzi tylko w komórce osiadłej.

U *C. crescentus* za rozdział chromosomów odpowiedzialne są białka ParA i ParB, kodowane przez geny występujące podobnie jak u innych organizmów w operonie *parAB* (Ryc. 2) [18]. Wykazano, że



Ryc. 5. Segregacja chromosomów do komórek potomnych u *Caulobacter crescentus* wg Mohl i wsp. [19]. Schematycznie przedstawiono osiadłą komórkę z łożyską oraz komórkę ruchliwą, urzęsioną.

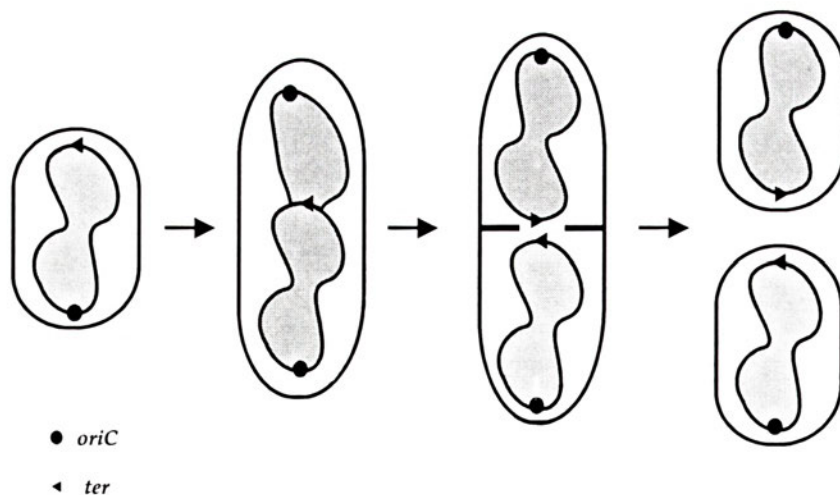
w przeciwieństwie do *B. subtilis*, mutacje delecyjne genów *parA* i *parB* są śmiertelne dla *C. crescentus*. Zaobserwowano również zaburzoną segregację chromosomów w komórkach nadprodukcujących białka ParA, B [18]. Podczas cyklu komórkowego stężenie białek ParB i ParA jest stałe, ale zmienia się subkomórkowa lokalizacja obu białek. Zaobserwowano, że w komórce osiadłej białko ParB jest zlokalizowane głównie na jednym z biegunów komórki. Po replikacji, a przed podziałem komórkowym, kompleks białka z nowozreplikowanym regionem *oriC* przemieszcza się w stronę przeciwnego bieguna komórki, co powoduje rozdział zreplikowanego chromosomalnego DNA. Przemieszczenie kompleksów jest możliwe dzięki oddziaływaniu białka ParB z białkiem ParA, które ma właściwości ATP-azy. Ostatnie badania wykazały, że białko ParA spełnia dodatkową funkcję, hamuje tworzenie przegrody komórkowej zanim chromosomy zostaną całkowicie rozdzielone (Ryc. 5) [19].

III-4. *Escherichia coli*

W genomie *E. coli* nie zidentyfikowano homologów genów *parA*, *parB*, ani sekwencji homologicznych do sekwencji *parS* występujących u innych bakterii. Mikroskopia fluorescencyjna wykazała, że w trakcie replikacji potomny region *oriC* wraz z sekwencjami *O_{lac}* wprowadzonymi w jego okolicę (p. I) ulegają przesunięciu w stronę przeciwnego bieguna komórki [4]. Po zakończeniu replikacji potomne regiony *oriC* są umiejscowione w pobliżu przeciwnych biegunów komórki (Ryc. 6). Doświadczenie to wskazuje, że w okolicy regionu *oriC*

występować powinny sekwencje centromerowe. Dotychczasowe próby zlokalizowania centromerów, polegające między innymi na wklonowywaniu różnych fragmentów sąsiadujących z *oriC* w plazmidy charakteryzujące się małą stabilnością (p. III-2), nie powiodły się.

Gen *mukB* był pierwszym zidentyfikowanym genem, którego obecność sugerowała, że w komórkach *E. coli* istnieje odpowiednik eukariotycznego aparatu mitotycznego [36]. Mutacje w genie *mukB* zaburzają subkomórkową lokalizację regionów *oriC*. Wykazano, że białko MukB wiąże DNA, ale w przeciwieństwie do białka ParB wiązanie to ma charakter niespecyficznego. Struktura domenowa MukB przypomina strukturę domenową białek SMC. Białka te występują zarówno u prokariotów, jak i u eukariotów. Białko MukB, analogicznie do białek SMC, jest prawdopodobnie odpowiedzialne za kondensację chromosomów [36]. Ponadto, białko MukB wykazuje homologię do eukariotycznej dynaminy wiążącej mikrotubule i — jak wykazano doświadczalnie — wiąże bakteryjne białko FtsZ [37]. Innym opisanym białkiem, które prawdopodobnie bierze udział w segregacji chromosomów u *E. coli* jest białko SeqA. Początkowo białku temu przypisano rolę negatywnego regulatora częstości inicjacji replikacji. Białko to wiąże hemimetylowane (metylacja adeniny w sekwencji GA^{*}TC) *oriC*, uniemożliwiając inicjatorowemu białku DnaA dostęp do miejsca inicjacji replikacji [38]. Ostatnie badania sugerują, że białko SeqA wiążąc się do nowozreplikowanych regionów *oriC* tworzy dwa białkowe kanały, przez które przechodzą kolejno zreplikowane fragmenty chromosomów potomnych [39]. Wydaje się, że białka MukB i SeqA



Ryc. 6. Segregacja chromosomów do komórek potomnych u *Escherichia coli* wg J e n s e n a i S h a p i r o [44]. Kolorem szarym schematycznie zaznaczono chromosom.

wykazują antagonistyczne działanie. Mutacja w genie *seqA* powoduje supresję niektórych fenotypowych cech mutantów genu *mukB* i *vice versa*.

Obserwując migrację białek biorących udział w segregacji chromosomów *E. coli* do potomnych komórek, zaproponowano dwa modele koreplikacyjnego rozdziału chromosomalnego DNA, tzw. model „przemieszczającego się aparatu replikacyjnego” (ang. *translocating replication factory*) oraz „nieruchomego aparatu replikacyjnego” (ang. *fixed replication factory*) [39]. W pierwszym modelu zakłada się, że po przyłączeniu białka SeqA, miejsce inicjacji replikacji oraz nowosyntetyzowane nici DNA wraz z widelkami replikacyjnymi są stopniowo rozdzielane i przemieszczają się w przeciwnych kierunkach. Według drugiego modelu, kompleksy białka SeqA z nowosyntetyzowanymi niemi DNA przemieszczają się w pozycje $\frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ komórki, a aparat replikacyjny pozostaje w centrum komórki aż do terminacji replikacji.

Nieruchomy aparat replikacyjny stwierdzono w komórkach *B. subtilis*, natomiast przemieszczenie aparatu replikacyjnego z bieguna komórki do jej centrum w początkowym stadium replikacji zaobserwowano w komórkach *C. crescentus*.

W genomach *B. subtilis*, *C. crescentus* i *S. coelicolor* nie stwierdzono obecności genu kodującego białko SeqA. Ponadto, sekwencje GATC nie ulegają metylacji w tych organizmach. Sugeruje to, że białko ParB, analogicznie do białka SeqA, może tworzyć kanały białkowe. Zjawisko wyciszania genów przez białko ParB zaobserwowane na przykładzie plazmidu P1 (p. II-4) częściowo potwierdza tę hipotezę.

IV. Uwagi końcowe

Analiza sekwencji genomów kilkudziesięciu gatunków bakterii wykazała, że u większości z nich

obecne są homologe genów *parA* i *parB*. Sekwencje tych genów są stosunkowo dobrze ewolucyjnie zachowane nawet w przypadku organizmów filogenetycznie bardzo odległych. Sugeruje to, że u organizmów prokariotycznych segregacja materiału genetycznego do potomnych komórek jest procesem ukształtowanym w stosunkowo wczesnych fazach ewolucji. Ostatnie badania wykazały, że mechanizm ten charakteryzuje się uniwersalnością działania; elementy odpowiedzialne za segregację funkcjonują nawet po przeniesieniu ich z organizmów Gram-dodatnich do Gram-ujemnych. Plazmid zawierający miejsce wiązania centromeru chromosomu *B. subtilis* oraz geny *spo0J* i *soj* podlegał aktywnej segregacji w komórkach *E. coli* [40].

Dotychczasowe badania nad segregacją bakteryjnych chromosomów dotyczyły chromosomów kolistnie zamkniętych. Chromosomy *Borrelia burgdorferi* oraz *Streptomyces coelicolor* występują w postaci liniowej typowej dla organizmów eukariotycznych. Chromosom *S. coelicolor* (8.6 Mbp) jest prawie dziesięciokrotnie większy od chromosomu *B. burgdorferi* (0.91 Mbp). Organizmy należące do rodzaju *Streptomyces* charakteryzują się złożonym cyklem życiowym, który upodabnia te mikroorganizmy do niższych organizmów eukariotycznych — grzybów [41]. W czasie rozwoju tworzą one grzybnię, w której nie dochodzi do tworzenia przegród komórkowych pomiędzy nowozreplikowanymi chromosomami. Ich precyzyjna segregacja jest niezbędna dopiero w trakcie tworzenia zarodników. U *Streptomyces* replikacja rozpoczyna się w środku liniowego chromosomu i podąża dwukierunkowo do końców chromosomu (telomerów) [42, 43]. Nasze ostatnie badania wykazały, że białko ParB wiążąc kilkanaście sekwencji *parS* w regionie *oriC* (Rys. 3) tworzy duży nukleoproteinowy kompleks [20]. Obecnie badamy

wewnątrzkomórkową lokalizację segregacyjnych kompleksów. Ponadto, interesującym wydaje się określenie położenia końców tak dużego liniowego chromosomu w trakcie replikacji oraz podziału komórek *Streptomyces*.

Artykuł otrzymano 24 stycznia 2002
Zaakceptowano do druku 29 lipca 2002

Podziękowania

Praca finansowana przez KBN (projekt grantowy nr 3PO4A 07922) oraz „The British-Polish Joint Research Collaboration Programme” (The British Council – KBN). DJ dziękuje Komisji Europejskiej za stypendium im. Marie Curie (MCFI-2001-01610).

Piśmiennictwo

1. Kornberg AI, Baker T (1992) Second edition. Freeman WH & Co., New York
2. Jakob FS, Brenner S, Cuzin F (1963) *Quant Biol* **28**: 329-348
3. Webb CD, Teleman A, Gordon S, Straight A, Belmont A, Lin DC, Grossman AD, Wright A, Losick R (1997) *Cell* **88**: 667-674
4. Gordon GS, Sitnikov D, Webb CD, Teleman A, Straight A, Losick R, Murray AW, Wright A (1997) *Cell* **90**: 1113-1121
5. Gerdes K, Moller-Jensen J, Bugge JR (2000) *Mol Microbiol* **37**: 455-466
6. Bignell C, Thomas CM (2001) *J Biotechnol* **91**: 1-34
7. Bouet JY, Funnell BE (1999) *EMBO J* **18**: 1415-1424
8. Radnedge L, Davis MA, Austin SJ (1996) *EMBO J* **15**: 1155-1162
9. Surtees JA, Funnell BE (2001) *J Biol Chem* **276**: 12385-12394
10. Davis MA, Martin KA, Austin SJ (1992) *Mol Microbiol* **6**: 1141-1147
11. Rodionov O, Lobočka M, Yarmolinsky M (1999) *Science* **283**: 546-549
12. Hayakawa Y, Murtosu T, Matsubara K (1985) *J Bacteriol* **163**: 349-354
13. Williams DR, Macartney DP, Thomas CM (1998) *Microbiology* **144**: 3369-3378
14. Niki H, Hiraga S (1998) *Genes Dev* **12**: 1036-1045
15. Glaser P, Sharpe ME, Raether B, Perego M, Ohlsen K, Errington J (1997) *Genes Dev* **11**: 1160-1168
16. Lewis PJ, Errington J (1997) *Mol Microbiol* **25**: 945-954
17. Lin DC, Levin PA, Grossman AD (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4721-4726
18. Mohl DA, Gober JW (1997) *Cell* **88**: 675-684
19. Mohl DA, Easter J Jr, Gober JW (2001) *Mol Microbiol* **42**: 741-755
20. Jakimowicz D, Chater KF, Zakrzewska-Czerwińska J (2002) *Mol Microbiol* **45**: 1365-1377
21. Ireton K, Gunther NW, Grossman AD (1994) *J Bacteriol* **176**: 5320-5329
22. Gordon GS, Wright A (2000) *Annu Rev Microbiol* **54**: 681-708
23. Lewis PJ (2001) *Microbiol* **147**: 519-526
24. Moller-Jensen J, Jensen RB, Gerdes K (2000) *Trends in Microbiol* **8**: 313-320
25. Sharpe ME, Errington J (1999) *Trends in Genetics* **15**: 70-74
26. Wheeler RT, Shapiro L (1997) *Cell* **88**: 577-579
27. Lin DC, Grossman AD (1998) *Cell* **92**: 675-685
28. Ogasawara N, Yoshikawa H (1992) *Mol Microbiol* **6**: 629-634
29. Autret S, Nair R, Errington J (2001) *Mol Microbiol* **41**: 743-755
30. Quisel JD, Grossman AD (2000) *J Bacteriol* **182**: 3446-3452
31. Marston AL, Errington J (1999) *Mol Cell* **4**: 673-682
32. Quisel JD, Lin DC, Grossman AD (1999) *Mol Cell* **4**: 665-672
33. Wu LJ, Errington J (1997) *EMBO J* **16**: 2161-2169
34. Wu LJ, Errington J (1994) *Science* **264**: 572-575
35. Sharpe ME, Errington J (1996) *Mol Microbiol* **21**: 501-509
36. Niki H, Jaffe A, Imamura R, Ogura T, Hiraga S (1991) *EMBO J* **10**: 183-193
37. Lockhardt A, Kendrick-Jones J (1998) *J Struct Biol* **124**: 303-310
38. Brendler T, Austin S (1999) *EMBO J* **18**: 2304-2310
39. Hiraga S (2000) *Annu Rev Genet* **34**: 21-59
40. Yamaichi Y, Niki H (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14656-14661
41. Chater KF (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 685-713
42. Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, Oliver SG (1994) *J Bacteriol* **176**: 5123-5125
43. Zakrzewska-Czerwińska J, Schrempf H (1992) *J Bacteriol* **174**: 2688-2693
44. Jensen RB, Shapiro L (2000) *Trends in Cell Biology* **10**: 483-488

Rola macierzy jądrowej w przestrzennej organizacji procesów jądrowych

The role of the nuclear matrix in the spatial organization of the nuclear events

ROBERT LENARTOWSKI¹, ANNA GOC²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metody izolacji macierzy jądrowej
- III. Budowa macierzy jądrowej
 - III-1. Skład biochemiczny macierzy jądrowej
 - III-2. Ultrastruktura macierzy jądrowej
 - III-3. Sekwencje DNA związane z macierzą jądrową
- IV. Rola macierzy jądrowej w procesach jądrowych
 - IV-1. Struktury macierzy jądrowej włączone w metabolizm RNA
 - IV-1-1. „Fabryki transkrypcyjne” miejscem syntezy RNA na terenie NM
 - IV-1-2. Kolokalizacja procesów transkrypcji i składania RNA na terenie NM
 - IV-2. Udział macierzy jądrowej w fazie S cyklu komórkowego
 - IV-3. Procesy naprawy DNA przynajmniej częściowo są powiązane z NM
 - IV-4. Dynamika składu peptydowego macierzy jądrowej jest skorelowana z przebiegiem licznych procesów jądrowych
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ARS — sekwencja replikująca się autonomicznie; CAP — białko wiążące czapkę końca 5' mRNA; CTD — domena C-końcowa polimerazy II RNA; DNA — kwas deoksyrybonukleinowy; Dnazal — deoksyrybonukleaza I; EDTA — etylenodiaminotetraoctan; faza S — faza replikacji DNA w cyklu komórkowym; hnRNA — niejednorodny jądrowy RNA; hnRNP — niejednorodna jądrowa rybonukleoproteina; MAR — rejon połączenia z macierzą jądrową; NM — macierz jądrowa; *Ori* — miejsce startu replikacji u ssaków; RNA — kwas rybonukleinowy; RnazaH — rybonukleaza H; RNP — rybonukleoproteiny; S/MAR — rejon połączenia z macierzą jądrową; SAR — rejon połączenia z macierzą jądrową; SC-35 — czynnik zaangażowany w składanie RNA; SCAF8 — podobny do białek SR czynnik wiążący domenę CTD polimerazy II RNA; SH — grupy tiolowe; Sm — białka rdzeniowe

¹Dr, ²dr, Pracownia Genetyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, e-mail: goc@cc.uni.torun.pl, rlenart@eagle.biol.uni.torun.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Isolation of the nuclear matrix
- III. Structure of the nuclear matrix
 - III-1. Biochemical composition of the nuclear matrix
 - III-2. Ultrastructure of the nuclear matrix
 - III-3. DNA sequences attached to the nuclear scaffold
- IV. Role of the nuclear matrix in the nuclear events
 - IV-1. Nuclear matrix compartments involved in RNA metabolism
 - IV-1-1. NM transcription takes the place in the “transcription factories”
 - IV-1-2. RNA transcription and splicing colocalised in the NM
 - IV-2. Nuclear matrix in the S phase of the cell cycle
 - IV-3. Association of the DNA repair with NM
 - IV-4. Dynamics of the nuclear matrix protein composition is correlated with other nuclear events
- V. Concluding remarks

cząsteczki snRNP; SnRNA — mały jądrowy RNA; SR — białka SR, bogate w serynowo-argininowe reszty aminokwasowe.

I. Wstęp

Macierz jądrowa (NM) jest strukturą szkieletową jądra komórkowego przesłanianą przez masy chromatyny oraz frakcję białek rozpuszczalnych. Jej uwidocznienie wymaga sekwencyjnego przemywania oraz usunięcia zalegającego w jej strukturze DNA. Struktura ta jest definiowana jako pozostałość jądrowa, zrąb jądrowy czy też frakcja biochemiczna oporna na działanie detergentów oraz wysokich stężeń soli. W czasopiśmiennictwie polskim została obszernie opisana przez prof. Zofię Kilińską w kolejnych pracach [1-3].

Sposoby pozyskiwania NM wywołują wciąż żywą dyskusję nad faktem jej istnienia [4]. Sceptycy wskazują, iż zastosowanie nieznacznie różniących się me-

to izolacji prowadzi do otrzymania preparatów o zróżnicowanym składzie biochemicznym. Ponadto w trakcie pozyskiwania macierzy jądrowej może dochodzić do licznych artefaktów w postaci strącania kompleksów białkowych, wypłukiwania ATP, zmiany stopnia utlenienia poszczególnych składników NM oraz zjawiska niespecyficznego polimeryzacji rybonukleoprotein tworzących wewnętrzną sieć fibrylarno-granularną. Jednakże, zakotwiczenie specyficznej klasy sekwencji DNA w macierzy sugeruje jej udział w tworzeniu strukturalnych i funkcjonalnych przedziałów wewnątrzjądrowych. Dlatego też, niezależnie od tego na ile macierz jądrowa odzwierciedla szkielet jądrowy istniejący *in vivo*, pozostaje ona niezwykle użyteczną strukturą w badaniu organizacji jądra komórkowego i zachodzących tam procesów. Ponadto wyniki ostatnich doświadczeń, w których podobną strukturę NM pozyskiwano różnymi metodami izolacji [5], dowodzą iż jest ona realną częścią struktury szkieletowej komórki.

II. Metody izolacji macierzy jądrowej

Jedną z pierwszych obserwacji macierzy jądrowej było stwierdzenie obecności nierozpuszczalnej frakcji białek jądrowych w roztworach o dużej sile jonowej [6]. Późniejsze doświadczenia [7], w których dodatkowo usunięto chromatynę przez trawienie nukleazami, doprowadziły do wyizolowania ciągłej, przestrzennej struktury macierzy jądrowej. Metoda izolacji, rozwinięta przez B e r z e n e y ' a i C o f f e y ' a w latach siedemdziesiątych, była modyfikowana tak, by zbliżyć warunki izolacji do fizjologicznych [8-10] i uniknąć powstawania licznych artefaktów w postaci strącania kompleksów transkrypcyjnych, czy też niespecyficznych interakcji DNA-NM [8-9, 11]. W poszczególnych metodach zmienia się zarówno rodzaj, stężenie i czas działania związku wypłukującego frakcję białek rozpuszczalnych i histony [8, 10, 12-13], rodzaj enzymu użytego do usunięcia frakcji DNA [7-8, 11], kolejność ekstrakcji DNA i białek [7-8, 11] oraz rodzaj detergentu wypłukującego lipidy [14]. Jedną z subteiniejszych metod izolacji struktury szkieletowej jądra rozwinęli J a c k s o n i i n . (1988) [15]. Komórki z hodowli płynnej po zatopieniu w agarozowych mikrokapsułkach poddawano lizie, a uzyskane jądra komórkowe — elektroelucji w obecności izotonicznego buforu. Struktura wyizolowana tą metodą wykazywała znaczne podobieństwo do macierzy jądrowych otrzymanych przy użyciu wyższych stężeń substancji ekstrahujących [15].

Zachowanie w trakcie izolacji ciągłości struktury zrębu jądrowego, szczególnie jego części wewnętrznej, wymaga stabilizacji oddziaływań pomiędzy poszczególnymi jego komponentami. Cel ten zostaje osiągnięty przez:

- bezpośrednią modyfikację chemiczną części białkowej NM związkami o właściwościach utleniających lub sprzęgających [10, 14, 16-17],
- poddanie szokowi cieplnemu komórek lub samych jąder komórkowych [8, 10, 13, 18],
- inkubację jąder komórkowych w buforach zawierających kationy dwuwartościowe [8, 18].

Zastosowanie związków o właściwościach utleniających prowadzi do zmodyfikowania grup tiolowych peptydów budujących NM, a w konsekwencji tworzenia wiązań dwusiarczkowych, stabilizujących oddziaływanie białko-białko. Pogląd ten potwierdziły badania z użyciem związków blokujących grupy SH — powodowało to rozpad wewnętrznej struktury macierzy jądrowej [10, 14, 16]. Na zubożenie lub całkowity rozpad komponentu RNP będącego budulcem sieci fibrylarno-granularnej NM, jak i zawieszony w tej sieci struktury resztkowego jąderka, wpływa nie tylko zastosowanie enzymów rybonukleolitycznych. Również zmiana kolejności etapu trawienia rybonukleazami względem ekstrakcji buforami o wysokim stężeniu soli w trakcie preparatyki prowadzi do spadku procentowej zawartości RNA w preparacie i zaniku wewnętrznej części szkieletu jądrowego [10, 14, 16]. Dlatego też otrzymanie pełnej struktury macierzy jądrowej wymaga zachowania odpowiedniej kolejności poszczególnych etapów izolacji oraz obecności związków hamujących aktywność RNaz. Postuluje się także, że we wzbogaceniu preparatów NM w składnik RNP dopomaga zastosowanie inhibitorów enzymów proteolitycznych [19].

Inkubacja jąder komórkowych lub całych komórek w podwyższonej temperaturze w środowisku jonów dwuwartościowych, jakkolwiek stabilizuje strukturę NM, może jednak wywoływać redystrybucję białek wchodzących w jej skład. Ustalenie optymalnych warunków stabilizacji, często różnych dla każdego z białek, wymaga porównania dystrybucji białek macierzowych obserwowanej metodami immunofluorescencyjnymi w permeabilizowanych komórkach z rozkładem białek w preparatach NM [18, 20]. Jedynie w doświadczeniach, w których posłużono się metodą zatapiania całych komórek w mikrokapsułkach stabilizacja cieplna jest zabiegiem niecelowym i nie wywołuje efektu redystrybucji białek [15].

III. Budowa macierzy jądrowej

Preparaty macierzy jądrowych komórek kręgowców wykazują znaczne podobieństwo na poziomie ultrastrukturalnym jak i biochemicznym do NM izolowanych z tak odległych filogenetycznie organizmów jak pierwotniaki [21] czy rośliny [22]. Pozwala to na przypuszczenie, iż macierz jądrowa jest strukturą uniwersalną u organizmów eukariotycznych, homologiczną w budowie i zaangażowaną w te same wydarzenia jądrowe.

III-1. Skład biochemiczny macierzy jądrowej

Głównym składnikiem NM (97-98%) są białka niehistonowe o kwaśnym charakterze. Tylko niektóre z nich jak np. laminy są konstytutywnymi składnikami macierzy. Pozostałe ze względu na zależność umiejscowienia w macierzy od aktualnie zachodzących procesów jądrowych zostały dokładniej omówione w punkcie IV-4. Kolejne frakcje stanowią RNA (1.2%), fosfolipidy (0.5%) i DNA (poniżej 0.1%, omówienie w punkcie III-3), wykryto także węglowodany [7, 23]. Udział procentowy poszczególnych składników w preparatach macierzy jądrowej ulega wahaniom w zależności od metody izolacji, użytych enzymów proteolitycznych i nukleolitycznych lub ich inhibitorów [14, 19].

III-2. Ultrastruktura macierzy jądrowej

Struktura macierzy jądrowej po etapie ekstrakcji jąder komórkowych jest widoczna już na poziomie mikroskopu świetlnego. Pozostaje kolistego kształtu, zajmując mniejszą przestrzeń niż jądro komórkowe. W jej wnętrzu są widoczne dwie struktury: pozostałość jąderka oraz sieć włókien [23]. Dokładniejsza analiza na poziomie ultrastrukturalnym pozwoliła na obserwację pozostałości otoczki jądrowej oraz laminy z widocznie zarysowanym kompleksem porowym — tzw. peryferyczna macierz jądrowa. We wnętrzu NM znajduje się elektronowo nieprzejrzysta pozostałość jąderka oraz silnie rozgałęziająca się ciągła sieć włókien o charakterze fibrylarno-granularnym — tzw. macierz wewnętrzna [7, 17, 23-27]. Macierz wewnętrzna z pozostałością jąderkową łączy się z laminą tworząc nieprzerwaną polimorficzną strukturę [23-25]. Włókna NM są połączone z licznymi gęstymi, granularnymi i morfologicznie zróżnicowanymi skupiskami [17, 23-26]. Doświadczenia He i in. przeprowadzone w 1990 roku [25], w których wykonywano kolejne ekstrakcje wzrastającymi stężeniami soli, doprowadziły do odkrycia

rdzeniowej istoty sieci włókien macierzy jądrowej. Obecność filamentów NM udokumentowali również Jackson i Cook [28] izolując szkielet jądrowy w środowisku izotonicznym w polu elektrycznym. Wyszczególniono grupy filamentów różniących się średnicą i zaobserwowano, iż rozgałęziają się one i łączą między sobą lub zmieniają swą wielkość przechodząc ze średnicy 8-10 do 3-5 nm [27]. W tworzeniu połączeń między filamentami nie uczestniczy specyficzne białko [27]. Brak morfologicznego zróżnicowania filamentów rdzeniowych obserwowano jedynie w doświadczeniach, w trakcie których stosowano buforu izotoniczne [26]. Pomimo odnalezienia wśród białek NM białek zdolnych do tworzenia struktury filamentu, takich jak aktyna, keratyna i wimentyna [24, 25], nie wyróżniono białka strukturalnego filamentów rdzeniowych NM [29]. W pracy Tan i in. (2000) [30] stwierdzono, iż rolę tę mogłyby pełnić białka wiążące hnRNA. Dwa z nich, tworzące w kompleksach hnRNP tetramer (A2)₃B1, po uwolnieniu z kompleksów RNP oddziałują ze sobą tworząc struktury filamentów podobne do obserwowanych w NM [30]. Jednakże wymóg dysocjacji białek z kompleksów z RNA może wskazywać na artefaktowy charakter obserwacji. Z filamentami rdzeniowymi NM pozostają zasocjowane niewielkie skupiska materiału fibrylarno-granularnego o charakterze RNP [25, 31]. Usunięcie składnika granularnego z pozostałości jąderkowej zawieszanej w sieci filamentów prowadzi do odsłonięcia kolejnych części tej struktury — szkieletu wewnątrzjąderkowego, pozostałości gęstego składnika fibrylarnego oraz centrów fibrylarnych [26, 32].

Porównania budowy i składu biochemicznego NM izolowanych z użyciem różnych technik prowadzą do wniosku, iż obserwowana niejednorodność struktury NM wynika z artefaktów powstałych podczas etapu izolacji jąder komórkowych poprzedzającego ekstrakcję macierzy jądrowej [33]. Hipotezę tę popierają również wyniki doświadczeń Wan i in. z 1999 roku [34], w których preparaty NM pozyskiwane z całych komórek, a nie izolowanych jąder, wykazują ultrastrukturalne podobieństwo mimo użycia różnych metod ekstrakcji macierzy.

III-3. Sekwencje DNA związane z macierzą jądrową

DNA w jądrze interfazowym charakteryzuje się wysokim stopniem uporządkowania w formie chromatyny, jednym z poziomów organizacji są pętle czy też domeny chromatynowe [35, 36]. Ten stopień organizacji zostaje osiągnięty przez upakowanie DNA w struktury wyższego rzędu i ich zakotwiczenie po-

przez specyficzne sekwencje w strukturze szkieletowej jądra komórkowego [8, 37] bądź chromosomu [38]. Podstawy pętli chromatynowych stanowi specyficzna klasa sekwencji DNA, pozostających w kontakcie ze strukturą szkieletową po ekstrakcji detergentem lub wysokimi stężeniami soli [37]. W zależności od metody użytej do ekstrakcji białek frakcji rozpuszczalnej jądra interfazowego sekwencje takie nazwano MAR — *Matrix Attachment Region* [7] lub SAR — *Scaffold Associated Region* [8]. Zbieżna lokalizacja obszarów SAR i MAR oraz ich podobieństwo w strukturze i funkcji [37, 39-42] umożliwia zastosowanie wspólnej terminologii — S/MAR. Sekwencje S/MAR początkowo sklasyfikowano jako obszary o losowym rozkładzie zakotwiczące pętle chromatyny w szkielecie macierzy jądrowej [43-44]. Podstawy pętli stanowią obszary DNA o długości 250 pz [37, 45], bogate w pary zasad AT [8, 37, 45-47], wiązane przez liczne miejsca w macierzy jądrowej [37] oraz niosące sekwencje rozpoznawane przez topoizomerazę II [37, 45-47]. Ponieważ obecność topoizomerazy II stwierdzono zarówno w strukturze macierzy jądrowej [48] jak i w szkielecie chromosomowym [49], wydaje się, że miejsce cięcia dla tego enzymu może stanowić wskaźnik specyficznej klasy sekwencji S/MAR oraz obszarów zakotwiczących DNA w strukturze szkieletowej chromosomu. Część sekwencji S/MAR jest wspólna dla jądra interfazowego jak i struktury chromosomu metafazowego [47].

Znaczenie miejsc wiązania do NM uwydatnia ich zachowywanie w toku ewolucji. Potwierdzają to reakcje wiązania *in vitro* [13, 37, 50] jak i *in vivo* [51] sekwencji DNA zdefiniowanych jako S/MAR do heterologicznych preparatów macierzy jądrowej.

Miejscem wiązania DNA jest zarówno lamina ułożona brzeżnie w jądrze komórkowym, jak i wewnętrzna sieć o charakterze RNP [13]. Zaobserwowano, że sekwencje S/MAR wykazują zróżnicowany potencjał wiązania się do białek NM [13]. Obserwacje A m a t i i wsp. (1990) [52] wskazują, że potencjał wiązania sekwencji S/MAR powstaje w wyniku nagromadzenia miejsc wchodzących w oddziaływanie z strukturą NM. Może to wskazywać na istnienie kilku klas sekwencji S/MAR różniących się pełnią rolą strukturalną bądź regulatorową. Stwierdzono, że miejscami wiązania do macierzy jądrowej mogą być sekwencje o specyficznym składzie nukleotydowym jak np. obszary homooligonukleotydowe, sekwencje powtórzone, w tym powtórzenia mikrosatelitarne i satelitarne, sekwencje o zmienionej konformacji DNA i zaburzonej strukturze nukleosomowej czy też obszary o podwyższonej częstości występowania se-

kwencji wiązanych przez czynniki regulatorowe [39, 42]. Ze strukturą macierzy jądrowej pozostają związane także sekwencje centromerowe [53] oraz telomerowe [54].

Sekwencje S/MAR stanowiące podstawy pętli chromatynowych nie tylko odgrywają rolę strukturalną w organizacji materiału genetycznego. Sekwencja S/MAR może stymulować poziom somatycznej hipermutacji [55] oraz rekombinacji w segmencie V_κ genu Igκ [56]. Jako elementy graniczne S/MARy izolują przyległe obszary od wzajemnego wpływu, co pozwala na zróżnicowanie aktywności wyznaczanych przez nie domen transkrypcyjnych [57] (omówienie rozdział IV-1).

Sekwencje S/MAR nie wykazują ściśle określonego położenia względem sekwencji kodujących genów. Występują zarówno w obszarach regulatorowych powyżej miejsca startu transkrypcji [8, 58-60], w sekwencji samego genu [37, 50, 58-59, 61], w obszarze poniżej części kodującej genu lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie [58-60, 62-63]. Jako elementy graniczne zamykają w pętli część genu [47, 60-61], pojedynczy gen [63] lub grupę genów [8]. Rozmiar funkcjonalnych domen pozostaje w związku z wzorcem aktywności danego obszaru i waha się od 5 000 do 250 000 pz [8, 35-36, 38, 64-65].

IV. Rola macierzy jądrowej w procesach jądrowych

IV-1. Struktury macierzy jądrowej włączone w metabolizm RNA

Obserwacje wykonane przy użyciu konwencjonalnej mikroskopii elektronowej dokumentują zasadnicze podobieństwo ultrastruktury jądra komórkowego oraz macierzy jądrowej. Regresywne barwienie preparatów EDTA [66-67] prowadzące do wyróżnienia perichromatynowych fibryli i interchromatynowych ziarnistości (struktur zaangażowanych w metabolizm jądrowy) wykazało, iż są one odpowiednikami filamentów NM oraz części zasocjowanych z nimi ciał gęstych [23].

IV-1-1. „Fabryki transkrypcyjne” miejscem syntezy RNA na terenie NM

Wykazano, iż nowo powstały transkrypt, wykryty dzięki zastosowaniu znakowanego nukleotydu, pozostaje zasocjowany ze strukturą NM [68-69]. Jego synteza przebiega w domenach lub „fabrykach transkrypcyjnych” złączonych ze strukturą szkieletu jądrowego [68, 70]. Dysocjacja dużej podjednostki polimerazy RNA nie wywołuje zmian w ultrastruktu-

rze NM. Sugeruje to, że polimeraza II RNA jest dynamicznym składnikiem struktury szkieletowej [5]. Izolacja NM nie wpływa na ułożenie przestrzenne jak i aktywność enzymatyczną skupisk transkrypcyjnych obserwowanych w jądrze komórkowym [68-69]. Nowo syntetyzowane cząsteczki RNA pozostają związane ze szkieletem jądrowym również w trakcie transportu na terenie jądra komórkowego [69, 71]. W mikroskopie fluorescencyjnym związek ten manifestuje się w postaci szlaków tworzących trójwymiarowo rozmieszczone kanały wyłaniające się z miejsca transkrypcji [72]. Zaangażowanie macierzy jądrowej w proces syntezy RNA potwierdza obecność w jej strukturze licznych czynników transkrypcyjnych [73-74] jak i remodulujących strukturę chromatyny [75]. Identyfikacja na terenie NM białek CAP [76] oraz elementów strukturalnych jąderka sugeruje włączenie macierzy jądrowej w syntezę i szeroko pojęty metabolizm RNA [32]. Wyniki doświadczeń Philimonek i wsp. (2001) [5] prowadzą do wniosku, że transkrypcja nie jest wymagana do utrzymania integralności struktury NM. Szkielet jądrowy jest obserwowany zarówno w komórkach wyciszonych jak i aktywnych transkrypcyjnie.

Łączenie się DNA genów aktywnych transkrypcyjnie z rybonukleoproteinowym szkieletem macierzy jądrowej potwierdza regulatorową rolę obszarów S/MAR [47, 58-59]. Zakotwiczenie sekwencji DNA w NM zmienia się wraz z postępem procesu transkrypcji [26, 77]. Ostatnie badania dowodzą też, że zasocjowane z NM pozostają aktywne transkrypcyjnie kopie genów podlegających piętnowaniu rodzicielskiemu [78].

S/MAR mogą być zależne od fazy rozwoju organizmu [60], konstytutywne [47], jak i wykazywać specyficzność komórkową i tkankową, gdy wyznaczają domeny genów aktywnych w określonych tkankach [58-59]. S/MAR spełniają wówczas rolę sekwencji regulatorowych o charakterze wyciszaczy i wzmacniaczy lub wykazują zbieżne z nimi położenie [46, 60]. Wspólna lokalizacja elementów regulatorowych oraz S/MAR w genie ciężkiego łańcucha μ immunoglobuliny umożliwia precyzyjną regulację jego ekspresji [61]. W genie tym obszary S/MAR oskrzydłają intronowy wzmacniacz I μ E, a dzięki niesionym sekwencjom wyciszaczy biorą udział w powstaniu specyficznego komórkowo wzorca ekspresji [79]. Wzmacniacz I μ E samodzielnie jest zdolny do tworzenia miejsca nadwrażliwego na DNazę I, wymaga jednak obecności sekwencji S/MAR wspomagających proces otwierania chromatyny w celu aktywacji genu oraz jego regulacji w zależności od stanu rozwoju komórek limfocytów B [80-81]. Również w

genie lekkiego łańcucha immunoglobuliny myszy miejsce zakotwiczenia w NM mapuje się razem z elementem regulatorowym jakim jest intronowy, specyficzny tkankowo wzmacniacz [37, 50]. Obszar S/MAR-wzmacniacz nie promuje samoistnie wysokiego poziomu transkrypcji genu Igk [82]. Oddziaływanie obu sekwencji umożliwia przeprowadzenie demetylacji zależnej od stadium rozwojowego, a w konsekwencji aktywacji genu w sposób specyficzny tkankowo [83]. Synergistyczne oddziaływanie obserwowane między opisywanymi elementami a wzmacniaczem położonym w obszarze 3' poniżej części kodującej genu Igk prowadzi do silnej stymulacji, a w konsekwencji aktywacji genu [62]. Wprowadzanie mutacji do obszaru zdefiniowanego jako S/MAR w przypadku obu genów Ig prowadziło do spadku poziomu transkrypcji [80, 82, 84].

- S/MAR jako element regulatorowy jest zdolny do:
- wzmacniania ekspresji genu oraz selektywnego znoszenia efektu pozycji w miejscu integracji konstruktów [85-86],
 - oddziaływań z elementami regulatorowymi i wprowadzania zmian w aktywności przyległych obszarów [62, 80],
 - otwarcia chromatyny w wyniku stanu niesparowania obszaru rdzeniowego sekwencji S/MAR wywołanego naprężeniem torsyjnym [87],
 - przewijania naprężenia torsyjnego i umożliwienia swobodnego przebiegu transkrypcji [61],
 - zestawiania elementów regulatorowych, a przez to oddziaływania na długie dystanse [39].

IV-1-2. Kolokalizacja procesów transkrypcji i składania RNA na terenie NM

Obecność pośrednich oraz końcowych produktów procesu składania transkryptu w NM wskazuje na udział tej struktury w obróbce hnRNA [12, 88-89]. W NM stwierdzono zarówno obecność białek Sm, SR jak i snRNA — biorących udział w składaniu RNA [12, 15, 34, 90-91]. Czynniki te są obserwowane w domenach jądrowych i niektórych skupiskach NM o charakterze granularnym [90, 92]. Skupiska te mogą odpowiadać ziarnistościom interchromatynowym pozostającym w strukturze macierzy w trakcie jej izolacji. Zaś białko szkieletu jądrowego NuMA, będące składnikiem filamentów rdzeniowych zdolnym do asocjacji z kompleksami zaangażowanymi w składanie RNA, mogłoby zakotwiczać je w sieci fibrylaro-granularnej [93]. Pierwotny skład spliceosomów związanych z macierzą jądrową nie jest wystarczający do składania RNA i wymaga uzupełnienia w celu ich aktywacji [89]. Bezpośrednie powiązanie domen jądrowych o obu rodzajach ak-

tywności tj. transkrypcji i składania RNA jest obecnie dyskutowane [94-96]. Może tego dowodzić wiązanie ze spliceosomami wysokoufosforylowanej formy podjednostki II0 polimerazy II RNA, będącej białkiem NM [94, 97-98]. Proces fosforylacji podjednostki II0 jest zależny od fazy cyklu komórkowego, a jej lokalizacja jest też wspólna z czynnikiem SC-35 [99]. Badania Patturajan i in. w 1998 roku [95] doprowadziły do izolacji białka macierzonego SCAF8 odpowiedzialnego za to zjawisko. SCAF8 (podobny do białek SR czynnik wiążący CTD) wykazuje wspólne położenie z miejscami transkrypcji i bierze udział w montażu kompleksu splicingowego.

IV-2. Udział macierzy jądrowej w fazie S cyklu komórkowego

Pojawienie się części aparatu replikacyjnego na obszarze macierzy jądrowej poprzedza wejście w fazę S i przypada na koniec fazy G₁ cyklu komórkowego [26, 100-101]. Proces ten zbiega się z agregacją, a w konsekwencji zmniejszeniem liczby skupisk aktywnych transkrypcyjnie, co nie prowadzi do całkowitego wyciszenia ich dotychczasowej aktywności. Wzajemne ułożenie domen replikacyjnych i transkrypcyjnych nie zostało jednoznacznie ustalone, jednak wydaje się być zbieżne. Zmiany konformacyjne chromatyny towarzyszące obu procesom mogą powodować swoisty dialog pomiędzy domenami [69, 102-105]. Białka włączone w proces replikacji tworzą charakterystyczne skupiska nazwane „clustersomes” [100] lub „fabrykami replikacyjnymi” [106]. Na poziomie ultrastrukturalnym stanowią one klasę ciał gęstych macierzy jądrowej wykazujących dynamikę objętości oraz aktywności w trakcie cyklu komórkowego [26, 101, 107]. Porównanie rozmieszczenia kompleksów replikacyjnych przed i po izolacji struktury NM dowodzi homologii między skupiskami obserwowanymi w jądrze komórkowym i macierzy jądrowej [26, 101, 107-109]. Stwierdzono, iż inicjację samego procesu syntezy DNA wywołuje włączenie w strukturę NM białek enzymatycznych, między innymi polimerazy α DNA, prymazy DNA, egzonukleazy 3'-5', RNazy H i metylazy DNA [100, 110-111]. Korelacja czasowa procesu asocjacji czynników replikacyjnych i aktywacji istniejących skupisk, a także ich poreplikacyjna redystrybucja sugerują, iż niektóre z tych czynników mogą pełnić rolę aktywatorów syntezy DNA [100, 112]. Aktywne skupiska replikacyjne obecne na terenie szkieletu jądrowego są miejscem włączania znakowanego nukleotydu i wykazują wspólną lokalizację z częścią frag-

mentów DNA pozostających po izolacji NM [103, 108].

Ze strukturą macierzy jądrowej pozostaje związany nie tylko aparat enzymatyczny odpowiedzialny za syntezę DNA, lecz także nowo zreplikowane DNA [108-109] bez względu na wykorzystywaną metodę izolacji [113]. Obserwowany w czasie spadek poziomu znakowania nukleotydami w macierzy jądrowej świadczy o dynamicznym charakterze asocjacji replikowanego DNA z tą strukturą, przewijaniu się replikowanego DNA przez kompleks replikacyjny zakotwiczony w NM [19, 108]. Wydaje się, że jedynym miejscem stale zakotwiczonym w białkowej strukturze macierzy jądrowej jest obszar widełek replikacyjnych [19, 113].

W trakcie przebiegu procesu replikacji obserwowano także wiązanie specyficznych sekwencji DNA do NM, co nasuwało przypuszczenia, iż niektóre z nich mogą pełnić rolę miejsc inicjacji tego procesu. Niektóre sekwencje S/MAR zmapowane w genach *Drosophila melanogaster* promowały przebieg procesu replikacji w preparatach macierzy jądrowej pochodzących z innych organizmów [114]. Sekwencje startu replikacji ARS u drożdży są obszarami wiązania do struktury macierzy jądrowej lub też występują w ich pobliżu. Stwierdzono, że drożdżowe ARS wykazują powinowactwo do heterologicznych preparatów macierzy jądrowych, co wskazuje na ich zachowywanie w trakcie ewolucji [52-53, 114]. Sekwencje ARS i S/MAR wykazują pewien poziom homologii. Wynika on z obecności obszarów bogatych w nukleotydy A/T, sekwencji homooligonukleotydowych, czy miejsc cięcia dla topoiizomerazy II [52-53, 114]. Doświadczenia dotyczące położenia miejsca startu replikacji w krótkim genie α -globiny wykazały, iż występuje ono w pobliżu miejsca oddziaływania DNA z macierzą jądrową [115] i wykazuje homologię do *ori* wirusa SV40 [116]. Sekwencja zakotwiczająca genu α -globiny wchodzi w ciągłe interakcje z NM na terenie komórek wielu tkanek, w tym komórek spermy [116]. Miejsce startu replikacji nie tylko zbiega się w swym położeniu z sekwencją S/MAR, ale i elementami regulatorowymi promotora genu α -globiny [117]. Obecność innych miejsc regulatorowych niż S/MAR jest także wymagana do funkcjonowania danego obszaru jako replikonu [118]. Przebieg procesu transkrypcji oraz odpowiednie naprężenie torsyjne w danym obszarze wywierają wpływ na miejsce startu replikacji, a poprzez jego konformację na przebieg tego procesu [119]. Wzorzec aktywnych miejsc startu replikacji zmienia się wraz z rozwojem komórki i stopniem jej zróżnicowania [64, 118]. Jednakże ostatnie prace nad rozmieszczeniem miejsc *ori*

w ssaczym genomie dokumentują brak korelacji pomiędzy miejscami S/MAR, a miejscami startu replikacji. Rozkład *ori* wydaje się być przypadkowy, a ich interakcje ze strukturą szkieletu jądrowego przejściowe i zależne od fazy cyklu komórkowego [120].

IV-3. Procesy naprawy DNA przynajmniej częściowo są powiązane z NM

Proces naprawy indukowanych uszkodzeń DNA też wydaje się być powiązany ze strukturą macierzy jądrowej [39]. Konformacja chromatyny genów związanych z macierzą jądrową sprawia, iż sekwencje DNA znajdujące się w podstawie pętli chromatynowej bądź jej pobliżu mogą częściej niż obszary heterochromatynowe podlegać uszkodzeniom w wyniku zadziałania czynników mutagennych [121]. Przypuszczenie to jest zgodne z obserwacjami przebiegu procesu naprawy fragmentów DNA uszkodzonych promieniowaniem UV na obszarze NM [39]. Część z enzymów naprawczych, jak polimeraza poli(ADP-rybozy) i polimeraza β DNA, jest konstytutywnie związana ze szkieletem jądra komórkowego [39]. Przypuszcza się, iż pozostałe składniki systemów naprawczych mogłyby asocjować z NM w wyniku zmiany swego stopnia ufosforylowania lub po rozpoznaniu uszkodzenia w sekwencji DNA. Nie wiadomo jednakże czy preferencyjny przebieg naprawy jest faktycznie związany ze strukturą szkieletu jądrowego i czy dotyczy wszystkich typów uszkodzeń [39].

IV-4. Dynamika składu peptydowego macierzy jądrowej jest skorelowana z przebiegiem licznych procesów jądrowych

Białka macierzy jądrowej ze względu na właściwości jak i spełniane funkcje można podzielić na: wiążące DNA bez ścisłego powinowactwa do sekwencji, czynniki transkrypcyjne, białka adaptorowe, enzymy i peptydy o zdefiniowanej funkcji oraz peptydy, których rola nie została poznana [39].

Na każdym etapie rozwoju komórkowego w strukturze macierzy jądrowej wyróżniono frakcję białek konstytutywnych oraz specyficznych rozwojowo [122]. Także zakończenie okresu różnicowania i wzrostu komórki zbiega się z ustabilizowaniem składu peptydowego NM i podziałem na dwie zasadnicze grupy białek — białka konstytutywne i specyficzne tkankowo bądź komórkowo [122, 123]. Wśród białek NM wyróżniono:

— enzymy o właściwościach oksydoreduktaz, transferaz [124] w tym acetylotransferaz histonowych [125], hydrolaz [126] w tym deacetylaz histono-

wych [127-128], liaz, izomeraz i ligaz [126] także w formie aktywnej [125-126],
— białka opiekuńcze [129].

Zmiany w składzie peptydowym NM są skorelowane nie tylko z przebiegiem procesu różnicowania i wzrostu komórkowego [122], ale także fazą cyklu komórkowego [100, 112, 130-133], starzeniem komórki [134], śmiercią komórki [135] oraz wkroczeniem na drogę nowotworzenia [136-137]. Ponadto NM jest miejscem wiązania receptorów hormonów steroidowych. Ich oddziaływanie z akceptorowymi miejscami w macierzy pozwala na generowanie odpowiedzi na hormon poprzez zmianę aktywności genów wyposażonych w odpowiedni element regulatorowy [138-139]. Redystrybucja białek NM w różnym stopniu wiąże się z poziomem ich syntezy oraz rodzajem modyfikacji potranslacyjnej, jakiej ulegają w danej fazie cyklu [130-135]. Dynamika ta dotyczy zarówno białek laminy — lamin zaangażowanych w rozproszenie i rekonstytucję jądra komórkowego, jak i niektórych enzymów i białek wewnętrznej sieci NM [100, 112, 130-132]. Szczególnie wymownym efektem redystrybucji białek NM i reorganizacji szkieletu jądrowego jest tworzenia w trakcie podziału komórki struktura szkieletowa chromosomu. Część białek macierzy jądrowej pozostaje obecna w tej strukturze odpowiedzialnej za ułożenie przestrzenne chromatyny w trakcie podziału [140] i uczestniczy w restytuowaniu interfazowej postaci jądra komórkowego [31, 141-142].

Rozpoczęcie procesu nowotworzenia skutkuje zmianami w elektroforetycznym wzorcu białek NM i jest związane z pojawieniem się peptydów najpierw charakterystycznych dla stanu dysplazji, a następnie zaawansowanego procesu nowotworowego [136-137]. Białka te obserwowane we wczesnych etapach normalnego rozwoju komórki [143] umożliwiają diagnozowanie rodzaju nowotworu [136]. W trakcie nowotworzenia część białek szkieletu jądrowego zostaje uwolniona do krwi obwodowej, stanowiąc marker tego procesu [135], podobnie jak białka charakterystyczne dla stanu dysplazji i nowotworzenia. Uwalnianie białek NM jest związane z apoptozą zachodzącą w komórkach nowotworowych i jest jednym z pierwszych kroków w procesie apoptotycznej degradacji struktury jądra komórkowego [144]. Dodatkowo działalność proteolityczna i nukleolityczna enzymów aktywowanych w trakcie apoptozy prowadzi do zniszczenia miejsc oddziaływań DNA-NM u podstaw pętli chromatynowych [145-146]. Wyniki badań klinicznych wskazują, iż NM jest także strukturą docelową dla leków o właściwościach antynowotworowych [121].

Zdolność do reorganizacji składu peptydowego NM oraz fakt zakotwiczenia aktywnych transkrypcyjnie genów w strukturze macierzy jądrowej przez sekwencje S/MAR [58-59] predysponuje NM do ustanowienia wielopoziomowej regulacji transkrypcji. Sekwencje S/MAR, mogą być jednocześnie sekwencjami regulatorowymi genów lub znajdują się w ich pobliżu, współdziałają z białkami macierzy i czynnikami związanymi z macierzą w wytworzeniu specyficznego wzorca transkrypcji, charakterystycznego dla danej fazy rozwojowej.

V. Podsumowanie

Topografia jądra komórkowego jest przedmiotem badań prowadzonych w wielu laboratoriach na całym świecie. Uzyskane wyniki jak dotąd nie pozwalają na jednoznaczną odpowiedź, jakie mechanizmy/struktury są zaangażowane w organizację domen jądrowych, ich niezwykle precyzyjnego, skorelowanego w czasie i przestrzeni układu. W kontekście przedstawionych informacji macierz jądrowa, jako szkielet jądra komórkowego o charakterze dynamicznym, decydując o specyficznej organizacji chromatyny wpływałaby na przebieg procesów jądrowych oraz przepływ informacji niezbędny do ich skorelowania. Stanowiłaby więc kolejny, a być może nawet główny, poziom organizacji procesów jądrowych.

Artykuł otrzymano 4 kwietnia 2002

Zaakceptowano do druku 24 czerwca 2002

Piśmiennictwo

- Kiliańska Z (1989) *Post Biol Kom* 16: 61-85
- Kiliańska Z (1994) *Post Biol Kom* 21: 27-42
- Szymczyk P, Kiliańska Z (1994) *Post Biol Kom* 21: 133-164
- Hancock R (2000) *Chromosoma* 109: 219-225
- Philimonenko VV, Flechon JE, Hozak P (2001) *Exp Cell Res* 264: 201-210
- Mayer DT, Gulick A (1942) *J Biol Chem* 146: 433-440
- Berezney R, Coffey DS (1974) *Biochem Biophys Res Commun* 60: 1410-1417
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK (1984) *Cell* 39: 223-232
- Roberge M, Dahmus ME, Bradbury EM (1988) *J Mol Biol* 201: 545-555
- Belgrader P, Siegel AJ, Berezney R (1991) *J Cell Sci* 98: 281-291
- Kirov N, Djondjurov L, Tsanev R (1984) *J Mol Biol* 180: 601-614
- Gallinaro H, Puvion E, Kister L, Jacob M (1983) *EMBO J* 2: 953-960
- Izauralde E, Mirkovitch J, Laemmli UK (1988) *J Mol Biol* 200: 111-125
- Kaufmann SH, Coffey DS, Shaper JH (1981) *Exp Cell Res* 132: 105-123
- Jackson DA, Yuan J, Cook PR (1988) *J Cell Sci* 90: 365-378
- Kaufmann SH, Shaper JH (1984) *Exp Cell Res* 155: 477-495
- Nickerson JA, Krochmalnic G, Wan KM, Penman S (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4446-4450
- Neri LM, Martelli AM, Maraldi NM (1997) *Microsc Res Tech* 36: 179-187
- Berezney R, Buchholtz LA (1981) *Exp Cell Res* 132: 1-13
- Martelli AM, Bareggi R, Riederer BM, Marugg RA, Narducci P (1994) *Cell Biol Int* 18: 151-158
- Minguez A, Franca S, Moreno Diaz de la Espina S (1994) *J Cell Sci* 107: 2861-2873
- Moreno Diaz de la Espina SM (1995) *Int Rev Cytol* 162B: 75-139
- Berezney R, Coffey DS (1977) *J Cell Biol* 73: 616-637
- Fey EG, Krochmalnic G, Penman S (1986) *J Cell Biol* 102: 1654-1665
- He DC, Nickerson JA, Penman S (1990) *J Cell Biol* 110: 569-580
- Hozak P (1996) *Exp Cell Res* 229: 267-271
- Padros MR, Giles DM, Suarez MD (1997) *Cell Biol Int* 21: 367-373
- Jackson DA, Cook PR (1988) *EMBO J* 7: 3667-3677
- Paddy MR (1998) *Am J Hum Genet* 63: 305-310
- Tan JH, Wooley JC, LeStourgeon WM (2000) *Mol Biol Cell* 11: 1547-1554
- He DC, Martin T, Penman S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7469-7473
- Hozak P, Cook PR, Schofer C, Mosgoller W, Wachtler F (1994) *J Cell Sci* 107: 639-648
- Waitz W, Loidl P (1988) *J Cell Sci* 90: 621-628
- Wan KM, Nickerson JA, Krochmalnic G, Penman S (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 933-938
- Benyajati C, Worcel A (1976) *Cell* 9: 393-407
- Cook PR, Brazell IA (1976) *J Cell Sci* 22: 287-302
- Cockerill PN, Garrard WT (1986) *Cell* 44: 273-282
- Paulson JR, Laemmli UK (1977) *Cell* 12: 817-828
- Boulikas T (1995) *Int Rev Cytol* 162A: 279-388
- Blasquez VC, Sperry AO, Garrard WT (1989) *UCLA Symp Molec Cell Biol. New series* 95: 273-286
- Garrard WT (1990) *Nucl Acids Mol Biol* 4: 163-175
- Bode J, Schlake T, Rios-Ramirez M, Mielke C, Stengert M, Kay V, Klehr-Wirth D (1995) *Int Rev Cytol* 162A: 389-454
- Basler J, Hastie ND, Pietras D, Matsui SI, Sandberg AA, Berezney R (1981) *Biochemistry* 20: 6921-6929
- Kuo MT (1982) *J Cell Biol* 93: 278-284
- Gasser SM, Laemmli UK (1986) *EMBO J* 5: 511-518
- Jarman AP, Higgs DR (1988) *EMBO J* 7: 3337-3344
- Käs E, Chasin LA (1987) *J Mol Biol* 198: 677-92
- Berrios M, Osheroff N, Fisher PA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4142-4146
- Lewis CD, Laemmli UK (1982) *Cell* 29: 171-181
- Cockerill PN, Garrard WT (1986) *FEBS Lett* 204: 5-7
- Chen Y, Zhang B, Li X, Zhai Z (1997) *FEBS Lett* 413: 449-452
- Amati B, Pick L, Laroche T, Gasser SM (1990) *EMBO J* 9: 4007-4016
- Amati BB, Gasser SM (1988) *Cell* 54: 967-978
- de Lange T (1992) *EMBO J* 11: 717-724
- Betz AG, Milstein C, Gonzalez-Fernandez A, Pannell R, Larson T, Neuberger MS (1994) *Cell* 77: 239-248
- Takeda S, Zou YR, Bluethmann H, Kitamura D, Muller U, Rajewsky K (1993) *EMBO J* 12: 2329-2336
- Mishra RK, Karch F (1999) *J Biosci* 24: 377-379
- Ciejek EM, Tsai MJ, O'Malley BW (1983) *Nature* 306: 607-609
- Robinson SI, Small D, Idzerda R, McKnight GS, Vogelstein B (1983) *Nucl Acids Res* 11: 5113-5130
- Gasser SM, Laemmli UK (1986) *Cell* 46: 521-530
- Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT (1987) *J Biol Chem* 262: 5394-5397

62. Blasquez VC, Hale MA, Trevorrow KW, Garrard WT (1992) *J Biol Chem* **267**: 23888-23893
63. Levy-Wilson B, Fortier C (1989) *J Biol Chem* **264**: 21196-21204
64. Buongiorno-Nardelli M, Micheli G, Carri MT, Marilley M (1982) *Nature* **298**: 100-102
65. Jackson DA, Dickinson P, Cook PR (1990) *EMBO J* **9**: 567-571
66. Bernhard W (1969) *J Ultrastruct Res* **27**: 250-265
67. Monneron A, Bernhard W (1969) *J Ultrastruct Res* **27**: 266-288
68. Jackson DA, McCreedy SJ, Cook PR (1981) *Nature* **292**: 552-555
69. Wei X, Somanathan S, Samarabandu J, Berezney R (1999) *J Cell Biol* **146**: 543-558
70. Jackson DA, Cook PR (1985) *EMBO J* **4**: 919-925
71. Xing YG, Lawrence JB (1991) *J Cell Biol* **112**: 1055-1063
72. Lawrence JB, Singer RH, Marselle LM (1989) *Cell* **57**: 493-502
73. van Wijnen AJ, Bidwell JP, Fey EG, Penman S, Lian JB, Stein JL, Stein G (1993) *Biochemistry* **32**: 8397-8402
74. Nardoza TA, Quigley MM, Getzenberg RH (1996) *J Cell Biochem* **61**: 467-477
75. Reyes JC, Muchardt C, Yaniv M (1997) *J Cell Biol* **137**: 263-274
76. Patzelt E, Blaas D, Kuechler E (1983) *Nucl Acids Res* **11**: 5821-5835
77. Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR (1996) *J Cell Sci* **109**: 1427-1436
78. Kagotani K, Nabeshima H, Kohda A, Nakao M, Taguchi H, Okumura K (2002) *Exp Cell Res* **274**: 189-196
79. Imler JL, Lemaire C, Wasylyk C, Wasylyk B (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2558-2567
80. Forrester WC, van Genderen C, Jenuwein T, Grosschedl R (1994) *Science* **265**: 1221-1225
81. Jenuwein T, Forrester WC, Fernández-Herrero LA, Laible G, Dull M, Grosschedl R (1997) *Nature* **385**: 269-272
82. Xu M, Hammer RE, Blasquez VC, Jones SL, Garrard WT (1989) *J Biol Chem* **264**: 21190-21195
83. Lichtenstein M, Keini G, Cedar H, Bergman Y (1994) *Cell* **76**: 913-923
84. Blasquez VC, Xu M, Moses SC, Garrard WT (1989) *J Biol Chem* **264**: 21183-21189
85. Stief A, Winter DM, Stratling WH, Sippel AE (1989) *Nature* **341**: 343-345
86. McKnight RA, Shamay A, Sankaran L, Wall RJ, Hennighausen (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6943-6947
87. Bode J, Kohwi Y, Dickinson L, Joh T, Klehr D, Mielke C, Kohwi-Shigematsu T (1992) *Science* **255**: 195-197
88. Ciejek EM, Nordstrom JL, Tsai MJ, O'Malley BW (1982) *Biochemistry* **21**: 4945-4953
89. Zeitlin S, Parent A, Silverstein S, Efstratiadis A (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 111-120
90. Blencowe BJ, Nickerson JA, Issner R, Penman S, Sharp PA (1994) *J Cell Biol* **127**: 593-607
91. Zeng C, He D, Berget SM, Brinkley BR (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1505-1509
92. Nickerson J (2001) *J Cell Sci* **114**: 463-474
93. van Driel R, Wansink DG, van Steensel B, Grande MA, Schul W, de Jong L (1995) *Int Rev Cytol* **162A**: 151-189
94. Vincent M, Lauriault P, Dubois MF, Lavoie S, Bensaude O, Chabot B (1996) *Nucl Acids Res* **24**: 4649-4652
95. Patturajan M, Wei X, Berezney R, Corden JL (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 2406-2415
96. Mattern KA, van der Kraan I, Schul W, de Jong L, van Driel R (1999) *Exp Cell Res* **246**: 461-470
97. Chabot B, Bisotto S, Vincent M (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 3206-3213
98. Mortillaro MJ, Blencowe BJ, Wei X, Nakayasu H, Du L, Warren SL, Sharp PA, Berezney R (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8253-8257
99. Bisotto S, Lauriault P, Duval M, Vincent M (1995) *J Cell Sci* **108**: 1873-1882
100. Tubo RA, Berezney R (1987) *J Biol Chem* **262**: 1148-1154
101. Hozák P, Jackson DA, Cook PR (1994) *J Cell Sci* **107**: 2191-2202
102. Hassan AB, Errington RJ, White NS, Jackson DA, Cook PR (1994) *J Cell Sci* **107**: 425-434
103. Hughes TA, Pombo A, McManus J, Hozak P, Jackson DA, Cook PR (1995) *J Cell Sci Suppl* **19**: 59-65
104. Cook P (1998) *Science* **281**: 1466-1467
105. Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, Siegel AJ, Acharya R, Berezney R (1998) *Science* **281**: 1502-1506
106. Jackson DA (1995) *BioEssays* **17**: 587-591
107. Nakayasu H, Berezney R (1989) *J Cell Biol* **108**: 1-11
108. Hozák P, Hassan AB, Jackson DA, Cook PR (1993) *Cell* **73**: 361-373
109. Neri LM, Mazzotti G, Capitani S, Maraldi NM, Cinti C, Baldini N, Rana R, Martelli A (1992) *Histochemistry* **98**: 19-32
110. Smith HC, Berezney R (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **97**: 1541-1547
111. Tubo RA, Berezney R (1987) *J Biol Chem* **262**: 5857-5865
112. Smith HC, Berezney (1983) *Biochemistry* **22**: 3042-3046
113. Vaughn JP, Dijkwel PA, Mullenders LH, Hamlin JL (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 1965-1969
114. Amati B, Gasser SM (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 5442-5454
115. Razin SV, Kekelidze MG, Lukanidin EM, Scherrer K, Georgiev GP (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 8189-8207
116. Kalandadze AG, Bushara SA, Vassetzky YS Jr, Razin SV (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 9-15
117. Razin SV, Vassetzky YS Jr, Kvartskhava AI, Grinenko NF, Georgiev GP (1991) *J Mol Biol* **217**: 595-598
118. Boulikas T (1995) *Oncol Rep* **2**: 171-181
119. Dijkwel PA, Hamlin JL (1996) *J Cell Biochem* **62**: 210-222
120. Ortega JM, DePamphilis ML (1998) *J Cell Sci* **111**: 3663-3673
121. Fernandes DJ, Catapano CV (1995) *Int Rev Cytol* **162A**: 539-576
122. Dworetzky SI, Fey EG, Penman S, Lian JB, Stein JL, Stein GS (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4605-4609
123. Korosec T, Gerner C, Sauermann G (1997) *Electrophoresis* **18**: 2109-2115
124. Mullenders LH, Venema J, van Hoffen A, Mayne LV, Natarajan AT, van Zeeland AA (1990) *Prog Clin Biol Res* **340A**: 223-232
125. Hendzel MJ, Sun JM, Chen HY, Rattner JB, Davie JR (1994) *J Biol Chem* **269**: 22894-22901
126. Sjakste NI, Sjakste TG (1994) *Biochemistry* **59**: 1239-1245
127. Hendzel MJ, Delcuve GP, Davie JR (1991) *J Biol Chem* **266**: 21936-21942
128. Li W, Chen HY, Davie JR (1996) *Biochem J* **314**: 631-637
129. Gerner C, Holzmann K, Meissner M, Gotzmann J, Grimm R, Sauermann G (1999) *J Cell Biochem* **74**: 145-151
130. Loidl P, Eberharter A (1995) *Int Rev Cytol* **162B**: 377-403
131. Moir RD, Spann TP, Goldman RD (1995) *Int Rev Cytol* **162B**: 141-182
132. Bladon T, Brasch K, Brown DL, Setterfield G (1988) *Biochem Cell Biol* **66**: 40-53
133. Mancini MA, Shan B, Nickerson JA, Penman S, Lee WH (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 418-422
134. Dell'Orco RT, Whittle WL (1994) *Exp Gerontol* **29**: 139-149

135. Miller TE, Beausang LA, Winchell LF, Lidgard GP (1992) *Cancer Res* **52**: 422-427
136. Getzenberg RH, Pienta KJ, Huang EY, Coffey DS (1991) *Cancer Res* **51**: 6514-6520
137. Partin AW, Getzenberg RH, CarMichael MJ, Vindivich D, Yoo J, Epstein JI, Coffey DS (1993) *Cancer Res* **53**: 744-746
138. Lauber AH, Sandhu NP, Schuchard M, Subramaniam M, Spelsberg TC (1995) *Int Rev Cytol* **162B**: 337-376
139. DeFranco DB, Guerrero J (2000) *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**: 39-44
140. Pieck AC, van der Velden HM, Rijken AA, Neis JM, Wanka F (1985) *Chromosoma* **91**: 137-144
141. Wan KM, Nickerson JA, Krockmalnic G, Penman S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 594-598
142. Penman S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5251-5257
143. Bidwell JP, Fey EG, van Wijnen AJ, Penman S, Stein JL, Lian JB, Stein GS (1994) *Cancer Res* **54**: 28-32
144. Miller T, Beausang LA, Meneghini M, Lidgard (1993) *Biotechniques* **15**: 1042-1047
145. Zhivotovsky B, Wade D, Gahm A, Orrenius S, Nicotera P (1994) *FEBS Lett* **351**: 150-154
146. Lagarkova MA, Iarovaia OV, Razin SV (1995) *J Biol Chem* **270**: 20239-20241

Import białek do mitochondriów

Import of protein into mitochondria

DOROTA PIĘKNA-PRZYBYLSKA¹, HALINA AUGUSTYNIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Transport prekursorów białek mitochondrialnych przez zewnętrzną błonę mitochondrialną
 - II-1. Sygnały determinujące umiejscowienie w mitochondriach białek prekursorowych
 - II-2. Cytosolowe białka opiekuńcze
 - II-3. Budowa translokazy zewnętrznej błony mitochondrialnej
- III. Transport przez wewnętrzną błonę mitochondrialną
 - III-1. Udział translokazy TIM23 w imporcie białek do macierzy mitochondrialnej
 - III-2. Udział translokazy TIM22 w transporcie białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej
 - III-3. Udział kompleksu OXA1 w procesie wbudowywania białek w wewnętrzną błonę mitochondrialną
- IV. Dojrzewanie białek mitochondrialnych
 - IV-1. Peptydazy mitochondrialne
 - IV-2. Mitochondrialne białka opiekuńcze
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Transport of mitochondrial precursor proteins across the mitochondrial outer membrane
 - II-1. Targeting signals of mitochondrial precursor proteins
 - II-2. Cytosol chaperones
 - II-3. Composition of the translocase outer membrane
- III. Transport across the mitochondrial inner membrane
 - III-1. Participation of TIM23 in import of matrix proteins
 - III-2. Participation of TIM22 in insertion of inner membrane proteins
 - III-3. Participation of OXA1 in insertion of proteins in the mitochondrial inner membrane
- IV. Maturation of mitochondrial proteins
 - IV-1. Mitochondrial peptidases
 - IV-2. Mitochondrial chaperones
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CAT — transacetylaza chloramfenikolu (ang. *chloramphenicol acetyltransferase*); GIP — główny por importowy (ang. *general insertion pore*); IMP — (ang. *inner membrane protease*); MIP — (ang. *mitochondrial intermediate peptidase*); MPP — białko przetwarzające macierzy (ang. *mitochondrial processing peptidase*); MSF — czynnik stymulujący import do mitochondriów (ang. *mitochondrial stimulating factor*); NEM — (ang. *N-ethylmaleimide*); OXA1 — (ang. *Cytochrome oxidase biogenesis protein*); TIM — translokaza wewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. *translocon in the inner mitochondrial membrane*); TOM — translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. *translocon in the outer mitochondrial membrane*); TPT — nośnik fosforanowy 3-fosfoglicerynianu (ang. *triose phosphate 3-phosphoglycerate-phosphate translocator*).

I. Wstęp

Białka mitochondrialne i chloroplastowe kodowane są głównie przez genom jądrowy w formie prekur-

sorów, które są dostarczane z cytosolu do błon lipidowych poszczególnych organelli. Badania procesu importu białek mitochondrialnych prowadzone są od przeszło 20 lat i dotyczą przeważnie białek mitochondrialnych grzybów. Poznanie translokacji białek do mitochondriów roślinnych jest szczególnie trudne ze względu na równoczesny import białek do chloroplastów. Występowanie zjawiska dostarczania poszczególnych białek do dwóch różnych organelli komórki roślinnej oznacza, że istnieje mechanizm zabezpieczający przed ich kierowaniem do niewłaściwych organelli.

Celem niniejszego opracowania jest omówienie danych dotyczących importu białek do mitochondriów roślinnych. Ponieważ stan wiedzy na ten temat ogranicza się głównie do identyfikacji poszczególnych białek, dla lepszego zilustrowania ich zaangażowania w ten proces, dane te przedstawiono na tle wyników uzyskanych z badań nad importem w *Saccharomyces cerevisiae* i *Neurospora crassa*.

Biogeneza mitochondriów zależy zarówno od ekspresji i importu prekursorów białek mitochondrialnych kodowanych przez genom jądrowy, jak i ekspresji białek kodowanych przez genom mitochondrialny. Błony mitochondrialne zostały wyposa-

¹Mgr, ²prof. dr hab., Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, e-mail: piekna@main.amu.edu.pl

zone w zestaw białek o właściwościach translokaz umożliwiających import. W macierzy mitochondrialnej natomiast występują białka uczestniczące w modyfikowaniu tych prekursorów oraz białka opiekuńcze, które wspomagają przyjęcie przez nie formy natywnej i wbudowanie w strukturę oligomeru [1-3].

Wszystkie prekursorowe białka mitochondrialne kodowane przez genom jądrowy są przenoszone przez zewnętrzną błonę mitochondrialną za pomocą translokazy błony zewnętrznej (kompleks TOM). W doprowadzeniu poszczególnych prekursorów białkowych do składników kompleksu TOM biorą udział różne receptory i białka opiekuńcze w zależności od miejsca docelowej lokalizacji importowanego białka [4]. Uważa się, że w przenoszeniu przez błonę zewnętrzną prekursora białka, które będzie umiejscowione w macierzy mitochondrialnej, istotną rolę odgrywają interakcje poszczególnych domen białek tworzących kompleks TOM z dodatnio naładowanym peptydem sygnałnym prekursora [3]. Po przeniesieniu prekursorów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną poszczególne białka są kierowane do miejsc docelowego funkcjonowania. Część z nich wprowadzana jest do błony wewnętrznej mitochondriów, część pozostaje w przestrzeni międzybłonowej, a część jest kierowana do macierzy mitochondrialnej lub błony wewnętrznej (Ryc. 1).

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej działają dwie translokazy nazywane kompleksami TIM23 i TIM22 [2]. Kompleksy te cechuje odmienna specyficzność w stosunku do białek prekursorowych [5-8]. TIM23 umożliwia translokację do macierzy mitochondrialnej tych prekursorów, które zostały zaopatrzone w sygnał transportu zlokalizowany przy końcu aminowym niedojrzałego białka, natomiast TIM22 pośredniczy w transporcie białek, które mają wewnętrzny sygnał lokalizacji i są składnikami wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Występujący w wewnętrznej błonie mitochondrialnej kompleks OXA1 jest odpowiedzialny za wprowadzanie w błonę zarówno białek kodowanych przez jądro, jak i białek kodowanych przez genom mitochondrialny [9, 10].

Import białek z cytosolu do macierzy mitochondrialnej jest więc procesem wieloetapowym, na który składa się: biosynteza w cytosolu prekursorowych białek mitochondrialnych, interakcja nowo powstałego białka z cytosolowymi białkami opiekuńczymi, rozpoznanie prekursorowego białka przez receptory błony mitochondrialnej, translokacja prekursora przez obie błony, proteolityczna obróbka prekursorowego białka z udziałem specyficznej peptydazy i składanie dojrzałej formy białka w funkcjo-

nalny oligomeryczny kompleks białkowy z udziałem mitochondrialnych białek opiekuńczych.

II. Transport prekursorów białek mitochondrialnych przez zewnętrzną błonę mitochondrialną

W 1975 roku Kellems i wsp. [11], używając mikroskopu elektronowego, zademonstrowali gromadzenie się w pobliżu mitochondriów grzybów tych rybosomów, które syntetyzowały prekursorowe białka mitochondrialne. Częsteczki mRNA białek mitochondrialnych już we wczesnej fazie translacji mogą być transportowane wraz z kompleksem rybosomalnym do okolic mitochondriów. Wziąwszy pod uwagę dynamiczny charakter przestrzeni cytosolowej, wydaje się możliwe takie przemieszczenie kompleksu mRNA/polisom w kierunku mitochondriów oraz zachodzenie procesu importu jeszcze w trakcie translacji (kotranslacja). Uważa się, że pojawiający się w trakcie translacji N-koniec białka prekursorowego wchodzi w interakcję z kompleksem TOM i podlega importowi kotranslacyjnemu [1].

Przykładem białka, które jest dostarczane do mitochondriów wyłącznie przez import kotranslacyjny, jest forma prekursorowa enzymu cyklu Krebsa — fumarazy. W komórkach grzybów fumaraza występuje zarówno w cytosolu, jak i w macierzy mitochondrialnej. Jednakże, jeżeli prekursor tego białka opuści rybosom, to cząsteczka ta nie może zostać przeniesiona do mitochondriów ze względu na N-końcową domenę prekursora, która przybiera strukturę wyższego rzędu. Białko prekursorowe fumarazy wchodzi wtedy w interakcję z kompleksem TOM, ale translokacji podlega jedynie N-końcowa część białka prekursorowego, która zostaje odcięta. Pozostała w cytosolu część prekursora przyjmuje dojrzałą formę fumarazy cytosolowej. W przypadku, gdy import prekursora fumarazy zachodzi kotranslacyjnie, całe prekursorowe białko zostaje przeniesione przez dwie błony i dopiero w macierzy mitochondrialnej ostatecznie przyjmuje dojrzałą formę fumarazy mitochondrialnej [12].

II-1. Sygnały determinujące umiejscowienie w mitochondriach białek prekursorowych

Jak już wspomniano, mitochondrialne białka kodowane przez genom jądrowy mogą funkcjonować zarówno w macierzy mitochondrialnej, przestrzeni międzybłonowej, jak i w wewnętrznej i zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Doprowadzenie białka do określonego miejsca w mitochondrium zależy od

występowania w białku prekursorowym odpowiedniego sygnału wskazującego na jego lokalizację. Sygnał ten może znajdować się przy końcu aminowym białka prekursorowego lub wewnątrz łańcucha polipeptydowego tego białka. Szczególnie dobrze został scharakteryzowany sygnał lokalizacji występujący przy końcu aminowym prekursora białka, nazywany peptydem sygnałnym lub presekwencją. Wiadomo, że peptyd sygnałny zawierają te białka, które mają być dostarczone do macierzy mitochondrialnej, natomiast sygnał lokalizacji znajdujący się wewnątrz prekursora białka wskazuje na umieszczenie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Długość peptydu sygnałnego w mitochondrialnych białkach prekursorowych roślin jest bardzo zróżnicowana i waha się od 13 aminokwasów w przypadku oksydazy alternatywnej *Arabidopsis thaliana* [13] do 85 aminokwasów w podjednostce P dekarboksylazy glicynowej *Pisum sativum* [14]. Średnia długość peptydu sygnałnego w białkach mitochondrialnych roślin wynosi 40 aminokwasów i jest ona przeciętnie dłuższa o 7 do 9 reszt od peptydu sygnałnego białek mitochondrialnych ssaków, a także *S. cerevisiae* i *N. crassa*. Peptydy sygnałne roślinnych białek mitochondrialnych bogate są w takie aminokwasy, jak: seryna (17.1%), arginina (12.6%), alanina (12.0%) i leucyna (10.6%), a zawierają mało takich aminokwasów, jak: cysteina (1.0%), histydyna (1.3%), tryptofan (1.4%), tyrozyna (1.4%), kwas glutaminowy (1.4%) oraz kwas asparaginowy (1.5%) [15]. Skład aminokwasowy peptydu sygnałnego roślinnych białek mitochondrialnych jest podobny do peptydu sygnałnego mitochondrialnych białek innych organizmów. Jedyną cechą wyróżniającą peptydy sygnałne roślinnych białek jest znacznie większa niż w przypadku peptydów sygnałnych białek grzybów zawartość seryny wynosząca 17%. Peptydy sygnałne białek prekursorowych grzybów zawierają tylko 7% seryny a ssaków — 3% [16].

W peptydach sygnałnych białek prekursorowych wyróżnia się domeny N- i C-końcowe. Domena N-końcowa peptydu sygnałnego, nazywana również domeną importu, jest istotna dla translokacji przez błonę i charakteryzuje się zdolnością formowania amfipatycznej α -helisy. [17]. Domena C-końcowa peptydu sygnałnego jest rozpoznawana przez peptydazę MPP i przyjmuje określoną strukturę drugorzędową istotną dla procesu proteolizy [16]. Obie domeny N- i C-końcowe mogą na siebie nachodzić. Usunięcie domeny C-końcowej z peptydu sygnałnego prowadzi do znacznie mniej efektywnego importu białka do mitochondriów [18], natomiast usunięcie

domeny N-końcowej całkowicie uniemożliwia jego import [19].

Badania mające na celu określenie funkcji poszczególnych aminokwasów w peptydzie sygnałnym białka prekursorowego wykazały, że istotną funkcję w imporcie takiego białka spełniają reszty argininy zawarte w pozycjach -2, -10, -20 i -30 (odległość liczona od domniemanego miejsca przecięcia przez peptydazę) peptydu sygnałnego. Żeby proces translokacji zachodził efektywnie peptyd sygnałny przyjmuje strukturę amfipatycznej α -helisy, ale nie jest to jedyny warunek jaki musi on spełniać. Podobnie jak prekursor białek mitochondrialnych, również prekursor białek chloroplastowych są wyposażone w sygnał lokalizacji umieszczony przy końcu aminowym niedojrzałego białka. Peptydy sygnałne prekursorów białek mitochondrialnych i chloroplastowych wykazują pewne różnice w strukturze. Sądzi się, że prawidłowe rozpoznanie w cytosolu nowo powstałego białka i zapobieganie skierowania go do niewłaściwych organelli jest uzależnione od wielu czynników [15].

Badania specyficzności procesu importu prekursorów białek do organelli dowiodły, że chimeryczne struktury składające się z peptydu sygnałnego i białek różnego pochodzenia inaczej są kierowane w układach *in vitro* niż w układach *in vivo*. Chimeryczny konstrukt zawierający peptyd sygnałny nośnika fosforanowego 3-fosfoglicerynianu (TPT) i 5- lub 23-aminokwasowy N-końiec dojrzałego białka TPT sprzężony z transacetylazą chloramfenikolu (CAT) był importowany do mitochondriów roślinnych w układzie *in vitro*. W układzie *in vivo*, konstrukt zawierający 5-aminokwasowy fragment dojrzałego białka TPT pozostawał jednak w cytosolu, natomiast konstrukt z 23-aminokwasowym fragmentem TPT był importowany do chloroplastów [20]. Na tej podstawie przyjęto, że niektóre peptydy sygnałne prekursorów białek chloroplastowych mogą zawierać informacje istotne dla importu do mitochondriów, jednakże w układzie *in vivo* informacje te nie mają wpływu na specyficzność importu do chloroplastów. Peptydy sygnałne prekursorów białek chloroplastowych jako jedyne podlegają fosforylacji z udziałem specyficznych kinaz i jedynie w formie ufosforylowanej mogą zostać związane przez błony chloroplastów. Waegemann i wsp. [21] sądzą, że proces defosforylacji warunkuje translokację prekursora białka do chloroplastów. Prawdopodobnie cykliczne fosforylacje i defosforylacje stanowią jeden z czynników zapewniających specyficzność importu syntetyzowanych w cytosolu prekursorów białek chloroplastowych.

II-2. Cytosolowe białka opiekuńcze

Prekursory białek mitochondrialnych kierowane do organelli są na ogół bardziej hydrofobowe aniżeli białka, które pozostają w cytosolu. Wiele z tych prekursorów stanie się integralnymi białkami błony mitochondrialnej lub wejdzie w skład wielopodjednostkowych kompleksów. Utrzymanie nowo powstałych prekursorów białek mitochondrialnych w stanie tzw. „kompetencji do importu” zapewniają cytosolowe białka opiekuńcze [22, 23]. Sądzi się, że cytosolowe białko Hsp70 wchodzi w interakcję z białkiem prekursorowym na całej jego długości, utrzymując go w postaci rozfałdowanej [24]. Okazało się, że aż 97% peptydów sygnałnych białek prekursorowych roślin zawiera miejsce wiązania Hsp70 [25].

W komórkach roślinnych stwierdzono również występowanie w cytosolu białka (OM) Hsp70, które różni się od pozostałych białek tym, że jest związane z zewnętrzną błoną mitochondrialną [26]. Obecności takiego białka nie stwierdzono w komórkach *N. crassa* czy *S. cerevisiae*, natomiast w komórkach ssaków znaleziono białko homologiczne z (OM) Hsp70 [27]. Przypuszcza się, że (OM) Hsp70 występując w komórkach wyższych organizmów przejmuje funkcję cytosolowego białka Hsp70 [15].

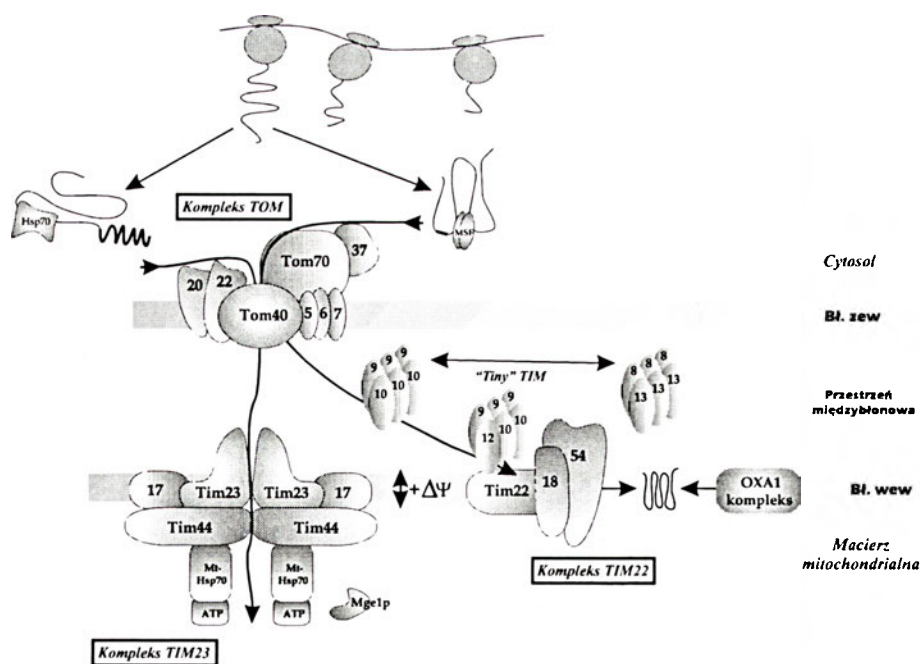
W utrzymywaniu prekursorów białek mitochondrialnych w stanie „kompetencji do importu” zaan-

gazowane są też inne białka opiekuńcze. Spośród nich najlepiej scharakteryzowano czynnik zwany MSF z rodziny białek 14-3-3. [28, 29]. MSF przenosi prekursor białek do receptorów Tom70 i Tom37 kompleksu TOM, które pośredniczą w imporcie białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej [30].

II-3. Budowa translokazy zewnętrznej błony mitochondrialnej

Budowę kompleksu translokazy błony zewnętrznej mitochondriów (kompleks TOM) najlepiej dotychczas scharakteryzowano w mitochondriach *N. crassa* i *S. cerevisiae* [31, 32] (Ryc. 1). Skład roślinnego kompleksu TOM jest mniej poznany i nie określono jeszcze funkcji wszystkich jego składników. W tabeli 1 zebrano dane dotyczące znanych składników translokaz błon mitochondrialnych *S. cerevisiae* i roślin.

Kompleks TOM zawiera dwie grupy białek. Pierwsza grupa białek określaną jako GIP stanowi rdzeń kompleksu i tworzy kanał umożliwiający przechodzenie prekursorów do przestrzeni międzybłonowej. W mitochondriach grzybów do tej grupy należą białka: Tom40, Tom5, Tom6 i Tom7, które tworzą kompleks o średnicy około 138 Å [33]. Białko Tom40 jest głównym składnikiem kanału rdzenia, którego wielkość oszacowano na około 20-26 Å [34].



Ryc. 1. Budowa kompleksów translokacyjnych mitochondriów. Kompleks TOM — translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej; Kompleksy: TIM23, TIM22 i OXA1 — translokazy wewnętrznej błony mitochondrialnej; „Tiny” TIM — kompleksy małych białek przestrzeni międzybłonowej; Hsp70, MSF, Mge1p — białka opiekuńcze. Rycina przedstawia stan wiedzy o budowie translokaz i drogach importu białek mitochondrialnych *S. cerevisiae* i *N. crassa* wg Bauer i w s p. [53] (zmieniono).

Drugą grupę białek kompleksu TOM stanowią białka luźno związane z GIP, które zaangażowane są w przejściowe interakcje z rdzeniem kompleksu TOM. Białka te pełnią funkcję receptorów, których podstawowym zadaniem jest doprowadzenie prekursorowych białek mitochondrialnych do kanału kompleksu TOM. W mitochondriach *S. cerevisiae* scharakteryzowano następujące receptory TOM: Tom72, Tom70, Tom37, Tom22 i Tom20. Okazało się, że domeny cytosolowe receptorów Tom20 i Tom22 rozpoznają prekursory białek macierzy mitochondrialnej [32]. Związany z receptorem prekursor białka wchodzi w interakcję z białkiem Tom5 rdzenia kompleksu TOM, które jest prawdopodobnie odpowiedzialne za przeniesienie go do Tom40 — głównego składnika translokacyjnego kanału błonowego [35]. Z kolei, białko Tom6 uznano za czynnik stabilizujący kompleks TOM, gdyż umożliwia ono wiązanie receptora Tom22 z białkami GIP [36], podczas gdy białko Tom7 uważa się za czynnik destabilizujący kompleks TOM, gdyż wpływa ono na interakcje pomiędzy Tom40 i Tom22 [37].

Funkcję receptorów spełniają także białka Tom70 i Tom37, które tworzą heterodimer i rozpoznają prekursorowe białka wewnętrznej błony mitochondrialnej należące do rodziny białek nośnikowych. Występujące w mitochondriach grzybów białko Tom72 zostało uznane za izoformę białka Tom70. Na poziomie sekwencji aminokwasowej oba białka wykazują wysoką homologię oraz charakteryzują się obecnością krótkiej domeny transmembranowej zakotwiczonej białko w błonie i olbrzymiej domeny cytosolowej pełniącej funkcję receptora. Różnice między Tom70 i Tom72 dotyczą krótkiej pętli odstającej od domeny cytosolowej, która u obu białek zlokalizowana jest w innym rejonie [38].

Masa cząsteczkowa całego kompleksu TOM nie została poznana, jednakże oszacowano masę jego subkompleksów. Na przykład białka Tom22, Tom40, Tom5, Tom6 i Tom7 tworzą subkompleks o masie 400 kDa, a białka Tom70 i Tom37 tworzą subkompleks o masie 170 kDa [36, 39].

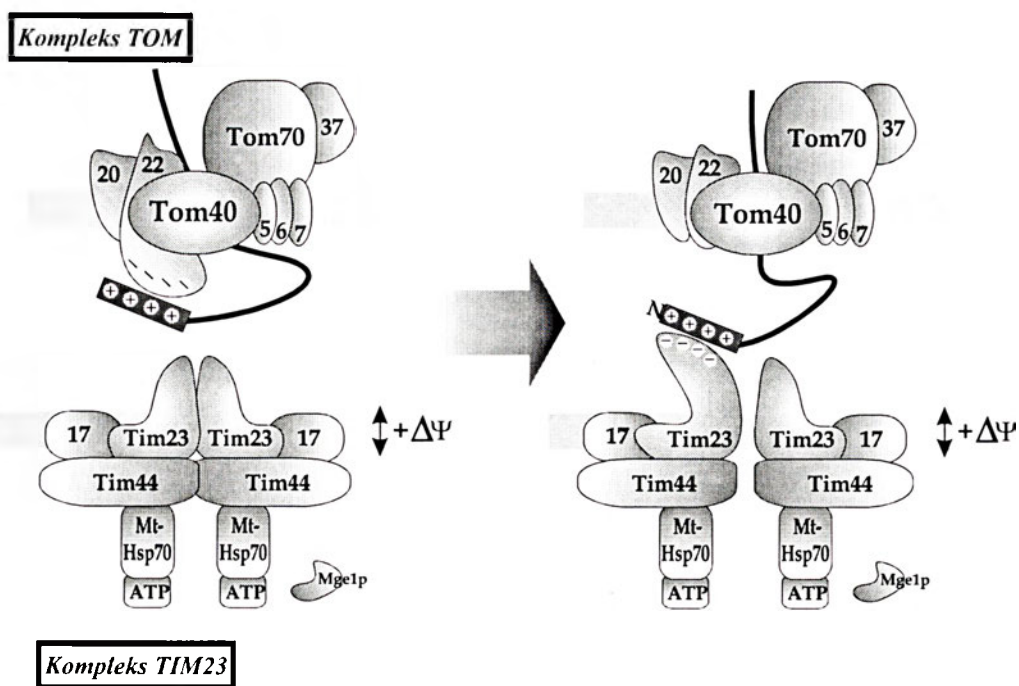
W przypadku mitochondriów roślin poznane dotąd składniki kompleksu TOM wykazują ograniczoną homologię ze swoimi odpowiednikami w mitochondriach grzybów i ssaków. Spośród 9 znanych białek, które tworzą kompleks TOM grzybów, w mitochondriach roślin zidentyfikowano 7 [40, 41]. Kompleks TOM *Solanum tuberosum*, jak i *A. thaliana* wykazują podobną masę około 230 kDa [40, 42]. Wśród podjednostek kompleksu TOM *S. tuberosum* zidentyfikowano białka odpowiadające podjednostkom kompleksu TOM grzybów, a mianowicie:

Tom70 *S. tuberosum* to prawdopodobnie Tom70 grzybów, Tom36 to Tom40, Tom23 to Tom20, Tom9 to Tom22, Tom7 to Tom7. Białka Tom6 i Tom8 *S. tuberosum* nie odpowiadają żadnym znanym białkom grzybów. Oczyszczony kompleks TOM *A. thaliana* składa się z podobnych białek, jednakże zamiast białka Tom9 występuje białko Tom21, które okazało się izoformą Tom23 [42].

Największa różnica pomiędzy kompleksem TOM grzybów i kompleksem TOM roślin dotyczy wielkości białka Tom22 (22 kDa), które w mitochondriach *S. tuberosum* ma tylko około 9 kDa [40]. Tom22 grzybów zawiera cztery domeny: domenę odpowiedzialną za transport do mitochondriów oraz domeny: „cis”, „transmembranową” i „trans”. Domena „cis” zwrócona jest w stronę cytosolu i pełni funkcję receptora rozpoznającego peptydy sygnałne mitochondrialnych białek prekursorowych. Domena „trans” skierowana jest w stronę przestrzeni międzybłonowej i wchodzi w interakcję z peptydem sygnałnym białka prekursorowego, wspomagając jego translokację przez kanał błonowy kompleksu TOM (Ryc. 2). Ta część białka Tom22 wykazuje najmniejszą zachowawczość. Domena „transmembranowa” białka Tom22 odpowiedzialna jest za oddziaływanie z białkami Tom40, Tom5, Tom6 i Tom7 w celu utworzenia kanału translokacyjnego [43].

Roślinne białko Tom9 odpowiadające białku Tom22 grzybów jest pozbawione domeny „cis”, co może wynikać z faktu występowania w komórce chloroplastów, do których również są importowane odpowiednie prekursory białek zaopatrzone w peptyd sygnałny. Usunięcie tej domeny z białka Tom9 zapewne wynika z tego, że w komórce roślinnej nie byłaby ona zdolna precyzyjnie rozpoznać powstające białko jako mitochondrialne lub chloroplastowe. Domena „cis” mitochondrialnego białka Tom22 grzybów i innych organizmów wykazuje jednak duże powinowactwo do peptydów sygnałnych prekursorów białek mitochondrialnych. M a c a s e v i wsp. [43] sądzą, że brak domeny „cis” w białku Tom9 roślin został zrekompensowany zmodyfikowaniem innego białka — Tom23, które odpowiada Tom20 grzybów. Roślinne białko Tom23 różni się od Tom20 grzybów i zwierząt budową domeny receptorowej oraz występowaniem C-końcowej domeny transmembranowej.

Ciekawe, że białka Tom20, Tom22 i Tom7 *A. thaliana* kodowane są przez co najmniej dwie kopie genu. Liczne izoformy Tom20 wykazują raczej wysoką wzajemną homologię, natomiast izoformy Tom22 różnią się zdecydowanie budową domeny „trans”, bo aż w 50% [42, 43]. Podstawowy składnik



Ryc. 2. Interakcja domeny receptorowej białka Tim23 kompleksu TIM23 z peptydem sygnałnym prekursora białka wchodzącego do przestrzeni międzybłonowej przez kompleks TOM. Wg Voos i wsp. [31] (zmieniono).

rdzenia kompleksu TOM, czyli białko Tom40 zidentyfikowane w mitochondriach *Vicia faba* wykazuje masę około 42 kDa [44], natomiast to samo białko w mitochondriach *S. tuberosum* ma masę około 36 kDa [40]. Dotychczas w komórkach roślin nie znaleziono białka odpowiadającego białku Tom37 *S. cerevisiae*, co nie jest dużym zaskoczeniem, gdyż w komórkach *N. crassa* również nie stwierdzono jego obecności [43].

III. Transport przez wewnętrzną błonę mitochondrialną

Wszystkie białka, które dostały się do przestrzeni międzybłonowej za pomocą kompleksu TOM, zostają następnie przeniesione do miejsc funkcjonowania. Uważa się, że białka z sygnałem lokalizacji umieszczonym w peptydzie sygnałnym prekursora zostają bezpośrednio przejęte przez translokazę TIM23 (kompleks TIM23). Proces ten zachodzi w wyniku interakcji dodatnio naładowanego peptydu sygnałnego białka mitochondrialnego z ujemnie naładowaną domeną receptorową białka Tim23 zwróconą do przestrzeni międzybłonowej [31] (Ryc. 2). Prekursory białek mitochondrialnych z wewnętrznym sygnałem lokalizacji zostają zaś przejęte przez kompleksy białek znajdujące się w przestrzeni

międzybłonowej. Białka tych kompleksów należą do rodziny małych białek Tim („tiny” Tim) (Ryc. 1).

III-1. Udział translokazy TIM23 w imporcie białek do macierzy mitochondrialnej

Proces importu białek prekursorowych zawierających sygnał wskazujący na lokalizację w macierzy mitochondrialnej najlepiej poznano w mitochondriach grzybów. Składnikami translokazy TIM23 (kompleks TIM23) grzybów są białka: Tim23, Tim17, Tim44, mitochondrialne białko szoku termicznego (mtHsp70), białko Mge1p i inne dodatkowe białka opiekuńcze [2] (Ryc. 1).

Tim23 jest integralnym białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej o masie 23 kDa. Około 100 aminokwasów od końca aminowego tego białka tworzy domenę receptorową zwróconą w stronę przestrzeni międzybłonowej. Umiejscowiona w błonie C-końcowa część białka Tim23 zbudowana prawdopodobnie z czterech transmembranowych helis wchodzi w interakcję z innym białkiem — Tim17. Tim17 wykazuje podobieństwo do domeny C-końcowej Tim23 i prawdopodobnie zbudowany jest również z czterech helis transmembranowych. Oba białka tworzą kanał w błonie wewnętrznej, którego otwarcie zależy od potencjału błony i związania

przez domenę receptorową białka Tim23 peptydu sygnałnego białka prekursorowego [45-47]. Tim23 i Tim17 jako białka prekursorowe, które będą wprowadzone do wewnętrznej błony mitochondrialnej, nie mają peptydów sygnałnych przy końcu aminowym, a sygnał lokalizacji mitochondrialnej umiejscowiony jest w środkowym rejonie białka [48, 49]. Na proces integracji w błonę białek Tim17 i Tim23 ma wpływ potencjał błony ($\Delta\Psi$) [47, 50].

Trzecim białkiem kompleksu TIM23 jest Tim44, które w odróżnieniu od Tim17 i Tim23 syntetyzowane jest jako prekursor zaopatrzony w peptyd sygnałny przy końcu aminowym. Z sekwencji aminokwasowej tego białka wynika, że nie ma ono charakteru hydrofobowego, a więc nie tworzy transmembranowych helis. Białko to związane jest z powierzchnią błony wewnętrznej od strony macierzy mitochondrialnej.

Kompleks TIM23 zbudowany jest z tej samej ilości trzech białek: Tim23, Tim17 i Tim44, a także wielu dodatkowych, jeszcze niezidentyfikowanych składników [51, 52]. Tim23 ma zdolność do dimeryzacji polegającej na interakcji transmembranowych C-końcowych domen w sposób zależny od potencjału błony ($\Delta\Psi$) oraz dimeryzacji domen N-końcowych tego białka [45]. Tim44 tworzy również dimer, ale prawdopodobnie poprzez interakcję domen N-końcowych tego białka [52]. Kompleks TIM23 występuje zatem w formie dimeru lub oligomeru wyższego rzędu. Domena N-końcowa białka Tim23 kompleksu pełni funkcję receptora peptydu sygnałnego białka prekursorowego [45]. Liczne reszty aminokwasowe o ładunku ujemnym występujące przy końcu aminowym Tim23 ułatwiają interakcję z resztami aminokwasowymi peptydu sygnałnego prekursora mającymi ładunek dodatni. Związanie peptydu sygnałnego prowadzi do dysocjacji dimeru domen N-końcowych białka Tim23 i w konsekwencji do otwarcie kanału w błonie wewnętrznej [53] (Ryc. 2).

W macierzy mitochondrialnej funkcjonuje odrębny zespół białek odpowiedzialnych za import prekursorów, który wspomaga przeprowadzanie białka przez kompleks TIM23. Białka te, do których należą mtHsp70 oraz Mge1p, wchodzi w interakcję z powierzchniowym białkiem Tim44 kompleksu TIM23 [54-57].

Dane dotyczące kompleksu TIM23 roślin są niezwykle skąpe. Potwierdzono jedynie występowanie niektórych składników kompleksu w przypadku kilku gatunków roślin. Na przykład w mitochondriach *A. thaliana* zidentyfikowano białko o masie 25 kDa jako Tim17, natomiast białko o masie 20 kDa jako Tim23 [58]. Białko opiekuńcze mtHsp 70 zidentyfi-

kowano w mitochondriach *Pisum sativum*, *S. tuberosum* i *Phaseolus vulgaris* [59-61]. Pełnego obrazu budowy roślinnego kompleksu TIM23 dotychczas nie poznano, jednakże sądzi się, że również istnieje podjednostka homologiczna z białkiem Tim44.

III-2. Udział translokazy TIM22 w transporcie białek do wewnętrznej błony mitochondrialnej

Białka nośnikowe jako integralne białka wewnętrznej błony mitochondrialnej są odpowiedzialne za transport metabolitów pomiędzy cytosolem a macierzą mitochondrialną. Prekursory białek nośnikowych są zaopatrzone w wewnętrzny sygnał lokalizacji i w cytosolu wiążą się z białkami opiekuńczymi MSF oraz receptorami Tom70 i Tom37 kompleksu TOM. Wbudowanie tych białek do błony wewnętrznej mitochondriów odbywa się z udziałem kompleksu TIM22. W przestrzeni międzybłonowej białka nośnikowe wchodzi w interakcję z małymi białkami przestrzeni międzybłonowej („tiny” Tim). W mitochondriach *S. cerevisiae* zidentyfikowano pięć małych białek Tim wykazujących podobieństwo w budowie. Są to białka: Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 i Tim13 [6-8, 62, 63] (Ryc. 1). Małe białka Tim charakteryzują się obecnością motywu CX₃C, przypominającego motyw palca cynkowego, które występuje dwukrotnie w odległości około 11-16 aminokwasów [2, 7, 62].

Jak dotąd w przypadku mitochondriów roślin nie wykazano udziału jakichkolwiek małych białek typu „tiny” Tim w interakcjach z białkami nośnikowymi w obszarze przestrzeni międzybłonowej. Poznano już jednak geny niektórych małych białek, na przykład w genomie *A. thaliana* są to geny białek: Tim9, Tim10, Tim8 i Tim13 [AF150111, AF150093, AF150083, AF144703].

Proces importu białek z udziałem kompleksu TIM22 przedstawia się następująco; z prekursorem białka opuszczającym kompleks TOM w pierwszej kolejności wchodzi prawdopodobnie kompleks o masie 70 kDa utworzony z trzech cząsteczek Tim10 i trzech cząsteczek Tim9 [7]. Przeniesienie prekursora do kompleksu TIM22 odbywa się z udziałem kompleksu białek Tim, złożonego z trzech cząsteczek Tim9, dwóch Tim10 i jednej Tim12 [6, 7]. Kompleks ten ma również masę 70 kDa [6]. Ponieważ w izolowanym kompleksie TIM22 zidentyfikowano białko Tim12 uważa się, że jest ono peryferyjnym składnikiem tego kompleksu [8]. W mitochondriach *S. cerevisiae* w przestrzeni międzybłonowej występują również białka Tim8 i Tim13, które tworzą kom-

pleks o masie 70 kDa [62]. Jak wykazali Leuenberger i wsp. [5], kompleks Tim8/13 pośredniczy w imporcie prekursora białka Tim23. Sugerują oni, że oba kompleksy Tim9/10 i Tim8/13 funkcjonują równolegle w przestrzeni międzybłonowej.

Wprowadzanie białek nośnikowych do błony wewnętrznej zachodzi za pośrednictwem białek Tim18, Tim22 i Tim54 tworzących kompleks TIM22, także w sposób zależny od potencjału ($\Delta\Psi$). Masę kompleksu oszacowano na około 300 kDa [63-65] (Ryc. 1). Białka Tim18 i Tim54 jako białka błonowe tego kompleksu zawierają segmenty transmembranowe. Białko Tim 18 ma trzy takie segmenty, natomiast Tim54 zawiera jeden lub dwa segmenty transmembranowe [64, 65]. Wykazano również, że kompleks TIM22 wchodzi w bezpośrednią interakcję z prekursorem białka nośnikowego poprzez białko Tim22, które wykazuje podobieństwo w budowie do białek Tim23 i Tim17 należących do kompleksu TIM23 [66].

W mitochondriach roślin nie poznano dotychczas budowy kompleksu TIM22.

III-3. Udział kompleksu OXA1 w procesie wbudowywania białek w wewnętrzną błonę mitochondrialną

W mitochondriach roślin i w mitochondriach grzybów zidentyfikowano kompleks OXA1, który pośredniczy w procesie wbudowywania białek w wewnętrzną błonę mitochondrialną [67-69]. Podobny kompleks znaleziono również w chloroplastach [70]. Kompleks OXA1 roślin i grzybów wykazują niewielkie podobieństwo w budowie tworzących je białek, jednakże oba kompleksy pełnią tę samą funkcję. Dotychczas poznano tylko jedną podjednostkę tego kompleksu — Oxa1p, która jest białkiem osadzonym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i zawierającym pięć segmentów transmembranowych. W mitochondriach drożdży wykazano, że kompleks OXA1 pośredniczy w procesie wbudowywania w błonę zarówno białek kodowanych przez genom mitochondrialny, jak i białek, które są importowane z cytosolu [10]. Białka wbudowywane z udziałem kompleksu OXA1 wykazują różną topologię w błonie, bowiem ich końce aminowe są skierowane zarówno w stronę macierzy mitochondrialnej, jak i w stronę przestrzeni międzybłonowej. Stwierdzono również, że białko, które ma zostać wbudowywane w błonę, wchodzi w interakcje z kompleksem OXA1 już w trakcie biosyntezy w macierzy mitochondrialnej. Hell i wsp. [10] uważają, że proces ten zachodzi kotranslacyjnie, tym bardziej, że stwierdzono

również asocjacje rybosomów z błoną mitochondrialną [71]. Brak kompleksu OXA1 w mitochondriach drożdży prowadzi do zaburzeń w procesie tworzenia się kompleksów III i IV łańcucha oddechowego, co powoduje utratę zdolności oddechowej [72].

IV. Dojrzewanie białek mitochondrialnych

IV-1. Peptydazy mitochondrialne

Dojrzewanie prekursorów białek mitochondrialnych wymaga obróbki proteolitycznej, podczas której odcinane są fragmenty nie występujące w formie natywnej tego białka. Usuwanie tych fragmentów zachodzi z udziałem peptydaz, do których zalicza się: MPP, IMP i MIP.

Bardzo dobrze poznana peptydaza MPP odpowiedzialna jest za usunięcie peptydu sygnałowego z końca aminowego prekursora białka mitochondrialnego. Proces zachodzi w trakcie importu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną lub tuż po przeniesieniu prekursora do macierzy mitochondrialnej [73]. MPP cechuje wysoka specyficzność w stosunku do swoich substratów, czyli peptydów sygnałowych, które stanowią zróżnicowaną grupę pod względem budowy. Peptydaza ta rozpoznaje miejsce proteolizy i precyzyjnie odcina peptyd sygnałowy od pozostałej części białka. MPP nie wykazuje żadnej aktywności w stosunku do dojrzałych form białek mitochondrialnych i do prekursorów białek kierowanych do innych organeli. Ciekawe, że prekursorzy mitochondrialnych białek *N. crassa* podlegają obróbce proteolitycznej przez MPP z *V. faba* i *Brassica oleracea* [74], natomiast prekursorzy białek chloroplastowych nie są substratem w reakcji, którą katalizuje ten enzym [75].

Peptydaza MPP zbudowana jest z dwóch podjednostek, α -MPP i β -MPP, które wspólnie uczestniczą w procesie odcięcia peptydu sygnałowego. MPP należy do rodziny pitrilysin, grupy wysoko specyficznych metaloendopeptydaz rozpoznających rejon cięcia na podstawie utworzonej struktury wyższego rzędu, a nie na podstawie sekwencji reszt aminokwasowych w peptydzie [76]. Rodzina metaloendopeptydaz charakteryzuje się obecnością miejsca wiążącego jon metalu. W obrębie podjednostki β -MPP występuje specyficzny motyw sekwencji aminokwasowej w odwróconej orientacji HxxEH, który jest odpowiedzialny za powstanie miejsca wiązania jonu metalu [77]. Motyw ten jest zachowany we wszystkich podjednostkach tego typu, natomiast w podjednostce α -MPP jest on zdegenerowany [78].

Chociaż peptydy sygnałne cechuje brak zachowawczości w sekwencji aminokwasów, to jednak w pozycji –2 od miejsca odcięcia przez MPP najczęściej występuje arginina. G l a s e r i wsp. [15] sądzą, że obecność innych reszt argininy w rejonie oddalonym od tego miejsca może mieć również duże znaczenie dla procesu odcięcia peptydu.

Wspólną cechą peptydów sygnalnych białek mitochondrialnych jest ich zdolność do tworzenia struktury helikalnej, a jakiegokolwiek zaburzenia w jej powstawaniu utrudniają rozpoznanie przez MPP miejsca cięcia. Analizy z wykorzystaniem mutagenезy ujawniły, że dla procesu odcięcia peptydu sygnałnego istotne są aminokwasy leżące po obu stronach miejsca cięcia zarówno w mniejszej, jak i większej odległości. Okazało się na przykład, że prekursor oksydazy alternatywnej wymaga obecności argininy w pozycji –2 dla prawidłowego odcięcia peptydu sygnałnego. Znane są jednak prekursorы roślinnych białek mitochondrialnych, które nie zawierają w pozycji –2 reszty argininy, a podlegają hydrolizie przez MPP. Stwierdzono także, że prekursor podjednostki F₁β syntazy ATP *N. tabacum* nie zawiera reszty argininy w pozycji –2, ale w pozycji –5, natomiast leżąca w dalszej odległości arginina nie wpływa na rozpoznanie przez MPP miejsca odcięcia peptydu sygnałnego. W przypadku prekursora alternatywnej oksydazy *Glycine max* reszty argininy, które występują w pozycjach –30 i –35 są istotne dla procesu odcięcia peptydu sygnałnego i sądzi się, że ich obecność związana jest z utworzeniem przez peptyd sygnałny właściwej struktury wyższego rzędu [15].

Niektórzy autorzy uważają, że obie podjednostki α i β peptydazy MPP działając wspólnie, angażują różne domeny tworząc miejsca wiązania peptydu sygnałnego. Występowanie w MPP wielu domen mogących wiązać peptyd sygnałny ułatwia peptydazie dopasowanie się do ich zróżnicowanej budowy [79].

Mitochondrialna peptydaza MPP roślin została wyizolowana z bulw *S. tuberosum*, liści *Spinacia oleracea* oraz z *Triticum aestivum* [80-82]. Wykazano, że w odróżnieniu od grzybów peptydaza roślin jest zintegrowana z kompleksem cytochromu bc₁ łańcucha oddechowego [80, 83]. Kompleks bc₁/MPP *Spinacia oleracea*, *S. tuberosum* i *T. aestivum* składa się z 10 podjednostek, wśród których są podjednostki kompleksu łańcucha oddechowego oraz podjednostki peptydazy MPP. Oczyszczony kompleks MPP/bc₁ *Spinacia oleracea* ma masę 550 kDa [84]. W układzie *in vitro* nie stwierdzono jednak jakiegokolwiek zależności pomiędzy aktywnością peptydazy MPP a aktywnością cytochromu bc₁ [81]. Roślinna

peptydaza MPP jest aktywna w szerokim zakresie pH obejmującym pH od 6 do 11, z optimum przypadającym na pH 8-9. Jest również aktywna w szerokim zakresie temperatur od 10 do 50°C, chociaż optimum jej działania wynosi 35°C. Inhibitorami tej peptydazy są orto-fenantrolina i EDTA [81, 83, 84].

W mitochondriach roślin występuje również MPP nie związana z błoną i działająca w macierzy mitochondrialnej. Została ona jednak scharakteryzowana w znacznie mniejszym stopniu, chociaż stwierdzono na przykład, że w mitochondriach *Glycine max* udział tej peptydazy w odcinaniu peptydu sygnałnego jest znacznie większy niż w mitochondriach *Spinacia oleracea*. Wiadomo również, że na aktywność MPP występującej w macierzy mitochondrialnej roślin hamująco wpływa NEM, podobnie jak peptydaza MPP grzybów [85]. W przypadku MPP występującej w macierzy mitochondrialnej drożdży i ssaków stwierdzono, że jest ona heterodimerem, podczas gdy odpowiednia peptydaza MPP *N. crassa* występuje prawdopodobnie jako monomer [86, 87].

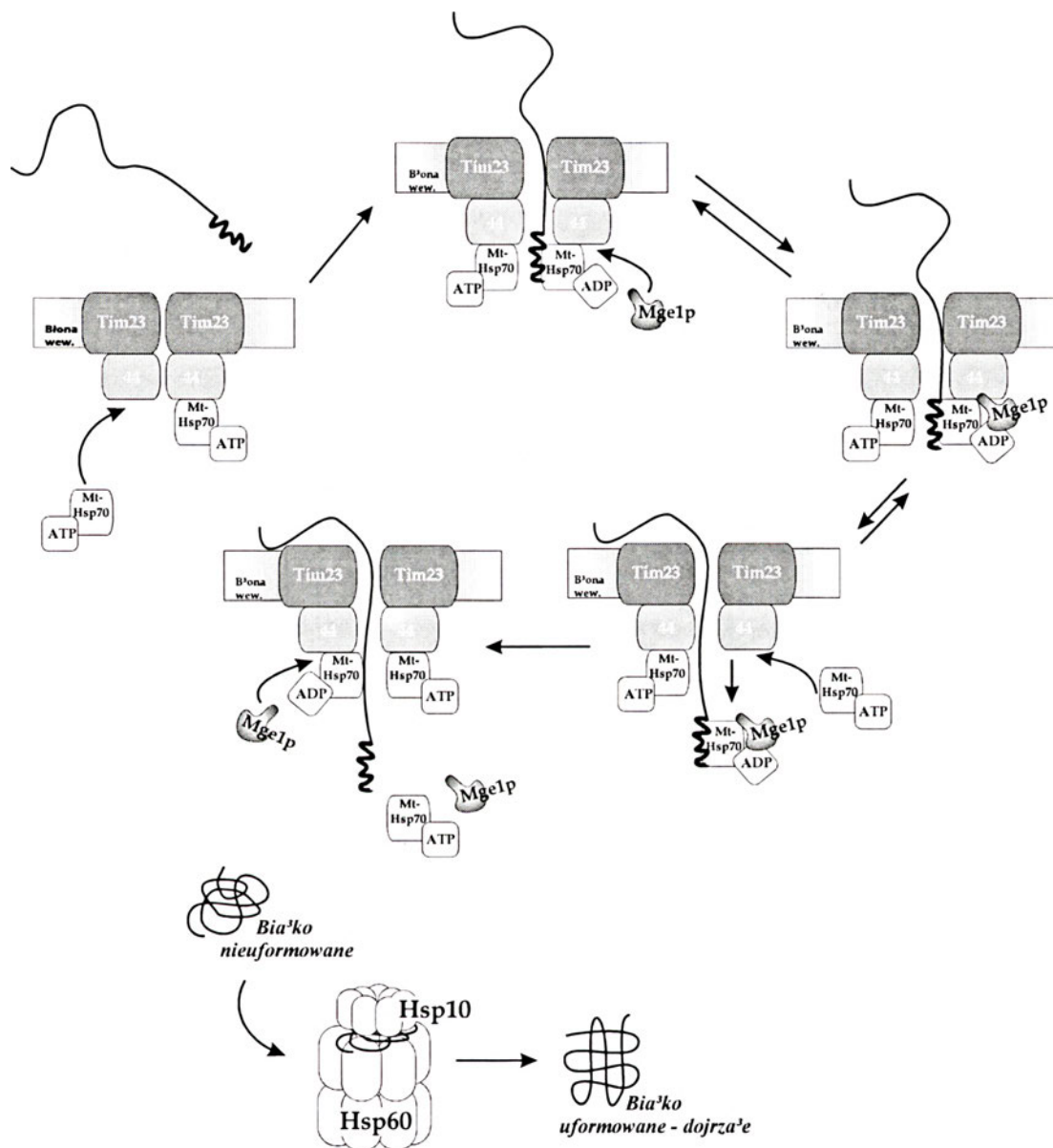
W mitochondriach grzybów oprócz MPP występują także dwie inne peptydazy związane z obróbką prekursora białka, a mianowicie IMP i MIP. Tych peptydaz dotąd nie zidentyfikowano w mitochondriach roślin. Peptydaza IMP składa się z podjednostek Imp1p i Imp2p, które są tak osadzone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, że ich części katalityczne skierowane są do przestrzeni międzybłonowej [88, 89]. IMP działa między innymi na białka prekursorowe cytochromu b₂, cytochromu c₁ i podjednostki oksydazy cytochromowej — COXII [90, 91]. Peptydaza MIP jest natomiast metalopeptydazą zlokalizowaną w macierzy mitochondrialnej funkcjonującą jako białko monomeryczne o masie 75 kDa [92, 93]. Wiadomo, że MIP uczestniczy w dojrzewaniu prekursorów, z których został usunięty peptyd sygnałny przez MPP. Wiele białek wymaga zaangażowania tych dwóch peptydaz w procesie dojrzewania swoich prekursorów. Są to między innymi prekursorы podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego oraz enzymy cyklu Krebsa [92].

IV-2. Mitochondrialne białka opiekuńcze

Transport prekursora białka przez wewnętrzną błonę mitochondrialną z udziałem kompleksu TIM23 wymaga również zaangażowania występujących w macierzy mitochondrialnej białek opiekuńczych takich jak mtHsp70 i Mge1. Białko mtHsp70 występuje w macierzy mitochondrialnej w bardzo dużej ilości [52]. Stwierdzono, że oddziaływanie białka mtHsp70 z białkiem Tim44, na-

leżącym do kompleksu TIM23, zależy od wielu czynników, a między innymi od ATP, białka Mge1p a nawet importowanego prekursora [54, 55, 94]. Do tychczas nie poznano w jaki sposób dochodzi do oddziaływania tych białek, chociaż istnieją przypuszczenia, że w pierwszym etapie tych wzajemnych in-

Tim44 a Mge1p umożliwia odłączenie ADP od mtHsp70. Białko mtHsp70 może ponownie związać ATP i ponownie przyłączyć się do Tim44 [53, 55-57]. Proces ten przypomina poznany w bakteriach cykl interakcji białek opiekuńczych DnaJ, DnaK i GrpE [95, 96]. Aby cały prekursor białka został



Ryc. 3. Oddziaływania białek opiekuńczych mtHsp70 i Mge1p z podjednostką Tim44 kompleksu TIM23, przy transporcie prekursora białka przez kompleks TIM23 w głąb macierzy mitochondrialnej. Hsp60, Hsp10 — białka opiekuńcze zaangażowane w proces dojrzewania białek mitochondrialnych. Wg Bauer i w s p . [53] (zmieniono).

terakcji następuje związanie białka Tim44 z białkiem mtHsp70, który ma przyłączoną cząsteczkę ATP (mtHsp70_{ATP}) (Ryc. 3). Prekursor białka w trakcie przechodzenia przez kompleks TIM23 nie wchodzi w bezpośredni kontakt z białkiem Tim44. Z prekursorem oddziałuje natomiast białko mtHsp70, któremu interakcję ułatwia Tim44. Hydroliza ATP umożliwia utworzenie kompleksu mtHsp70_{ADP}/Tim44. W następnej kolejności dochodzi do oddziaływania pomiędzy Mge1p i kompleksem mtHsp70_{ADP}/Tim44, po czym mtHsp70_{ADP} oddysocjowuje od

wprowadzony do macierzy mitochondrialnej, musi zająć wiele takich cyklicznych oddziaływań. W ostatnim etapie fałdowanie białka prowadzi do powstania jego natywnej formy, a w przypadku podjednostek większego kompleksu, następuje ich wbudowanie w strukturę oligomeru. W tym ostatnim procesie zaangażowane są inne białka opiekuńcze, a mianowicie białka Hsp60 i Hsp10 [97]. Kompleks Hsp60/Hsp10 wymaga udziału ATP i przypomina bakteryjny system GroEL-GroES [32, 98].

Tabela 1

Składniki kompleksów TOM i TIM *S. cerevisiae* i roślin

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Rośliny	
nazwa białka	hipotetyczna rola	białka odpowiadające	roślina
Tom72	nieznana (homolog Tom70)	nieznany	
Tom70	receptor kompleksu TOM	70kDa ??	<i>S. tuberosum</i> [40]
Tom37	receptor kompleksu TOM	nie znany	
Tom40	główny składnik kanału (GIP)	36kDa	<i>S. tuberosum</i> [40]
		34kDa	<i>A. thaliana</i> [42]
		42kDa	<i>V. faba</i> [44]
Tom22	receptor kompleksu TOM	9kDa	<i>S. tuberosum</i> [40]
Tom20	receptor kompleksu TOM	23kDa	<i>S. tuberosum</i> [41]
		23kDa	<i>A. thaliana</i> [42]
		21kDa	<i>A. thaliana</i> [42]
Tom7	czynnik destabilizujący TOM	7.6kDa	<i>S. tuberosum</i> [40]
Tom6	czynnik stabilizujący TOM	nieznany	
Tom5	łącznik kompleksów: Tom22/20/prakursor białka z GIP	nieznany	
nieznany		Tom8	<i>S. tuberosum</i> [40]
nieznany		Tom6	<i>S. tuberosum</i> [40]
Tim44	składnik TIM23 wiążący mtHsp70	nieznany	
Tim23	błonowy składnik TIM23 z domeną receptorową dla peptydu sygnałnego	20kDa	<i>A. thaliana</i> [58]
Tim17	błonowy składnik TIM23	25kDa	<i>A. thaliana</i> [58]
Tim54	błonowy składnik TIM22	nieznany	
Tim22	błonowy składnik TIM22	nieznany	
Tim18	błonowy składnik TIM22	nieznany	
Tim13	składnik kompleksu Tim8/13 — receptora przestrzeni międzybłonowej	gen — [AF144703]	<i>A. thaliana</i>
		gen — [AF144706]	<i>Pinus taeda</i>
Tim12	powierzchniowy składnik TIM22	nieznany	
Tim10	składnik kompleksu Tim9/10 — receptora przestrzeni międzybłonowej	gen — [AF150093]	<i>A. thaliana</i>
		gen — [AF150096]	<i>L. esculentum</i>
Tim9	składnik kompleksu Tim9/10 — receptora przestrzeni międzybłonowej	gen — [AF150111]	<i>A. thaliana</i>
		gen — [AF150113]	<i>Oryza sativa</i>
Tim8	składnik kompleksu Tim8/13 — receptora przestrzeni międzybłonowej	gen — [AF150083]	<i>A. thaliana</i>
		gen — [AF150085]	<i>Brassica rapa</i>

W mitochondriach roślin, pomimo że potwierdzono występowanie mtHsp70, na przykład w: *S. tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris* i *Spinacia oleracea*, nie wykazano dotąd jego udziału w procesie importu prekursorów [59-61, 99]. Stwierdzono jedynie, że w mitochondriach *Spinacia oleracea* i *Phaseolus vulgaris* mtHsp70 jest częściowo związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną [61, 100].

Białko Mge1p, które wykryto w mitochondriach *A. thaliana* i *N. tabacum* nazwano MGE [101, 102]. W mitochondriach *A. thaliana* wykazano również obecność innego białka zaangażowanego w dojrzewanie prekursora, a mianowicie białka DnaJ, które nazwano MDJ [101]. Występowanie białka Hsp60 potwierdzono w mitochondriach kilku gatunków roślin, na przykład: *A. thaliana*, *Zea mays*, *Cucurbita* (cv. *Kurokawa Amakuri*) i *Brassica napus* [103-105], natomiast obecność w mitochondriach białka Hsp10 potwierdzono dla *Hordeum vulgare*, *S. tuberosum* i *A. thaliana* [106-108].

V. Uwagi końcowe

Proces importu białek do mitochondriów nie byłby możliwy bez wyspecjalizowanych kompleksów białkowych umożliwiających wbudowanie białek w błony mitochondrialne lub ich wprowadzenie do przestrzeni międzybłonowej i macierzy mitochondrialnej. Dotychczas wszystkie badania prowadzone nad importem białek mitochondrialnych skupiały się na identyfikacji składników kompleksów zaangażowanych w ten proces. Praktycznie brakuje danych na temat zmienności procesu importu w różnych warunkach fizjologicznych komórki.

W przypadku grzybów uzyskano już znaczną ilość informacji, które spośród białek zarówno zewnętrznej, jak i wewnętrznej błony mitochondrialnej mają „aktywność kanałową”. Takich wiadomości nie ma dotąd odnośnie białek związanych z importem do mitochondriów roślinnych. Cała energia badaczy jest skierowana natomiast na poszukiwanie białkowych składników kompleksów odpowiadających kom-

pleksom znanym w mitochondriach grzybów. Ponieważ w trakcie badań stwierdzono pewne różnice w budowie kompleksów w mitochondriach roślinnych, powstaje pytanie: czy droga importu i zaangażowanie określonych białek w poszczególne etapy tego procesu jest zawsze takie same, i w związku z tym, czy składniki kompleksów spełniają te same funkcje. Wątpliwości te wynikają między innymi z faktu, że transport prekursorowych białek do mitochondriów nie zawsze określa peptyd sygnałowy występujący przy końcu aminowym, czy wewnętrzny sygnał lokalizacji.

Na przykład w prekursorach białek błonowych Tom40 i Tim22 nie znaleziono peptydów sygnałowych na końcu aminowym, a mimo to prekursor tych białek są importowane z udziałem receptora Tom20, który jak wiadomo jest zaangażowany w import białek do macierzy mitochondrialnej [109, 110]. Prekursor białka błony wewnętrznej Tim54, którego koniec aminowy wykazuje podobieństwo do peptydu sygnałowego, jest importowany z udziałem receptora Tom70 rozpoznającego wewnętrzny sygnał lokalizacji [110].

Nie wszystkie prekursorowe białka mitochondrialne wymagają rozpoznania przez receptory kompleksu TOM. Na przykład prekursor białka Tom20 nie wymaga żadnych receptorów do przebiegu procesu importu, podobnie jak małe białka przestrzeni międzybłonowej „tiny” Tim [110, 111]. Okazało się również, że niektóre białka wymagają udziału kilku receptorów. Białko nośnikowe ADP/ATP na przykład wymaga do importu zarówno receptorów Tom20, jak i Tom70 [112].

Artykuł otrzymano 13 maja 2002

Zaakceptowano do druku 4 października 2002

Piśmiennictwo

- Lithgow T (2000) *FEBS Lett* 476: 22-26
- Koehler CM (2000) *FEBS Lett* 476: 27-31
- Paschen SA, Neupert W (2001) *Life* 52: 101-112
- Pfanner N (2000) *Curr Biol* 10 R412-R415
- Leuenberger D, Bally NA, Schatz G, Koehler CM (1999) *EMBO J* 18: 4816-4822
- Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M (1999) *EMBO J* 18: 313-319
- Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K (1998) *EMBO J* 17: 6477-6486
- Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G (1998) *Science* 279: 369-373
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2250-2255
- Hell K, Neupert W, Stuart RA (2001) *EMBO J* 20: 1281-1288
- Kellems RE, Allison VF, Butow RA (1975) *J Cell Biol* 65: 1-14
- Knox C, Sass E, Neupert W, Pines O (1998) *J Biol Chem* 273: 25587-25593
- Kumar AM, Soll D (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10842-10846
- Turner SR, Ireland R, Rawsthorne S (1992) *J Biol Chem* 267: 5355-5360
- Glaser E, Sjöling S, Tanudji M, Whelan J (1998) *Plant Mol Biol* 38: 311-338
- Sjöling S, Glaser E (1998) *Trends Plant Sci* 7: 1-4
- Von Heijne G (1986) *EMBO J* 5: 1335-1342
- Chaumont F, de Castro Silva Filho M, Thomas D, Leterme S, Boutry M (1994) *Plant Mol Biol* 24: 631-641
- Hugosson M, Boman H, Glaser E (1994) *Eur J Biochem* 223: 1027-1033
- Silva-Filho MC, Wieërs MC, Flügge UI, Chaumont F, Boutry M (1997) *J Biol Chem* 272: 15264-15269
- Waegemann K, Soll J (1996) *J Biol Chem* 271: 6545-6554
- Mihara K, Omura T (1996) *Trends Cell Biol* 6: 104-108
- Czuryło EA, (2002) *Post Bioch* 48: 101-110
- Thulasiraman V, Yang CF, Frydman J (1999) *EMBO J* 18: 85-95
- Zhang XP, Glaser E (2002) *Trends Plant Sci* 7: 14-21
- Mooney B, Harmey MA (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 218: 309-313
- Lithgow T, Ryan M, Anderson RL, Hoj PB, Hoo-genraad NJ (1993) *FEBS Lett* 332: 277-281
- Mihara K, Omura T (1996) *Experientia* 52: 1063-1068
- Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K (1994) *EMBO J* 13: 5146-5154
- Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T (1995) *Nature* 376: 705-709
- Voos W, Martin H, Krimmer T, Pfanner N (1999) *Biochim Biophys Acta* 1422: 235-254
- Neupert W (1997) *Annu Rev Biochem* 66: 863-917
- Rassow J, Pfanner N (2000) *Traffic* 1: 457-464
- Schwartz MP, Matouschek A (1999) *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 13086-13090
- Dekker PJ, Ryan MT, Brix J, Muller H, Honlinger A, Pfanner N (1998) *Mol Cell Biol* 18: 6515-6524
- Dekker PJ, Muller H, Rassow J, Pfanner N (1996) *Biol Chem* 377: 535-538
- Dietmeier K, Hönliger A, Bömer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kübrich M, Pfanner N (1997) *Nature* 388: 195-200
- Hönliger A, Bömer U, Alconada A, Eckerskorn C, Lottspeich F, Dietmeier K, Pfanner N (1996) *EMBO J* 15: 2125-2137
- Haucke V, Lithgow T (1997) *J Bioenerg Biomembr* 29: 11-17
- Jänsch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (1998) *J Biol Chem* 273: 17251-17257
- Braun HP, Schmitz UK (1999) *Planta* 209: 267-274
- Werhahn W, Niemeyer A, Jänsch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (2001) *Plant Phys* 125: 943-954
- Macasev D, Newbiggin E, Whelan J, Lithgow T (2000) *Plant Physiol* 123: 811-816
- Perryman RA, Mooney B, Harmey MA (1995) *Arch Biochem Biophys* 316: 659-664
- Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M (1996) *Cell* 87: 33-41
- Dekker PJ, Keil P, Rassow J, Maarse AC, Pfanner N, Meijer M (1993) *FEBS Lett* 330: 66-70
- Ryan KR, Leung RS, Jensen R (1998) *Mol Cell Biol* 18: 178-187
- Ryan KR, Menold MM, Garrett S, Jensen RE (1994) *Mol Biol Cell* 5: 529-538
- Maarse AC, Blom J, Keil P, Pfanner N, Meijer M (1994) *FEBS Lett* 349: 215-221
- Káldi K, Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M (1998) *EMBO J* 17: 1569-1576

51. Blom J, Dekker PJ, Meijer M (1995) *Eur J Bioch* **232**: 309-314
52. Moro F, Sirrenberg C, Schneider HC, Neupert W, Brunner M (1999) *EMBO J* **18**: 3667-3675
53. Bauer MF, Hofmann S, Neupert W, Brunner M (2000) *Trends Cell Biol* **10**: 25-31
54. Rassow J, Maarse AC, Krainer E, Kubrich M, Muller H, Meijer M, Craig EA, Pfanner N (1994) *J Cell Biol* **127**: 1547-1556
55. Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, Neupert W (1994) *Nature* **371**: 768-774
56. Schneider HC, Westermann B, Neupert W, Brunner M (1996) *EMBO J* **15**: 5796-5803
57. Laloraya S, Dekker PJ, Voos W, Craig EA, Pfanner N (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 7098-7105
58. Bömer U, Rassow J, Zufall N, Pfanner N, Meijer M, Maarse AC (1996) *J Mol Biol* **262**: 389-395
59. Watts FZ, Walters AJ, Moore AL (1992) *Plant Mol Biol* **18**: 23-32
60. Neuman D, Emmermann M, Thierfelder JM, Zur Nieden U, Clericus M, Braun H-P, Nover L, Schmitz UK (1993) *Planta* **190**: 32-43
61. Vidal V, Ranty B, Dillenschneider M, Charpentreau M, Ranjeva R (1993) *Plant J* **3**: 143-150
62. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2141-2146
63. Koehler CM, Murphy MP, Bally NA, Leuenberger D, Oppliger W, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Or E (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 1187-1193
64. Kerscher O, Sepuri NB, Jensen RE (2000) *Mol Biol Cell* **11**: 103-116
65. Kerscher O, Holder J, Srinivasan M, Leung RS, Jensen RE (1997) *J Cell Biol* **139**: 1663-1675
66. Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M (1996) *Nature* **384**: 582-585
67. Hamel P, Sakamoto W, Wintz H, Dujardin G (1997) *Plant J* **12**: 1319-1327
68. Nargang FE, Preuss M, Neupert W, Herrmann JM (2002) *J Biol Chem* **277**: 12846-12853
69. Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slominski PP, Dujardin G (1994) *J Mol Biol* **239**: 201-212
70. Sundberg E, Slagter JG, Fridborg I, Cleary SP, Robinson C, Coupland G (1997) *Plant Cell* **9**: 717-730
71. Liu M, Spremulli L (2000) *J Biol Chem* **275**: 29400-29406
72. Saint-Georges Y, Hamel P, Lemaire C, Dujardin G (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13814-13819
73. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) *Biochim Biophys Acta* **988**: 1-45
74. Whelan J, O'Mahony P, Harmey MA (1990) *Arch Biochem Biophys* **279**: 281-285
75. Whelan J, Knorpp C, Harmey MA, Glaser E (1991) *Plant Mol Biol* **16**: 283-292
76. Anastasi A, Knight CG, Barrett AJ (1993) *Biochem J* **290**: 601-607
77. Becker AB, Roth RA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3835-3839
78. Whelan J, Glaser E (1997) *Plant Mol Biol* **33**: 771-789
79. Ito A (1999) *Biochem Biophys Res Comm* **265**: 611-616
80. Braun HP, Emmermann M, Krufft V, Schmitz UK (1992) *EMBO J* **11**: 3219-3227
81. Eriksson AC, Sjöling S, Glaser E (1994) *Biochim Biophys Acta* **1186**: 221-231
82. Braun HP, Emmermann M, Krufft V, Bödicker M, Schmitz UK (1995) *Planta* **195**: 396-402
83. Eriksson AC, Glaser E (1992) *Biochim Biophys Acta* **1140**: 208-214
84. Eriksson AC, Sjöling S, Glaser E (1996) *J Bioenerg Biomem* **28**: 283-290
85. Szigyarto C, Dessi P, Smith MK, Knorpp C, Harmey MA, Day DA, Glaser E, Whelan J (1998) *Plant Mol Biol* **36**: 171-181
86. Ou W-J, Ito A, Okazaki H, Omura T (1989) *J Biochem* **103**: 589-595
87. Yang M, Jensen RE, Yaffe MP, Oppliger W, Schatz G (1988) *EMBO J* **7**: 3857-3862
88. Schneider A, Behrens M, Scherer P, Pratje E, Michaelis G, Schatz G (1991) *EMBO J* **10**: 247-254
89. Schneider A, Oppliger W, Jenö P (1994) *J Biol Chem* **269**: 8635-8638
90. Nunnari J, Fox TD, Walter P (1993) *Science* **262**: 1997-2004
91. Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, Pratje E (1994) *Mol Gen Genet* **245**: 272-278
92. Branda SS, Isaya G (1995) *J Biol Chem* **270**: 27366-27373
93. Kalousek F, Isaya G, Rosenberg LE (1992) *EMBO J* **11**: 2803-2809
94. Kronidou NG, Oppliger W, Bolliger L, Hannavy K, Glick BS, Schatz G, Horst M (1994) *Proc Nat Acad Sci USA* **91**: 12818-12822
95. Hartl FU (1996) *Nature* **381**: 571-579
96. Bukau B, Horwich AL (1998) *Cell* **92**: 351-366
97. Martin J (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**: 35-43
98. Pfanner N, Craig EA, Hönlinger A (1997) *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 25-51
99. Guy CL, Li QB (1998) *Plant Cell* **10**: 539-556
100. von Stedingk E, Glaser E (1995) *Biochem Mol Biol Int* **35**: 1307-1314
101. Kroczyńska B, Zhou R, Wood C, Miernyk JA (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 619-629
102. Padidam M, Reddy VS, Beachy RN, Fauquet CM (1999) *Plant Mol Biol* **39**: 871-881
103. Prasad TK, Stewart CR (1992) *Plant Mol Biol* **18**: 873-885
104. Tsugeki R, Mori H, Nishimura M (1992) *Eur J Biochem* **209**: 453-458
105. Cole KP, Blakeley SD, Dennis DT (1994) *Plant Physiol* **105**: 451
106. Hartman DJ, Dougan D, Hoogenraad NJ, Hoj PB (1992) *FEBS Lett* **305**: 147-150
107. Burt WJ, Leaver CJ (1994) *FEBS Lett* **339**: 139-141
108. Koumoto Y, Tsugeki R, Shimara T, Mori H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M (1996) *Plant J* **10**: 1119-1125
109. Rapaport D, Neupert W (1999) *J Cell Biol* **146**: 321-331
110. Kurz M, Martin H, Rassow J, Pfanner N, Ryan MT (1999) *Mol Biol Cell* **10**: 2461-2474
111. Schneider H, Söllner T, Dietmeier K, Ecker-skorn C, Lottspeich F, Trülsch B, Neupert W, Pfanner N (1991) *Science* **254**: 1659-1662
112. Steger HF, Söllner T, Kiebler M, Dietmeier KA, Pfaller R, Trülsch KS, Tropschug M, Neupert W, Pfanner N (1990) *J Cell Biol* **111**: 2353-2363

Nadrodzina lipoksygenaz — struktura i funkcje w metabolizmie

The lipoxygenase superfamily — structure and functions in metabolism

BARBARA DOŁĘGOWSKA¹, DARIUSZ CHLUBEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa i narządowa
- III. Struktura enzymu
- IV. Funkcje katalityczne lipoksygenaz
- V. Rola lipoksygenaz
 - V-1. Tworzenie biologicznych mediatorów i cząsteczek sygnałowych
 - V-2. Modyfikacja struktury błon (reakcje peroksydacji)
 - V-3. Mobilizacja metabolizmu lipidowego

Contents:

- I. Introduction
- II. Intracellular and tissue localization
- III. Structure of enzyme
- IV. Catalytic function of lipoxygenases
- V. Role of lipoxygenases
 - V-1. Formation of biological mediators and signaling molecules
 - V-2. Modification of membrane structure (peroxidation reactions)
 - V-3. Mobilization of lipid metabolism

Wykaz stosowanych skrótów: AA — kwas arachidonowy; BMMC — komórki tuczne pochodzenia szpikowego (ang. *bone marrow-derived mast cells*); DAMI — znacznik megakariocyto-
wy; EDTA — wersenian; FLAP — białko aktywujące 5-lipoksy-
genazę (ang. *5-lipoxygenase activating protein*); GC-MS —
chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową;
HEL — ludzka erytroleukemia (ang. *human erythroleukemia*);
HETE — kwas hydroksyeikozatetraenowy; HODE — kwas hy-
droksyoktadecadienowy; HPETE — kwas hydroperoksyekoza-
tetraenowy; ETE — kwas eikozatetraenowy; L-1 — izoenzym 1
lipoksygenazy sojowej; LDL — lipoproteiny o małej gęstości
(ang. *low density lipoprotein*); 3LL — rak płuca typu Lewisa;
LOX — lipoksygenazy (P — płytkowa; L — leukocyta; e —
epidermalna); LT — leukotrieny; PAF — czynnik aktywujący
płytki (ang. *platelet-activating factor*); PG — prostaglandyny;
PUFA — wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsat-
urated fatty acid*); PMN — granulocyty obojętnościenne (ang.
polymorphonuclear leukocyte); RBL — białaczka eozynofilowa
u szczurów (ang. *rats basophilic leukemia*); TX — tromboksan;

I. Wstęp

Lipoksygenazy są niehemowymi dioksygenazami (EC 1.13.11) wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Ich substraty zawierają układ (1Z, 4Z)-pentadienowy, który jest utleniany do (1S)-hydroperoksy-(2E, 4Z)-pentadienu przez lipoksygenazy roślinne i ssaków oraz do (1R)-hydroperoksy-(2E, 4Z)-pentadienu przez lipoksygenazy morskich bezkręgowców [1, 2]. Wszystkie znane lipoksygenazy pochodzą z tej samej rodziny genowej. Do tej pory wyizolowano cDNA i zbadano sekwencje około 40 lipoksygenaz roślin i ssaków [1, 3, 4].

Fizjologicznym substratem lipoksygenaz ssaków jest kwas arachidonowy, podczas gdy lipoksygenazy roślinne utleniają głównie kwas linolowy lub linolenowy [1, 3, 5]. Hydronadtlenki tych kwasów tłuszczowych są następnie metabolizowane do wielu produktów o zróżnicowanej aktywności biologicznej np. leukotrienów u zwierząt, czy czynników regulujących wzrost u roślin — aldehydu i kwasu jasmonowego [3, 4]. Lipoksygenazy, dzięki swojej zdolności do katalizowania peroksydacji lipidów, mogą stać się również przyczyną zmian metabolicznych lub strukturalnych w komórkach.

¹Dr n. med., ²prof.nadzw., Zakład Biochemii i Chemii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel. (091) 466-1515, tel/fax. (091) 466 1516, e-mail: basiad@sci.pam.szczecin.pl

Lipoksygenazy stanowią dużą, heterogenną nadrodzinę enzymów utleniających wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA). Podstawą podziału na rodziny jest atom węgla, przy którym enzym wbudowuje tlen cząsteczkowy do łańcucha kwasu tłuszczowego, będącego dla niego substratem. Lipoksygenazy ssaków zostały podzielone na cztery rodziny: 5-lipoksygenazy (5-LOX), 8-lipoksygenazy (8-LOX), 12-lipoksygenazy (12-LOX) i 15-lipoksygenazy (15-LOX) [6, 7].

W rodzinie 12-lipoksygenaz wyróżniamy z kolei 3 typy: płytkowy (P-12LOX); leukocytarny (L-12LOX) i epidermalny (e12-LOX). Nazwy typów 12-LOX pochodzą od nazw komórek, z których enzymy te zostały po raz pierwszy wyizolowane [3, 8, 9]. Poszczególne typy 12-LOX, odpowiadają izoformom tego enzymu. Różnią się one nie tylko miejscem ekspresji tkankowej, ale także aktywnością ka-

talityczną, immunoreaktywnością i funkcjami biologicznymi [8].

Podział 12-LOX na typy — płytkowy, leukocytarny i epidermalny jakkolwiek praktyczny, nie jest precyzyjny, ponieważ typ płytkowy enzymu jest znajdowany także w innych komórkach niż płytki, na przykład w ludzkiej i mysiej skórze [3, 10, 11], natomiast nie jest obecny w płytkach świni (Tabela 1) [9]. Typ leukocytarny enzymu nie jest natomiast obecny w leukocytach ludzi czy królików. Z kolei typ leukocytarny L-12LOX z leukocytów świni wykazuje aż 65% homologii z ludzkim enzymem płytkowym P-12LOX [6].

Niektóre lipoksygenazy mogą wbudowywać tlen w dwóch różnych miejscach łańcucha kwasu tłuszczowego. Efektem ich działania jest mieszanina dwóch rodzajów produktów. Na przykład 15-LOX ssaków katalizuje reakcję oksydacji kwasu arachi-

Tabela 1

Lokalizacja komórkowa i narządowa niektórych lipoksygenaz ssaków (wg [3] – uzupełniona)

Lipoksygenaza	Tkanka	Linia komórkowa	Piśmiennictwo
5-LOX	granulocyty obojętnochłonne (PMN), eozynofile, monocyty, makrofagi, limfocyty, komórki tuczne	komórki białaczki bazofilowej u szczurów (RBL)	[3, 22, 92]
P-12LOX	płytki krwi, skóra (m.in. ludzka i mysia), keratynocyty naskórkowe, makrofagi płuc i śledziona, szyszynka, aorta, nadnercza (warstwa kłębuszkowata kory), rdzeń kręgowy, komórki α trzustki u szczurów	komórki HEL, komórki nowotworowe (np. komórki raka płuc Lewisa 3LL, melanoma B16a, komórki raka naskórka A431, komórki ze znacznikami magakariocytowymi HEL i DAM1)	[3, 23, 30-38]
L-12LOX	leukocyty* (m.in. szczura, świni, krowy), makrofagi otrzewnej, komórki nabłonka, śródbłonek, komórki mięśni gładkich naczyń, szyszynka, mózg, komórki mięśnia sercowego		[3, 23, 25, 26, 93]
e12LOX	różnicujące się keratynocyty, mieszki włosowe		[3, 10, 94]
15-LOX-1	retikulocyty, eozynofile, nabłonek dróg oddechowych, makrofagi pęcherzykowe, komórki piankowate	komórki nowotworowe (np. komórki raka okrężnicy, raka sutka, raka prostaty)	[2, 3, 70]
15-LOX-2	mieszki włosowe		[2, 3]
12(R)-LOX	skóra ssaków, transformowane limfocyty B, nabłonki		[13, 48, 82]
8-LOX	skóra myszy		[8]
12/15-LOX	makrofagi, monocyty		[85-87]

* L-12LOX nie występuje w leukocytach u ludzi oraz u królików

donowego przy 12 i 15 atomie węgla — powstaje mieszanina produktów: 15-HPETE i 12-HPETE. Ponieważ jednak produktem dominującym jest 15-HPETE (85-90%), więc enzym ten nazwano 15-LOX. Leukocytarna L-12LOX może wbudowywać tlen zarówno przy 12 jak i przy 15 atomie węgla, jednakże dominującym produktem w przypadku tego enzymu jest 12-HPETE [3, 9]. 12-lipoksygenazę typu epidermalnego (e-12LOX) z komórek naskórka myszy charakteryzuje także podwójna specyficzność substratowa, 12/15-lipoksygenazowa (stosunek wytworzonych produktów 12-HETE/15-HETE wynosi około 6:1) [8].

Leukocytarna L-12LOX i 15-LOX-1 wykazują duże podobieństwo strukturalne i czynnościowe. Często określa się je wspólną nazwą: 12/15-lipoksygenaza (12/15-LOX), szczególnie wówczas, gdy produkują takie same ilości obydwu produktów: 12-HPETE oraz 15-HPETE. Jako przykład mogą posłużyć lipoksygenazy komórek wykazujących zdolność do fagocytozy, na przykład makrofagów [2, 12].

II. Lokalizacja narządowa i wewnątrzkomórkowa

Lipoksygenazy są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i zwierząt [3, 4, 9, 13]. Typowi przedstawiciele *Prokaryota* nie posiadają lipoksygenaz. Brakuje obecnie niepodważalnych dowodów na istnienie tych enzymów u owadów, chociaż u ich prymitywnych przedstawicieli, owadów *Thermobia domestica*, stwierdzono obecność pochodnej kwasu arachidonowego — kwasu hydroksyeikozatetraenowego (HETE) [2]. Jednokomórkowa *Chlorella* posiada lipoksygenazę, natomiast w cDNA u *Dictyostelium discoideum* stwierdzono jedynie częściową sekwencję odpowiadającą temu enzymowi. Wyższe rośliny zawierają wiele lipoksygenaz — u soi (*Glycine max*) zidentyfikowano ich do tej pory osiem. U myszy stwierdzono obecność siedmiu genów, odpowiadających białkom lipoksygenaz. Pięć homologicznych genów zostało opisanych u ludzi [14, 15].

Lipoksygenazy u ssaków były początkowo znajdowane w różnych liniach komórkowych komórek szpiku kostnego [3]. Leukocytarna 5-lipoksygenaza, płytkowa 12-lipoksygenaza, retikulocytarna i eozynofilowa 15-lipoksygenaza zostały odkryte około 25 lat temu [3, 10].

Zawartość lipoksygenaz w różnych tkankach roślinnych i zwierzęcych jest zróżnicowana. Stanowią one na przykład kilka procent białka nasion soi. W retikulocytach królika podczas anemii 15-LOX jest, obok hemoglobiny, głównym białkiem komórko-

wym [2]. Natomiast izoenzymy lipoksygenaz obecne w liściach soi, czy w skórze ssaków charakteryzują się znacznie słabszą ekspresją i występują w dużo mniejszych ilościach [16].

Początkowo 5-LOX została zidentyfikowana jako rozpuszczalne białko cytozolowe granulocytów obojętnochłonnych (PMN), a następnie stwierdzono jej obecność w otoczce jądrowej oraz we frakcji jądrowej homogenatów komórek stymulowanych jonoforem (PMN i makrofagów).

W błonie jądrowej tych komórek występuje białko aktywujące 5-LOX (FLAP) o masie cząsteczkowej 18 kD, ułatwiające przenoszenie kwasu arachidonowego do 5-LOX, umożliwiając tym samym zapoczątkowanie reakcji syntezy 5-HPETE, a następnie dalszych pochodnych kwasu arachidonowego, między innymi 5-HETE, czy leukotrienu A₄ [3, 17].

Rozmieszczenie 5-LOX oraz jej translokacja, są uzależnione od typu komórki [17, 18]. Można założyć przynajmniej trzy modele rozmieszczenia i translokacji 5-LOX:

1) w ludzkich spoczynkowych PMN 5-LOX występuje w cytozolu i przemieszcza się do otoczki jądrowej w wyniku stymulacji jonoforem A23187. 5-LOX przemieszcza się do określonych miejsc w otoczce jądrowej bezpośrednio, lub oddziałuje z cytoszkieletem co prawdopodobnie ułatwia jej translokację [3]. Niektórzy autorzy sugerują, że kinaza tyrozynowa, poprzez fosforylację 5-LOX w komórkach PMN, może wpływać zarówno na jej translokację, jak i na właściwości katalityczne [3, 19].

2) w makrofagach 5-LOX znajduje się w cytozolu oraz w przedziale jądrowym. Obecnie są dowody *in vivo* jądrowej lokalizacji 5-LOX w makrofagach pęcherzykowych uzyskanych od pacjentów z idiopatycznym zwłóknieniem płuc [20]. Podczas stymulacji makrofagów jonoforem A23187 nie stwierdzono przemieszczania się enzymu cytozoluowego. Natomiast izoenzym jądrowy, występujący pierwotnie w euchromatynowym regionie jądra, przemieszcza się do otoczki jądrowej [21].

3) w komórkach białaczki bazofilowej u szczurów (RBL) 5-LOX także znajduje się w cytozolu oraz w jądrze komórkowym. Po stymulacji jonoforem A23187 obydwie izoenzymy przemieszczają się w kierunku otoczki jądrowej [3]. Komórki tuczne pochodzące ze szpiku kostnego myszy (BMBC), fenotypowo podobne do komórek RBL, zawierają 5-LOX jedynie wewnątrz jądra. W zależności od rodzaju bodźca pobudzającego te komórki rozmieszczenie enzymu w jądrze jest różne. Stymulacja tych komórek jonoforem powoduje powstanie modelu punktowego rozmieszczenia 5-LOX w jądrze, w przeci-

wieństwie do modelu okołojądrowego powstającego podczas pobudzenia tych komórek kompleksem IgE/antygen [22].

Enzymy L-12LOX i 15-LOX występują w cytoplazmie różnych typów komórek. Z jednym wyjątkiem: L-12LOX w komórkach nabłonka oddechowego owcy znajdująca jest w mikrosomach i jej aktywność regulowana jest na drodze reakcji utleniania i redukcji [3]. Typ leukocytny 12-LOX (L-12LOX) w największych ilościach występuje w leukocytach świni i mysich makrofagach otrzewnowych [23]. Ekspresja L-12LOX została także stwierdzona w innych komórkach, takich jak komórki mięśni gładkich, czy komórki śródbłonka [24, 25].

15-LOX-1 jest obecna w retikulocytach, eozynofiliach, makrofagach pęcherzykowych, komórkach piankowatych oraz w komórkach nabłonka dróg oddechowych [10]. Natomiast 15-LOX-2 została wyizolowana z mieszków włosowych [2].

W komórkach naskórka oraz w mieszkach włosowych została odkryta lipoksygenaza epidermalna (e12-LOX), katalizująca reakcję 12S-lipoksygenacji [8, 26]. O przypadkach wysokich stężeń 12-HETE w próbkach skóry pobranych od pacjentów z łuszczycą donosili Hammarstrom i wsp. już w 1975 roku [10]. Niedawno w komórkach nabłonkowych ssaków odkryto „nową” lipoksygenazę. Posiada ona cechy 12(R)-lipoksygenazy czyli enzymu katalizującego syntezę związków o konfiguracji R, będących stereozomerami produktów 12(S)-lipoksygenazy posiadających konfigurację S [27]. Z komórek skóry myszy obok e-12LOX wyizolowano także 8-LOX [8, 28, 29].

P-12LOX jest obecna w płytkach krwi, keratynocytach naskórka, makrofagach płuc i śledziony, a także w szyszynce, warstwie kłębkowatej kory nadnerczy, aorticie, rdzeniu kręgowym i komórkach α trzustki szczurów [23]. Dużą aktywność P-12LOX stwierdza się także w komórkach niektórych nowotworów, m. in. raka naskórka A431, białaczki megakarioblastycznej ze znacznikami megakariocytowymi (HEL, DAMI), raka prostaty, sutka, jelita grubego i płuc [30-37]. W komórkach naskórka i komórkach białczkowych ze znacznikami HEL i DAMI enzym znajduje się w cytozolu i w obrębie błon komórkowych. W komórkach raka A431 P-12LOX jest znajdująca głównie we frakcji mikrosomalnej [3, 23]. W płytkach krwi szczurów jony Ca^{2+} i trombina powodują przemieszczenie P-12LOX do błon [3]. Podobną Ca^{2+} -zależną redystrybucję białka P-12LOX zaobserwowano w komórkach białczkowych ze znacznikiem HEL i w komórkach raka płuc (3LL) [3, 38]. W komórkach z HEL enzym związany z błonami

jest bardziej aktywny od enzymu cytozolowego, podczas gdy odwrotne relacje mają miejsce w komórkach raka 3LL.

III. Struktura enzymu

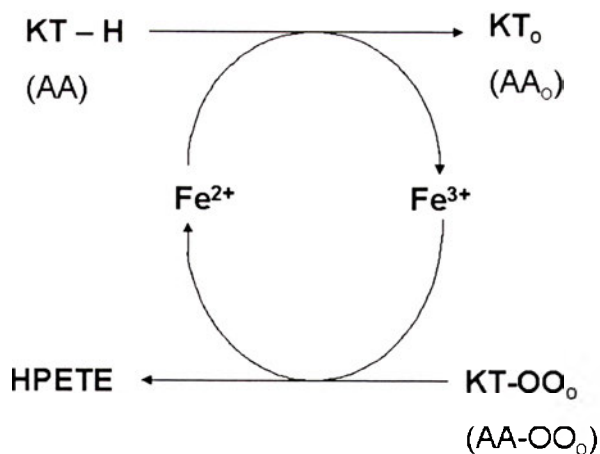
Białka lipoksygenaz zbudowane są z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych o masie cząsteczkowej wynoszącej około 75-80 kDa u zwierząt, oraz około 94-104 kDa u roślin.

N-końcowa domena izoenzymu 1 lipoksygenazy sojowej (L-1) o strukturze β -beczułki jest złożona ze 146 reszt aminokwasowych. Globularna domena katalityczna zbudowana jest z 693 reszt aminokwasów i składają się na nią 23 α -helisy i 2 przeciwrównoległe β -harmonijki [37]. C-końcowa domena katalityczna lipoksygenaz ssaków jest zbudowana analogicznie jak w przypadku enzymów roślinnych. W ich cząsteczce brakuje jednak krótkiego fragmentu N-końcowej domeny występującego u roślin.

Katalityczne centrum lipoksygenaz zawiera jon żelaza niehemowego, które jak wynika z analizy sekwencyjnej i krystalograficznej, jest wiązane przez trzy stałe reszty histydynowe, grupę karboksylową C-końcowej izoleucyny łańcucha polipeptydowego, cząsteczkę wody (jedynie w modelach struktur krystalicznych, w rzeczywistości jest to ligand wolny dla oddziaływań z substratem) i zmienny szósty ligand, którym w enzymach roślinnych jest reszta asparaginy, a u ssaków reszta histydyny, asparaginy lub seryny [1, 39-42]. Arachidonianowa 8(R)-lipoksygenaza *P.homomalla* posiada, podobnie jak S-lipoksygenazy, stałe reszty histydyny i asparaginy, ale C-końcowym aminokwasem zamiast izoleucyny jest treonina [2]. Dotychczas poznano dokładnie struktury krystaliczne lipoksygenaz: sojowej L-1 [2, 40, 43], sojowej L-3 [44] i króliczej retikulocytniej 15-LOX [40, 43].

Nie wiadomo dotąd, w jaki sposób substrat łączy się z centrum aktywnym lipoksygenaz [43]. Domena katalityczna sojowej lipoksygenazy L-1 posiada dwie hydrofobowe jamy prowadzące do ukrytego w centrum aktywnym jonu żelaza [45]. Żelazo w enzymach nieaktywnych występuje na +2 stopniu utlenienia (forma żelazawa enzymu). Dla ujawnienia się aktywności katalitycznej lipoksygenazy niezbędne jest utlenienie żelaza (Rys. 1). Powoduje to wystąpienie tak zwanej fazy opóźnienia, która poprzedza właściwą reakcję lipoksygenazową [45].

Swoistość enzymu nie jest ściśle związana z sekwencją aminokwasów białka enzymatycznego. Na przykład struktura pierwszorzędowa enzymu sojowego L-1 (15-lipoksygenaza) jest identyczna jedynie



Ryc. 1. Ogólny schemat procesu lipoksygenacji (wg [2] — zmodyfikowany). Kwas tłuszczowy: KT-H (kwas arachidonowy AA) ulega przekształceniu do rodników: $KT\cdot$ ($AA\cdot$) oraz $KT-OO\cdot$ ($AA-OO\cdot$), a następnie do kwasu hydroperoksyekozatetraenowego: HPETE. Proces ten jest sprzężony z utlenieniem Fe^{2+} do Fe^{3+} , niezbędnym dla ujawnienia aktywności katalitycznej lipoksygenazy. Jon żelaza znajduje się w centrum aktywnym enzymu.

w 25% z 15-lipoksygenazami ssaków. Dwie ludzkie 15-lipoksygenazy są identyczne tylko w 35%. Struktura pierwszorzędowa mysiej epidermalnej lipoksygenazy 2 (eLOX-2) wykazuje 50, 8% identyczności z ludzką 15-LOX-2, około 40% z 5-LOX oraz około 35% z 12/15-LOX [14]. Natomiast lipoksygenazy katalizujące wbudowywanie atomu tlenu w sąsiedztwie różnych atomów węgla, tworzące odmienne grupy enzymów, mają w obrębie danego gatunku sekwencję identyczną w 70-95% [3].

IV. Funkcje katalityczne lipoksygenaz

W zależności od pozycji tlenu cząsteczkowego wbudowywanego do łańcucha kwasu arachidonowe-

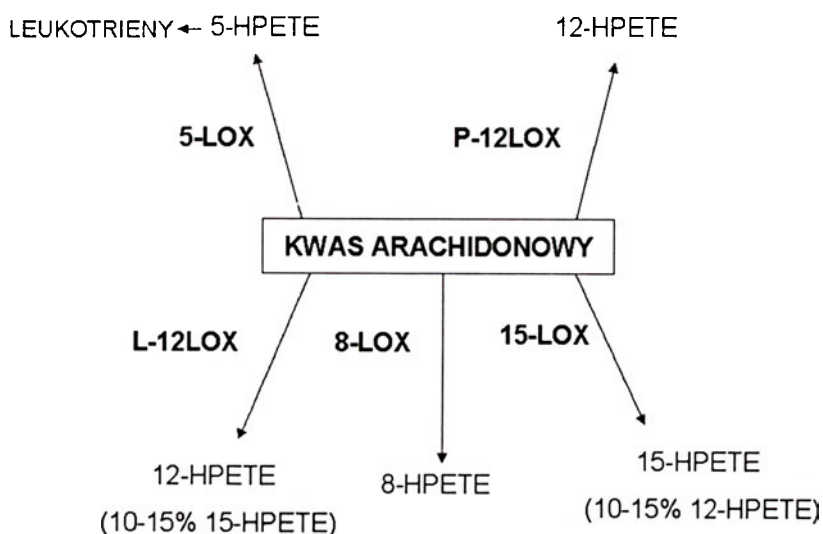
go, lipoksygenazy ssaków zostały sklasyfikowane jako 5-, 8-, 12- i 15-lipoksygenazy (Rys. 2). „Odliczając” one atomy węgla w łańcuchu substratu poczynając od końca metylowego i wbudowują obydwie reagujące atomy tlenu w pozycji $\omega-6$ [3].

Produktami reakcji katalizowanej przez lipoksygenazy ssaków są kwasy 5-, 8-, 12- i 15-hydroperoksyekozatetraenowe (HPETE), które są następnie zredukowane do odpowiednich kwasów hydroksyekozatetraenowych (HETE). Zarówno HPETE jak i HETE mogą być metabolizowane w kierunku kolejnych pochodnych kwasu arachidonowego: leukotrienów, lipoksyn i hepoksylin [8]. Rodzaj powstających eikozanoidów, pochodnych AA, zależy od enzymów jakimi dysponuje komórka, a to z kolei wynika z funkcji jaką ona pełni w warunkach fizjologicznych lub patologicznych.

Lipoksygenazy wbudowują atom tlenu w cząsteczkę substratu z dużą stereospecyficznością — HETE produkowane przy ich udziale mają głównie konfigurację S [46]. Ostatnio, ze skóry ssaków udało się jednak wyizolować 12(R)-lipoksygenazę. W wyniku jej działania powstają enancjomery 12(R)-HPETE [27, 46-48].

12-LOX katalizują stereospecyficzne utlenianie kwasu arachidonowego (AA) do kwasu 12(S)-hydroperoksy-5, 8, 10, 14-eikozatetraenowego (12-HPETE) [49]. 12-HPETE jest następnie przekształcany do 12(S)-hydroksyekozatetraenowego (12-HETE) lub do hepoksylin [23, 50].

12(S)-lipoksygenaza typu leukocytarnego (L-12LOX), katalizuje przekształcenie kwasu arachidonowego głównie do kwasu 12-hydroksyekozatetraenowego (12-HETE), w mniejszym stopniu do kwasów 15- i 8-hydroksyekozatetraenowego (15- i



Ryc. 2. Ogólny schemat przemian kwasu arachidonowego w tkankach ssaków pod wpływem lipoksygenaz (wg [3] zmieniony). W zależności od pozycji tlenu wbudowywanego do kwasu arachidonowego lipoksygenazy zostały sklasyfikowane jako: 5-lipoksygenaza (5-LOX), 8-lipoksygenaza (8-LOX), płytkowa 12-lipoksygenaza (P-12-LOX), leukocytarna 12-lipoksygenaza (L-12-LOX) i 15-lipoksygenaza (15-LOX). Produktami reakcji katalizowanej przez poszczególne lipoksygenazy są kwasy: 5-hydroperoksyekozatetraenowy (5-HPETE), 8-hydroperoksyekozatetraenowy (8-HPETE), 12-hydroperoksyekozatetraenowy (12-HPETE) i 15-hydroperoksyekozatetraenowy (15-HPETE). Typ leukocytarny 12-lipoksygenazy (L-12LOX) obok głównego produktu jakim jest 12-HPETE, katalizuje także syntezę 10-15% 15-HPETE. 15-lipoksygenaza obok 15-HPETE katalizuje także syntezę 10-15% 12-HPETE.

8-HETE), natomiast kwasu linolowego — do kwasów 13- i 9-hydroksyoktadekadienowego (13- i 9-HODE). 12-lipoksygenaza typu płytkowego (P-12LOX) utlenia kwas arachidonowy do 12- i 8-HETE, a kwas linolowy do 13- i 9- HODE. 12(S)-lipoksygenaza typu naskórkowego (e12-LOX) katalizuje reakcję monospecyficzną z kwasem arachidonowym, ale kwas linolowy utlenia z kolei do 13- i 9-HODE, przy czym są to prawie wyłącznie S-enancjomery [3, 46].

8-HETE, uboczny produkt 12(S)-lipoksygenazy typu płytkowego, jest R enancjomerem. Natomiast S enancjomer 8-HETE jest ubocznym produktem typu leukocytarnego 12(S)-LOX. 9-HODE jest R-enancjomerem w reakcji katalizowanej przez lipoksygenazę typu płytkowego i naskórkowego, natomiast S-enancjomerem w reakcji katalizowanej przez enzym typu leukocytarnego.

Stereochemia produktów 12-lipoksygenaz typu płytkowego i naskórkowego wynika z przestrzennego ułożenia substratu w miejscu wiążącym obu enzymów. Produkty reakcji enzymu typu leukocytarnego 12-LOX świadczą o odwrotnej orientacji przestrzennej lub izomeryzacji rotacyjnej wokół długiej osi substratu [46].

Obecnie wiadomo, że R-lipoksygenazy tworzące produkty będące lustrzanym odbiciem produktów o konfiguracji S, są także szeroko rozpowszechnione. Znajdowane są wśród bezkręgowców wodnych i roślin, a ostatnio stwierdzono ich występowanie u ludzi [2, 27]. Sekwencje aminokwasowe R-lipoksygenaz oraz rozmieszczenie stałych ligandów żelaza są identyczne jak w S-lipoksygenazach roślinnych i zwierzęcych [49]. Dotychczas nie wyjaśniono jakie czynniki odpowiadają za stereospecyficzność R-lipoksygenaz.

Izoenzym sojowej lipoksygenazy L-1 jest 15-lipoksygenazą, która podczas pierwszej reakcji oksygenacji, katalizuje powstanie z kwasu arachidonowego jedynie 15(S)-HPETE, w przeciwieństwie do innych izoenzymów sojowych czy 15-lipoksygenazy typu retikulocytarnego ssaków. Jednak sojowa L-1 może także katalizować specyficzną 5S i 8S oksygenację. Początkowy produkt - 15-HPETE, jest przez nią oksygenowany do specyficznych, podwójnie utlenionych produktów: 5S, 15S-di-HPETE oraz 8S, 15S-di-HPETE. Reakcja ta zachodzi jednak ze znacznie mniejszą prędkością [2]. Ten sam enzym, przypuszczalnie w tym samym miejscu aktywnym, zdolny jest zatem do katalizowania stereospecyficznej reakcji: 15S-, 5S- i 8S- lipoksygenazowej.

Ludzka retikulocytarna 15-LOX (15-LOX-1) i jej zwierzęce odpowiedniki tworzą mieszaninę produk-

tów 12-HPETE i 15-HPETE. Prawdopodobnie kluczową rolę w kontroli kolejnych reakcji oksygenacji pełni usytuowanie substratu w centrum aktywnym enzymu.

Płytkowa P-12LOX różni się od leukocytarniej L-12LOX specyficznością substratową. Typ płytkowy 12-LOX zużywa do syntezy 12(S)-HPETE prawie wyłącznie kwas arachidonowy (AA) uwalniany z puli glicerofosfolipidów błonowych. Natomiast typ leukocytarny 12-LOX posiada szeroką specyficzność substratową reagując z 18 i 22-węglowymi, nienasyconymi kwasami tłuszczowymi tak samo wydajnie jak z AA [2].

Kwasy arachidonowy i linolowy mają wartości pK_a pomiędzy 7 i 8 [51], a zatem w fizjologicznym pH są one zaledwie częściowo zjonizowane i całkowicie nierozpuszczalne w wodzie. W tych warunkach, wolne kwasy tłuszczowe uwalniane przez lipazę mają niewielką tendencję do opuszczania błony, chyba, że w połączeniu z nośnikiem. Kwasy tłuszczowe w błonach mają swoje łańcuchy węglowodorowe zwrócone w kierunku hydrofobowej dwuwarstwy, a ich bardziej polarna grupa karboksylowa (zjonizowana lub nie zjonizowana) skierowana jest w kierunku środowiska wodnego lub łączy się wiązaniem estrowym z fosfolipidami.

W badaniach nad wykorzystaniem substratów przez lipoksygenazy stwierdzono, że izoenzymy sojowe L-1 i L-2 nie metabolizują wolnych kwasów tłuszczowych zmieszanych z fragmentami błon biologicznych. Z kolei enzym L-2 (ale nie L-1) utlenia kwasy tłuszczowe estrów błonowych [2]. Natomiast aktywność 15-LOX ssaków w stosunku do wolnych kwasów tłuszczowych jest większa w obecności fragmentów błon [52]. Enzym ten metabolizuje także substraty zestyfikowane [2]. Lipoksygenazy e-12(S)-LOX i 12(R)-LOX wykazują słabą aktywność w stosunku do wolnego kwasu arachidonowego oraz linolowego — znacznie lepiej metabolizują te kwasy w postaci zestyfikowanej [29].

Większość lipoksygenaz znajduje się w cytoplazmie. Wymagają więc dostępu do substratu ułożonego w hydrofobowym środowisku błony. Prawdopodobnie istotną rolę w pozyskaniu i wiązaniu substratu odgrywa stała β -beczułkowata domena lipoksygenaz [43].

Jedynie w przypadku 5-LOX dokładnie poznano procesy poprzedzające właściwą reakcję utleniania AA. 5-LOX znajduje się głównie w cytoplazmie niepobudzonych neutrofilów (PMN), a także w jądrze makrofagów [48]. Pobudzenie tych komórek prowadzi do przemieszczenia 5-LOX w kierunku błony jądrowej i jej połączenia z FLAP (białkiem akty-

wującym 5-lipoksygenazę). FLAP odgrywa jednocześnie rolę białka przenoszącego kwas arachidonowy oraz eksponującego substrat 5-lipoksygenazie na błonie jądrowej leukocyta [2]. Białko to jest homologiczne z syntazą leukotrienu C₄ i mikrosomalną transferazą glutationu, chociaż samo nie posiada aktywności enzymatycznej [3, 53]. Inhibitor MK886 wiąże FLAP i blokuje produkcję leukotrienów zarówno z egzogenego jak i endogenego kwasu arachidonowego w komórkach leukocytów. Inhibitor ten jest nieaktywny w komórkach uszkodzonych oraz wobec 5-LOX wyizolowanej z komórki. FLAP wydaje się być białkiem unikalnym. Do tej pory, w przypadku żadnej innej oksygenazy kwasów tłuszczowych nie zostało odkryte białko o równoważnej roli w przenoszeniu substratu. Niedawno zidentyfikowano trzy dodatkowe białka współdziałające z 5-LOX, jednak ich znaczenie dla tego enzymu nie zostało jeszcze wyjaśnione [54].

Istotnym jest pytanie, czy dochodzi do przeniesienia substratu (np. AA) ze szlaku lipoksygenazowego na cyklooksygenazowy (i odwrotnie) oraz z jednej lipoksygenazy na drugą. Wyniki uzyskane przez Funka i wsp. podczas inkubacji makrofagów otrzewnowych z zymosanem lub w trakcie pobudzenia komórek tucznych pochodzenia szpikowego (BMMC) jonoforem A23187 w warunkach *in vitro*, nie wskazują na przesunięcie substratu w kierunku syntezy eikozanoidów powstających przy udziale cyklooksygenazy: PGE₂ lub PGD₂ (pomiaru dokonano metodą GC-MS) [3]. Natomiast Goulet i wsp. zaobserwowali 2-3-krotny wzrost wydzielania PGE₂ i TXB₂ przez makrofagi otrzewnowe stymulowane przez jonofor A23187 (oznaczenia wykonano metodą radioimmunologiczną) [55]. Z kolei Calzadai i wsp. stwierdzili, że płytki poddane działaniu nanomolarnych stężeń 12(S)-HPETE w obecności śladowych ilości kolagenu znacząco zwiększały syntezę TXB₂. W komórkach tych istotnie wzrastało stężenie endogenego kwasu arachidonowego [56].

W komórkach, w których obecne są dwie różne lipoksygenazy, brak aktywności enzymów jednego szlaku metabolizmu kwasu arachidonowego może prowadzić do wzmożenia jego metabolizmu na drugim szlaku, prawdopodobnie w wyniku przeniesienia substratu. Stwierdzono jednak, że ukierunkowanie metabolizmu AA na szlak L-12LOX w makrofagach uzyskanych od myszy nie posiadających 5-LOX (5-LOX^{-/-}) może budzić wątpliwości. Natomiast przesunięcie w stronę przeciwną (w kierunku 5-LOX u myszy pozbawionych L-12LOX) jest możliwe pod warunkiem, że makrofagi będą dysponowały kwasem arachidonowym pochodzenia egzogenego [3].

V. Rola lipoksygenaz

V-1. Tworzenie biologicznych mediatorów i cząsteczek sygnałowych

Rola ta polega na wykorzystaniu wolnych kwasów tłuszczowych do syntezy specyficznych hydro-nadtlenków, czyli substancji pełniących funkcje sygnalizacyjne u roślin: kwasu i aldehydu jasmonowego [13] i leukotrienów lub lipoksyn u kręgowców [57-59].

U ludzi aktywna 5-LOX leukocytów produkuje 5-HPETE i LTA₄, zapoczątkowując syntezę dalszych pochodnych: 5-HETE i LTC₄, D₄ i E₄ (Tabela 2). Produkty 5-LOX odgrywają istotną rolę w patogenezie astmy i zapalenia dróg oddechowych na tle alergicznym. Leukotrieny peptydylowe (LTC₄, D₄ i E₄) są silnymi związkami zwięzającymi oskrzela [3].

Wydaje się, że nadreaktywność dróg oddechowych nie jest wynikiem bezpośredniego wpływu leukotrienów peptydylowych na mięśniówkę gładką dróg oddechowych [3]. Prawdopodobnie produkty 5-LOX mogą zmieniać niespecyficzną reaktywność dróg oddechowych poprzez nasilenie obrzęku, wpływ na produkcję cytokin lub poprzez zwiększenie napływu komórek zapalnych (działanie chemotaktyczne). Wpływają one pośrednio na mięśniówkę gładką (powodując jej przerost) i nabłonek oddechowy, prowadząc do przebudowy dróg oddechowych.

U myszy pozbawionych 5-LOX^{-/-} zaobserwowano mniejszą eozynofilię zarówno w obrębie dróg oddechowych jak i innych tkanek. W modelu zwierzęcym zapalenia na tle alergicznym (mysz), komórki tuczne oraz substancje produkowane przez pobudzone eozynofile są zaangażowane w rozwój nadreaktywności dróg oddechowych [60, 61].

Istnieje pogląd, że produkty 5-LOX zmieniają immunologiczne funkcje komórek [3]. Jednakże badania powierzchniowych markerów komórek śledziowych T i B (CD3, CD4 i CD220) nie wykazały żadnych znaczących różnic ani w liczbie ani w budowie tych komórek. Nie stwierdzono również żadnych zmian w budowie najważniejszych narządów limfatycznych, prekursorów tymocytów (obydwu CD4⁻CD8⁻ i CD4⁺CD8⁺) ani różnych klas tymocytów [3]. Konieczne są zatem badania dla ustalenia jednoznacznej funkcji immunologicznej produktów 5-LOX.

Leukotrieny związane z mielopoezą oraz czynnikami stymulującymi tworzenie kolonii komórek szpikowych badano przy użyciu inhibitorów 5-LOX [3]. LTB₄ podobnie jak PGE₂ moduluje hematopoezę

Tabela 2

Funkcje lipoksygenaz

Lipoksygenaza	Produkt powstający z kwasu arachidonowego	Rola fizjologiczna	Patologia*	Piśmiennictwo
5-LOX	5-HETE, leukotrieny (LTA ₄ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄)	modulowanie hematopoezy poprzez udział we wzroście komórek progenitorowych erytro i mielopoezy, pobudzenie produkcji cytokin, współdziałanie z czynnikiem aktywującym płytki (PAF)	zapalenie (wzrost przepuszczalności naczyń, działanie chemotaktyczne na neutrofile i eozynofile, wpływ na komórki tuczne – wyzwalanie zjawiska nadreaktywności), zwężenie oskrzeli, zmiana funkcji immunologicznych komórek, wzbudzenie reakcji wczesnej i opóźnionej nadwrażliwości na antygeny pasożytów, zwężenie naczyń wieńcowych	[3, 61, 62, 92, 95]
P-12LOX	12-HPETE 12-HETE	modulowanie neurotransmisji, pobudzanie wydzielania aldosteronu, pobudzanie adhezji komórek i angiogenezy, wzrost wydzielania glukagonu	nadciśnienie pierwotne, zapalenie stawów, nowotwory okrężnicy, prostaty, sutka, trzustki, żołądka, skóry	[2, 6, 26, 28, 30, 37, 64, 68, 69, 71, 72]
L-12LOX	12-HPETE 12-HETE	modulowanie wydzielania insuliny, regulacja transportu glukozy w mięśniu sercowym	anemia sierpowata, zapalenie, zakrzepica, pobudzenie wzrostu fibroblastów mięśnia sercowego	[3, 73-76, 93, 96]
e12-LOX	12-HPETE 12-HETE	kontrolowanie prawidłowej czynności naskórka, występuje we wczesnym okresie rozwoju osobniczego (funkcja nieznana)	łuszczyca i inne dermatozy	[3, 16]
15-LOX	15-HPETE 15-HETE	dojrzwianie retikulocytów, dojrzwianie keratynocytów, rozwój soczewkowatych komórek nabłonka	miażdżycy (oksydacyjna modyfikacja LDL)	[2, 3, 80, 83, 84]
12/15-LOX	12-HPETE 15-HPETE 12-HETE 15-HETE	czynność makrofagów, fagocytoza, funkcje bakteriobójcze	zapalenie, miażdżycy (oksydacyjna modyfikacja LDL)	[2, 10, 85-91]

* Stany patologiczne, w przebiegu których stwierdzono zwiększone aktywności poszczególnych lipoksygenaz

u ludzi poprzez udział we wzroście komórek progenitorowych erytro- i mielopoezy [62-64].

Makrofagi pęcherzykowe, makrofagi otrzewnowe i komórki tuczne, czyli komórki biorące udział w procesach zapalnych posiadają 5-LOX i syntetyzują leukotrieny z endogennego i egzogennego kwasu arachidonowego [3]. Leukotrien B₄ (LTB₄) jest jednym z najsilniejszych czynników chemotaktycznych dla granulocytów obojętnochłonnych (PMN).

Eozynofile i komórki tuczne są kluczowymi komórkami w reakcji obronnej gospodarza przed pasożytami, w czym uczestniczą leukotrieny syntetyzowane i uwalniane przez te komórki. Produkty

5-LOX są zaangażowane w reakcje wczesnej i opóźnionej nadwrażliwości na antygeny pasożyta, proliferację komórek śledziony, wydzielanie cytokin (głównie interferonu γ oraz interleukiny 4) oraz pojawienie się eozynofili w wysięku otrzewnowym. Produkty 5-LOX są ważnymi, chociaż nie głównymi czynnikami uwalnianymi podczas ostrego zapalenia w odpowiedzi na zakażenie pasożytnicze [3]. W tej sytuacji produkowane są także cytokiny Th2, które wspólnie z IL-4 biorą udział w usuwaniu niektórych pasożytów z organizmu gospodarza, przy czym do reakcji tej potrzebna jest także obecność produktów 5-LOX. Prawdopodobnie IL-4 moduluje odpowiedź

cholinergiczną mięśni gładkich jelita cienkiego za pośrednictwem komórek tucznych i mechanizmu zależnego od leukotrienu D₄ [65].

Listeria monocytogenes jest Gram-dodatnią bakterią, umiejscawiającą się wewnątrzkomórkowo w komórkach Kupffera, hepatocytach i makrofagach śledzionowych, wywołującą nacieczenie granulocytami, a następnie monocytami [3]. Produkty 5-LOX są ważne dla zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *L. monocytogenes*, być może przez nasilanie gromadzenia się komórek (np. PMN) w miejscach infekcji (działanie chemotaktyczne) lub poprzez wspomaganie odpowiedzi makrofagów.

Leukotrieny współdziałają z czynnikiem aktywującym płytki (PAF). Powoduje on uwolnienie produktów 5-LOX, co prowadzi do śmierci myszy znajdujących się w ostrym wstrząsie na tle gwałtownego obniżenia ciśnienia tętniczego (ze 100 mmHg do 25 mmHg w ciągu 10 minut). Przypuszczalnie bezpośrednią przyczyną ich śmierci są leukotrieny powodujące zwężenie naczyń wieńcowych (znane działanie leukotrienów), czego konsekwencją jest drastyczne zmniejszenie przepływu wieńcowego [3].

Lipoksyny, trihydroksylowe pochodne kwasu arachidonowego, powstające w wyniku jego dwukrotnej oksygenacji katalizowanej przez różne lipoksygenazy, wykazują zbliżoną do leukotrienów, chociaż słabszą aktywność biologiczną. Antagonizują jednak działania prozapalne leukotrienów, co może sugerować ich rolę jako endogennych inhibitorów tego procesu i czynników sygnalizujących jego zakończenie [45].

Liczne biologiczne aktywności przypisywane kwasom HPETE i HETE świadczą o tym, że także one odgrywają rolę jako cząsteczki sygnalizacyjne. Mogą działać szybko i silnie, za pośrednictwem receptorów lub kanałów na powierzchni komórki. Biologiczna aktywność HETE ujawnia się wówczas w zakresie stężeń nanomolowych. W modulowaniu neurotransmisji, 12-HETE i jego pochodne działają bardzo szybko [2]. 12(S)-HETE aktywuje kinazę białkową C i za jej pośrednictwem działa na komórki efektorowe [2]. Uzasadnieniem takiego mechanizmu działania jest receptor dla 12-HETE sprzęgający białko G, obecny w komórkach czerniaka złośliwego [2].

Działanie produktów lipoksygenaz może także przebiegać wolno. Ciekawym jest, że płytkowa 12-LOX, przy ciągłym dostępie do substratu (AA), może podtrzymywać powstawanie 12-HETE przez godziny, podczas gdy płytkowa cyklooksygenaza odpowiada za krótkotrwałą i intensywną przyrost stężenia produktów oraz ich szybką inaktywację. Na-

suwa się zatem wniosek, że P-12HETE wpływa na procesy trwające dłużej niż agregacja płytek, w której bierze udział pochodna kwasu arachidonowego, produkt działania cyklooksygenazy płytkowej - tromboksan A₂ (TXA₂).

Związki powstające przy udziale P-12LOX: 12(S)-HPETE i 12(S)-HETE, są biologicznie aktywnymi metabolitami, pośredniczącymi m. in. w inicjowanym przez angiotensynę II wewnątrzkomórkowym przemieszczeniu wapnia w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń u szczurów. Według ostatnich doniesień, u szczurów z samorzutnym nadciśnieniem wzmagają się produkcja płytkowego 12(S)-HETE. Wykazano również wzrost stężenia 12(S)-HETE oraz białka P-12LOX u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym [64, 66]. Wiadomo również, że P-12HETE wpływa na zależną od angiotensyny II sekrecję aldosteronu przez komórki warstwy kłębkowatej kory nadnerczy [3].

Wysoką aktywność P-12LOX stwierdzono także w wielu liniach komórek rakowych m. in. okrężnicy, prostaty, sutka i trzustki. Obecnie prowadzi się badania nad ekspresją P-12LOX oraz jej wpływem na proliferację i przeżycie komórek dwóch linii ludzkiego raka żołądka (AGS i MKN-28). RT-PCR i *western blot*, odpowiednio wykazują obecność mRNA dla P-12LOX oraz ekspresję białka w obydwu liniach komórkowych. Leczenie inhibitorem 12-LOX - baicaleiną, znacząco hamowało proliferację komórek nowotworowych. Natomiast podanie 12-HETE odwracało efekt baicaleiny. Ponadto, inhibitor P-12LOX powodował apoptozę komórek raka żołądka [13, 67].

P-12HETE ułatwia inwazję i przerzuty nowotworowe poprzez zmniejszanie adhezji i wzmaganie ruchliwości komórek nowotworowych, a także nasilanie procesów angiogenezy i sekrecji proteinaz [6, 25, 36]. W raku prostaty u ludzi, poziom ekspresji P-12LOX koreluje z fazą nowotworu [26]. Płytkowa 12-LOX w ludzkich komórkach raka prostaty PC3 stymuluje wzrost nowotworu, głównie poprzez pobudzanie angiogenezy [30, 68, 69]. Dobrym wskaźnikiem rozwoju i wzrostu niektórych postaci nowotworów jest także 15-LOX-1 [70].

Angiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń z już istniejących naczyń krwionośnych, jest wieloetapowym procesem obejmującym kiełkowanie naczyń, migrację komórek śródbłonna, proliferację i różnicowanie naczyń. Eikozanoidy wykazują dużą aktywność biologiczną wobec komórek śródbłonna naczyń. Stwierdzono, że do stymulacji proliferacji komórek śródbłonna, ich migracji i różnicowania naczyń *in vitro* oraz angiogenezy *in vivo*, wy-

magana jest między innymi aktywność P-12LOX [25]. 12(S)-HETE może bezpośrednio pobudzać komórki śródbłonna, ich mitogenezę, migrację i powierzchniową ekspresję integryny $\alpha_v\beta_3$, która jest zaangażowana w procesy mitogenezy. Wyniki badań sugerują możliwość użycia inhibitorów w chorobach, w przebiegu których dochodzi do wzmożonej angiogenezy, takich jak niektóre choroby nowotworowe, czy zapalenie stawów [25, 71].

12-LOX typu płytkowego wzmagają wydzielanie glukagonu przez komórki a wysp trzustkowych u szczurów. Natomiast hepoksylina, będąca pochodną szlaku leukocytarnej 12LOX pośredniczy w zależności od glukozy sekrecji insuliny [3, 72]. Wzrost aktywności L-12LOX ma miejsce w przypadkach zamknięcia światła naczynia w przebiegu anemii sierpowatej, zapaleniu i zakrzepicy [73-75].

Typ naskórkowy 12-lipoksygenazy (e-12LOX) odgrywa rolę w prawidłowej czynności naskórka [3]. Prawidłowa ludzka skóra posiada zdolność do syntezy niewielkich ilości 12S-HETE i 12R-HETE, podczas gdy znacznie wyższe stężenia, przede wszystkim 12R-HETE, stwierdza się w przypadkach łuszczycy i wielu innych zapalnych typach dermatoz [10]. Typ naskórkowy 12-lipoksygenazy (e-12LOX) odgrywa także bliżej nieokreśloną rolę we wczesnym okresie rozwoju osobniczego [3].

Funkcji i wsp. wykazali obecność mRNA ludzkiej 12R-lipoksygenazy w transformowanych komórkach linii limfocytów B, chociaż odpowiadająca jej aktywność enzymatyczna nie była wykrywana [47]. Późniejsze badania wykazały obecność 12R-LOX w ludzkich migdałkach [27]. Funkcja 12R-LOX w migdałkach nie jest jasna. Być może 12(R)-HETE wskazuje na osłabienie prozapalnej aktywności komórek w nich występujących [76].

Spośród wszystkich dotychczas poznanych lipoksygenaz ssaków jedynie 12/15-LOX posiada zdolność bezpośredniego utleniania estrów lipidowych nawet wtedy gdy są one związane z błonami czy występują w obrębie lipoprotein [77, 78]. Wiadomo również, że 12/15-LOX umożliwia wypełnianie prawidłowych czynności przez makrofagi (fagocytoza i funkcja bakteriobójcza) [2, 12, 79].

V-2. Modyfikacja struktury błon (reakcje peroksydacji)

Typowym jest tutaj związek lipoksygenaz z metabolizmem zestryfikowanych substratów i często wytwarzanie mieszanin hydronadtlenków. Struktura produktów hydronadtlenkowych nie jest tu tak istotna, jak wywoływanie przez nie zmian w strukturze

błon i powodowanie wtórnej oksygenacji (peroksydacji lipidów błonowych katalizowanej enzymatycznie). Koncepcja zakładająca, że lipoksygenaza może utleniać lipidy błonowe i wywoływać w komórce zmiany strukturalne, prowadzące do degradacji organeli wewnątrzkomórkowych, była pierwotnie rozwijana w odniesieniu do 15-LOX retikulocytów ssaków i jej potencjalnej roli w dojrzewaniu erytrocytów [2, 3]. W analogiczny sposób 15-LOX może być zaangażowana w procesy dojrzewania keratynocytów i rozwój soczewkowatych komórek nabłonkowych. Podobne koncepcje, w odniesieniu do roli lipoksygenaz w procesach dojrzewania i starzenia się, rozwijały się niezależnie w literaturze fachowej dotyczącej roślin [2].

Obecność 15-LOX w komórkach piankowatych, może świadczyć pośrednio o roli, jaką ta lipoksygenaza pełni w rozwoju zmian miażdżycowych [3, 80, 81]. 12/15-LOX bierze udział w oksydacyjnej modyfikacji cząstek LDL, procesie o kluczowym znaczeniu w zapoczątkowaniu rozwoju miażdżycy [78, 82, 83]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że w procesie oksydacji LDL bierze udział 12/15-LOX obecna w monocytach i makrofagach [82, 84-86]. 12/15-LOX i utlenione kwasy tłuszczowe występują w zmodyfikowanych oksydacyjnie cząstkach LDL [83, 87-89]. Oksydacja LDL powoduje ich przekształcenie w formy aterogenne i nasilenie procesów miażdżycowych [3, 78]. Stwierdzono, że zniszczenie genu dla 12/15-LOX zmniejsza miażdżycę u myszy pozbawionych apoE, a nadmierna ekspresja tego genu nasila miażdżycę u myszy z wadliwym receptorem dla LDL [90].

V-3. Mobilizacja metabolizmu lipidowego

Lipoksygenazy katalizujące utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych zestryfikowanych w triacyloglicerolach, biorą udział w procesach kiełkowania u roślin oleistych [91]. Po specyficznej konwersji do 13-hydroksyestrów kwasy tłuszczowe stają się dostępne dla procesu β -oksydacji oraz wykorzystania jako źródła energii dla rozwijającego się zarodka. Równoważna funkcja nie została opisana u zwierząt. Wciąż jeszcze brakuje uzasadnienia dla wysokiej aktywności lipoksygenaz w zwierzęcych oocytach. Być może umożliwiają one wykorzystanie zapasów lipidowych przez rozwijający się zarodek [2].

Artykuł otrzymano 11 lutego 2002

Zaakceptowano do druku 9 września 2002

1. Su C, Olliw EH (1998) *J Biol Chem* **273**: 13072-13079
2. Brash AR (1999) *J Biol Chem* **274**: 23679-23682
3. Funk CD (1996) *Biochim Biophys Acta* **1304**: 65-84
4. Shibata D, Axelrod B (1995) *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**: 213-228
5. Rosahl S (1996) *Z Naturforsch* **51**: 123-138
6. Wong BCY, Wang WP., Cho CH, Fan XM, Lin MCM, Kung HF, Lam SK (2001) *Carcinogenesis* **22**: 349-135
7. Kuhn H, Thiele BJ (1999) *FEBS Lett* **449**: 7-11
8. McDonnell M, Davis W Jr, Li H, Funk CD (2001) *Prostaglandin Other Lipid Mediat* **63**: 93-107
9. Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N (1997) *Prog Lipid Res* **36**: 23-41
10. Schneider C, Keeney DS, Boeglin WE, Brash AR (2001) *Arch Biochem Biophys* **386**: 268-274
11. Krieg P, Kinzig A, Ress-Loschke M, Vogel S, Vanlandingham B, Stephan M, Lehmann WD, Marks F, Furstenberger G (1995) *Mol Carcinog* **14**: 118-129
12. Sun D, Funk CD (1996) *J Biol Chem* **271**: 24055-24062
13. Grechkin A (1998) *Prog Lipid Res* **37**: 317-352
14. Krieg P, Kinzig A, Heidt M, Marks F, Furstenberger G (1998) *Biochim Biophys Acta* **1391**: 7-12
15. Sun D, Elsea SH, Patel PI, Funk CD (1998) *Cytogenet Cell Genet* **81**: 79-82
16. Stephenson LC, Bunker T W, Dubbs WE, Grimes HD (1998) *Plant Physiol* **116**: 923-933
17. Werz O, Burkert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002) *Blood* **99**: 1044-1052
18. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M (1995) *J Biol Chem* **270**: 21652-21658
19. Lepley RA, Muskardin DT, Fitzpatrick FA (1996) *J Biol Chem* **271**: 24163-24168
20. Wilborn J, Bailie M, Coffey M, Burdick M, Strieter R, Peters-Golden M (1996) *J Clin Invest* **97**: 1827-1836
21. Woods JW, Coffey MJ, Brock TG, Singer II, Peters-Golden M (1995) *J Clin Invest* **95**: 2035-2046
22. Chen XS, Naumann TA, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG, Funk CD (1996) *J Biol Chem* **270**: 17993-17999
23. Kawajiri H, Zhuang D, Qiao N, Yoshimoto T, Yamamoto M, Iseki S, Hamaguchi K (2000) *J Histochem Cytochem* **48**: 1411-1419
24. Kim JA, Gu JL, Natarajan R, Berliner JA, Nadler JL (1995) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**: 942-948
25. Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV (2000) *Blood* **95**: 2304-2311
26. Nie D, Hillman GG, Geddes T, Tang K, Pierson C, Grignon DJ., Honn KV (1998) *Cancer Res* **58**: 4047-4051
27. Boeglin WE, Kim RB, Brash AR (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6744-6749
28. Virmani J, Johnson EN, Klein — Szanto AJP, Funk CD (2001) *Cancer Lett* **162**: 161-165
29. Siebert M, Krieg P, Lehmann WD, Marks F, Furstenberger G (2001) *Biochem J* **355**: 97-104
30. Natarajan R, Esworthy R, Bai W, Gu JL, Wilczynski S, Nadler JL (1997) *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 1790-1798
31. Kamitani H, Geller M, Eling T (1999) *Adv Exp Med Biol* **469**: 593-598
32. Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr, Chou TC (1999) *Cancer Res* **59**: 6178-6184
33. Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL (1999) *Cancer Res* **59**: 2223-2228
34. Timar J, Ras E, Honn KV, Hagmann W (1999) *Adv Exp Med Biol* **469**: 617-622
35. Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 218-223
36. Nappes C, Liagre B, Beneytout JL (1995) *Cancer Lett* **96**: 133-140
37. Gaffney BJ (1996) *Annu Rev Biophys Biomol Structure* **25**: 431-459
38. Hagmann W, Gao X, Zacharek A, Wojciechowski LA, Honn KV (1995) *Prostaglandins* **49**: 49-62
39. Prigge ST, Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1996) *Proteins* **24**: 275-291
40. Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bollen JT, Walter R, Axelrod B (1996) *Biochemistry* **35**: 10687-10701
41. Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Nanney LB, Brash AR (1997) *J Biol Chem* **272**: 24410-24416
42. Jisaka M, Boeglin WE, Kim RB, Brash AR (2001) *Arch Biochem Biophys* **386**: 136-142
43. Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF (1997) *Nat Struct Biol* **4**: 1003-1009
44. Skrzypczak-Jankun E, Amzel LM, Kroa BA, Funk MOJ (1997) *Proteins* **29**: 15-31
45. Tornhamre S, Stenberg AE, Lindgren JA (2000) *Biochim Biophys Acta* **1484**: 298-306
46. Burger F, Krieg P, Marks F, Furstenberger G (2000) *Biochem J* **348**: 329-335
47. Sun D, McDonnell M, Chen XS, Lakkis MM, Li H, Isaacs SN, Elsea SH, Patel PI, Funk CD (1998) *J Biol Chem* **273**: 33540-33547
48. Krieg P, Siebert M, Kinzig A, Bettenhausen R, Marks F, Furstenberger G (1999) *FEBS Lett* **446**: 142-148
49. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS, Shieh BH (1996) *J Biol Chem* **271**: 20949-20957
50. Funk CD, Keeney DS, Olliw EH, Boeglin WE, Brash AR (1996) *J Biol Chem* **271**: 23338-23344
51. Glickman MH, Klinman JP (1996) *Biochemistry* **35**: 12882-12892
52. Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kuhn H (1998) *Blood* **91**: 64-74
53. Jakobsson PJ, Mancini JA, Riendeau D, Ford-Hutchinson AW (1997) *J Biol Chem* **272**: 22934-22939
54. Provost P, Samuelsson B, Radmark O (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1881-1885
55. Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM, Koller BH (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12852-12856
56. Calzada C, Vericel E, Mitel B, Coulon L, Lagarde M (2001) *J Lipid Res* **42**: 1467-1473
57. Samuelsson B (1997) *Adv Exp Med Biol* **433**: 1-7
58. Serhan CN (1997) *Prostaglandins* **53**: 107-137
59. Howe GA, Schimmler AL (2002) *Curr Opin Plant Biol* **5**: 230-236
60. Eum SY, Haile S, Lefort J, Huerre M, Vargaftig BB (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12290-12294
61. Drazen JM, Arm JP, Austen KF (1996) *J Exp Med* **183**: 1-5
62. Dupuis F, Desplat V, Praloran Y, Denizot J (1997) *J Lipid Mediat Cell Sign* **16**, 117-125
63. Denizot Y, Dulery C, Trimoreau F, Desplat V, Praloran V (1997) *Biochim Biophys Acta* **1402**: 209-215
64. Sasaki M, Hori MT, Hino T, Golub MS, Tuck ML (1997) *Am J Hypertens* **10**: 371-378
65. Goldhill J, Morris SC, Maliszewski C, Urban JF, Funk CD, Finkelman FD, Shea-Donahue T (1997) *Am J Physiol* **272**: G1135-G1140
66. Gonzalez-Nunez D, Claria J, Rivera F, Poch E (2001) *Hypertension* **37**: 334-338
67. Tang DG, La E, Kern J, Kehrer JP (2002) *Biol Chem* **383**: 425-442
68. Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV (2002) *Cancer Res* **62**: 2721-2727

69. Nie D, Che M, Grignon D, Tang K, Honn KV (2001) *Cancer Metastasis Rev* **20**: 195-206
70. Kelavkar U, Glasgow W, Eling TE (2002) *Curr Urol Rep* **3**: 207-214
71. Nie D, Honn KV (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**: 799-807
72. Pace-Asciak CR, Demin PM, Estrada M, Liu G (1999) *FEBS Lett* **461**: 165-168
73. Setty BN, Chen D, O'Neal P, Littrell JB, Grosman MH, Stuart MJ (1998) *J Lab Clin Med* **131**: 344-353
74. Wang MM, Reynaud D, Pace-Asciak CR (1999) *Biochem Biophys Acta* **1436**: 354-362
75. Katoh A, Ikeda H, Murohara T, Haramaki N, Ito H, Imaizumi T (1998) *Circulation* **98**: 2891-2898
76. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP (1996) *Cell* **86**: 345-348
77. Kuhn H, Borchert A (2002) *Free Radic Biol Med* **33**: 154-172
78. Schewe T (2002) *Biol Chem* **383**: 365-374
79. Miller YI, Chang MK, Funk CD, Feramisco JR, Witztum JL (2001) *J Biol Chem* **276**: 19431-19439
80. Hiltunen T, Luoma J, Nikkari T, Yla-Herttuala S (1995) *Circulation* **92**: 3297-3303
81. Noguchi N, Yamashita H, Hamahara J, Nakamura A, Kuhn H, Niki E (2002) *Biol Chem* **383**: 619-626
82. Xu W, Takahashi Y, Sakashita T, Iwasaki T, Hattori H, Yoshimoto T (2001) *J Biol Chem* **276**: 36454-36459
83. Feinmark SJ, Cornicelli JA (1997) *Biochem Pharmacol* **54**: 953-959
84. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK (1999) *J Biol Chem* **274**: 25959-25962
85. Honda HM, Leitinger N, Frankel M, Goldhaber JL, Natarajan R, Nadler JL, Weiss IN, Berliner JA (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 680-686
86. Kim JA, Gu JL, Natarajan R, Berliner JA, Nadler JL (1995) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**: 942-948
87. Folcik VA, Nivar-Aristy RA, Krajewski LP, Cathcart MK (1995) *J Clin Invest* **96**: 504-510
88. Kuhn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C (1997) *J Clin Invest* **99**: 888-893
89. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD (1999) *J Clin Invest* **103**: 1597-1604
90. Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2100-2105
91. Feussner I, Kuhn H, Wasternack C (1997) *FEBS Lett* **406**: 1-5
92. Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF (2002) *J Allergy Clin Immunol* **109**: 393-400
93. Wen Y, Gu J, Liu Y, Wang PH, Sun Y, Nadler JL (2001) *Circ Res* **88**: 70-76
94. Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Brash AR (2000) *J Biol Chem* **275**: 1287-1293
95. O'Flaherty JT, Taylor JS, Thomas MJ (1998) *J Biol Chem* **273**: 32535-32541
96. Dransfeld O, Rakatzi I, Sasson S, Eckel J (2002) *Ann N Y Acad Sci* **967**: 208-216

Budowa i rola białka tau

Tau protein, structure and roles

MARTA BAKSALERSKA-PAZERA¹, GRAŻYNA NIEWIADOMSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Udział białka tau w transporcie aksonalnym
- III. Synteza białka tau
- IV. Izoformy białka tau
- V. Fosforylacja białka tau
- VI. Defosforylacja białka tau
- VII. Hiperfosforylacja tau i tworzenie się PHF
- VIII. Rola białka tau w chorobie Alzheimera
- IX. Tauopatie — zespoły otępienne związane z nieprawidłową przemianą białka tau
- X. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AD — choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease*); APP — białko prekursorowe amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*); CaMPK II — kinaza zależna od jonów Ca²⁺ i kalmoduliny (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*); CBD — zwyrodnienie korowo-podstawne (ang. *corticobasal degeneration*); cdk2, cdk5 — kinazy cyklinozależne (ang. *cyclin-dependent kinases*); FTD — otępienie czołowo-skroniowe (ang. *frontotemporal dementia*); FTDP-17 — otępienie czołowo-skroniowe i parkinsonizm kodowany przez gen zlokalizowany w chromosomie 17 (ang. *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*); fyn — niereceptorowa kinaza tyrozyny; GSK3 — kinaza syntazy glikogenowej 3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*); kinazy MAP — kinazy białkowe aktywowane mitogenami (ang. *mitogen activated protein kinases*); MAP — białka związane z mikrotubulami (ang. *microtubule associated proteins*); MARK — kinazy regulujące powinowactwo do mikrotubul (ang. *Microtubule-affinity regulating kinase*); mRNA — informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*); MTOC — „ośrodki organizacji mikrotubul” (ang. *microtubule organizing centers*); NT — sploty włókienek nerwowych (ang. NT — *neurofibrillary tangles*); PDPK — kinazy zależne od proliny (ang. *proline-directed protein kinases*); PHF — parzyste spiralnie skręcone włókienka (ang. *paired helical filaments*); PiD — choroba Picka (ang. *Pick's disease*); PKA — kinaza zależna od cyklicznego AMP (ang. *cyclic-AMP-dependent kinase*); PLC — fosfolipaza C, PP1, PP2A, PP2B, PP2C — białkowe fosfatazy; Pro — prolina, PSP — postępujące porażenie ponadjądrowe (ang. *progressive supranuclear palsy*); R —

Contents:

- I. Introduction
- II. Tau participates in axonal transport
- III. Tau synthesis
- IV. Tau isoforms
- V. Tau phosphorylation
- VI. Tau dephosphorylation
- VII. Hyperphosphorylation and PHF formation
- VIII. Role of tau in Alzheimer's disease
- IX. Tauopathies
- X. Summary

domeny wiązania białka tau z mikrotubulami; Ser — seryna; SH3 — domena homologii z białkami Src (ang. *Src homology domain*); Src — niereceptorowa kinaza tyrozyny; Thr — tyrozyna.

I. Wstęp

Białko tau jest białkiem cytoplazmatycznym, którego główną fizjologiczną funkcją jest udział w procesach polimeryzacji tubuliny i stabilizacji mikrotubul. Badania nad budową i rolą białka tau są ważne z uwagi na jego znaczenie dla funkcjonowania cytoszkieletu komórek nerwowych. Szczególnego znaczenia nabrały one, gdy okazało się, że nieprawidłowa przemiana białka tau ma związek z chorobą Alzheimera oraz z wieloma innymi chorobami układu nerwowego zwanymi zespołami otępiennymi typu tauopatii. Jak wykazano, nadmierna fosforylacja białka tau zmniejsza jego powinowactwo do mikrotubul i zapoczątkowuje proces jego polimeryzacji we włókna. Uniemożliwia to wiązanie się białka tau z mikrotubulami, wskutek czego zaburzeniu ulega struktura cytoszkieletu i wewnętrzny transport komórkowy. Wysoko ufosforylowane białko tau jest głównym składnikiem wewnątrzkomórkowych, parzystych spiralnie skręconych włókienek (PHF, ang. *paired helical filaments*). Są to struktury patologiczne, które ulegają dalszej agregacji tworząc sploty włókienkowe (NT, ang. *neurofibrillar tangles*). Pojawianie się NT w neuronach jest przyczyną zmian neurodegeneracyjnych prowadzących do śmierci komórek w chorobie Alzheimera. Gęstość splotów

¹ Mgr, ² dr, Zakład Neurofizjologii, Instytut Nenckiego PAN w Warszawie, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: mbaksal@nencki.gov.pl

włókienkowych koreluje z rozmiarami zaburzeń wywołanych tą chorobą. Zaburzenia w przemianie białka tau są także jedną z najczęstszych przyczyn innych zespołów otępiennych związanych z wiekiem. Choroby te powodują znaczący spadek funkcji intelektualnych i upośledzenie podstawowych funkcji życiowych. Stopniowe narastanie objawów otępienia, tj. zespołu psychopatologicznego, w którym zaburzone są wyższe funkcje kory mózgowej, powoduje pogorszenie pamięci krótkotrwałej oraz długoterminowej pamięci semantycznej (szczególnie werbalnej). Pamięć dawna jest stosunkowo dobrze zachowana, aż do późnych stadiów choroby. Objawem choroby jest także upośledzenie myślenia, orientacji, rozumienia, liczenia, mowy i oceny (np. samokrytycyzm). Uszkodzeniu funkcji poznawczych towarzyszy zwykle obniżenie kontroli nad reakcjami emocjonalnymi i społecznymi oraz zachowaniem i motywacją (spadek apetytu i libido), często prowadzące do depresji i frustracji. Niektórym tauopatiom towarzyszą także symptomy choroby Parkinsona, polegające na zaburzeniu aparatu mięśniowo-ruchowego organizmu. W miarę rozwoju choroby pacjenci nie są w stanie wypełniać samodzielnie podstawowych czynności fizjologicznych i wymagają stałej opieki. Ostatecznie choroby te prowadzą do śmierci dotkniętych nimi osób.

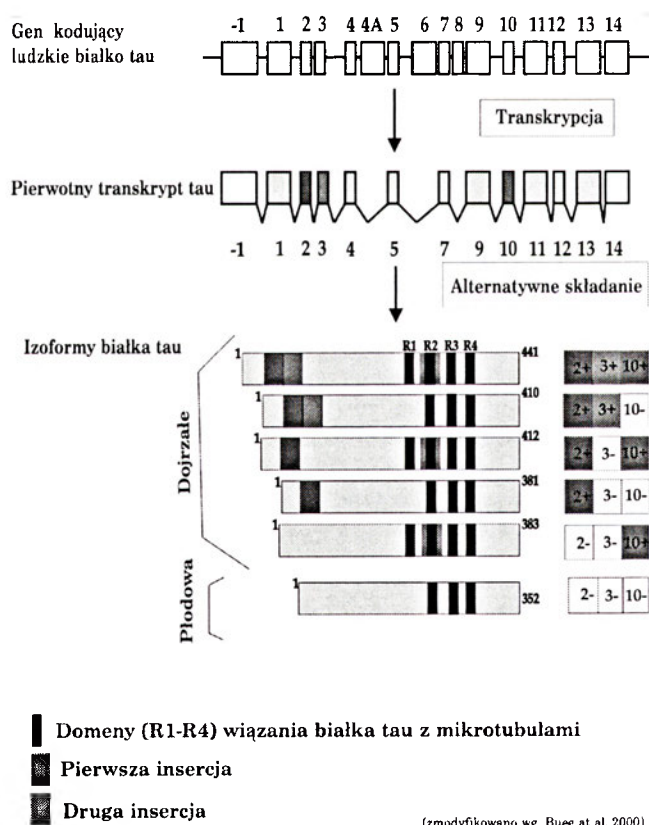
II. Udział białka tau w transporcie aksonalnym

Transport aksonalny zachodzi w dużej mierze przy udziale aparatu mikrotubularnego aksonów. Elementy komórkowe są transportowane po mikrotubulach przez białka motoryczne należące do dwóch nadrodzin: kinezy i dynein. Wykazują one odmienne preferencje kierunku ruchu. Kinezy wędrują na ogół w kierunku zakończeń aksonalnych, a dyneiny w kierunku ciała perykarionu [1-3]. Natomiast strukturę cytoszkieletu aksonów i dendrytów tworzą głównie tubulina, białka neurofilamentów, białka związane z mikrotubulami MAP (ang. *microtubule associated proteins*) oraz aktyna i białka przyłączające się do aktyny [4]. Tubulina jest heterodimerem złożonym z α - i β -tubuliny, które układają się w postaci rureczek zwanych mikrotubulami. Badania *in vitro* wykazały, że wysoce oczyszczona i w pełni zdysocjowana tubulina polimeryzuje w mikrotubule [5]. Tubulina w mikrotubulach ulega polimeryzacji na końcu (+) i depolimeryzacji na końcu (-). Tworzenie mikrotubul odbywa się w „ośrodkach organizacji mikrotubul” MTOC (ang. *microtubule organizing centers*). Znana jest również γ -tubulina,

która wchodzi w skład MTOC [6]. Mikrotubule są jednym ze składników cytoszkieletu komórkowego. Przenikają one komórkę, utrzymują jej kształt, są również szlakami transportu pęcherzyków, organelli i substancji odżywczych. Stabilność mikrotubul w komórce zapewniają białka należące do rodziny białek związanych z aparatem mikrotubularnym aksonów (ang. *microtubule-associated proteins*, MAPs). Jednym z takich białek jest białko tau, które przyłącza się do tubuliny poprzez swoje domeny wiązania z mikrotubulami, dzięki czemu tubulina pozostaje w stanie spolimeryzowanym.

III. Synteza białka tau

Białko tau jest białkiem rozpuszczalnym, które w normalnych warunkach przyłącza się do mikrotubul [4,7]. Gen kodujący ludzkie białko tau zajmuje około 100 kb na dłuższym ramieniu chromosomu 17 w pozycji 17q21 i zawiera 16 egzonów [8] (Ryc.1). Anali-



Ryc. 1. Gen kodujący ludzkie białko tau zawiera 16 egzonów. W wyniku transkrypcji dochodzi do powstania pierwotnego transkryptu tau. Egzony 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, to egzony konstytuujące czyli kształtujące pierwszorzędową strukturę białka. W wyniku alternatywnego składania produktów egzonów 2, 3 i 10 powstają izofomy białka tau. U ludzi zidentyfikowano 6 izoforn białka tau, które różnią się między sobą liczbą aminokwasów w łańcuchu (352, 381, 383, 410, 412, 441) jak również obecnością insercji i domen wiązania z mikrotubulami (R1-4).

za restrykcyjna i sekwencjonowanie genu wykazały obecność dwóch wysp CpG, z których jedna związana jest z obszarem promotora, a druga z egzonem 9 [9]. Transkrypcja tau mRNA obejmuje 16 egzonów, ale trzech z pośród nich nigdy nie znaleziono w mRNA ludzkiego mózgu. Są to egzony 4A, 6 i 8, charakterystyczne dla obwodowej izoformy białka tau. Egzon 4A jest długim egzonem, który generuje dodatkową sekwencję 253 aminokwasów. Egzon ten zidentyfikowano nie tylko u ludzi, ale również u gryzoni i bawołów. Izoformę białka tau zawierającą sekwencję kodowaną przez egzon 4A nazwano „Dużym Tau” (ang. *big tau*). Jego masa cząsteczkowa wynosi 130 kDa [10]. Tau mRNA zawierający egzon 8, nie wykryty w ludzkim mózgu, zidentyfikowano w mózgach gryzoni, bawołów i małp [11]. Egzon „-1” (minus 1) jest częścią promotora, ulega transkrypcji, ale nie ulega translacji. Egzony 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 i 13 są egzonami konstytuującymi istotnymi w kształtowaniu l-rzędowej struktury białka. Egzon 14 nie ulega translacji i występuje jedynie w mRNA [10,12]. Egzony 2, 3 i 10 są charakterystyczne dla dojrzałego mózgu. Ich produkty tworzą 6 kombinacji opartych o występowanie (+) lub brak (-) poszczególnych produktów w łańcuchu białka tau (2-,3-,10-; 2+,3-,10-; 2+,3+,10-; 2-,3-,10+; 2+,3-,10+; 2+,3+,10+) [10,12,13]. W wyniku alternatywnego składowania produktów egzonów 2, 3 i 10 powstają izoformy białka tau.

IV. Izoformy białka tau

U ludzi zidentyfikowano 6 izoform białka tau. W ośrodkowym układzie nerwowym dorosłego człowieka występuje 5 izoform, które zawierają odpowiednio 381, 383, 410, 412 i 441 aminokwasów. Izoforma białka tau zawierająca 441 aminokwasów występuje również w obwodowym układzie nerwowym [14]. Poszczególne izoformy białka tau różnią się nie tylko liczbą aminokwasów w łańcuchu, ale również obecnością 3 lub 4 domen wiążących się z mikrotubulami oraz lokalizacją 1 lub 2 insercji, które mogą zawierać od 29 do 58 aminokwasów [4,7,15]. Dwie sekwencje zawierające każda po 29 aminokwasów kodowane są przez egzony 2 i 3. Sekwencje te nazwane zostały insercjami i wykazują wysoko kwaśny odczyn. Znana jest również płodowa izoforma białka tau, która zawiera 3 domeny i zbudowana jest z 352 aminokwasów. Płodowa izoforma białka tau nie zawiera insercji. Ciężar cząsteczkowy izoform białka tau wynosi od 45 do 65 kDa [15].

N-koniec białka tau określany jest jako domena projekcyjna, ponieważ może on reagować z mikrotubulami i innymi elementami cytoszkieletu oraz z

błoną cytoplazmatyczną [16]. Odgrywa on znaczącą rolę w stabilizacji i organizacji pewnych typów aksonów [17]. Białko tau może pełnić rolę mediatora pomiędzy mikrotubulami, a błoną plazmatyczną. Interakcje takie zachodzą pomiędzy obszarem bogatym w prolinę w N-końcu białka tau, a domeną SH3 w niereceptorowych kinazach tyrozyny rodziny src takich jak np. fyn [18]. W przeprowadzonych przez Hwang i współautorów [19] badaniach *in vitro* wykazano, że białko tau reaguje z domeną SH3 fosfolipazy PLC- γ i wzmacnia jej aktywność w obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych takich jak kwas arachidowy. Reakcji tej towarzyszy obecność jonów Ca^{2+} . Proces ten jest w znaczący sposób hamowany przez fosfatydylocholinę. Jenkinson i Johnson [20] wykazali asocjację białka tau i PLC- γ bez obecności kwasu arachidowego [20]. Wyniki te wskazują, iż białko tau może odgrywać rolę w transdukcji sygnału poprzez reagowanie z białkami takimi, jak kinazy PLC- γ i Src.

Domeny odpowiedzialne za przyłączanie białka tau do mikrotubul zlokalizowane są na C-końcu łańcucha, natomiast insercje znajdują się na N-końcu. Białko tau przyłącza się do mikrotubul poprzez znajdujące się na jego C-końcu powtarzające się sekwencje, zbudowane z 18 aminokwasów o wysokiej zachowawczości składu aminokwasowego. Te powtarzające się sekwencje to domeny R1-R4 kodowane przez egzony 9-12 [21]. W poszczególnych izoformach białka tau występują 3 lub 4 (3R lub 4R) domeny. Poszczególne domeny wiązania z mikrotubulami rozdzielone są przez mniej konserwatywne wewnętrzne domeny zbudowane z 13-14 aminokwasów [22]. Izoformy białka tau występujące u dojrzałych osobników i zawierające 4R (R1-R4) efektywniej utrzymują integralność mikrotubul, niż płodowa izoforma tau zawierająca 3R (R1, R3, R4) [21,23]. Obszarem najskuteczniej stymulującym polimeryzację mikrotubul jest interregion pomiędzy domenami R1 i R2, gdzie występuje specyficzny peptyd 274KVQIINKK281 [24,25].

V. Fosforylacja białka tau

Białko tau ulega fosforylacji najczęściej w miejscach występowania seryny i treoniny. Stopień fosforylacji białka tau zmienia się wraz z rozwojem. Jej wysoki poziom występuje u płodu, po czym spada on wraz z wiekiem. Spowodowane to jest wzrostem aktywności fosfataz w dojrzewającym organizmie odpowiedzialnych za defosforylację białka tau [26]. Używając różnych technik, takich jak stosowanie zależnych od fosforylacji monoklonalnych przeciwciał

skierowanych przeciw białku tau, spektroskopii masowej oraz sekwencjonowania wyróżniono następujące miejsca fosforylacji białka tau: Thr39, Ser46Pro, Thr50Pro, Thr69Pro, Thr175Pro, Thr181Pro, Ser198, Ser199Pro, Ser202Pro, Thr205Pro, Ser208, Ser210, Thr212Pro, Ser214, Thr217Pro, Thr231Pro, Ser235Pro, Ser237, Ser241, Ser262, Ser285, Ser305, Ser324, Ser352, Ser356, Ser396Pro, Ser400, Thr403, Ser404Pro, Ser409, Ser412, Ser413, Ser416 i Ser422Pro [27-32]. Większość z tych miejsc fosforylacji znajduje się poza domenami wiązania białka tau z mikrotubulami z wyjątkiem Ser262, która znajduje się w domenie R1, Ser285 w interdomenie pomiędzy R1 a R2, Ser305 w interdomenie pomiędzy R2-R3, Ser324 w domenie R3, Ser352 w domenie R4 oraz Ser356 również w domenie R4 [10, 12, 31, 33].

Białko tau ulega fosforylacji regulowanej przez kinazy, spośród których większość to kinazy zależne od proliny PDPK (ang. *proline-directed protein kinases*). Należą do nich kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*), GSK3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*), kinaza tau-tubulina oraz kinazy cdk2 i cdk5 (ang. *cyclin-dependent kinases*) [32, 34-40]. Białko tau ulega również fosforylacji w miejscach, w których nie występują Ser-Pro czy Thr-Pro. W tych miejscach fosforylacja zachodzi przy udziale kinazy CaMKII (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*), kinazy PKA (ang. *cyclic-AMP-dependent kinase*) i kinazy kazeiny II [41-45]. Stopień fosforylacji białka tau regulowany jest także przez kinazy MARK (ang. *microtubule-affinity regulating kinases*) [15, 20, 46]. Zidentyfikowano cztery kinazy MARK (MARK1 — MARK4) o ciężarze cząsteczkowym od 90 do 110 kDa [34]. Wykazano, że kinazy MARK fosforylują białko tau w miejscach bogatych w serynę i treoninę (Ser 262/356, Ser 422, Ser202/Thr 205), które są domenami KXGS wiązania białka tau z mikrotubulami [20, 47-49]. Kinazy MARK zawierają cztery domeny, w tym domenę katalityczną o ciężarze 30 kDa. Analiza filogenetyczna tej domeny pozwala zaliczyć kinazy MARK do podrodziny Snf1/AMPK, należącej do grupy kinaz zależnych od wapnia i kalmoduliny CaMK [50]. Aktywacja endogennych kinaz MARK prowadzi do wzrostu fosforylacji białka tau w domenach wiązania z mikrotubulami, do odłączenia białka tau od tubuliny oraz wzrostu niestabilności mikrotubul [47,48] i rozzerwania cytoszkieletu [47,49,51].

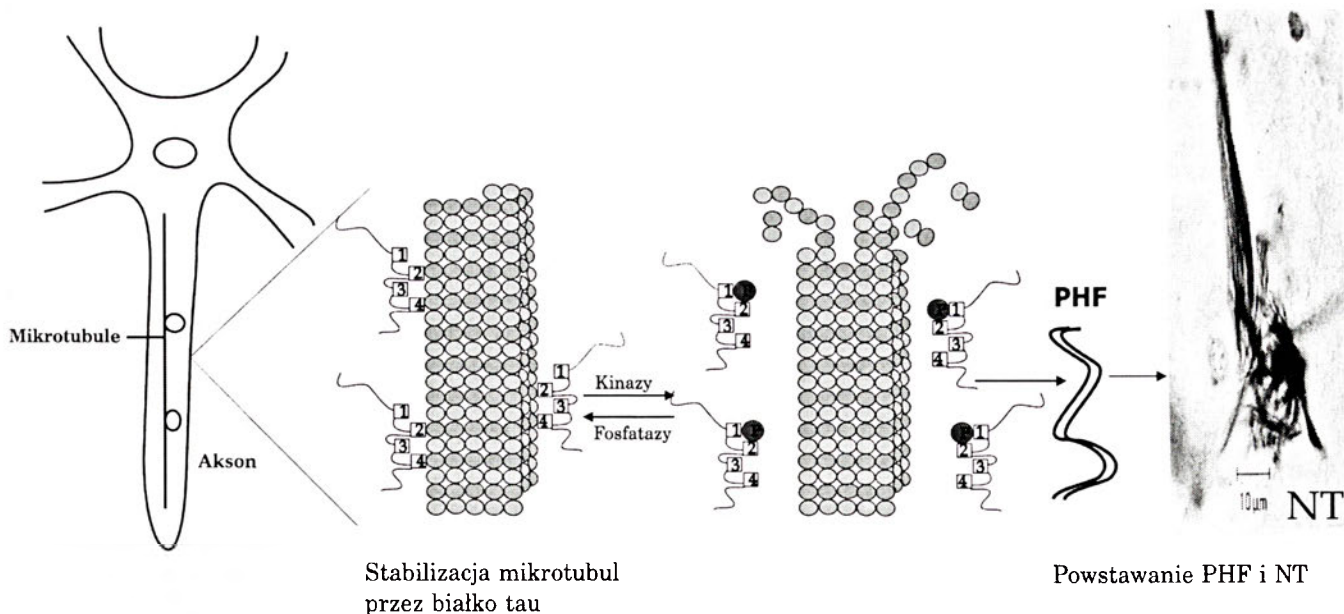
VI. Defosforylacja białka tau

Defosforylacja białka tau regulowana jest poprzez endogenne fosfatazy [52-55]. Należą do nich seryno-

wo/treoninowa fosfataza białkowa 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B) i 2C (PP2C). Ich poziom w komórkach zmienia się wraz z rozwojem osobniczym [56, 57]. Fosfatazy przyłączają się do mikrotubul w sposób bezpośredni lub pośredni [56]. Fosfataza PP1 defosforyluje formę białka tau występującą w mózgu osób z chorobą Alzheimera w miejscach nieprawidłowej fosforylacji Ser199, Ser202, Thr231, Ser393 i Ser404. Proces ten jest aktywowany przez jony Mn^{2+} [58]. Z badań *in vitro* przeprowadzonych przez Ono i współautorów [59] oraz przez Saito i współautorów [60] wynika, że białkowe fosfatazy 2A i 2B defosforylują długą izoformę białka tau w różnych miejscach występowania ufosforylowanej seryny. Białkowa fosfataza 2A defosforyluje tau w miejscu seryny 396, natomiast fosfataza 2B powoduje odszczepienie cząsteczki fosforu od seryny 199 i 202 [59,60]. Nieprawidłowe miejsca fosforylacji Ser46, Ser 199, Ser202, Ser235, Ser396 i Ser404 występujące w chorobie Alzheimera ulegają defosforylacji przy udziale PP2B. Tylko niektóre z wymienionych 6 miejsc fosforylacji mogą być defosforylowane przez pozostałe fosfatazy PP1 i PP2A, co może sugerować, że to fosfataza PP2B jest odpowiedzialna za nieprawidłową defosforylację białka tau w chorobie Alzheimera. Fosfataza PP2C nie defosforyluje żadnego z wcześniej wymienionych miejsc, co sugeruje, że nie bierze ona udziału w defosforylacji ufosforylowanych form białka tau występujących w chorobie Alzheimera, a jedynie defosforyluje białko tau występujące w normie [61].

VII. Hiperfosforylacja tau i tworzenie się PHF

Hiperfosforylacja w krytycznych miejscach białka tau przyłączonego do mikrotubul powoduje dysocjację białka od mikrotubul i depolimeryzację tubuliny [7], co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji mikrotubul (Ryc.2). Odczepione od mikrotubul agregaty tau łączą się w pary, ulegają skręceniu i tworzą PHF. Skutkiem zaburzeń w wiązaniu białka tau do tubuliny, stanowiącej szkielet mikrotubul, i zakłóceń w równowadze pomiędzy różnymi izoformami białka tau jest nagromadzenie się nadmiernych ilości wolnego, wysoce ufosforylowanego białka tau, które z przedziału aksonalnego zostaje przesunięte do przedziału somato-dendrytycznego neuronu. Struktury mikrotubularne nie funkcjonują wówczas prawidłowo, a złogi tau uniemożliwiają transport komórkowy. W rezultacie tego neurony nie są w stanie przekazywać sygnału elektrycznego ani transportować substancji odżywczych i innych ważnych



Transport aksonalny
po szlakach mikrotubul

Stabilizacja mikrotubul
przez białko tau

Fosforylacja tau prowadząca
do depolimeryzacji mikrotubul

Powstawanie PHF i NT

● Fosforylacja tau w krytycznych miejscach

Ryc. 2. Transport aksonalny zachodzi w dużej mierze po szlakach mikrotubul. Białko tau przyłącza się do tubuliny poprzez swoje domeny wiązania z mikrotubulami (R1-4) i stabilizuje je. W wyniku hiperfosforylacji białka tau w specyficznych miejscach łańcucha dochodzi do oddysocjowania białka tau od tubuliny. Tubulina ulega depolimeryzacji a struktury mikrotubularne zostają rozerwane. W wyniku tego neurony nie są w stanie przekazywać sygnałów elektrycznych ani transportować ważnych dla siebie składników w obrębie komórki. Wysoce ufosforylowane cząsteczki białka tau mogą łączyć się w pary, ulegać skręceniu i tworzyć parzyste spiralnie skręcone włóknienka (ang. PHF — *paired helical filaments*). Duże ilości PHF zbijają się, skręcają i tworzą sploty włóknienek nerwowych (ang. NT — *neurofibrillary tangles*). Komórka nerwowa wypełniona splotami staje się komórką martwą.

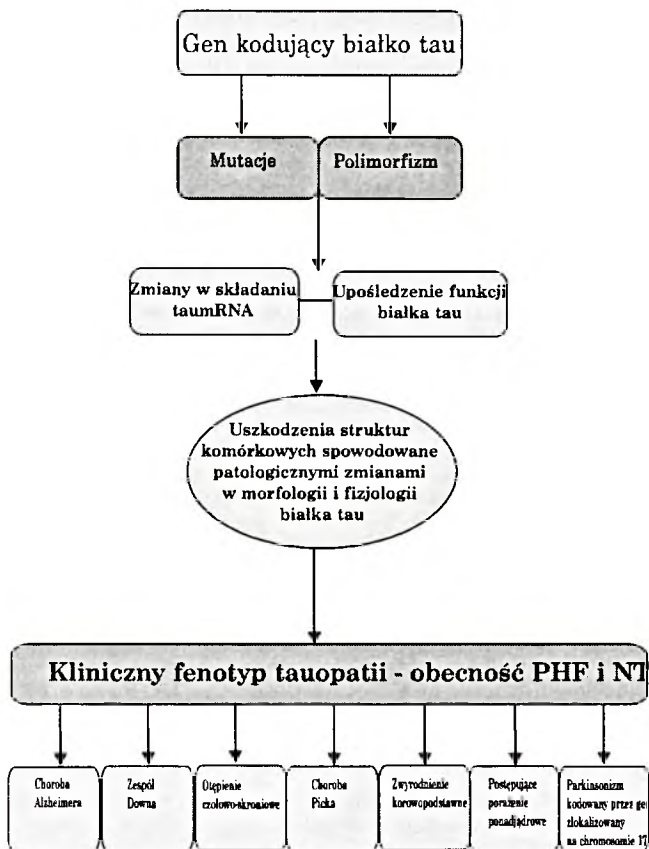
składników w obrębie komórki [3]. W powstawaniu PHF udział biorą izoformy białka tau o ciężarze cząsteczkowym 55, 64, 69 i 74 kDa (Ryc.3). Izoforma Tau55 powstaje w wyniku fosforylacji płodowej izoformy białka tau. Tau64 to efekt fosforylacji izoform o liczbie aminokwasów 383 i/lub 381. Tau69 powstaje wskutek fosforylacji izoformy o liczbie aminokwasów 410 i/lub 412, natomiast Tau74 to wynik fosforylacji najdłuższej izoformy o liczbie aminokwasów 441 [62,63]. Rozkład elektroforetyczny zdefosforylowanych izoform białka tau tworzących PHF jest podobny do rozkładu 6 izoformy powstałych w wyniku alternatywnego składowania tyle, że zajmują one nieco inne pozycje na żelu użytym do analizy [14].

VIII. Rola białka tau w chorobie Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*) jest najczęstszym zespołem otępiennym występującym w populacji osób starych. Charakteryzuje ją stopniowe pogarszanie się funkcji poznawczych, którym towarzyszą szeroko rozprzestrzenione patologiczne zmiany morfologiczne w mózgu. Wymiarowanie neuronów związane jest z odkładaniem się płytek starczych oraz pojawianiem się splotów włóknienek

nerwowych. Patogeneza AD nie jest dokładnie znana, ale wiadomo, że rozwój choroby zależy zarówno od czynników genetycznych, jak i środowiskowych. Obecnie za najbardziej kluczowe czynniki genetyczne uważa się mutacje występujące w genie kodującym presenilinę 1 (PS-1) położonym w chromosomie 14, genie kodującym presenilinę 2 (PS-2) w chromosomie 1 oraz w genie kodującym białko prekursorowe amyloidu (APP, ang. *amyloid precursor protein*) zlokalizowanym w chromosomie 21. Te mutacje towarzyszą odmianie choroby zwanej rodzinną formą choroby Alzheimera (FAD, ang. *Familial Alzheimer's Disease*). Znane są jeszcze inne geny, w których mutacje stanowią czynnik ryzyka w AD. Należą do nich: gen kodujący izoformę apolipoproteiny E (Apo E ε4), gen α2-makroglobuliny, gen kodujący komponent dehydrogenazy α-ketoglutaranowej oraz gen kodujący izoformę K butyrylocholinesterazy, a także kilka genów mitochondrialnych.

Prowadzone w latach osiemdziesiątych badania nad chorobą Alzheimera pozwoliły stwierdzić, że w mózgu chorych, poza złogami blaszek starczych zbudowanych głównie z β-amyloidu, występują również inne zwyrodnienia znajdujące się wewnątrz komórek nerwowych i nazywane splotami włóknienek nerwowych (NT). Zwyrodnienia te przypominają wielo-



Ryc. 4. Polimorfizm lub mutacje zachodzące w genie kodującym ludzkie białko tau doprowadzić mogą do dwóch procesów: 1) zmiany w składaniu tau mRNA lub 2) upośledzenia funkcji tau. W wyniku tych procesów może dochodzić do składania toksycznych izoform białka tau lub zaburzeń w procesach fosforylacji i defosforylacji, prowadzących do powstawania nadmiernych ilości wolnego, wysoce ufosforylowanego białka tau. Zarówno w pierwszym, jak i w drugim przypadku mamy do czynienia z patologicznymi zmianami, które mogą uszkadzać struktury komórkowe zależne od prawidłowej morfologii i fizjologii białka tau, a więc głównie aparat mikrotubularny aksonów. Obecność form PHF i NT w mózгах chorych to kliniczny fenotyp tauopatii. Do tauopatii zaliczamy między innymi: chorobę Alzheimera, zespół Downa, otępienie czołowo-skroniowe, chorobę Picka, postępujące porażenie ponadjądrowe, zwyrodnienie korowo-podstawne oraz Parkinsonizm kodowany przez gen zlokalizowany na chromosomie 17.

PHF obecnych w mózgu pacjentów z AD występują niewielkie ilości Tau74. W postępującym porażeniu ponadjądrowym, otępieniu czołowo-skroniowym i zwyrodnieniu korowo-podstawnym w PHF jest obecny dublet Tau64 i Tau69. Postępujące porażenie ponadjądrowe po raz pierwszy zostało opisane w 1964 roku przez Steele, Richardsona i Olszewskiego [73]. Podobnie jak pozostałe tauopatie jest to heterogenna choroba neurodegeneracyjna, prowadząca do rozwoju zespołu otępienia. W PSP wymieranie neuronów pojawia się po 40 roku życia i obejmuje pięć mózgu oraz mózdzek. Otępienie pojawia się w późniejszym stadium tej choroby.

Zwyrodnienie korowo-podstawne cechuje się powstawaniem PHF w neuronach kory mózgu oraz substancji czarnej. Otępienie czołowo-skroniowe to choroba, w której PHF obserwuje się głównie w korze mózgu. U pacjentów z otępieniem czołowo-skroniowym dochodzi do zmian behawioralnych, zaniku czynności wykonawczych i upośledzenia mowy. Znanych jest około 19 podtypów tej choroby. Natomiast w chorobie Picka PHF utworzone są z pary izoform Tau55 i Tau64. U chorych dochodzi do zaniku płatów czołowych i skroniowych kory mózgu. W chorobie Picka dochodzi do afazji, pojawiają się oznaki otępienia oraz zaburzenia zachowania. W miarę postępowania wszystkich z wymienionych chorób dochodzi do całkowitego zniedołężnienia pacjentów prowadzącego do ich śmierci [15].

X. Podsumowanie

Białko tau należy do rodziny białek związanych z mikrotubulami. W układzie nerwowym występuje sześć różnych jego izoform. W normalnym stanie fizjologicznym białko tau stabilizuje mikrotubule w aksonach neuronów, bierze udział w kotwiczeniu białek enzymatycznych, takich jak kinazy i fosfatazy, moduluje wyrastanie neurytów i przekazywanie sygnałów w komórce oraz reguluje transport pęcherzyków plazmalemalnych po elementach strukturalnych cytoszkieletu komórkowego. Z uwagi na te funkcje odgrywa ono bardzo ważną rolę w procesach plastyczności, zachodzących w układzie nerwowym. Nieprawidłowe modyfikacje białka tau, takie jak hiperfosforylacja, glikacja, oksydacja oraz skracanie łańcucha aminokwasowego mogą zaburzać te procesy i powodować zmiany neurodegeneracyjne, będące przyczyną chorób otępiennych, w tym choroby Alzheimera. Ostatnio znaczenia nabiera pogląd, że przyczyną tych chorób są zaburzenia mechanizmów regulujących tzw. własną organizację strukturalną mózgu (ang. *structural brain self-organization hypothesis*). Hipoteza ta zakłada, że obserwowane w AD zmiany degeneracyjne są wynikiem nieprawidłowego działania tzw. cząsteczek morforegulatorowych (ang. *morphoregulatory molecules*) odpowiedzialnych za utrzymanie właściwych połączeń pomiędzy neuronami, co ma wpływ na regulację przekazywania synaptycznego i procesy plastyczności w mózgu [74]. Badania tych procesów oraz udziału w nich białka tau prowadzi się w nadziei opracowania strategii terapeutycznych, mogących zatrzymać lub spowolnić zmiany otępienne zachodzące u osób dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi. Ustalenie związku pomiędzy tworzeniem się płytek starczych

oraz akumulacją splotów neurofibrylarnych może okazać się kluczem pomocnym w rozpoznawaniu przedklinicznej fazy choroby, a także w określeniu właściwych działań neuroprotektoryjnych możliwych do zastosowania w postępowaniu klinicznym.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych grant 3 PO5A 124 22

Artykuł otrzymano 17 stycznia 2002

Zaakceptowano do druku 23 września 2002

Piśmiennictwo

1. Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA (2000) *Brain Res* 33: 169-178
2. Yano H, Lee FS, Konf H, Chuang JZ, Arevalo JC, Perez P, Sung CH, Chao MV (2001) *J Neurosci* 21: RC125
3. Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) *Trends Cell Biol* 8: 425-427
4. Billingsley ML, Kincaid RL (1997) *J Biochem* 323: 577-591
5. Wojas-Ługowska U, Strzyżewska I, Jerka-Dziadosz M (1998) *Pos Biol Kom* 25: 251-262
6. Marschall LG, Jeng RL, Mullholand J, Stearns T (1996) *J Cell Biol* 134: 443-445
7. Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK (2000) *J Biol Chem* 275: 24977-24983
8. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) *Brain Res* 387: 271-280
9. Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) *Nucleic Acids Res* 23: 3585-3593
10. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) *EMBO J* 8: 393-399
11. Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J, Saper CB (1996) *J Neurochem* 67: 1622-1632
12. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) *Neuron* 3: 519-526
13. Kosik KS, Kowall NW, McKee A (1989) *Ann Med* 21: 109-112
14. Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) *Neuron* 8: 159-168
15. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hoff PR (2000) *Brain Res Rev* 33: 95-130
16. Brandt R, Lee G (1993) *J Neurochem* 61: 997-1005
17. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) *Biochemistry* 31: 10626-10633
18. Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamorthy G (1998) *J Cell Sci* 111: 3167-3177
19. Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG (1996) *J Biol Chem* 271: 18342-18349
20. Jenkins SM, Johnson GV (2000) *J Neurochem* 74: 1463-1468
21. Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) *Neuron* 2: 1615-1624
22. Brandt R, Lee G (1993) *J Neurochem* 61: 997-1005
23. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) *Biochemistry* 33: 9511-9522
24. Schumacher A, Lichtarge O, Schwartz S, Magnuson T (1998) *Genomics* 54: 79-88
25. Simon J, Bornemann D, Lunde K, Schwartz C (1995) *Mech Dev* 53: 197-208
26. Rosner H, Rebhan M, Vacun G, Vanmechelen E (1995) *Int J Dev Neurosci* 13: 607-617
27. Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) *J Biol Chem* 267: 17047-17054
28. Lovestone S, Reynolds CH (1997) *Neuroscience* 78: 309-324
29. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) *J Biol Chem* 270: 823-829
30. Paudel HK, Li W (1999) *J Biol Chem* 274: 8029-8038
31. Roder HM, Fracasso RP, Hoffman FJ, Witowsky JA, Davis G, Pellegrino CB (1997) *J Biol Chem* 272: 4509-4515
32. Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K (1995) *J Neurochem* 64: 1759-1768
33. Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, Lee VMY (1995) *J Biol Chem* 270: 18917-18922
34. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) *EMBO J* 11: 2131-2138
35. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997) *FEBS Lett* 409: 57-62
36. Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH (1997) *J Neurochem* 68: 1736-1744
37. Vulliamt R, Halloran SM, Braun RK, Smith AJ, Lee G (1992) *J Biol Chem* 267: 22570-22574
38. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) *Neurosci Lett* 147: 58-62
39. Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnicka-Worms H, Mandelkow E (1993) *FEBS Lett* 336: 417-424
40. Liu WK, Williams RT, Hall FL, Dickson DW, Yen SH (1995) *Am J Pathol* 146: 228-238
41. Baudier J, Cole RD (1987) *J Biol Chem* 262: 17577-17583
42. Johnson GV (1992) *J Neurochem* 59: 2056-2062
43. Jicha GA, O'Donnell A, Weaver C, Angeletti R, Davies P (1999) *J Neurochem* 72: 214-224
44. Litsersky JM, Johnson GV (1992) *J Biol Chem* 267: 1563-1568
45. Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (1994) *J Biol Chem* 269: 4373-4380
46. Maccioni RB, Otth C, Concha II, Munoz JP (2001) *Eur J Biochem* 268: 1518-1527
47. Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) *Cell* 89: 297-308
48. Ebnet A, Drewes G, Mandelkow E (1999) *Cell Motil Cytoskeleton* 44: 209-224
49. Chin JY, Knowles RB, Schneider A, Drewes G, Mandelkow EM, Hyman BT (2000) *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 966-971
50. Hanks SK, Hunter T (1995) *FASEB J* 9: 576-596
51. Jenkins SM, Johnson GV (1997) *Brain Res* 767: 305-313
52. Buee-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A (1996) *Mol Brain Res* 39: 79-88
53. Garver TD, Harris KA, Lehman RA, Lee VMY, Trojanowski JQ, Billingsley ML (1994) *J Neurochem* 63: 2279-2287
54. Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van de Voorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VMY (1994) *Neuron* 13: 989-1002
55. Soulié C, Lepagnol J, Delacourte A, Caillet-Boudin M L (1996) *Neurosci Lett* 206: 189-192
56. Dudek SM, Johnson GV (1995) *Dev Brain Res* 90: 54-61
57. Pope W, Enam SA, Bawa N, Miller BE, Ghanbari HA, Klein WL (1993) *Exp Neurol* 120: 106-113
58. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) *Neuroscience* 61: 765-772
59. Ono T, Yamamoto H, Tashima K, Nakashima H, Okumura E, Yamada K, Hisanaga S, Kishimoto T, Miyakawa T, Miyamoto E (1995) *Neurochem Int* 26: 205-215
60. Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T, Hisanaga S (1995) *FEBS Lett* 376: 238,242

61. Gong CX, Grundke-Iqbal I, Damuni Z, Iqbal K (1994) *FEBS Lett* **341**: 94-98
62. Sergean N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buee L, Lefranc D, Wattez A, Delacourte A (1997) *J Neurochem* **69**: 834-844
63. Sergean N, Bussiere T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A (1995) *NeuroReport* **6**: 2217-2220
64. Emmerling MR, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Stahel PF, Watson MD, Evans LM, Metha P D, Spiegel K, Kuo YM, Roher AE, Raby CA (2000) *Ann N Y Acad Sci* **903**: 118-122
65. Hardy JA, Higgins GA (1992) *Science* **256**: 184-185
66. Terry R (1998) *J Neural Trans* **53**: 141-145
67. Vickers JC, DickInson TC, Adlard PA, Saunders HL, King CE, McCormack G (2000) *Progress Neurobiol* **60**: 139-165
68. Dowjat WK (2001) *Neurosci* **103**: 1-8
69. Le WD, Xie WJ, Kong R, Appel SH (1997) *J Neurochem* **69**: 978-985
70. Spillantini MG, Goedert M (1998) *Trends Neurosci* **21**: 428-433
71. Forman MS, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2000) *J Chem Neuroanat* **20**: 225-244
72. Vogel G (1998) *Science* **280**: 1524-1525
73. Steele J, Richardson CJ, Olszewski J (1964) *Arch Neurol* **10**: 333-359
74. Arendt T (2001) *Neurosci* **102**: 723-765

Prolaktyna (PRL) – wielofunkcyjny, przysadkowy hormon peptydowy

Prolactin (PRL) — a pituitary peptide hormon of multiple functions

JOANNA MICHALIK¹, ZBIGNIEW BARTOSZEWICZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Gen i struktura prolaktyny ludzkiej
- III. Formy prolaktyny
 - III-1. Warianty genu
 - III-2. Modyfikacje posttranslacyjne
- IV. Mechanizm działania
 - IV-1. Budowa i miejsce występowania receptora hormonu
 - IV-2. Przekazywanie i hamowanie sygnału hormonu
- V. Funkcje biologiczne
 - V-1. Rozmnażanie
 - V-2. Utrzymanie homeostazy
- VI. Biotechnologiczny aspekt otrzymywania hormonu w systemie *in vitro*

Contents:

- I. Introduction
- II. Human prolactin gene and protein structure
- III. Prolactin isoforms
 - III-1. Prolactin gene variants
 - III-2. Prolactin posttranslational modifications
- IV. Mechanism of action
 - IV-1. Structure and distribution of prolactin receptor
 - IV-2. Prolactin signal transduction and inhibition
- V. Biological functions
 - V-1. Reproduction
 - V-2. Homeostasis maintenance
- VI. Biotechnological methods in hormone synthesis by *in vitro* systems

Wykaz stosowanych skrótów: GH — hormon wzrostu, GPRL — glikozylowana prolaktyna, kpz – kilopar zasad, LH – laktogen łożyskowy, PRL – prolaktyna, PRLR — recetor prolaktyny

I. Wstęp

Prolaktyna (PRL), hormon wzrostu (GH) oraz laktogen łożyskowy (LH) należą do rodziny trzech pokrewnych hormonów peptydowych wywodzących się ewolucyjnie ze wspólnego genu, którego wiek szacuje się na 400 milionów lat [1]. Dalsze powolne zmiany sekwencji nukleotydów, głównie duplikacja, delecje i insercje doprowadziły do wytworzenia trzech niezależnie regulowanych genów. Gen ludzkiej prolaktyny zlokalizowany jest u człowieka na chromosomie 6 [2]. Zarówno PRL jak GH występują

powszechnie u wielu gromad kręgowców: ryb, gadów, płazów, ptaków i ssaków [3-6] w tym naczelników [7]. Prolaktyna pochodząca z różnych gatunków charakteryzuje się znacznym stopniem homologii sekwencji aminokwasów w pojedynczym łańcuchu peptydowym i podobnym ciężarem cząsteczkowym. U różnych gatunków ssaków homologia ta dochodzi do 74%, natomiast podobieństwo sekwencji między odległymi gromadami zwierząt jest znacznie niższe i wynosi tylko 36% [8]. Prolaktyna reguluje u człowieka ponad 300 procesów [9,10] i choć pełen zakres jej funkcji nie został jeszcze poznany wiadomo, że podstawową jej rolą jest stymulowanie i podtrzymanie laktacji a także udział w procesie reprodukcji.

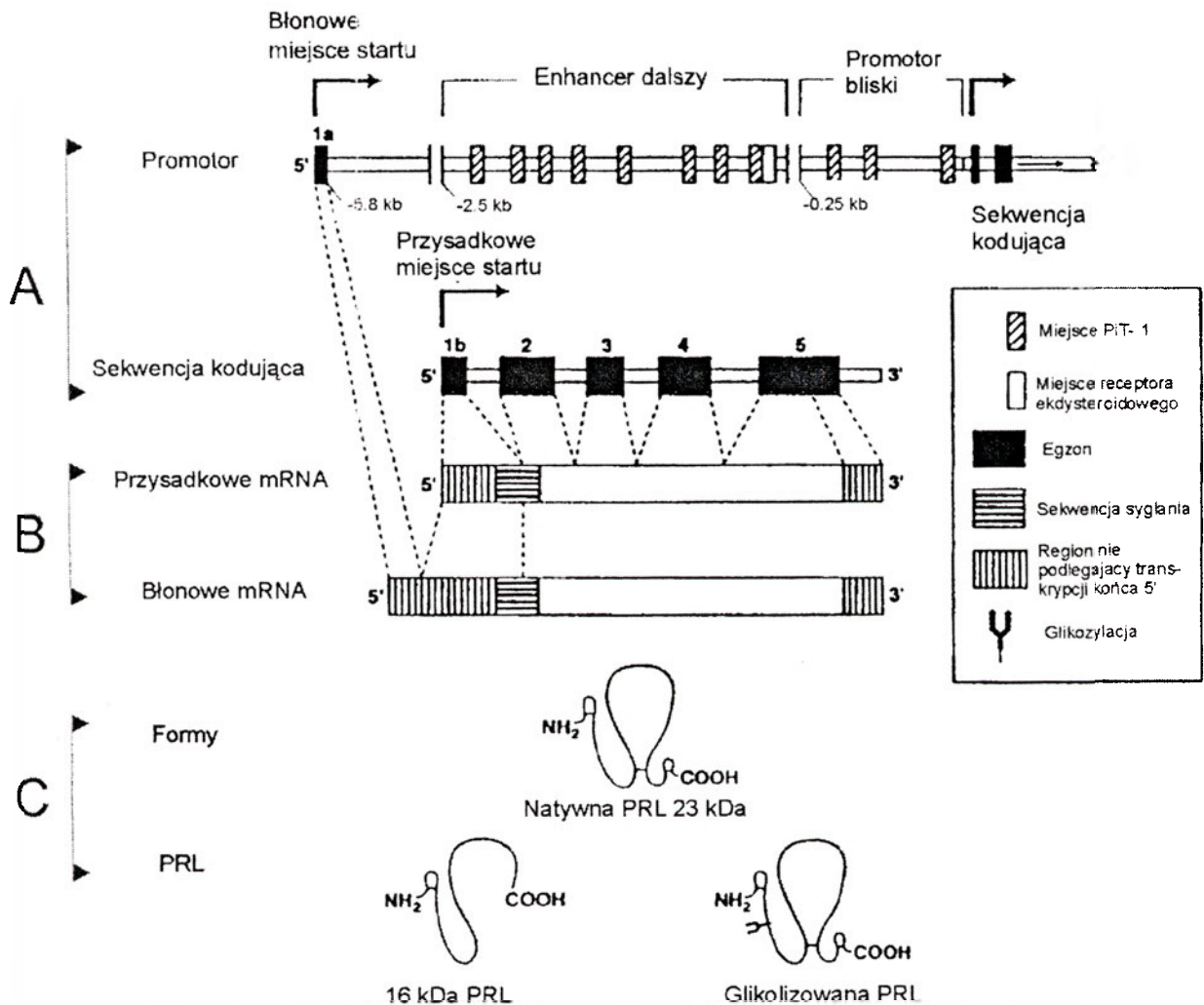
Prolaktyna (PRL) jest hormonem peptydowym syntetyzowanym i wydzielanym głównie przez wyspecjalizowane komórki przedniego płata przysadki mózgowej — komórki laktotropowe, ale występuje również w innych tkankach jak błona doczesna macicy, łożysko, jelito, mózg i tkanki układu immunologicznego. Co więcej — PRL obecna jest w mleku wyższych kręgowców oraz innych płynach ustrojowych człowieka: mózgowo-rdzeniowym i owodniowym [11].

¹Dr hab.; ²dr; ¹Akademia Świętokrzyska, Zakład Genetyki, Świętokrzyska 15, 25-369 Kielce, tel. /041/ 332 37 33 email: joanna.mi@o2.pl; ¹Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów, POLATOM, 05-400 Otwock-Świerk; tel. 718 07 45; e-mail: joanna_mi@poczta.onet.pl; ²Klinika Endokrynologii SP-CSK AM, Banacha 1a, 02-097 Warszawa; ²Zakład Endokrynologii ICMDiK PAN Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

II. Gen i struktura prolaktyny ludzkiej

Gen prolaktyny wielkości 10 kilopar zasad składa się z 5 egzonów i 4 intronów (Ryc.1A). cDNA ludzkiej PRL (914 nukleotydów) koduje prekursor — preprolaktynę zbudowaną z 227 aminokwasów. Sekwencję sygnałną stanowi 28 aminokwasów obecnych na N-końcu cząsteczki prekursora. Model ekspresji genu PRL opracowany został początkowo u

Białko fałduje się samoistnie w obrębie cząsteczki z wytworzeniem mostków dwusiarczkowych. Cztery domeny alfa-helikalne ułożone są tak, że helisy 1 i 2 zajmują położenie antyrównoległe do helis 3 i 4 [14]. Strukturę trzeciorzędową opracowano w oparciu o modelowanie komputerowe i analogie do cząsteczki hormonu wzrostu [15]. Natomiast tworzenie kompleksu receptora PRL z hormonem opisano na podstawie wyników badań krystalograficznych z wyko-



Ryc.1. Schemat budowy genu ludzkiej prolaktyny. Gen (A) oraz mRNA dla PRL trzustkowej i błonowej (B), różniących się wielkością cząsteczki. Struktura trzech form PRL: białka natywnego 23kDa, zmodyfikowanego postranslacyjnie w wyniku cięcia proteolitycznego 16kDa oraz N-glikozylowanego w pozycji 32 łańcucha 23 kDa (C). Schemat zmodyfikowany wg [10].

szczura [12]. Obszar 2-2.5 kpb powyżej 5' końca genu kontroluje zarówno jego ekspresję zależną od hormonu jak i tkankowo-specyficzną [13]. Ostatecznie powstaje w przysadce cząsteczka dojrzałego hormonu w postaci pojedynczego łańcucha peptydowego długości 199 aminokwasów, z których 6 reszt cysteiny tworzy trzy mostki dwusiarczkowe w pozycjach Cys⁴-Cys¹¹, Cys⁵⁸-Cys¹⁷⁴ oraz Cys¹⁹¹-Cys¹⁹⁴ łańcucha (Ryc.1C). Badania rekombinowanej prolaktyny produkowanej w systemie bakteryjnym pozwoliły stwierdzić, że modyfikacje postranslacyjne nie są niezbędne dla zasadniczych funkcji hormonu.

rzystaniem laktogenu łożyskowego, ponieważ prolaktyny nie otrzymano dotychczas w postaci krystalicznej [16].

Badania struktury czwartorzędowej wskazują, że 50% łańcucha aminokwasowego tworzy strukturę α -helikalną, pozostała zaś część uformowana jest w postaci pętli [14].

III. Formy prolaktyny

Powodem występowania różnych form PRL są jej modyfikacje postranslacyjne oraz obecność różnych

wariantów genu prolaktyny wynikająca z występowania więcej niż jednej jego kopii lub alternatywnego składowania genów.

Występowanie różnych form PRL związane jest ze stanem fizjologicznym organizmu.

III-1. Warianty genu

Transkrypcję genu PRL regulują dwa niezależne obszary promotora: region „bliski” kontroluje syntezę PRL specyficzną dla przysadki [17,18], podczas gdy promotor „dalszy” odpowiada za syntezę pozaprzysadkową hormonu [19]. Funkcjonalnie wyróżnić można dwie domeny warunkujące ekspresję genu na terenie przysadki: promotor bliski w pozycji (-250 +33) od miejsca startu transkrypcji i enhancer odległy, zlokalizowany między -1800 a -1300 nukleotydem od miejsca startu transkrypcji [20,21], Ryc.1A. Cztery *cis*-elementy 1P-4P bliskiego promotora i cztery enhancera 1D-4D wiążą sekwencję Pit -1, transaktywującą domenę N-końca i homeodomenę POU, reagującą z sekwencją konsensusową DNA [22]. Model ten ulega pewnej modyfikacji w przypadku genu ludzkiej PRL, w którym istnieje dodatkowy niekodujący egzon 1a, a miejsce startu transkrypcji znajduje się w odległości 5,8 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji na terenie przysadki [23].

III-2. Modyfikacje posttranslacyjne

PRL może ulegać licznym modyfikacjom posttranslacyjnym: proteolizie, glikozylacji, fosforylacji, sulfatacji i deamidacji, może też tworzyć dimery oraz kompleksy z innymi białkami. Modyfikacje te zmieniają jej aktywność biologiczną, wpływają na uwalnianie z komórki oraz szybkość degradacji w płynach ustrojowych.

Glikozylacja jest powszechną formą modyfikacji cząsteczki prolaktyny. Glikozylowana prolaktyna (GPRL) może stanowić do 60 % całej puli tego hormonu. W przeciwieństwie do formy nieglikozylowanej GPRL nie jest magazynowana w organellach komórkowych, a natychmiast po zsyntetyzowaniu uwalniana jest na zewnątrz [23]. Łańcuchy oligosacharydowe zbudowane są najczęściej z glukozy, galaktozy, mannozy, fukozy, N-acetyloglukozoaminy, N-acetylogalaktozoaminy i kwasu N-acetylneuraminowego. Reszty cukrowe mogą być przyłączone do polipeptydu wiązaniem O- lub N-glikozydowym. GPRL występuje u kilkunastu gatunków kręgowców [24, 25], między innymi u człowieka [26], ptaków [27] i gadów [28]. Glikozylacja wpływa na powinowactwo prolaktyny do receptora. Aktywność biolo-

giczna GPRL jest najczęściej obniżona [29, 30]. GPRL człowieka wiąże się z receptorem o 50% słabiej niż jej forma nieglikozylowana [31]. Stwierdzono również spowolnienie usuwania GPRL z osocza w [32]. Modyfikacja ta może być jedną z istotnych form regulacji aktywności prolaktyny.

Fosforylacja grup hydroksylowych seryny lub treoniny PRL zachodzi przy udziale ATP w pęcherzykach wydzielniczych komórek laktotropowych. Zostają one zestryfikowane przez przyłączenie reszty fosforanowej, której donorem jest adenozyntrifosforan. Fosforylacji mogą ulegać również łańcuchy oligosacharydowe GPRL co wiąże się ze zmianą wypadkowego ładunku cząsteczki [33]. Ten typ modyfikacji opisano u wielu kręgowców, [34, 35, 36]. Przyłączenie reszty fosforanowej obniża aktywność biologiczną hormonu [23] i może hamować wydzielanie formy niefosforylowanej z komórek linii GH₃ w przysadce pełniąc rolę autokrynnego regulatora wydzielania prolaktyny. Ponieważ forma niefosforylowana jest również czynnikiem wzrostu dla komórek linii GH₃ fosforylacja hamuje ich proliferację [37].

Sulfatacji może ulegać tyrozyna łańcucha polipeptydowego oraz oligosacharydowa część prolaktyny (najczęściej glukoza, galaktoza i N-acetyloglukozoamina). Modyfikacja ta [38] może wpływać na wiązanie cząsteczki prolaktyny z receptorem.

Deamidację prolaktyny polegającą na usunięciu grupy amidowej z reszt asparaginy lub glutaminy opisano u człowieka [39] oraz innych kręgowców [40, 41, 42]. U gryzoni powoduje ona obniżenie aktywności biologicznej hormonu [41, 42].

Enzymy proteolityczne generują trzy różne formy prolaktyny o masie 14, 16 i 22 kDa. Występujący w podwzgórzcu fragment 14 kDa zawiera część prolaktyny pochodzącą z N-końca cząsteczki [43, 44]. Fragment 16 kDa (pierwszych 148 aminokwasów) powstający w wyniku aktywności kalikreiny-trypsynopodobnej proteazy serynowej indukowanej estrogenami, obserwowano w przysadce gryzoni [42,44] i człowieka [45]. Obie formy — 14 i 16 kDa — hamują angiogenezę wiążąc się z krótką, rozpuszczalną formą receptora [46, 47]. Fragment 22 kDa (pierwszych 173 aminokwasów) powstały w wyniku działania karboksypeptydazy B znaleziono w przysadce samicy szczura. Forma ta zależna najprawdopodobniej od płci jest hamowana przez dopaminę [23, 48] i charakteryzuje się obniżoną aktywnością biologiczną. Proteoliza zachodzi zarówno w tkankach produkujących prolaktynę, jak i w tkankach docelowych.

Agregaty powstałe przez utworzenie wiązań kowalencyjnych lub niekowalencyjnych pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami prolaktyny wykrywane są w przysadce i osoczu. Wiązania kowalencyjne tworzą mostki dwusiarczkowe lub wiązania glikozydowe pomiędzy resztami oligosacharydowymi monomerów hormonu [49]. Polimeryzacja obniża aktywność biologiczną hormonu [23]. Stwierdzono również obecność prolaktyny związanej z białkiem wiążącym prolaktynę (PBP — ang. *prolactin binding protein*), o wysokiej homologii do domeny zewnątrzkomórkowej receptora dla prolaktyny [50]. Prolaktyna może wiązać się również ze skierowanymi przeciw niej przeciwciałami. Znaczenie tej modyfikacji nie jest do końca poznane, jednak istnieją doniesienia, że stymuluje ona proliferację limfocytów [51]. Wzrost poziomu polimerów prolaktyny („big”, o masie 50 kDa i „big-big”, o masie od 170 do ponad 600 kDa) obserwuje się w przebiegu hiperprolaktynemii u ludzi [52-54]

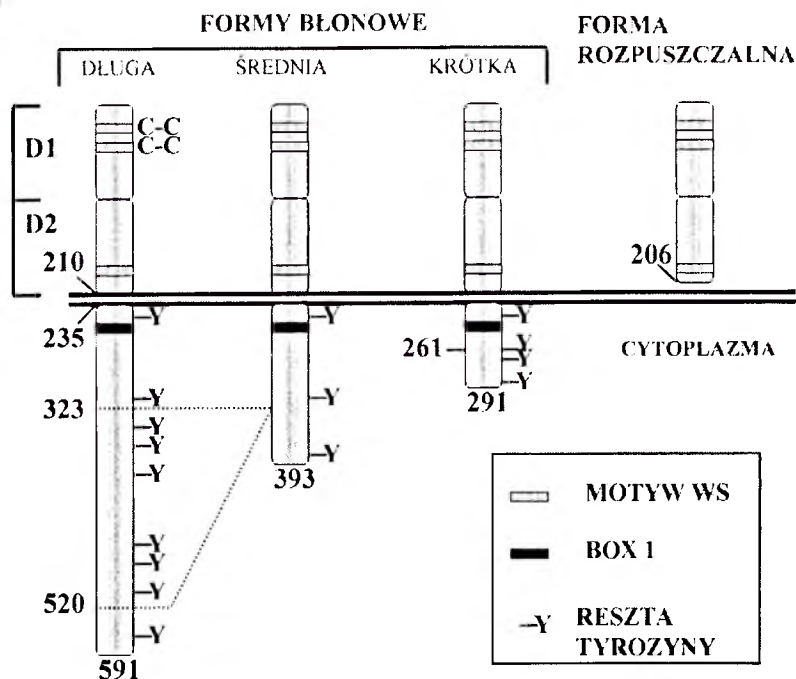
IV. Mechanizm działania

Działanie prolaktyny na tkanki docelowe może następować klasyczną drogą endokrynną, w której syntetyzowany i wydzielany przez gruczoł hormon uwolniony zostaje do krwiobiegu. Wraz z krwią dociera do odpowiednich narządów, łączy się z odpowiednimi receptorami błonowymi i wywiera właściwe sobie efekty. Prolaktyna może też działać w sposób bardziej bezpośredni, z pominięciem etapu uwalniania hormonu do krwi na drodze parakrynowej lub

autokrynowej: jako czynnik wzrostu, neurotransmitter lub immunomodulator [55].

IV-1. Budowa i miejsce występowania receptora hormonu

Receptor prolaktyny (PRLR) jest białkiem transbłonowym należącym do nadrodziny receptorów cytokinowych klasy I. Pomimo niskiej (30%) homologii sekwencji aminokwasowej wykazuje duże podobieństwo, zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne, do receptora hormonu wzrostu [56]. U człowieka zlokalizowany jest również w pobliżu genu receptora hormonu wzrostu na chromosomie 5. Gen PRLR jest zbudowany z przynajmniej 5 egzonów. Posiada trzy tkankowo specyficzne regiony promotorowe (region I odpowiada za jego ekspresję w gonadach, II za ekspresję w wątrobie, III za ekspresję w innych tkankach) [56]. PRLR jest zbudowany z trzech domen: zewnątrzkomórkowej odpowiedzialnej za wiązanie z prolaktyną, transbłonowej kołtwejcej receptor w błonie komórkowej i cytoplazmatycznej odpowiedzialnej za transdukcję sygnału (Ryc. 2). W tkankach występują trzy, różniące się wielkością, domeny cytoplazmatycznej, formy receptora: długa, średnia i krótka. Ich powstawanie jest spowodowane różnicami w miejscach rozpoczęcia transkrypcji oraz alternatywnym składaniem genów [57, 58]. Poza wymienionymi, w osoczu występuje również rozpuszczalna forma PRLR zbudowana z 206 aminokwasów N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej [14] utożsamiana z tzw. białkiem



Ryc. 2. Budowa receptora prolaktyny wg. B o l e - F e y s o t i wsp. [9]. Szczegółowy opis budowy PRLR w tekście pracy.

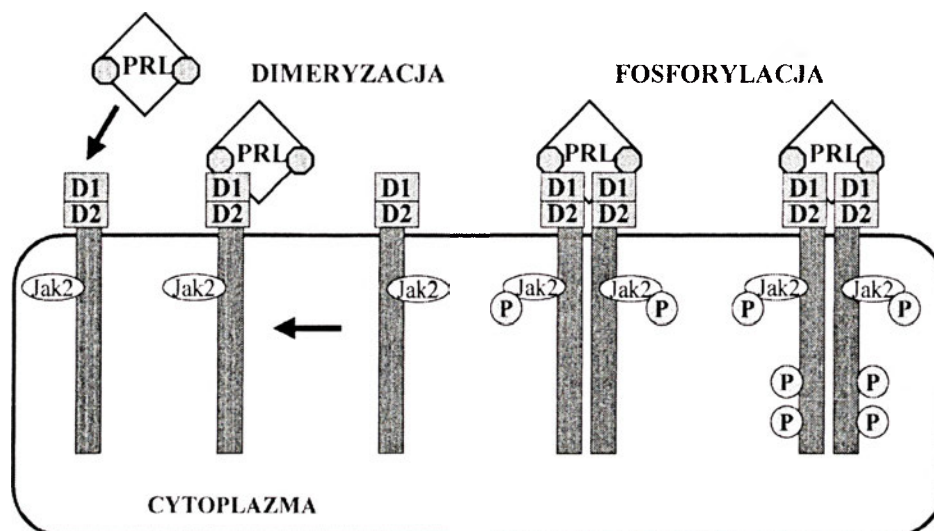
wiążącym prolaktynę PRLbp (ang. *prolactin binding protein*).

Część zewnątrzkomórkowa PRLR składa się z dwóch około 100-aminokwasowych domen D1 i D2 zawierających dwa silnie konserwowane ewolucyjnie miejsca, kluczowe dla wiązania prolaktyny z jej receptorem. Są to cysteiny połączone mostkami dwusiarczkowymi w N-końcowym fragmencie do-

mony płciowe oraz samą prolaktynę a efekt tego wpływu zależy od rodzaju tkanki [9, 61].

IV-2. Przekazywanie i hamowanie sygnału hormonu

Kluczowym procesem dla działania prolaktyny, niezbędnym do przekazania sygnału jest dimeryzacja jej receptora (Ryc. 3). Przyłączenie pierwszej

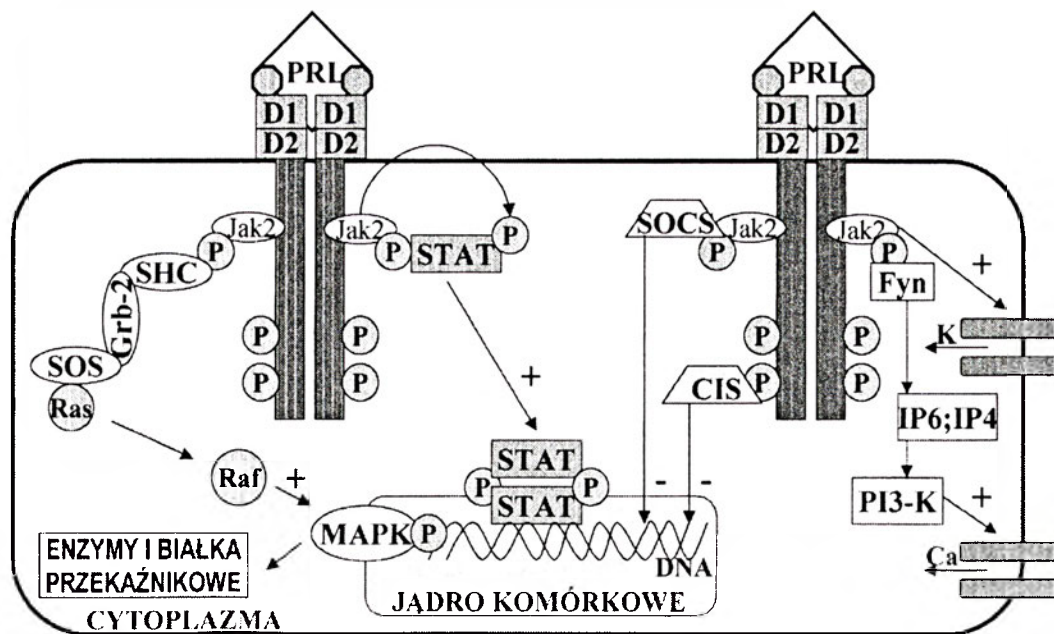


Ryc. 3. Przekazywanie sygnału. Wiązanie PRL z receptorem, dimeryzacja receptora i fosforylacja reszt tyrozyny. Szczegółowy opis w tekście pracy.

meny D1 oraz motyw WS (o sekwencji: tryptofan-seryna-dowolny aminokwas-tryptofan-seryna) przy C-końcowej części domeny D2. Jest to region o wysokiej homologii sekwencji pomiędzy różnymi typami receptorów należących do nadrodziny receptorów cytokinowych, nazywany regionem CRH (region homologii receptorów cytokinowych, ang. *cytokine receptor homology region*) [9]. Część transbłonowa PRLR składa się z krótkiego łańcucha peptydowego o charakterze α -helisy. Część cytoplazmatyczna zawiera dwa rejony o wysokiej homologii między różnymi typami receptorów należącymi do omawianej rodziny — box1 (bogaty w reszty proliny) i nie występujący w formie krótkiej receptora box2 (składający się głównie z aminokwasów hydrofobowych) [9]. Do domeny cytoplazmatycznej dołączone są cząsteczki kinazy. Zwykle domena zewnątrzkomórkowa PRLR posiada połączone z asparaginą łańcuchy oligosacharydowe ułatwiające wiązanie cząsteczki prolaktyny [59]. Formy deglikozylowane PRLR transportowane są do aparatu Golgiego, skąd po ponownej glikozylacji katalizowanej przez transferazę N-acetyloglukozoaminy mogą ponownie zostać przetransportowane do błony komórkowej [59,60]. Obecność PRLR obserwowano u kręgowców prawie we wszystkich tkankach. Ich poziom jest regulowany hormonalnie, między innymi przez hor-

cząsteczki prolaktyny do receptora nie pobudza go, ale powoduje zmianę jego konformacji i uwidocznia na powierzchni drugie miejsce wiążące. Miejsce to zostaje wykorzystane przez cząsteczkę prolaktyny do związania drugiej cząsteczki receptora. Dopiero tak powstały kompleks receptor-prolaktyna-receptor jest w pełni aktywny [9]. Dimeryzacja uaktywnia kinazy tyrozynowe Jak2 (kinazy Janusa 2), związane z fragmentem box1 domeny cytoplazmatycznej receptora, które fosforylują się wzajemnie; jak również fosforylują reszty tyrozynowe receptora (proces ten nie zachodzi na krótkiej formie PRLR). Taka modyfikacja powoduje, że receptor może wiązać białka mające domenę SH2 (domena 2 homologii src) [38, 39, 62] (Ryc. 4). Istnieje kilka dróg przekazywania sygnału indukowanego połączeniem cząsteczki prolaktyny z jej receptorem.

— Ścieżka związana z białkami biorącymi udział w przekazywaniu sygnału i aktywacji transkrypcji STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*). Z 8 opisanych białek należących do rodziny białek STAT, białka 1, 3, 5a oraz 5b biorą udział w przekazywaniu informacji pochodzącej od PRL. Białka STAT posiadają domenę SH2, która przyłącza się do ufosforylowanej tyrozyny w formie długiej receptora lub do kinazy Jak2 w formie krótkiej. Następnie jest ono fosfo-



Ryc. 4. Szlaki przekazywania sygnału w komórce (opis w tekście). Ścieżka wykorzystująca rodzinę białek STAT i kinazy Jak2 w przekazywaniu sygnału hormonalnego. Ścieżka wykorzystująca kinazy MAP i system przekazników Shc/Grb2/SOS oraz Ras/Raf/MAP. Ścieżka oparta na kinazach rodziny Src (c-src oraz Fyn). Hamowanie przekazywania sygnału zachodzi poprzez działanie cytokin SOCS oraz indukowanego przez cytokiny białka CIS.

rylowane przez kinazę Jak2 i oddysocjują od receptora. Ufosforylowane białko STAT tworzy homo- lub heterodimer z innym ufosforylowanym białkiem STAT, łącząc się z jego domeną SH2 przez ufosforylowaną resztę tyrozynową. Tak powstały dimer przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. Oddziałuje tam z motywem GAS — sekwencją aktywowaną przez interferon — (ang. *interferon activated sequence*), który wchodzi w skład promotorów wielu genów) [56, 63].

— Ścieżka związana z kinazami białkowymi aktywowanymi mitogenem MAP (ang. *mitogen activated protein kinase*). Białka adaptorowe Shc/Grb2/SOS (posiadające domeny SH2 i SH3) przyłączają się do ufosforylowanych reszt tyrozynowych formy długiej receptora, pośrednicząc między cząsteczką receptora a kaskadą między cząsteczką receptora a kaskadą Ras/Raf/kinaza MAP [64]. Kinaza MAP aktywuje wiele różnych czynników transkrypcyjnych oraz enzymów.

Prawdopodobnie wyżej opisane ścieżki przekazywania sygnału nie są niezależne.

— Ścieżka związana z kinazą c-src i kinazą Fyn. Niedawno zaobserwowano indukowaną przez prolaktynę szybką fosforylację reszt tyrozynowych w cząsteczkach substratu receptora insuliny IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) oraz w podjednostce kinazy fosfatydyloinozytoli. Obie cząsteczki wydają się być związane z receptorem prolaktyny. Prawdopodobnie w procesie tym pośredniczą ki-

nazy c-src i Fyn należące do rodziny kinaz Src [65].

— Wewnątrzkomórkowe zmiany stężenia jonów. Kinaza Jak2 receptora aktywuje zależne od kinazy tyrozynowej kanały potasowe, zaś C-koniec domeny wewnątrzkomórkowej receptora jest zaangażowany w powstawanie 1,3,4,5-tetrafosforanu inozytoli (IP₄) oraz heksafosforanu inozytoli (IP₆), które to przekazywanie działając poprzez kinazę 3 fosfatydyloinozytoli (PI3-K) powodują otwarcie niezależnych od napięcia kanałów wapniowych [66].

W regulację przekazywania sygnału w komórce są zaangażowane białka hamujące przekazywanie sygnału od cytokin, SOCS (ang. *supressors of cytokine signaling protein*) zawierające domenę SH2. PRL indukuje szybką i krótkotrwałą ekspresję białek SOCS-1 i SOCS-3, które hamują aktywność kinazy Jak2 i aktywację białek STAT. Dłuższe oddziaływanie PRL powoduje ekspresję białka SOCS-2, które najprawdopodobniej podtrzymuje wrażliwość komórki na PRL, hamując białko SOCS-1. Efekt hamujący wywiera również białko zawierające domenę SH2 indukowane przez cytokiny CIS (ang. *cytokine-inducible SH2-containing protein*), które współzawodniczy z białkami STAT o miejsca wiązania z receptorem. Niewielki wpływ hamujący mają również zawierające domenę SH2 fosfatazy tyrozynowe SHP-1 i SHP-2, które powodują defosforylację cząsteczki receptora [67].

V. Funkcje biologiczne

PRL, w przeciwieństwie do innych hormonów przysadkowych, nie uległa specjalizacji we wczesnych stadiach filogenezy i dlatego jej spektrum działania jest niezwykle szerokie. Dotychczas opisano ponad trzysta funkcji pełnionych przez prolaktynę. Być może bardziej odpowiednią nazwą dla tego hormonu jest proponowana w latach siedemdziesiątych wersatilina (od ang. *versatile*). Większość poznanych funkcji prolaktyny związana jest przede wszystkim z utrzymaniem homeostazy organizmu oraz rozmnażaniem [9, 10, 23, 61].

V-1. Rozmnażanie

PRL przysadkowa u ssaków zaangażowana jest w mammogenezę, oraz inicjację i podtrzymanie laktogenezy. U niektórych gatunków ma wpływ na funkcjonowanie ciała żółtego. U szczurów wywiera wpływ luteotropowy, podtrzymując funkcję ciała żółtego poprzez wzrost wydzielania progesteronu [67]. U chomików natomiast, przy braku bodźców seksualnych, prolaktyna wywiera wpływ luteolityczny [68]. Stwierdzono jej wpływ na narządy płciowe. U samic PRL ułatwia implantację zarodka w macicy i pobudza rozwój i dojrzewanie oocytów oraz wpływa na regresję jajników powodując spadek ilości estrogenów [69]. U samców syntetyczna PRL podnosi aktywność jąder i pobudza spermatogenezę [10]. U ptaków PRL stymuluje produkcję ptasiego mleczka poprzez aktywację lipazy lipoproteinowej, dekarboksylazy ornitynowej i pobudzanie ekspresji aneksyny Icp 35 (białka biorącego udział w procesie endocytozy) oraz wzrost ilości podziałów w warstwie rozrodzkiej nabłonka wyściełającego wole [70].

Oddziałując na różne rejony mózgu PRL wpływa na zachowania związane z rozrodem [9] i rodzicielstwem [71]. Podniesienie poziomu PRL wywołuje również hiperfagię [72]. U ptaków wzrost stężenia PRL powoduje wzmożone pobieranie pokarmu, wpływa na budowanie i wzrost częstości odwiedzania gniazd, wysiadywanie jaj, karmienie młodych i przygotowania do migracji [73, 74].

Indukujący wpływ PRL na zachowania rodzicielskie stwierdzono też u niższych kręgowców — u ryb [75]. Indukuje ona opiekę nad ikrą polegającą na stałym wachlowaniu, budowanie gniazd z piany oraz produkcję śluzu służącego do karmienia narybku, wpływa również na migrację ryb [76]. Poziom receptorów prolaktyny w mózgu wzrasta wraz z wiekiem, ekspozycją na estrogeny, wzrostem stężenia PRL w osoczu oraz kontaktem z młodymi [10].

V-2. Utrzymanie homeostazy

Prolaktyna bierze udział w wielu procesach związanych z przyrostem masy ciała i postnatalnym wzrostem organizmu. Jedną z ważniejszych jej funkcji jest wpływ na rozwój żeńskich narządów rozrodczych. U ssaków stwierdzono pobudzający wpływ PRL na proliferację keratynocytów, hepatocytów, nabłonka kanalików nerkowych i nabłonka jelitowego, miocytów naczyń krwionośnych, komórek β wysp Langerhansa, astrocytów oraz limfocytów [9, 68]. U ptaków PRL wpływa na rozwój piór [77], proliferację komórek epitelialnych w wolu [78] oraz spadek masy gonad [79]. U niższych kręgowców PRL hamuje metamorfozę poprzez oddziaływanie na hormony tarczycy. U płazów wpływa na rozwój skrzeli i ogona u kijanek. Podobny wpływ wywiera u ryb podlegających przeobrażeniu. U ryb, płazów i gadów PRL bierze udział w powstawaniu zabarwienia godowego pobudzając proliferację i migrację melanocytów w skórze [9].

U ssaków PRL reguluje procesy energetyczne w neuronach i komórkach gleju poprzez modulację aktywności ATP-az [80]. Prolaktyna reguluje również aktywność enzymów i wydzielanie hormonów związanych z metabolizmem cukrów i lipidów, w wątrobie wzmaga aktywność fosforylasy glikogenu [81], w trzustce pobudza wydzielanie insuliny [82]. Zwiększa ona również aktywność glukokinazy i transportera glukozy GLUT2 [83], powoduje wzrost aktywności lipazy lipoproteinowej [84] i sekrecji żółci w wątrobie [85]. Prolaktyna wzmaga syntezę steroidów [86], prostaglandyn PGE i PGF₂ oraz IGF-1 [87]. Jej udział jest też istotny w utrzymaniu homeostazy wapniowej w komórce [81].

Prolaktyna *in vivo* powoduje wzmożenie odpowiedzi immunologicznej [9]. Usunięcie przysadki mózgowej powoduje zahamowanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej, a podanie egzogennej prolaktyny znosi ten efekt [88]. PRL wywiera wpływ na odpowiedź immunologiczną, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych, oraz bierze udział w powstawaniu chorób autoimmunologicznych [9]. U ssaków stwierdzono, że powoduje ona wzrost masy śledziony i grasicy [89], a także wzrost wydzielania tymuliny w grasicy [90]. Aktywacja limfocytów T przez prolaktynę umożliwia inicjowanie podziałów przez interleukinę 2 oraz mitogeny [95]. Prolaktyna przeciwdziała apoptozie limfocytów [96], aktywuje makrofagi [97], wzmaga cytotoxicność komórek NK i produkcję niszczących patogeny anionów nadtlenkowych [98].

Podwyższony poziom PRL zaobserwowano również podczas odrzucania przeszczepu. Podawanie surowicy antylimfocytarnej zapobiegało jego odrzuceniu [99].

PRL wykazuje również działanie mitogenne np. na komórki limfoblastyczne Nb2. W ich błonie komórkowej występuje wysokie stężenie „średniego” receptora prolaktyny, który po połączeniu z hormonem aktywuje szlak białek STAT. Dimer białek STAT wędruje do jądra komórkowego, gdzie aktywuje PRE (region wiążący się z prolaktyną, ang. *prolactin response element*) α -kazeiny lub IRF-1 (region regulowany przez interferon, ang. *interferon regulatory factor-1*) znajdujący się w promotorach wielu genów. W wyniku aktywacji tych genów dochodzi do podziału komórki. Tę właściwość prolaktyny wykorzystano do określania jej aktywności biologicznej oraz aktywności laktogenicznej innych hormonów [100, 101].

Stwierdzono, że PRL u kręgowców pełni funkcję hormonu osmoregulacyjnego i wpływa na transport różnych substancji (przede wszystkim jonów sodu, chloru i wapnia) oraz wody przez błonę komórek nabłonkowych. Rodzaj wywieranego wpływu zależy od tkanki, gatunku zwierzęcia i jego stanu fizjologicznego [9, 10, 23]. U ssaków PRL hamuje wydalanie jonów sodu i potasu przez nerki, powoduje wzrost wchłaniania wody i soli w jelicie, hamuje utratę jonów sodu i chloru z potem. Ma również wpływ na transport wody przez błonę owodniową. Być może utrzymywanie równowagi wodno-elektrolitowej ma również związek z procesem rozmnażania, poprzez oddziaływanie na transport różnych substancji do rozwijającego się płodu oraz do mleka [9]. U ptaków PRL wpływa na wzrost sekrecji soli przez gruczoły nosowe i wzrost poziomu mocznika w osoczu [102, 103]. Również u niższych kręgowców PRL pełni istotne funkcje osmoregulacyjne. U płazów powoduje wzrost resorpcji wody i jonów sodu w kanalikach nerkowych i pęcherzu moczowym oraz wpływa na transport wody i elektrolitów przez skórę. U ryb słodkowodnych zmniejsza utratę sodu i potasu oraz wchłanianie wody w skrzelach [9].

Fragmety 16 i 14 kDa PRL, oddziałując na specyficzne receptory znajdujące się na komórkach nabłonkowych kapilar, hamują angiogenezę. Właściwość ta jest intensywnie badana pod kątem terapii nowotworów. Forma natywna prolaktyny, niezmienniona przez enzymy proteolityczne wydaje się wpływać na wzrost szybkości angiogenezy [43, 46, 47].

PRL u ssaków jest wydzielana w odpowiedzi na stres. Wykazano również jej wpływ analgetyczny, co

może świadczyć o przystosowaniu w reakcji stresowej. Hormon ten powoduje też zmiany rytmu sen/czuwanie oraz wzrost częstości i długości występowania paradoksalnej fazy snu (REM, ang. *rapid eye movement*). W siatkówce PRL zmniejsza poziom fotoreceptorów oraz receptorów TRH. Jest ona również niezbędna dla prawidłowego rozwoju systemu neuroendokrynowego. Zaobserwowano też wzrost poziomu prolaktyny po wysiłku fizycznym oraz po spożyciu pokarmu, szczególnie bogatego w białko [9, 10].

VI. Biotechnologiczny aspekt otrzymywania hormonu w systemie *in vitro*

Prolaktynę ludzką (hPRL) otrzymywano w kilku układach ekspresyjnych, zarówno prokariotycznym jak i eukariotycznym. System bakteryjny oparty jest na syntezie PRL w komórkach *E. coli*. W komórkach bakterii białko gromadzi się w postaci wyraźnych, licznych granul obecnych na terenie cytoplazmy [104-107]. Produkt otrzymano z dużą wydajnością, jednak pozbawiony jest on modyfikacji posttranslacyjnych, charakterystycznych dla cząsteczki występującej w tkankach eukariontów. Ponadto upłynnienie granul celem wydzielenia i oczyszczenia zrekombinowanej prolaktyny otrzymanej w komórkach bakteryjnych wymaga użycia silnie denaturujących warunków, 6M chlorowodoru guanidyny czy 8M mocznika. Opisany przez Patersona [108] sposób renaturacji białka opiera się na stopniowym i powolnym przywracaniu warunków natywnych środowiska i pozwala na uzyskanie produktu aktywnego biologicznie, lecz jest bardzo pracochłonne. PRL syntetyzowano również w systemach eukariotycznych wykorzystujących komórki mysie [109], HCO (ang. *Chinese hamster ovary*) [110, 111] oraz komórki owadzie w systemie bakulowirusa [112, 113]. Prolaktyna syntetyzowana w komórkach CHO wykazuje wyraźną obecność odmiennej N-glikozylacji. Stwierdzono co prawda w teście z komórkami Nb2, że aktywność biologiczna uzyskanego produktu nie jest niższa od PRL obecnej w tkankach ludzkich, jednak hormon służący jako wzorzec w testach klinicznych czy do celów terapeutycznych nie powinien różnić się od naturalnego białka hPRL występującego w organizmie człowieka. Produkt syntetyzowany w systemie bakulowirusa w komórkach owadzie, sprawdzony w teście z komórkami Nb2 nie wykazuje różnic aktywności w porównaniu z hormonem wyizolowanym z tkanek ludzkich. Otrzymany w ten sposób preparat może stanowić wzorzec używany w testach diagnostycznych. Test *in vivo*

sprawdzający aktywność biologiczną PRL ludzkiej przeprowadzono na skrawkach gruczołu mlekowego królika (Michalik i wsp. w druku). Sposób pozyskiwania hormonu ludzkiego służącego do celów diagnostycznych i terapeutycznych drogą syntezy *in vitro* znacznie obniża koszty otrzymania jego znaczących ilości. Dlatego system bakulowirusa zapewniający uzyskanie produktu z wydajnością 35-40 mg białka/ l medium wydaje się optymalnym systemem pozyskiwania tego hormonu do celów farmakologicznych.

Artykuł otrzymano 8 kwietnia 2002
Zaakceptowano do druku 15 lipca 2002

Piśmiennictwo

- Miller W L, Eberhardt N L (1983) *Endocr Rev* 4: 97-130
- Owerbach D, Rutter W J, Cooke N E, Martial J A, Shows T B (1981) *Science* 212: 815-816
- Mercier L, Rentier-Delrue F, Swennen D, Prunet P, Lion M, Martial J A (1989) *DNA* 8: 119-125
- Rentier-Delrue F, Swennen D, Prunet P, Lion M, Martial J A (1989) *DNA* 8: 261-270
- Watahiki M, Tanaka M, Masuda N, Sugisaki K, Yamamoto M, Yamakawa M, Nagai Yakashima K (1989) *J Biol Chem* 264: 5535-5539
- Miller W L, Coit D, Baxter J D, Martial J A (1981) *DNA* 1: 37-50
- Truong A T, Duez C, Belayew A, Renard A, Picquet R, Bell G I, Martial J A (1984) *EMBO J* 3: 429-437
- Yasuda A, Miyazima K I, Kawauchi H, Peter R E, Lin H R, Yamaguchi K, Sano H (1987) *Gen Comp Endocrinol* 66: 280-290
- Bole-Feysot Ch, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P A (1998) *Endocr Rev* 19: 225-268
- Freeman M E, Kanyicska B, Lenart A, Nagy G (2000) *Physiol Rev* 80: 1523-1631
- Ben-Jonathan N, Mershon J L, Allen D L, Steinmetz R W (1996) *Endocr Rev* 17: 639-669
- Gubbins E J, Maurer R A, Lagrimini M, Erwin C F, Donelson J E (1980) *J Biol Chem* 255: 8655-8662
- Nelson C, Albert V R, Elsholtz H P, Lu L I, Rosenfeld M G (1988) *Science* 239: 1400-1445
- Bewley T A, Li C H (1972) *Biochemistry* 11: 884-888
- Abdel-Meguid S S, Shieh H S, Smith W W, Dayringer H E, Violand B N, Bentle L A (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6434-6437
- Christinger H W, Elkins P A, Sandowski Y, Sakal E, Gartler A, Kossiakoff A A, deVos A M (1998) *Acta Cryst D* 54: 1408-1411
- Berwaer M, Monget P, Peers B, Mathy-Hartet M, Bellefroid E, Davis J R E, Belayew A, Martial J A (1991) *Mol Cell Endocrinol* 80: 53-64
- Peers B, Vos M L, Monget P, Mayhy-Hartet M, Berwaer M, Belayew A, Martial J A (1990) *Mol Cell Biol* 10: 4690-4700
- Berwaer M, Martial J A, Davis J R E (1994) *Mol Endocrinol* 8: 635-642
- Nowakowski B E, Maurer R A (1994) *Mol Endocrinol* 18: 1742-1749
- Gourdji D, Laverriere J N (1994) *Mol Cell Endocrinol* 100: 133-142
- Ingraham H A, Chen R, Mangalam H J, Elsholtz H P, Flynn S E, Lin C R, Simmonds D M, Swanson L, Rosenfeld M G (1998) *Cell* 55: 519-529
- Sinha Y N (1995) *Endocr Rev* 16: 354-369
- Lewis U J, Singh R N P, Lewis L J, Seavey B K, Sinha Y N (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 385-389
- Pankov Y A, Butnev V Y (1986) *Int J Peptide Res* 28: 113-118
- Lewis U J, Singh R N P, Sinha Y N, Van Der Laan W P (1985) *Endocrinology* 116: 359-363
- Corcoran D H, Proudman J A (1991) *Comp Biochem Physiol* 99B: 563-570
- Noso T, Swanson P, Lance V A, Kawauchi H (1992) *In J Pept Protein Res* 39: 250-257
- Markoff E, Sigel M B, Lacour N, Seavey B K, Friesen H G, Lewis U J (1988) *Endocrinology* 123: 1303-1306
- Sinha Y N, DePaolo L V, Haro L S, Singh R N P, Jacobsen B P, Scott K E, Lewis U J (1991) *Moll Cell Endocrinol* 80: 203-213
- Haro L S, Lee D W, Singh R P N, Bee G, Markoff E, Lewis U J (1990) *J Clin Endocrinol Metab* 71: 379-383
- Carlson H E, Markoff E, Lee D W (1992) *Fertil Steril* 58: 78-87
- Greenen J R, Balden E, Ho T W C, Walker A M (1989) *Endocrinology* 125: 2041-2048
- Oetting W S, Tazoun P T, Traugh J A, Walker A M (1986) *J Biol Chem* 261: 1649-1652
- Brooks C L, Kim B G, Aphale P, Kleeman B E, Johnson B C (1990) *Moll Cell Endocrinol* 71: 117-123
- Aramburo C, Monteil J L, Proudman J A, Berghman L R, Scanes C G (1992) *J Mol Endocrinol* 8: 83-191
- Ho T W C, Leong F S, Olaso C H, Walker A M (1993) *Neuroendocrinology* 58: 160-165
- Kohli R, Chadha N, Muralidhar K (1988) *FEBS Letters* 242: 134-143
- Nyberg F, Ross P, Wide L (1980) *Biochim Biophys Acta* 625: 255-265
- Cheng C H K, Wong T M, Blake J, Li C H (1981) *Int J Peptide Protein Res* 18: 343-347
- Sinha Y N, Baxter S R (1979) *Biochim Biophys Res Commun* 86: 325-330
- Sinha Y N, Gilligan T A (1981) *Endocrinology* 108: 1091-1094
- Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez F J, Nagano M, Kelly P A, Majia S, Morales M A, Martinez de la Escalera G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10384-10388
- Mittra I A (1980) *Biochim Biophys Res Commun* 95: 1750-1759
- Sinha Y N, Gilligan T A, Lee D W, Hollingsworth D, Markoff E (1985) *J Clin Endocrinol Metab* 60: 239-243
- Clapp C, De la Escalera G M (1997) *Physiol Sci* 12: 231-237
- Clapp C, Martial J A, Guzman R C, Rentier-Delrue F, Weiner R I, (1993) *Endocrinology* 133: 1292-1299
- Anthony P K, Stoltz R A, Pucci M L, Powers C A (1993) *Endocrinology* 132: 806-814
- Mena F, Hummelt G, Aguyano D, Clapp C, Martinez de la Escalera G (1992) *Endocrinology* 130: 3365-3377
- Cohen H, Guillaumot P, Sabbagh I (1993) *Endocrinology* 132: 2601-2606
- Walker A M, Montgomery D W, Ho T W C (1992) *Program of the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society*, Las Vegas, NV, 1993, 163 (abstract)
- Cavaco B, Leite V, Santos M A, Arranhado E, Sobrinho L G (1995) *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2342-2346
- Krzeska D, Skórka B, Bartoszewicz Z (1997) *Endokrynologia Polska* 48: 135-150
- Jeske W, Zdunowski P, Bartoszewicz Z, Kondracka A, Gorzelak K, Zgliczyński W, Szczupacka I (2000) *Endokrynologia Polska* 51: 237-248
- Goncikowska E, Sotowska-Brochocka J (2002) W: Sotowska-Brochocka (red) *Fizjologia zwierząt — zagadnienia wybrane*, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa str 187-217

56. Goffin V, Bouchard B, Ormandy C J, Weimann E, Ferrag F, Touraine P, Bole-Feysot C, Maaskant R A, Clement-Lacroix P, Edery M, Binart N, Kelly P A (1998) *Ann NY Acad Sci* **840**: 498-509
57. Hu Z, Zhuang L, Meng J, Dufau M L (1998) *J Biol Chem* **273**: 26225-26235
58. Hu Z, Dufau M L (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 219-225
59. Butaeu H, Pezet A, Ferrag F, Perrot-Appianat M, Kelly P A, Edery M (1998) *Mol Endocrinol* **12**: 544-555
60. Bolander F F Jr (1999) *Moll Cell Endocrinol* **149**: 85-92
61. Horseman N D (2001) W: DeGroot H (red) *Endocrinology* W B Saunders, Philadelphia str, 209-220
62. Rui H, Djeu J Y, Evans G A, Kelly P A, Farrar W L (1992) *J Biol Chem* **267**: 24076-24081
63. Jabbour H N, Critchley H O, Boddy S C (1998) *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2545-2553
64. Buckley A R, Rao Y-P, Buckley D J, Gout P W (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 1158-1164
65. Berlanga J J, Gualillo O, Buteau H, Appianat M, Kelly P A, Edery M (1997) *J Biol Chem* **272**: 2050-2052
66. Ratovondrahona D, Fahmi M, Fournier B, Odesa M F, Skryma R, Prevarskaya N, Djiane J, Dufy B (1998) *J Mol Endocrinol* **21**: 85-95
67. Pezet A, Favre H, Kelly P A, Edery M (1999) *J Biol Chem* **274**: 24497-24502
68. Freeman M E (1994) W: Knobil E, Neill J D (red) *Physiology of Reproduction* New York: Raven, str, 613-658
69. Greenwald G S (1967) *Arch Anat* **86**: 281-291
70. Zadworny D, Shimada K, Ishida H, Sato K (1989) *Gen Comp Endocrinol* **75**: 468-473
71. Horseman N D, Buntin J D (1995) *Ann Rev Nutr* **15**: 213-238
72. Dutt A., Kaplitt M G, Kow L-M, Pfaff D W (1994) *Neuroendocrinology* **59**: 413-419
73. Gerardo-Gettens T, Moore B J, Stern J S, Horwitz B A (1989) *Am J Physiol* **256**: 276-280
74. Buntin J D, Advis J P, Ottinger M A, Lea R W, Sharp P J (1999) *Gen Comp Endocrinol* **114**: 97-107
75. Meier A H, Farner D S., King J R (1965) *Anim Behav* **13**: 453-465
76. Blüm V, Fiedler K (1965) *Gen Comp Endocrinol* **5**: 186-196
77. Lam T J, Hoar W S (1967) *Can J Zool* **45**: 509-516
78. Nicolls C S (1974) W: Knobil E, Sawyer W H (red) *Handbook of Physiology*, Washington DC, str, 253-292
79. Anderson T R (1984) *Gen Comp Endocrinol* **54**: 236-246
80. Kumaran B, Gunasekar P G, Aruldas M M (1989) *Ind J of Exp Biol* **27**: 17-19
81. Villalba C M, Zabala M T, Martinez-Serrana A, de la Colina R, Satrustegui J, Garcia-Ruiz J P (1991) *Endocrinology* **129**: 2857-2861
82. Curry D L, Bennett L L, Li C H (1975) *J Endocrinol* **65**: 245-251
83. Weinhaus A J, Stout L E, Sorenson R I (1996) *Endocrinology* **137**: 1640-1643
84. Machida T, Taga M, Minaguchi H (1990) *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* **16**: 161-165
85. Liu Y, Hyde J F, Vore M (1992) *J Pharmacol Exp Ther* **261**: 560-566
86. Glasow A, Breidert M, Haidan A, Anderegg U, Kelly P A, Bornstein S (1996) *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 3103-3111
87. Dave J R, Brown N V, Knazek R A (1982) *Biochem Biophys Res Commun* **108**: 193-199
88. Nagy E, Berczi I (1981) *Allergy* **36**: 479-481
89. Berczi I, Nagy E, de Toledo S M, Matusik R J, Friesen H G (1991) *J Immunol* **146**: 2201-2206
90. Dardenne M, Savino W, Gagnerault M C, Itoh T, Bach J F (1989) *Endocrinology* **125**: 3-12
91. Nagy E, Berczi I, Friesen H G (1983) *Acta Endocrinol (Copenh)* **102**: 351-357
92. Gala R R, Shevach E M (1993) *Proc Soc Exp Biol Med* **204**: 224-230
93. Bellone G, Genua M, Carbone A, Silvestri S, Steinmetz R W (1995) *J Cell Physiol* **163**: 221-231
94. Gagnerault M C, Touraine P, Savino W, Kelly P A, Dardenne M (1993) *Immunol* **150**: 5673-5681
95. Sabharwal P, Glaser R, LaFuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley K W, Malarkey W B (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7713-7716
96. LaVoie H A, Witorsch R J (1995) *Proc Soc Exp Biol Med* **209**: 257-269
97. Bernton E W, Meltzer M S, Holaday J W (????) *Science* **239**: 401-404
98. Cesano A, Oberholtzer E, Contarini M, Geuna M, Bellone G, Matera L (1994) *Immunopharmacology* **28**: 67-75
99. Rosso di san Secondo V E M, Fitch C A, Aniasi A, Close F T, Sirchia G, Freeman M E (1996) *Transplant Proc* **28**: 3193-3195
100. Yu-Lee L Y (1997) *Exp Biol Med* **215**: 35-52
101. Kirken R A, Malabarba M G, Xu J, Liu X, Farrar W L, Hennighausen L, Larner A C, Gimley P M, Rui H (1997) *J Biol Chem* **272**: 14098-14103
102. Roberts J R, Dantzler W H (1992) *Am J Physiol* **262**: 933-937
103. Peaker M J, Philips J G, Wright A (1970) *J Endocrinol*: 123-127
104. Paris N, Rentier-Delrue F, Defontaine A, Goffin V, Lebrun J J, Mercier L, Martial J A (1990) *Biotechnol Appl Biochem* **12**: 436-449
105. Cunningham B C, Henner D J, Wells J A (1990) *Science* **247**: 1461-1465
106. Gilbert M S, Lowry P J, Castro M G, Woods R J, Savva D (1991) *Int J Biochem* **23**: 107-114
107. Hiraoka Y, Nomata Y, Matsuo K, Tsubata N, Tanabe K, Fukusawa T (1991) *Mol Cel Endocrinol* **81**: 147-154
108. Paterson F C, Anderson P J, Berlinger L J, Brooks C L (1999) *Prot Expres Purific* **15**: 16-23
109. Price AE, Logvinenko KB, Higgins EA, Cole ES, Richards SM (1995) *Endocrinology* **136**: 4827-4833
110. Morganti L, Huyer M, Gout P W, Bartolini P (1966) *Biotechnol Appl Biochem* **23**: 67-75
111. Soares C R J, Morganti L, Miloux B, Lupker J H, Ferrara P, Bartolini P (2000) *Biotechnol Appl Biochem* **32**: 127-135
112. Das T, Johns P W, Goffin V, Kelly P, Kelder B, Kopchick J, Buxton K, Mukerji P (2000) *Prot Expres & Purific* **20**: 265-273
113. Stokovskaya L, Bartoszewicz Z, Szofajska E, Kikhno I, Solomko A, Michalik J (2001) *Prot Expres & Purific* **24**: 242-248

Biologiczna aktywność galaniny i jej znaczenie w procesach fizjologicznych i patologicznych

Biological action of galanin and its significance in physiological and pathological processes

JAROSŁAW RUCZYŃSKI¹, PIOTR REKOWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odkrycie galaniny
- III. Receptory galaniny
- IV. Mechanizmy działania galaniny
- V. Funkcje biologiczne galaniny
 - V-1. Wpływ galaniny na funkcję wewnątrzwydzielniczą trzustki
 - V-2. Wpływ galaniny na aktywność mięśni gładkich przewodu pokarmowego
 - V-3. Wpływ galaniny na wydzielanie hormonów przysadki
 - V-4. Galanina, a procesy neuropsychiatryczne
 - V-5. Galanina, a efekty przeciwbólowe
 - V-6. Wpływ galaniny na pobieranie pokarmów
 - V-7. Inne biologiczne aktywności galaniny
- VI. Agony i antagony galaniny
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: Ach — acetylocholina; ACTH — kortykotropina; ATP — adenozynotrifosforan; cAMP — cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; CD — spektroskopia dichroizmu kołowego; DAG — 1,2-diacylglicerol; FRET — fluorescencyjny rezonansowy transfer energii; FSH — folikulotropina; GAL — galanina; GH — hormon wzrostu; GMAP — peptyd informacyjny towarzyszący galaninie; IP3 — 1,4,5-trifosforan inozytolu; IR — spektroskopia w podczerwieni; Kd — równowagowa stała wiązania kompleksu ligand-receptor; LH — lutropina; NMR — spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; PRL — prolaktyna; RINm5F — linia komórkowa szczurzych wysp trzustkowych; TFE — 2,2,2-trifluoroetanol; VIP — naczyniowoczynny peptyd jelitowy.

¹Mgr, ²prof. dr hab., Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk, ¹e-mail: jarecki@chemik.chem.univ.gda.pl, ²e-mail: rekowski@chemik.chem.univ.gda.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery of galanin
- III. Galanin receptors
- IV. Mechanisms of galanin action
- V. Biological functions of galanin
 - V-1. Effect of galanin on endocrine function of pancreas
 - V-2. Effect of galanin on gastrointestinal smooth muscles activity
 - V-3. Effect of galanin on pituitary hormone secretion
 - V-4. Galanin and neuropsychiatric processes
 - V-5. Galanin and analgetic effects
 - V-6. Effect of galanin on food consumption
 - V-7. Other biological activities of galanin
- VI. Galanin agonists and antagonists
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

W 1983 roku w laboratorium Victora Mutta w Sztokholmie wyizolowano z tkanek przewodu pokarmowego świni nowy, biologicznie czynny peptyd, który nazwano galaniną [1]. Galanina (GAL) jest neuropeptydem o szerokim spektrum aktywności biologicznej. GAL moduluje działanie hormonów przysadki, wpływa na sekrecję insuliny, procesy pamięciowe, łaknienie, odczuwanie bólu i zachowania seksualne [2]. Znana jest także jako modulator funkcji motorycznych mięśni przewodu pokarmowego. Możliwość zastosowania galaniny oraz jej analogów (szczególnie tych o charakterze antagonistycznym) w terapii oraz diagnostyce medycznej czynią galaninę obiektem intensywnych badań wielu laboratoriów. Niniejsza praca stanowi przegląd literaturowy dotyczący budowy, funkcji biologicznych oraz mechanizmów działania galaniny, a także receptorów galaniny i ich ligandów.

II. Odkrycie galaniny

Galanina jest amidem 29-peptydu, nie wykazującym homologii z żadnym znanym neuropeptydem [1]. Nazwa tego peptydu wywodzi się z nazwy N-końcowego aminokwasu glicyny oraz C-końcowego aminokwasu alaniny [1]. Opisano wiele odmian gatunkowych galaniny. Wszystkie, z

do wody zaobserwowano, rozpoczynający się od C-końca galaniny, wyraźny proces zanikania konformacji α -helikalnej [11].

Galanina jest ewolucyjnie starym, dobrze zachowanym peptydem, obecnym w tkankach wielu narządów ludzi i zwierząt [1-7]. Neuropeptyd ten znaleziono zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Występuje w rdzeniu krę-

Tabela 1

Struktury pierwszorzędowe znanych galanin niektórych kręgowców [1-7]

Gatunek	SEKWENCJA AMINOKWASOWA
Człowiek	GWTLNSAGYLLGPHA VGNHRFSFSDKNGLTS-COOH
Świnia	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHDKYGLA-NH ₂
Pies	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHEKPGLT-NH ₂
Owca	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHDKHGLA-NH ₂
Krowa	GWTLNSAGYLLGPHA LDSHRFQDKHGLA-NH ₂
Szczur	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRFSFSDKHGLT-NH ₂
Mysz	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRFSFSDKHGLT-NH ₂
Kurczak	GWTLNSAGYLLGPHA VDNHRSFNDKHGFT-NH ₂
Aligator	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFNEKHGIA-NH ₂
Żaba	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFNDKHGLA-NH ₂
Pstrąg	GWTLNSAGYLLGPHG IDGHRTLSDKHGLA-NH ₂
Bowfin*	GWTLNSAGYLLGPHA VDNHRSLNDKHGLA-NH ₂

*prastara ryba północnoamerykańska

wyjątkiem galaniny pstrąga, mają identyczny N-końcowy fragment 1-15 (Tabela 1) [1-7]. Galanina z tkanki człowieka jest 30-peptydem, z wolną grupą karboksylową na C-końcu. GAL powstaje z białka prekursorowego — preprogalaniny (prepro-GAL), zbudowanej z 123/124 (w zależności od odmiany gatunkowej) reszt aminokwasowych [8, 9]. W wyniku działania enzymów proteolitycznych z prepro-GAL powstaje galanina oraz składający się z 59/60 reszt aminokwasowych peptyd informacyjny towarzyszący galaninie (GMAP) [8, 9].

Strukturę GAL badano przy pomocy technik spektroskopowych: NMR, IR, CD, FRET oraz teoretycznych metod dynamiki molekularnej (MD), np. Monte Carlo [10-14]. Zaobserwowano, że w środowisku wodnym GAL nie wykazuje uporządkowanej struktury drugorzędowej [11, 12]. Natomiast w środowisku niewodnym (np. w 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE), który symuluje środowisko błony komórkowej) GAL przyjmuje strukturę helikalną. Stwierdzono obecność dwóch α -heliksów połączonych zgięciem, utworzonym przez Pro w pozycji 13 [12, 13]. Dane eksperymentalne potwierdzają wyniki otrzymane metodami dynamiki molekularnej. Podczas symulowanego przejścia ze środowiska niewodnego (TFE)

gowym, podwzgórze, miejscu sinawym, hipokampie (rogu Ammona), ciele prądkowym i opuszce węchowej [2, 4, 8]. Obecność GAL wykryto w tkankach wielu narządów układu oddechowego, pokarmowego, moczowo-płciowego oraz w autonomicznych zwojach nerwowych unerwiających serce, nerki, wątrobę i śledzionę [2, 4, 8]. Tabela 2 przedstawia funkcje GAL związane z miejscami jej występowania [4, 8].

III. Receptory galaniny

Receptor galaninowy jest sprzężoną z białkiem G glikoproteiną o masie cząsteczkowej 54 kDa [15]. Galanina wykazuje silne powinowactwo do swoich receptorów. Wartość K_d (równowagowa stała wiązania ligand-receptor) kompleksu galanina-receptor wynosi 0.8 nM. Nie zaobserwowano współzawodnictwa o wiązalność z receptorami GAL ze strony takich peptydów jak: naczyniowoczynny peptyd jelitowy (VIP), glukagon, insulina, substancja P i neurotensyna [15].

Badania przeprowadzone z użyciem hybrydowych analogów GAL zawierających jej N-końcowy fragment (1-13) połączony z C-końcową częścią in-

Tabela 2

Funkcje galaniny związane z miejscem jej występowania [4, 8]

OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY		OBWODOWY UKŁAD NERWOWY	
REGION	FUNKCJA	REGION	FUNKCJA
Podwzgórze	<ol style="list-style-type: none"> 1. Regulowanie procesu pobierania pokarmu 2. Stymulowanie procesu wydzielania hormonu wzrostu 3. Hamowanie procesu wydzielania kortykosteronu 	Trzustka	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hamowanie indukowanego glukozą wydzielania insuliny
Miejsce sinawe	<ol style="list-style-type: none"> 1. Udział w blokowaniu neuronów produkujących noradrenalinę 2. Udział w procesie hiperpolaryzacji 	Komórki RINm5F	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hamowanie wydzielania insuliny i somatostatyny
Hipokamp (róg Ammona)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hamowanie procesu wydzielania acetylocholino 2. Hamowanie obrotu metabolicznego fosfoinozytydu współpracującego z receptorem muskarynowym 3. Udział w procesie zamykania kanałów wapniowych 	Część lędźwiowa rdzenia kręgowego	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tłumienie odruchów na bodźce wywołujące ból
Ciało prądkowane	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stymulowanie procesu wydzielania acetylocholino 	Mięśnie gładkie	<ol style="list-style-type: none"> 1. Wpływ na funkcje motoryczne

nego peptydu, np. substancji P, umożliwiły wysunięcie hipotezy występowania podtypów receptorów GAL [5, 16]. W zależności od miejsca działania hybrydowe peptydy wykazywały działanie antagonistyczne (np. w przysadce, hipokampie) lub agonistyczne (np. w mięśniach gładkich przewodu pokarmowego) względem galaniny. Wyniki badań sugerowały obecność receptorów GAL różnych podtypów aktywujących odmienne, lecz specyficzne dla każdego podtypu receptora, wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe [5, 16].

W 1994 roku sklonowano po raz pierwszy receptor ludzkiej galaniny, oznaczony jako GALR1 [17]. GALR1 zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego 349 reszt aminokwasowych oraz z siedmiu domen wbudowanych w błonę plazmatyczną komórki. Zlokalizowano również miejsca odpowiedzialne za wiązanie się galaniny z receptorem [18]. Stwierdzono, że wolna grupa aminowa reszty Gly¹ galaniny oddziałuje za pomocą wiązań wodorowych z resztą Glu²⁷¹ receptora. Ponadto reszta Trp² galaniny oddziałuje z wrażliwą na obecność jonów Zn²⁺ parą reszt His²⁶⁴ i His²⁶⁷, zlokalizowaną w domenie VI receptora, zaś reszta Tyr⁹ w cząsteczce galaniny uczestniczy w oddziaływaniach hydrofobowych z resztą Phe²⁸², obecną w domenie VII receptora. Ostatnie badania potwierdzają hipotezę na temat oddziaływań pomiędzy receptorem, a resztami: Trp² i Tyr⁹, w cząsteczce galaniny [19]. Su-

geruje się, że Gly¹ w cząsteczce galaniny oddziałuje raczej z resztą Phe¹¹⁵ receptora, a nie z Glu²⁷¹, jak przypuszczano wcześniej.

Obecnie znane są 3 podtypy receptorów galaninowych: GALR1, GALR2 oraz GALR3 [17, 20-23]. Drugi podtyp, oznaczany jako GALR2, zbudowany jest z 372 reszt aminokwasowych i wykazuje 40% homologii w sekwencji z GALR1. W odróżnieniu od GALR1, GALR2 wykazuje duże powinowactwo do fragmentu GAL(2-29)NH₂ sugerując, że reszta Gly¹ nie jest istotna w tworzeniu kompleksu GAL-GALR2 [20-22]. GALR2 jest szeroko rozpowszechniony w ośrodkowym układzie nerwowym i tkankach obwodowych (płuca, serce, śledziona, wątroba, mięśnie szkieletowe, jelito cienkie), podczas gdy GALR1 występuje tylko w mózgu i rdzeniu kręgowym [20, 21]. Trzeci podtyp, oznaczany jako GALR3, zbudowany jest 368 reszt aminokwasowych i wykazuje 36% homologii w sekwencji z GALR1 oraz 54% homologii w sekwencji z GALR2 [20, 21, 23]. GALR3, podobnie jak GALR2, wykazuje wysokie powinowactwo do fragmentu GAL(2-29)NH₂ [20-21]. Stwierdzenie również, że obecność C-koncowego fragmentu GAL, tzn. obecność reszt aminokwasowych znajdujących się w pozycjach: 17, 18, 19 jest ważna dla zachowania wysokiego powinowactwa do receptora GALR3 [20, 21].

Wyróżnione dotychczas trzy podtypy receptorów GAL klasyfikuje się na podstawie różnego powinowactwa do receptora GALR3 [20, 21].

wactwa do fragmentów GAL(2-29) i GAL(1-16) [20-24]. GAL(2-29) wiąże się do GALR2 i GALR3 z wysokim powinowactwem, w przeciwieństwie do niskiego powinowactwa GALR1. GAL(1-16) wiąże się z GALR1 i GALR2 z wysokim powinowactwem, a jej powinowactwo do GALR3 jest znacznie niższe [24]. Obecność receptorów GAL różnych podtypów sugeruje, że pośredniczą one w różnych procesach biochemicznych. Prawdopodobnie jest to rezultat funkcjonowania różnych, lecz charakterystycznych dla każdego podtypu receptora, wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Mimo sklonowania trzech podtypów receptorów galaninowych, nie są jeszcze znane mechanizmy oddziaływania tych receptorów z białkami G.

IV. Mechanizmy działania galaniny

Efekty biologiczne wywoływane przez galaninę są wynikiem oddziaływania tego neuropeptydu z receptorami GAL różnych podtypów, które poprzez białka G przekazują sygnał na różne układy efektorowe powodując kompleksową odpowiedź komórki. Wyróżniono kilka mechanizmów działania galaniny (Ryc. 1). Stwierdzono, że biologiczna aktywność ga-

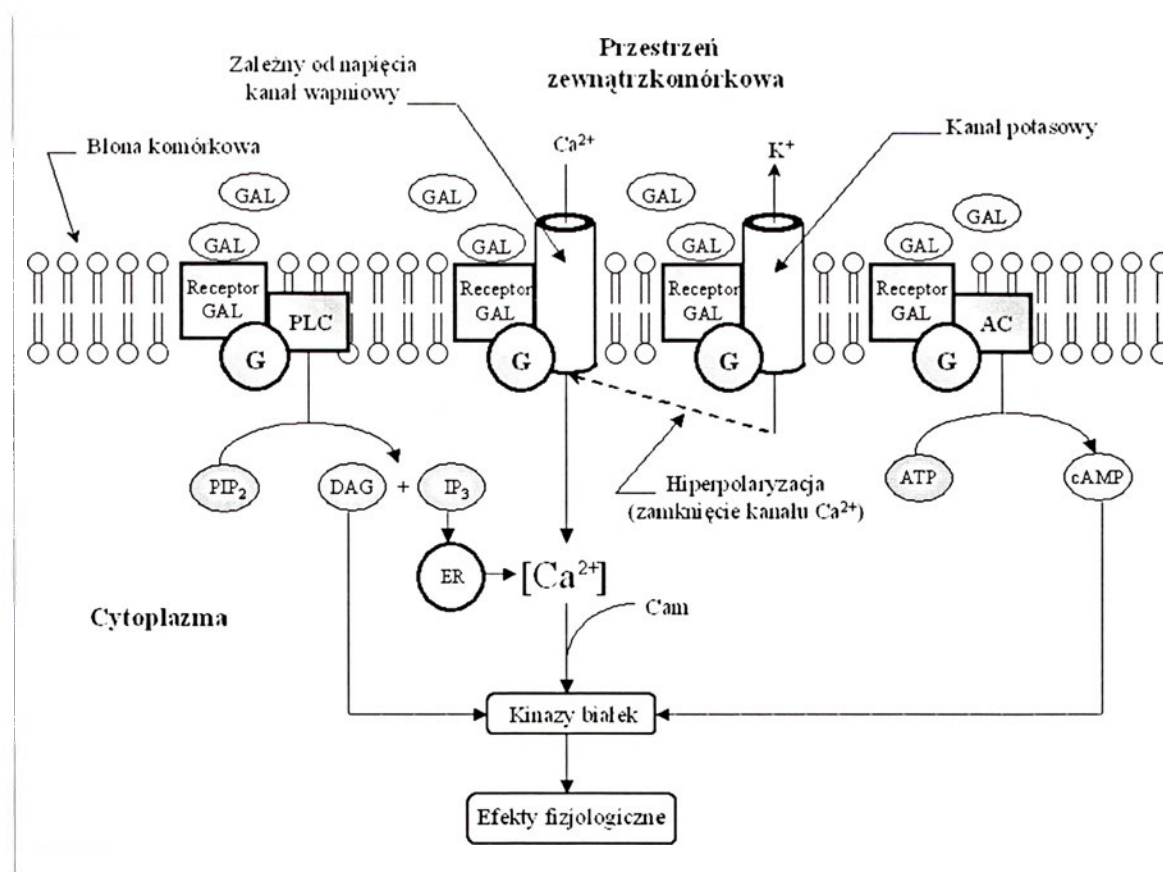
laniny, wynikająca z wiązania się GAL ze swoistymi receptorami, które poprzez białka G aktywują różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, realizowana jest poprzez [4, 8, 25]:

- wpływ GAL na otwieranie zależnych od ATP kanałów K^+ , co wywołuje hiperpolaryzację i pośrednie działanie na zależne od potencjału kanały Ca^{2+} ,
- bezpośredni wpływ GAL na zamykanie dihydrok-sypiridyno-zależnych kanałów Ca^{2+} ,
- wpływ GAL na blokowanie cykazy adenyłowej, która katalizuje powstawanie cAMP,
- wpływ GAL na aktywność fosfolipazy C, pod wpływem której powstaje DAG i IP_3 ,
- kombinacje powyższych procesów.

V. Funkcje biologiczne galaniny

V-1. Wpływ galaniny na funkcję wewnątrzwydzielniczą trzustki

Obecność galaniny stwierdzono we włóknach nerwowych wysp Langerhansa w trzustce psów, szczurów, myszy i człowieka [2, 26-28]. Galanina jako lokalny wewnątrzkomórkowy regulator wydzielania



Ryc. 1. Mechanizmy działania galaniny; AC — cyklaza adenyłowa; ATP — adenosynotrifosforan; Cam — kalmodulina; cAMP — cykliczny adenosyno-3',5'-monofosforan; DAG — 1,2-diacylglicerol; ER — retikulum endoplazmatyczne; G — kompleks regulatorowy białka G; GAL — galanina; IP₃ — 1,4,5-trifosforan inozytolu; PIP₂ — 4',5'-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (fosfoinozytyd); PLC — fosfolipaza C [4, 8, 25].

insuliny działa bezpośrednio na komórki β , odpowiedzialne za produkcję hormonu. Obniża ona podstawowy poziom insuliny we krwi oraz wpływa hamująco na wydzielanie insuliny stymulowane glukozą. Stwierdzono ponadto inhibitorowy wpływ galaniny na wydzielanie innych hormonów trzustkowych: somatostatyny, polipeptydu trzustkowego i glukagonu [28].

Wpływ GAL na poziom wydzielania insuliny zbadano u ludzi i zwierząt [28]. Badania *in vivo* oraz *in vitro* wykazały wpływ wieprzowej galaniny (pGAL) na wydzielanie insuliny u ludzi, myszy, szczurów, psów, królików, świń i pawianów [28]. W testach *in vitro* stwierdzono, że podanie pGAL powodowało spadek poziomu wydzielania insuliny we wszystkich przypadkach. Natomiast w testach *in vivo*, pGAL nie wykazywała aktywności w przypadku pawiana i człowieka [28]. Stwierdzono również hamujący wpływ ludzkiej i szczurzej galaniny (w dawce 10^{-8} M) na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych wysp Langerhansa szczura [29].

Hamujące działanie galaniny na wydzielanie insuliny z wysp trzustkowych wywoływane jest przez blokowanie układu cykazy adenylowej [30, 31] oraz aktywację zależnych od ATP kanałów K^+ , co wywołuje hiperpolaryzację błony komórkowej i pośrednie działanie na zależne od potencjału kanały Ca^{2+} [31, 32]. Badania sugerują również funkcjonowanie mechanizmów działania galaniny w trzustce, nie związanych z hiperpolaryzacją błony komórkowej oraz blokowaniem aktywności cykazy adenylowej [31, 33].

V-2. Wpływ galaniny na aktywność mięśni gładkich przewodu pokarmowego

Galanina wpływa na funkcje motoryczne tkanek mięśniowych [34]. Zależnie od gatunku zwierzęcia i rodzaju tkanki, GAL pobudza [1, 35-39] lub hamuje [1, 9, 40-44] skurcze mięśni gładkich. Procesy te mogą przebiegać w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku galanina wywiera bezpośredni wpływ na mięśniówkę gładką, co wywołuje zależne od stężenia GAL skurcze mięśni gładkich (np. żołądka, jelita cienkiego i grubego) [1, 35-39]. Ten rodzaj aktywności neuropeptydu związany jest z jego wpływem na wydzielanie pozakomórkowych jonów Ca^{2+} oraz aktywacją układu fosfolipazy C [45-47]. W drugim przypadku GAL działa jako neuromodulator, wpływając na aktywność neuronów cholinergicznym i hamując uwalnianie acetylocholin (Ach) z zakończeń neuronalnych [1, 9, 40-44].

GAL wywołuje zależne od stężenia skurcze mięśni gładkich jelita krętego u świń, świnki morskiej, szczura i królika, natomiast u psa obserwuje się efekt odwrotny — rozkurcz tych mięśni [39]. Galanina działa również kurcząco na mięśnie przewodu pokarmowego ludzi [36]. Kurczące działanie pGAL potwierdzają również badania na mięśniach gładkich dna żołądka, jelita czczego, jelita krętego, okrężnicy i pęcherza moczowego szczura, a także ludzkiego wyrostka robaczkowego i jelita cienkiego oraz okrężnicy myszy [35-39].

pGAL hamuje skurcze mięśni przewodu pokarmowego stymulowane polem elektrycznym lub Ach u świnki morskiej i psa [9, 44]. Hamujący efekt galaniny został również potwierdzony podczas badań nad skurczami wywołanymi bodźcami elektrycznymi lub Ach, na izolowanych mięśniach zwierzęcia tęczówki oka królika [9] oraz mięśniach gładkich ludzkiego pęcherza moczowego [44]. Okazało się przy tym, iż działanie galaniny zredukowane było przez atropinę (antagona Ach), która hamuje kurczliwość mięśni gładkich [44]. Można zatem stwierdzić, że galanina jest antagonistą receptorów acetylocholinowych.

V-3. Wpływ galaniny na wydzielanie hormonów przysadki

GAL odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji układu podwzgórzowo-przysadkowego, co stwarza możliwość praktycznego zastosowania galaniny jako klinicznego markera wielu chorób tego układu [48]. Galanina reguluje czynność tylnego i przedniego płata przysadki mózgowej [4, 8, 48-57]. Wpływa na sekrecję hormonu wzrostu (GH), kortykotropiny (ACTH) oraz hormonów gonadotropowych: prolaktyny (PRL), lutropiny (LH) i folikulotropiny (FSH) i prawdopodobnie tyreotropiny (TSH) [48].

Wpływ galaniny na wydzielanie hormonu wzrostu (GH), odpowiedzialnego za wzrost w okresie pourodzeniowym oraz za prawidłową przemianę węglowodanów i lipidów, zbadano u ludzi i szczurów [53-56]. Stwierdzono, że podanie pGAL powoduje wzrost wydzielania GH, zaś jednoczesne podanie argininy oraz pGAL znacznie wzmacnia działanie galaniny [54]. pGAL zwiększa również wydzielanie GH stymulowane przez podwzgórzowy czynnik uwalniający GH (GHRF) [54, 55]. Podobny efekt u człowieka wywołuje ludzka galanina (hGAL) [55]. Zaobserwowano, że wpływ GAL na wydzielanie GH u ludzi zależy od wieku i płci [56]. Wśród ludzi młodych (poniżej 40 lat) stwierdzono po podaniu GAL wyższy poziom GH u kobiet, niż u mężczyzn,

natomiast w grupie ludzi starszych (powyżej 65 lat) wyższy poziom GH u mężczyzn. Ma to prawdopodobnie związek z poziomem estrogenu [56].

Doświadczenia ze szczurami wykazały również, że galanina jest regulatorem funkcji komórek laktotropowych i stymuluje wydzielanie prolaktyny [49-53]. Prolaktyna jest hormonem uczestniczącym w inicjacji i utrzymywaniu laktacji w okresie poporodowym oraz powodującym przejściową fizjologiczną niepłodność (brak owulacji) u ssaków. GAL stymuluje także uwalnianie lutropiny (hormonu odpowiedzialnego za wytwarzanie progesteronu u samic i testosteronu u samców) [57].

V-4. Galanina, a procesy neuropsychiatryczne

Obecna w nerwach przodomózgowia galanina współwystępuje z acetylocholiną, odgrywającą ważną rolę w procesach neuropsychiatrycznych [4, 8, 48, 58-65]. Galanina hamuje wydzielanie acetylocholino w hipokampie, który stanowi składową układu limbicznego, odpowiadającego za pamięć świeżą, emocje i powstawanie wrażeń [48]. W badaniach na szczurach wykazano wpływ galaniny na procesy uczenia się i zapamiętywania [8, 58-60]. Domózgowe podanie galaniny osłabiało zdolność zdrowych zwierząt do pokonywania wodnego labiryntu (Morris swim maze) [58]. Natomiast galanina wstrzyknięta do podwzgórza szczurów z uszkodzonym przodomózgiem hamowała indukowany acetylocholiną postęp w umiejętności przejścia labiryntu (T-maze) [58].

Hamujący wpływ galaniny na wydzielanie acetylocholino połączony ze wzmożonym przesyłaniem impulsów we włóknach galaninergicznych w przodomózgiu sugeruje związek galaniny z zaburzeniami funkcjonowania włókien cholinergicznych, a więc udział w patofizjologii choroby Alzheimera [4, 8, 48, 61-65]. W chorobie Alzheimera degradacji ulegają cholinergiczne nerwy przodomózgowia, istotne w procesach uczenia się i zapamiętywania. Obserwuje się wówczas zanik kory mózgowej, co prowadzi do głębokiego upośledzenia fizycznego i psychicznego (demencji). U pacjentów chorych na chorobę Alzheimera stwierdzono podwyższony poziom galaniny w mózgu, jak również spowodowaną galaniną hipertrofię (przerost) neuronów oraz hiperprzewodzenie impulsów, prowadzące do szybkiej degradacji neuronów [61]. Konsekwencją tych efektów jest redukcja wydzielania acetylocholino i szybki rozwój choroby. Inhibicja aktywności galaniny, poprzez wprowadzenie antagonistów blokujących recep-

tory galaninowe stwarza nowe możliwości w leczeniu choroby Alzheimera.

Galanina uczestniczy również w powstawaniu depresji [66]. W neuronach miejsca sinawego GAL współwystępuje z noradrenaliną. Galanina blokuje aktywność neuronów dopaminergicznych, produkujących noradrenalinę. Następstwem tego efektu są typowe objawy depresji: obniżenie aktywności ruchowej, obniżenie zdolności odczuwania bodźców "przyjemnych" oraz spadek umiejętności ich oceny. Sugeruje się, iż zastosowanie silnych antagonistów GAL może wywierać korzystny efekt w leczeniu depresji.

V-5. Galanina, a efekty przeciwbólowe

Galanina i jej agony hamują odruchy mięśniowe wywołane bodźcami nocycyptywnymi, co sugeruje związek GAL z działaniem przeciwbólowym [67-72]. U małp, uszkodzenie nerwów obwodowych powoduje wzrost poziomu galaniny [67]. Okazało się, że galanina blokuje odruchy mięśni spowodowane uszkodzeniem nerwów. U szczurów natomiast galanina wzmacnia i wydłuża przeciwbólowe działanie morfiny [68-70]. Największą aktywność w procesach tłumienia bólu wykazuje fragment GAL(1-15), a fragment pGAL(16-29) jest prawie nieaktywny [69-70]. Wynika stąd, że galanina lub jej agony mogą być użyteczne w leczeniu bólu wywołanego neuropatią [71-72].

V-6. Wpływ galaniny na pobieranie pokarmu

Galanina reguluje procesy łaknienia pokarmu pobudzając apetyt na tłuszcze [73-76]. Dożylnie i domózgowe podanie wieprzowej galaniny (pGAL) stymuluje pobieranie pokarmu przez szczury [75, 76]. Efekt ten wynika prawdopodobnie z aktywacji receptorów α_2 -adrenergicznych lub oddziaływania galaniny z innymi neurotransmiterami [73]. U ludzi nie stwierdzono znaczących różnic w stężeniu galaniny pomiędzy grupą pacjentów cierpiących na anoreksję lub bulimię, a grupą ludzi zdrowych [75, 77]. Znaczny jednak wzrost stężenia galaniny zaobserwowano w grupie kobiet otyłych, w porównaniu z grupą kontrolną kobiet szczupłych [78].

V-7. Inne biologiczne aktywności galaniny

W badaniach wpływu pGAL na funkcje układu krwionośnego uśpionych kotów stwierdzono osłabienie akcji serca oraz spadek ogólnoustrojowe-

go ciśnienia krwi [79, 80]. U ryb, płazów i ssaków zaobserwowano natomiast efekt przeciwny — podwyższenie ciśnienia krwi [81]. Galanina powoduje również wzrost produkcji śliny wydzielanej przez gruczoły ślinowe u ludzi [82]. Przeprowadzone na szczurach badania behawioralne sugerują także, iż galanina może wywierać istotny wpływ na zachowania seksualne [83]. Dokomorowe podanie galaniny hamuje aktywność kopulacyjną samców szczurów. Natomiast podanie galantylu (M15), antagona galaniny, znosiło hamujący efekt galaniny i powodowało wzrost aktywności kopulacyjnej [84].

VI. Agony i antagony galaniny

Ogromną rolę w badaniach fizjologicznych właściwości galaniny odgrywają peptydy o właściwościach antagonistycznych [4]. Ich duże powinowactwo do receptorów galaninowych hamuje fizjologiczną aktywność GAL. Za rozpoznanie peptydu przez receptory galaninowe odpowiedzialny jest N-końcowy fragment galaniny, zatem wszystkie peptydy o charakterze antagonistycznym muszą zawierać ten fragment lub jego modyfikacje [4]. Projektując nowe analogi galaniny powinno się również uwzględniać rodzaj aktywności biologicznej. Zmiana strukturalna korzystna dla jednego rodzaju aktywności nie musi być korzystna dla innej, co sugeruje istnienie różnych podtypów receptorów GAL, pośredniczących w różnych procesach biochemicznych.

Pierwszym krokiem w kierunku znalezienia korzystnych zmian strukturalnych było wskazanie fragmentów odpowiedzialnych za aktywność biologiczną oraz stwierdzenie, które reszty aminokwasowe w sekwencji GAL są kluczowe dla jej aktywności biologicznej. W badaniach nad receptorami GAL analizowano między innymi wpływ skracania natywnego łańcucha galaniny oraz wpływ zamiany poszczególnych reszt aminokwasowych L-alaniną w aktywnym fragmencie GAL(1-16) na powinowactwo do receptorów GAL z podwzgórza szczura [85] oraz rdzenia kręgowego [86]. Wnioski z tych badań są następujące:

- za wiązanie z receptorami GAL, jak i za większość funkcji biologicznych odpowiedzialny jest N-końcowy fragment GAL
- najbardziej aktywnym fragmentem cząsteczki peptydu jest N-końcowy fragment GAL(1-15), zaś najkrótszy fragment, który posiada jeszcze pewną aktywność to GAL(1-10); fragment GAL(3-29) jest nierozpoznawalny przez receptory

- dla uzyskania pełnej aktywności wymagana jest pełna sekwencja peptydu; C-końcowy fragment nie jest niezbędny, lecz jego obecność wzmacnia działanie biologiczne oraz chroni N-końcowy fragment przed działaniem enzymów proteolitycznych
- dwie pierwsze reszty aminokwasowe tj. Gly¹ i Trp² w cząsteczce GAL oraz w jej fragmentach bądź analogach są kluczowe dla aktywności i powinowactwa do receptorów; usunięcie Gly¹, podstawienie Trp² aminokwasem niearomatycznym (L-Ile lub L-Ala) obniża w sposób znaczący aktywność neuropetydu
- ważną rolę w oddziaływaniu z receptorami GAL odgrywają również reszty: Asn⁵, Tyr⁹, Leu^{10,11}, Gly¹²
- dopuszczalne są zmiany w niektórych pozycjach: 4, 6 oraz w pozycjach za 12 resztą aminokwasową, które nie prowadzą do zaniku aktywności GAL.

Zsyntezowano wiele analogów N-końcowego fragmentu GAL [4, 5, 8, 16, 25, 29, 39, 85-91]. Tylko niektóre z nich wykazują silną aktywność biologiczną. Znany jest efekt działania analogów: [Ala⁶, D-Trp⁸]GAL(1-15)-ol i [D-Thr⁶, D-Trp^{8,9}]GAL(1-15)-ol [29, 88]. Zbadano wpływ tych peptydów na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych wysp trzustek szczurzych. Zastosowanie samych analogów nie wpływało na poziom insuliny. Natomiast podanie ich (0,1 μM) w obecności galaniny (1 nM) blokowało inhibitorowy efekt galaniny na wydzielanie insuliny indukowane glukozą. Analogi te okazały się silnymi antagonistami galaniny, znosząc całkowicie efekt jej działania. Powyższe badania sugerują, że modyfikacje fragmentu galaniny 1-15 mogą odgrywać istotną rolę w poszukiwaniu analogów galaniny, wykazujących silne powinowactwo do receptorów oraz selektywne agonistyczne lub antagonistyczne właściwości biologiczne.

Opisano również działanie biologiczne wielu hybrydowych analogów, zawierających fragment GAL(1-13) (lub jego modyfikacje) oraz fragment innego biologicznie czynnego peptydu, np. neuropeptydu Y (NPY), scyliorhininy I (SCY I), substancji P (SP), bradykininy (BK) lub mastoparanu (MAS) [4, 5, 8, 25, 89-94]. Otrzymane w ten sposób peptydy hybrydowe łatwiej wiążą się z błoną komórkową i/lub mogą być rozpoznawane przez receptory obu peptydów [4]. Tabela 3 przedstawia sekwencje kilku biologicznie czynnych peptydów hybrydowych oraz porównanie ich powinowactwa do receptorów GAL z podwzgórza szczura [89, 90, 92] oraz obecnych w

Tabela 3

Biologicznie czynne hybrydowe analogi galaniny [89, 90, 92, 93]

LIGAND	K _D [nM]
pGAL GWTLSAGYLLGP HAIDNHRSFHDKYGLA-NH ₂	0.8/0.4*
GAL(1-13)NH ₂ GWTLSAGYLLGP-NH ₂	150
M15; GAL(1-13)-SP(5-11)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP QQFFGLM-NH ₂	0.1
M32; GAL(1-13)-NPY(25-36)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP RHYNLITRQRY-NH ₂	0.1
M35; GAL(1-13)-BK(2-9)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP PPGFSPFR-NH ₂	0.3
M40; GAL(1-13)-PPALALA-NH ₂ GWTLSAGYLLGP PPALALA-NH ₂	10
C7; GAL(1-13)-spantyd-NH ₂ GWTLSAGYLLGP (D-R)PKPQQ(D-W)F(D-W)LL -NH ₂	0.2
Galparan; GAL(1-13)-MAS-NH ₂ GWTLSAGYLLGP INLKALAALAKKIL-NH ₂	7.1*

*powinowactwa do receptorów GAL obecnych w komórkach linii RINm5F szczurzych wysp trzustkowych

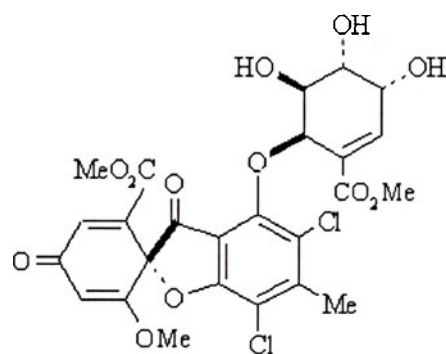
komórkach linii RINm5F szczurzych wysp trzustkowych [93].

Pierwszym opisanym peptydem hybrydowym o charakterze antagonistycznym był peptyd GAL(1-13)-SP(5-11)NH₂, zwany galantydem lub M15 [92, 94]. Przedłużenie N-końcowego fragmentu GAL(1-13) o fragment substancji P(5-11) spowodowało 1000-krotne zwiększenie powinowactwa peptydu do receptorów galaninowych w porównaniu z fragmentem GAL(1-13)NH₂. M15 wykazywał również 10-krotnie większe powinowactwo do receptorów galaninowych, niż GAL(1-29)NH₂ oraz wysokie powinowactwo do receptorów substancji P, większe od fragmentu SP(5-11)NH₂, lecz mniejsze od SP(1-10)NH₂.

Galantyd w wielu przypadkach działa antagoniście w stosunku do GAL [94-97]. W testach na wydzielanie insuliny znosi hamujący efekt galaniny [94], blokuje wywołaną przez galaninę redukcję wydzielania acetylocholiny w hipokampie [95] oraz hamuje wywołane galaniną podwyższenie poziomu GH [96]. Nie stwierdzono natomiast działania antagonistycznego galantydu w stosunku do galaniny w badaniach na mięśniach gładkich, w których M15 był aktywatorem odruchów mięśniowych [97]. Odmienne aktywność hybrydowych analogów galaniny w różnych tkankach związana jest prawdopodobnie z istnieniem kilku podtypów receptorów galaninowych oraz z różnym oddziaływaniem hybrydowych analogów z tymi receptorami. Dalsze badania nad hybrydowymi analogami galaniny mogą doprowadzić do odkrycia silnych ligandów receptorów GAL, wyka-

zujących ukierunkowane właściwości agonistyczne lub antagonistyczne.

Znaczącą rolę w badaniach nad fizjologicznymi właściwościami galaniny mogą również odgrywać małowcząsteczkowe niepeptydowe ligandy receptorów GAL. Dotychczas odkryto dwa niepeptydowe ligandy receptorów GAL. Jeden z nich, nazwany Sch 202596, jest produktem przemiany materii grzybów, wyizolowanym w trakcie poszukiwań silnych ligandów receptorów GAL pochodzenia naturalnego (np. z produktów fermentacji grzybów lub bakterii) [98]. Stwierdzono, że Sch 202596 wykazuje umiarkowane powinowactwo do ludzkiego receptora GALR1 (IC₅₀ = 1.7 μM), otrzymanego z komórek ludzkiego czerniaka Bowena. Struktura Sch 202596 (Ryc. 2) może być dobrym punktem wyjściowym dla syntezy no-



Ryc. 2. Struktura Sch 202596 [98].

wych małowcząsteczkowych niepeptydowych ligandów GAL, receptorów wykazujących silne specyficzne właściwości agonistyczne lub antagonistyczne.

ne. Drugi z nich wykazuje właściwości antagoni-
styczne względem ludzkiego receptora GALR1 w
badaniach *in vitro*, jednakże jego struktura nie zo-
stała dotychczas opublikowana [90, 91].

VII. Uwagi końcowe

Galanina wykazuje bardzo szeroki zakres aktywności biologicznych, które mogą odgrywać istotną rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych w organizmach ludzi i zwierząt. Między innymi galanina moduluje aktywność mięśni gładkich przewodu pokarmowego, wpływa na wydzielanie hormonów trzustki i przysadki, procesy uczenia się, zapamiętywania, łaknienia pokarmu, odczuwania bólu i zachowania seksualne. Przypuszcza się, że galanina może mieć również związek z takimi stanami chorobowymi jak: choroba Alzheimera, depresja i akromegalia. Hamowanie aktywności galaniny, poprzez zastosowanie antagonistów blokujących receptory galaninowe może stworzyć nowe możliwości w terapii oraz diagnostyce medycznej.

Mimo dynamicznego w ciągu ostatnich kilku lat rozwoju technik biologii molekularnej, dokładny mechanizm działania galaniny na poziomie molekularnym nie jest nadal znany. Z tego względu wiele funkcji oraz zależności związanych z aktywnością biologiczną galaniny pozostaje nadal niewyjaśnionych. Nie są jeszcze znane dokładne profile oddziaływania receptorów galaniny (GALR1, GALR2 oraz GALR3) z białkami G. Brakuje również silnych selektywnych antagonistów receptorów GAL. Znalezienie peptydowych lub małowcząsteczkowych niepeptydowych ligandów receptorów GAL, wykazujących selektywne właściwości antagonistyczne lub agonistyczne, może wnieść znaczący wkład do badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów działania GAL. W najbliższej przyszłości należy oczekiwać dalszych postępów w badaniach mających na celu dokładniejsze określenie roli galaniny w funkcjonowaniu organizmów ludzi i zwierząt, a także dokładniejsze poznanie mechanizmów działania galaniny na poziomie molekularnym.

Czytelnicy zainteresowani tematyką związaną z aktywnością biologiczną galaniny mogą również skorzystać z anglojęzycznych artykułów przeglądowych zaznaczonych w Piśmiennictwie numerami [2, 5, 8, 21, 25, 63, 71, 73].

Podziękowania

Praca finansowana ze środków KBN: grant nr 1606/T09/2000/19 i BW-8000-5-0297-2.

Artykuł otrzymano 6 czerwca 2002
Zaakceptowano do druku 30 września 2002

Piśmiennictwo

1. Tatemoto K, Rökaeus A, Jörnvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983) *FEBS Lett* 164: 124-128
2. Crawley JN (1995) *Regul Pept*, 59: 1-16
3. Sillard R, Rökaeus A, Xu Y, Carlquist M, Bergman T, Jörnvall H, Mutt V (1992) *Peptides* 13: 1055-1060
4. Bartfai T, Fisone G, Langel Ü (1992) *Trends Pharm Sci* 13: 312-317
5. Bartfai T, Langel Ü (1995) *Eur J Med Chem* 30: 163S-174S
6. Bersani M, Johnsen AJ, Hojrup P, Dunning BE, Andreasen JJ, Host JJ (1991) *FEBS Lett* 283: 189-194
7. Wang Y, Conlon JM (1994) *Peptides* 15: 981-986
8. Bedecs K, Berthold M, Bartfai T (1995) *Int J Biochem Cell Biol* 27: 337-349
9. Rökaeus A (1987) *Trends Neurosci* 10: 158-164
10. Wannerberg ABA, Cooke RM, Carlquist M, Rigler R, Campbell ID (1990) *Biochem Biophys Res Comm* 166: 1102-1109
11. Liwo A, Oldziej S, Ciarkowski J, Kupryszewski G, Pincus MR, Wawak RJ, Rackovski S, Scheraga HA (1994) *J Protein Chem* 13: 375-380
12. De Loof H, Nilsson L, Rigler R (1992) *J Am Chem Soc* 114: 4028-4035
13. Wannerberg ABA, Jackson M, Öhman A, Gräslund A, Langel Ü, Bartfai T, Rigler R, Mantsch HH (1994) *Can J Chem* 72: 1495-1499
14. Öhman A, Lycksell PO, Andell S, Langel Ü, Bartfai T, Gräslund A (1995) *Biochim Biophys Acta* 1236: 259-265
15. Amiranoff B, Lorinet AM, Laburthe M (1989) *J Biol Chem* 264: 20714-20717
16. Amiranoff B, Chien YH, Lorinet AM, Couvineau A, Laburthe M (1992) *Biomed Res* 13: 319-323
17. Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M, Mayaux JF (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9780-9783
18. Kask K, Berthold M, Kahl U, Nordvall G, Bartfai T (1996) *EMBO J* 15: 236-244
19. Berthold M, Kahl U, Juréus A, Kask K, Nordvall G, Langel Ü, Bartfai T (1997) *Eur J Biochem* 249: 601-606
20. Branchek TA, Smith KE, Walker MW (1998) *Ann NY Acad Sci* 863: 94-107
21. Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW (2000) *Trends Pharmacol Sci* 21: 109-116
22. Smith KE, Forray C, Walker MW, Jones KA, Tamm JA, Bard J, Branchek TA, Linemeyer DL, Gerald C (1997) *J Biol Chem* 272: 24612-24616
23. Wang S, He C, Hashemi T, Bayne M (1997) *J Biol Chem* 272: 31949-31952
24. Wang S, Clemmons A, Strader C, Bayne M (1998) *Biochemistry* 37: 9528-9535
25. Kask K, Langel Ü, Bartfai T (1995) *Cell Mol Neurobiol* 15: 653-673
26. Lindskog S, Dunning BE, Mårtensson H, Ar'rajab A, Taborsky GJ Jr, Åhrén B (1990) *Acta Physiol Scand* 139: 591-596
27. Lindskog S, Åhrén B (1989) *Int J Pancreatol* 4: 335-344
28. Åhrén B, Rorsman P, Berggren PO (1988) *FEBS Lett* 229: 233-237
29. Yanaihara N, Mohizuki T, Takatsuka N, Iguchi K, Sato K, Kakuyama H, Li M, Yanaihara C (1993) *Regul Pept* 46: 93-101
30. Amiranoff B, Lorinet AM, Lagny-Pourmir I, Laburthe M (1988) *Eur J Biochem* 177: 147-152.
31. Sharp GW (1996) *Amer J Physiol* 271: C1781-C1799

32. Straub SG, James RF, Dunne MJ, Sharp GW (1998) *Diabetes* **47**: 758-763
33. Sharp GW, Le Marchand-Brustel Y, Yada T, Russo LL, Bliss CR, Cormont M, Monge L, Van Obberghen E (1989) *J Biol Chem* **264**: 7302-7309
34. Rattan S (1991) *Gastroenterology* **100**: 1762-1768
35. Ekblad E, Rökaeus A, Hakanson R, Sundler F (1985) *Neuroscience* **16**: 355-363
36. Maggi CA, Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Turini D, Barbanti G, Beneforti B, Misuri D, Meli A (1989) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **339**: 415-423
37. Ekblad E, Arnbjörnsson E, Ekman R, Hakanson R, Sundler F (1989) *Dig Dis Sci* **34**: 1217-1230
38. Fontaine J, Lebrun P (1989) *Eur J Pharmacol* **164**: 583-586
39. Botella A, Delvaux M, Frexinós J, Bueno L (1992) *Life Sci* **50**: 1253-1261
40. Kuwahara A, Ozaki T, Yanaihara N (1989) *Eur J Pharmacol* **164**: 175-178
41. Tamura K, Palmer JM, Wood JD (1987) *Eur J Pharmacol* **136**: 445-446
42. Ekblad E, Hakanson R, Sundler F, Wahlstedt C (1985) *Br J Pharmacol* **86**: 241-246
43. Fox JET, McDonald TJ, Kostolanska F, Tatemoto K (1986) *Life Sci* **39**: 103-110
44. Maggi CA, Santicioli P, Patacchini R, Turini D, Barbanti G, Beneforti B, Giuliani S, Meli A (1987) *Eur J Pharmacol* **143**: 135-137
45. Ahtaridis SA, Katoch SS, Moreland RS (1998) *Am J Physiol* **274**: G306-G316
46. Korolkiewicz R, Konstański Z, Rekowski P, Ruczyński J, Szyk A, Szczepańska R, Korolkiewicz KZ, Petrusiewicz J (2000) *Pharm Pharmacol Commun* **6**: 415-420
47. Korolkiewicz R, Konstański Z, Rekowski P, Ruczyński J, Szyk A, Korolkiewicz KZ, Petrusiewicz J (2000) *J Physiol Pharmacol* **51**: 821-831
48. Zdrojewicz Z, Sowińska E (2000) *Post Hig Med Dośw* **54**: 819-834
49. Lopez FJ, Meade EH Jr, Negro-Vilar A (1993) *Endocrinology* **132**: 795-800
50. Wynick D, Hammond PJ, Akinsanya KO, Bloom SR (1993) *Nature* **364**: 529-532
51. Ervat E, Gianotti L, Ramunni J, Grottoli S, Brossa PC, Bertagna A, Camanni F, Ghigo E (1995) *Eur J Endocrinol* **133**: 300-304
52. Wynick D, Small CJ, Bacon C, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NCH, Ghatei M, Talamantes F, Bloom S, Pachnis V (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12671-12677
53. De Marinis L, Manchini A, Valle D, Bianchi A, Gentilella R, Milardi D, Mascadri C, Giustina A (2000) *Metabolism* **49**: 155-159
54. Ghigo E, Maccario R, Arvat E, Valetto MR, Valente F, Nicolosi M, Mazza E, Martina V, Cocchi C, Camanni F (1992) *Metabolism* **41**: 85-89
55. Giustina A, Girelli A, Bossoni S, Legati F, Schettino M, Wehrenberg WB (1992) *Metabolism* **41**: 548-551
56. Giustina A, Licini M, Bussi AR, Girelli A, Pizzoccolo G, Schettino M, Negro-Vilar A (1993) *J Clin Endocrinol Metab* **76**: 1369-1372
57. Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4508-4512
58. Ögren SO, Hökfelt T, Kask K, Langel Ü, Bartfai T (1992) *Neuroscience* **51**: 1-5
59. Schött PA, Bjelke B, Ögren SO (1998) *Neuroscience* **83**: 123-136
60. Ögren SO, Schött PA, Kehr J, Misane I, Razani H (1999) *Brain Res* **848**: 174-182
61. Chan-Palay V (1988) *J Comp Neurol* **273**: 543-557
62. Mufson EJ, Cochran E, Benzing W, Kordower JH (1993) *Dementia* **4**: 237-250
63. Crawley JN (1996) *Life Sci* **58**: 2185-2199
64. Mufson EJ, Kahl U, Bowsere R, Mash DC, Kordower JH, Decher D (1998) *Ann NY Acad Sci* **863**: 291-304
65. Jhamandas JH, Harris KH, McTavish D, Jassar BS (2002) *J Neurophysiol* **87**: 696-704
66. Weiss JM, Bonsall RW, Demetrikopoulos MK, Emery MS, West CH (1998) *Ann NY Acad Sci* **863**: 364-382
67. Hökfelt T, Zhang X, Verge V, Villar M, Elde R, Bartfai T, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (1993) *Regul Pept* **46**: 76-80
68. Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Villar M, Hökfelt T (1990) *Neurosci Lett* **109**: 217-221
69. Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Fisone G, Bartfai T, Hökfelt T (1990) *Eur J Pharmacol* **182**: 137-141
70. Przewłocka B, Machelska H, Rekowski P, Kupyszewski G, Przewłocki R (1995) *J Neural Transm (G. Sect.)* **102**: 229-235
71. Xu XJ, Hökfelt T, Bartfai T, Wiesenfeld-Hallin Z (2000) *Neuropeptides* **34**: 137-147
72. Kerr BJ, Wynick D, Thompson SWN, McMahon SB (2000) *Prog Brain Res* **129**: 219-230
73. Crawley JN (1999) *Neuropeptides* **33**: 369-375
74. Strader CD, Hwa JJ, Van Heek M, Parker EM (1998) *DDT* **3**: 250-256
75. Schick RR, Samsami S, Zimmermann JP, Eberl T, Endres C, Schusdziarra V, Classen AM (1993) *Am J Physiol* **264**: R355-R361
76. Crawley JN, Austin MC, Fiske SM, Martin B, Consolo S, Berthold M, Langel Ü, Fisone G, Bartfai T (1990) *J Neurosci* **10**: 3695-3700
77. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Chmielowska M (2001) *Neuroendocrinol Lett* **22**: 356-358
78. Baranowska B, Wasilewska-Dziubinska E, Radzikowska M, Plonowski A, Roguski K (1997) *Metabolism* **46**: 1384-1389
79. Ulman LG, Potter EK, McCloskey DI (1993) *Regul Pept* **44**: 85-92
80. Ulman LG, Potter EK, McCloskey DI (1994) *Regul Pept* **51**: 17-23
81. Preston E, McManus CD, Jonsson AC, Courtice GP (1995) *Regul Pept* **58**: 123-134
82. Bauer FE, Chatel MA, Zintel A, Bloom SR (1989) *Aliment Pharmacol Ther* **3**: 591-596
83. Poggioli R, Rasori E, Bertolini A (1992) *Eur J Pharmacol* **213**: 87-90
84. Benelli A, Arletti A, Bertolini A, Menozzi B, Basaglia R, Poggioli R (1994) *Eur J Pharmacol* **260**: 279-282
85. Land T, Langel Ü, Löw M, Berthold M, Uden A, Bartfai T (1991) *Int J Pept Protein Res* **38**: 267-272
86. Bedecs K, Langel Ü, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Bartfai T (1994) *Eur J Pharmacol* **259**: 151-156
87. Juréus A, Langel Ü, Bartfai T (1997) *J Pept Res* **49**: 195-200
88. Kakuyama H, Mochizuki T, Iguchi K, Yamabe K, Hosoe H, Hoshino M, Yanaihara N (1997) *Biomed Res* **18**: 49-56
89. Pooga M, Juréus A, Rezaei K, Hasanvan H, Saar K, Kask K, Kjellén P, Land T, Halonen J, Mäeorg U, Uri A, Solyom S, Bartfai T, Langel Ü (1998) *J Pept Res* **51**: 65-74
90. Langel Ü, Bartfai T (1998) *Ann NY Acad Sci* **863**: 86-93
91. Florén A, Land T, Langel Ü (2000) *Neuropeptides* **34**: 331-337
92. Langel Ü, Land T, Bartfai T (1992) *Int. J. Pept Protein Res* **39**, 516-522
93. Östenson CG, Zaitsev S, Berggren PO, Efendic S, Langel Ü, Bartfai T (1997) *Endocrinology* **138**: 3308-3313

94. Lindskog S, Ahrén B, Land T, Langel Ü, Bartfai T (1992) *Eur J Pharmacol* **210**: 183-188
95. Bartfai T, Bedecs K, Land T, Langel Ü, Bertorelli R, Girotti P, Consolo S, Xu X, Wiesensfeld-Hallin Z, Nilsson S, Pieribone VA, Hökfelt T (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10961-10965
96. Gabriel SM, Rivkin A, Mercado J Jr (1003) *Peptides* **14**: 633-636
97. Gu ZF, Rossowski WJ, Coy DH, Pradhan TK, Jensen RT (1993) *J Pharmacol Exp Ther* **266**: 912-818
98. Chu M, Mierzwa R, Truumees I, King A, Sapidou E, Barrabee E, Terracciano J, Patel MG, Gullo VP, Burrier R, Das PR, Mittelman S, Puar MS (1997) *Tetrahedron Lett* **38**: 6111-6114

Oznaczanie hormonów w osoczu krwi techniką HPLC

Determination of hormones in plasma by HPLC techniques

MAGDALENA GOZDOWSKA¹, EWA KULCZYKOWSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
 - I-1. Wstępne przygotowanie próbki — ekstrakcja do fazy stałej (SPE)
 - I-2. Rozdział RP-HPLC
- II. Rozdział i oznaczanie hormonów w osoczu krwi
 - II-1. Hormony peptydowe i białkowe
 - II-1.1. HPLC peptydów i białek
 - II-1.2. Detekcja
 - II-1.3. Hormony tylnego płata przysadki
 - II-2. Pochodne aminokwasów (indoloaminy i katecholaminy)
 - II-3. Hormony sterydowe
 - II-3.1. Oczyszczanie i zagęszczanie
 - II-3.2. HPLC i detekcja
- III. Porównanie czułości metod HPLC z innymi technikami — wnioski

Contents:

- I. Introduction
 - I-1. Sample preparation: solid-phase extraction (SPE)
 - I-2. Separation by RP-HPLC
- II. Separation and determination of plasma hormones
 - II-1. Peptide and protein hormones
 - II-1.1. HPLC of peptides and proteins
 - II-1.2. Detection
 - II-1.3. Neurohypophysial hormones
 - II-2. Amino acid derivatives (indolamines and catecholamines)
 - II-3. Steroids hormones
 - II-3.1. Purification and concentration
 - II-3.2. HPLC and detection
- III. Sensitivity of HPLC methods and comparison with other techniques — conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: ED — detektor elektrochemiczny; FD — detektor fluorescencyjny; HPLC — wysokosprawna chromatografia cieczowa; MS — spektrometr masowy; ODS — żel oktadecylosililowy; OPA — *o*-ftaldehyd, PAD — macierzowy detektor fotodiodowy; RIA — metoda radioimmunologiczna; RP — faza odwrócona; SPE — ekstrakcja do fazy stałej.

I. Wstęp

Osocze tak jak inne płyny ustrojowe zawiera w swym składzie wiele różnych związków chemicznych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują hormony. Jest to duża grupa związków biologicznie czynnych różniących się pod względem budowy chemicznej i funkcji fizjologicznych.

Ze względu na budowę i ich fizyczne właściwości można je podzielić na trzy grupy:

- peptydy lub białka,
- pochodne aminokwasów takie jak indoloaminy czy katecholaminy,
- sterydy.

Hormony jako tzw. przekaźniki chemiczne są wytwarzane przez gruczoły wydzielania wewnętrznego i uwalniane do płynów ustrojowych. Ich stężenie może się wahać w zależności od stanu fizjologicznego organizmu, a w szczególnych przypadkach od oddziaływań czynników zewnętrznych. Najczęściej występują one w bardzo małych ilościach w osoczu krwi rzędu piko- czy femtomoli w ml osocza.

Oznaczenie tak niewielkich stężeń tych ważnych dla funkcjonowania organizmu związków stanowi prawdziwe wyzwanie dla analityka. Przez długi czas jedyną skuteczną i odpowiednio czułą techniką ilościowego oznaczania hormonów były metody radioimmunologiczne (ang. *radioimmunoassay*) (RIA). Alternatywę dla tej metody stanowią techniki chromatograficzne. Ostatnie lata to okres ogromnego postępu w tej dziedzinie. Dotyczy to szczególnie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej czy kapilarnej elektroforezy. Wśród nich wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) stanowi jedną z najczęściej stosowanych technik. Jej

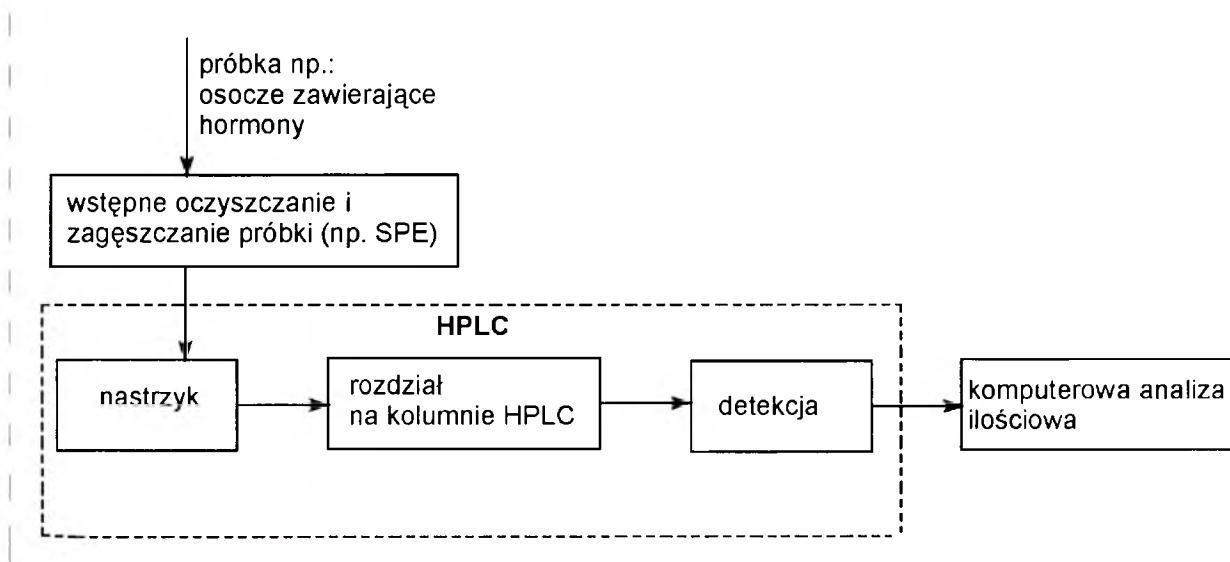
¹Dr inż., ²doc. dr hab., Instytut Oceanologii PAN, Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej w Gdyni, ul. Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia, e-mail: magda@cbmpan.gdynia.pl, tel. (58) 620-89-13, e-mail: ewakulcz@cbmpan.gdynia.pl, tel. (58) 620-29-01

podstawowe zalety to szybkość, powtarzalność oraz niski koszt w porównaniu z innymi metodami. Dysponując bardzo czystym wzorcem oznaczanej substancji i sprzężonym z HPLC odpowiednim dla danego problemu analitycznego detektorem można oznaczyć jakościowo i ilościowo hormony w stężeniach na poziomie nawet femtomol/ml osocza. Stosowane najczęściej rodzaje detektorów, to detektor UV, fluorescencyjny (FD), elektrochemiczny (ED) czy spektrometr masowy (MS).

Stosując metodę HPLC można wyróżnić kilka głównych etapów:

- wstępne oczyszczenie i zagęszczanie próbki,
- rozdział na kolumnie,
- detekcję badanych związków,
- komputerową analizę ilościową (Ryc. 1).

toż polega na przepuszczaniu ciekłej analizowanej próbki (np. o objętości od kilkudziesięciu μl do kilku ml, w zależności od dostępnych ilości) przez złożo adsorbentu w kolumnie i adsorpcji oznaczanych związków w złożu. Po przemyciu kolumny (w celu oddzielenia reszty zanieczyszczeń) zaadsorbowane substancje wymywa się następnie niewielką ilością rozpuszczalnika. W taki sposób można otrzymać nawet 1000-krotne zagęszczenie analizowanej substancji. Stosuje się sorbenty niepolarne, polarne i jonowymienne. Niepolarne wypełnienia zawierają np. metylowe, oktylowe czy oktadecylowe grupy funkcyjne przyłączone do powierzchni żelu krzemionkowego mające na celu zwiększenie właściwości retencyjnych. Polarne wypełnienia kolumny to niemodyfikowana krzemionka lub żel krzemionko-



Ryc. 1. Schemat analizy za pomocą HPLC.

I-1. Wstępne przygotowanie próbki — ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Ważnym etapem analizy chromatograficznej jest wstępne przygotowanie próbki, mające na celu uwolnienie substancji badanej od niepotrzebnych, często interferujących związków i zagęszczenie jej. Do metod tych należą: ekstrakcja ciecz-ciecz, ekstrakcja do fazy stałej (SPE), metody strąceniowe (w przypadku białek) i metody membranowe tj. dializa, ultrafiltracja [1].

Z wymienionych technik w ostatnich latach największe znaczenie zyskała metoda SPE [2-4]. Jej główne atuty to przede wszystkim: wysoka selektywność zagęszczanej wybranej substancji, wysoki stopień powtarzalności ekstrakcji, łatwość i szybkość wykonania, niski koszt.

Technika ta wykorzystuje kolumny wypełnione krzemionką bądź zmodyfikowanym polimerem. Me-

ty z cyjano-, amino- czy diolowymi grupami funkcyjnymi. Jonowymienne sorbenty posiadają grupy kationowe bądź anionowe. W przeciwieństwie do wypełnień używanych w HPLC wielkość cząstek sorbentu jest znacznie większa w kolumnach do SPE. Pozwala to na łatwe nanoszenie próbki i elucję z kolumny przy użyciu małego nadciśnienia lub podciśnienia.

Przy odpowiednim doborze wypełnienia kolumny oraz rodzaju rozpuszczalnika można zoptymalizować warunki prowadzenia ekstrakcji praktycznie dla każdej analizowanej próbki a dostępność przygotowywanych komercyjnie, wypełnionych mini-kolumnek czyni metodę SPE coraz częściej i chętniej stosowaną w różnych laboratoriach analitycznych. Przy czym spore koszty gotowych kolumnek, szczególnie przy seryjnych analizach, można znacząco zredukować poprzez wielokrotne ich

użycie. Niezbędne jest wówczas przemywanie kolumnek między analizami.

I-2. Rozdział RP-HPLC

Optymalizacja warunków rozdzielania na kolumnie chromatograficznej sprowadza się do doboru wypełnienia kolumny, fazy ruchomej i temperatury rozdzielania.

HPLC można ogólnie podzielić na chromatografię: żelowo-permeacyjną, adsorpcyjną (tzw. faza normalna), podziałową (w tym z fazami odwróconymi, RP), jonowymienną oraz powinowactwa [5]. Chromatografia RP jest najbardziej wszechstronną i najczęściej używaną metodą HPLC. Faza stacjonarna jest tutaj chemicznie modyfikowanym żelom krzemionkowym połączonym z alkilosililowymi związkami dającymi niepolarną, hydrofobową powierzchnię. Retencja związków rozdzielanych spowodowana jest głównie hydrofobowymi interakcjami pomiędzy nimi a węglowodorową powierzchnią sorbentu. Fazę ruchomą (polarną) zazwyczaj stanowi wodny roztwór metanolu, acetonitrylu czy innych rozpuszczalników (mieszających się z wodą). Związki wymywane są w kolejności zmniejszającej się polarności (zwiększającej się hydrofobowości), a podwyższenie polarnego charakteru fazy ruchomej (przez zwiększenie ilości wody) wydłuża czas retencji.

Najbardziej popularną fazę stacjonarną stanowi C_{18} (ODS), czyli oktadecylosilanowa grupa przyłączona do powierzchni żelu krzemionkowego. Jest sorbentem niepolarnym. Można go wykorzystywać do rozdzielania różnych związków — od polarnych do niepolarnych. Dostępne są również wypełnienia o krótszych łańcuchach bocznych przyłączonych do powierzchni żelu. Faza C_8 jest fazą średnio polarną i może być wykorzystywana do wstępnego, orientacyjnego rozdzielania mieszanin o nieznanym składzie, zawierających także związki polarne. Natomiast faza C_2 jest stosowana zwłaszcza do rozdzielania związków wielkocząsteczkowych.

Kolumny z fazą odwróconą są stabilne przy pH 2-7, ponieważ w zasadowych warunkach krzemionka rozpuszcza się. Dotyczy to szczególnie wypełnień z krótszymi łańcuchami bocznymi (C_1 czy C_2).

Oprócz zazwyczaj stosowanych rozpuszczalników metanol-woda, acetonitryl-woda często niezbędne są dodatki do fazy ruchomej w celu zwiększenia selektywności. Dlatego też RP możemy podzielić na chromatografię: z supresją jonową (zahamowanie dysocjacji jonowej słabych kwasów i zasad poprzez dodatek innych silniejszych kwasów i zasad), z kon-

trrolą jonizacji (dodatek odpowiednich buforów), jonowo-asocjacyjną czyli par jonowych (dodatek hydrofobowych przeciwjonów tworzących z oznaczanymi jonami pary jonowe).

II. Rozdział i oznaczanie hormonów w osoczu krwi

II-1. Hormony peptydowe i białkowe

Hormony peptydowe i białkowe to duża grupa związków biologicznie czynnych. Różnią się one znacznie pod względem budowy chemicznej. Jedne są prostymi oligopeptydami, inne większe charakteryzują się skomplikowaną budową przestrzenną. Systematycznie co parę lat ukazują się artykuły przeglądowe dotyczące analizy peptydów i białek za pomocą HPLC [6-8]. W niniejszej pracy przedstawione zostaną ogólne założenia analizy tych związków z wykorzystaniem RP-HPLC.

II-1.1. HPLC peptydów i białek

Zachowanie się poszczególnych hormonów podczas rozdzielania chromatograficznego jest uzależnione od ilości i właściwości reszt aminokwasowych w łańcuchu peptydowym. Dlatego też do ich rozdzielania wykorzystuje się różne metody HPLC, takie jak: żelowo-permeacyjną, jonowymienną czy w fazie odwróconej. Chromatografia w fazie odwróconej stanowi technikę dominującą.

Najczęściej stosowanymi fazami stacjonarnymi RP przy rozdzielaniu tej grupy związków są ODS i żel oktasililowy (C_8). Średnica cząstki sorbentu wynosi zazwyczaj 5-10 μm a rozmiar porów 100 \AA — dla małych związków (do 20 aminokwasów) i 300 \AA — dla peptydów zawierających powyżej 20 aminokwasów w cząsteczce. Zazwyczaj im mniejsza jest ilość aminokwasów w cząsteczce, tym większą hydrofobowością powinna charakteryzować się faza stacjonarna. Dla większych peptydów preferowane są mniej hydrofobowe sorbenty (tj. C_4) a nawet relatywnie polarne (tj. CN). Faza ruchoma to wodne roztwory acetonitrylu, metanolu czy izopropanolu. W celu otrzymania wystarczających oddziaływań peptydu z hydrofobową powierzchnią fazy stacjonarnej, niezbędne są dodatki do eluentu. I tak, aby zmniejszyć ładunek peptydu i wyeliminować hydrofilowe oddziaływanie pomiędzy fazą nieruchomą a rozdzielanym związkiem, stosuje się bufor o pH 2-4. W tych warunkach zahamowana zostaje dysocjacja jonowa reszt kwasowych peptydu (np. kwasu asparaginowego i glutaminowego). Natomiast aniony zawarte w buforze działają jako przeciwjony i tworzą pary jo-

nowe z zasadowymi, bocznymi łańcuchami aminokwasów takich jak arginina, lizyna czy histydyna. Powoduje to maskowanie ładunku dodatniego. Wymagania te spełniają trifluorooctany i fosforany. Kwas trifluorooctowy jest najczęściej stosowanym dodatkiem, normalnie dodawanym w stężeniu 0.05 lub 0.1%.

Najczęściej używane kolumny RP w analizie peptydów mają długość 100-250 mm i średnicę 4-4,6 mm.

II-1.2. Detekcja

Wiązanie peptydowe, podobnie jak aromatyczne reszty aminokwasowe (Tyr, Phe, Trp) silnie absorbują światło w zakresie ultrafioletu (odpowiednio 210-220 nm i 250-290 nm). Dlatego też detektory UV są najczęściej wykorzystywane do oznaczeń peptydów. Jednak w przypadku wielu hormonów peptydowych, występujących w niskich stężeniach w płynach ustrojowych, detekcja UV nie wykazuje wystarczającej czułości. Rozwiązaniem jest zastosowanie detektora fluorescencyjnego i elektrochemicznego.

Przeprowadzając derywatyzację czyli modyfikację chemiczną peptydów możemy oznaczać te związki na poziomie femtomoli [9,10,11]. Wykonuje się to przed kolumną lub za kolumną, dodając do analizowanej próbki lub do eluatu odczynnik, które reagując ze związkami analizowanymi, tworzą ich fluorozujące pochodne. Do najczęściej stosowanych odczynników o właściwościach fluorescencyjnych należą *o*-ftaldialdehyd (OPA), 2,3-naftalenodkarboaldehyd (NDA), fluoreskamina, ninhydryna czy chlorek danzylu (Dns-Cl). Główną wadą metody jest możliwość powstawania kilku produktów reakcji (w przypadku obecności kilku wolnych grup funkcyjnych w cząsteczce peptydu). Pomimo tego technika ta stosowana jest coraz częściej. Wykorzystując laser (ang. *laser induced fluorescence*) zamiast lampy ksenonowej można zwiększyć poziom detekcji o jeden rząd wielkości [12].

W przypadku elektrochemicznej detekcji wykorzystywany jest fakt, że peptydy często posiadają aminokwasy z różnymi grupami funkcyjnymi zdolnymi do utleniania/ redukcji (tj. Tyr, Trp, Met czy mostek siarczkowy pomiędzy Cys-Cys). Zmieniając potencjał można selektywnie przeprowadzać reakcje elektrochemiczne na poszczególnych grupach funkcyjnych peptydu, przez co oznaczany związek może być 'wyodrębniony' z całej mieszaniny (rozdzielony od innych peptydów czy związków).

Ze względu na uzyskiwaną wysoką czułość oznaczeń coraz większego znaczenia nabiera również zastosowanie spektrometru masowego sprzężonego z HPLC.

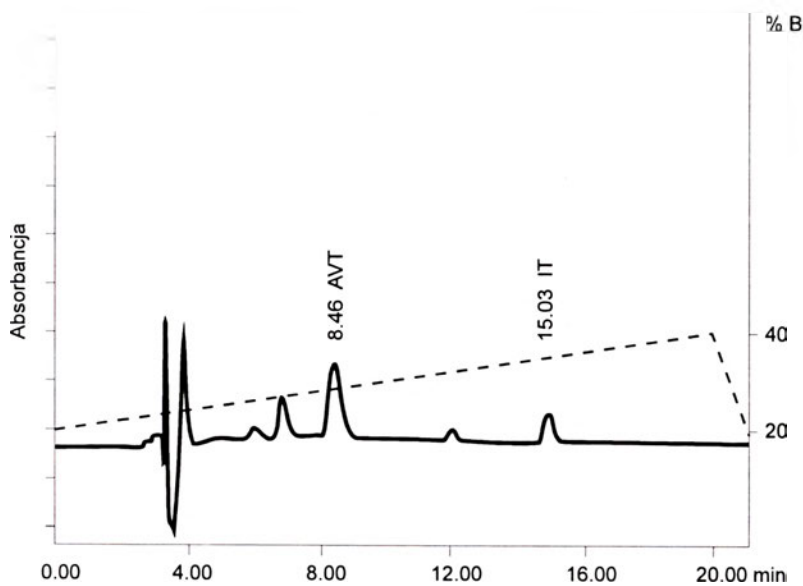
II-1.3. Hormony tylnego płata przysadki

Hormony nerwowej części przysadki mózgowej, np. obecne u ssaków wazopresyna i oksytocyna, należą do nonapeptydów. Wszystkie posiadają mostek disiarczkowy pomiędzy 1 i 6 aminokwasem (cysteiną) i zachowane aminokwasy na pozycjach 1, 6, 7, 9 sekwencji aminokwasów.

Przy analizie nonapeptydów próbkę przed wprowadzeniem na kolumnę chromatograficzną oczyszcza się i zagęszcza za pomocą ekstrakcji do fazy stałej [13, 14, 15]. Natomiast analizę RP-HPLC hormonów przysadkowych przeprowadza się najczęściej w układzie izokratycznym, na kolumnie ODS, z wykorzystaniem detekcji UV [16, 17, 18]. Przykładowo B i i wsp. oznaczali wazopresynę na poziomie 50 pmol/ml osocza [19]. Jak dotychczas najlepszą czułość dla nonapeptydów udało się uzyskać sprzęgając z HPLC udoskonalony spektrometr masowy [20]. Poziom wykrywalności nonapeptydu wynosił 50 fmol/ml.

W centrum zainteresowania naszej grupy badawczej znajdują się nonapeptydy przysadkowe ryb: wazotocyna argininowa i izotocyna będące analogami wazopresyny i oksytocyny. Metoda pozwalająca na oznaczenie obydwu hormonów w jednej próbce została opracowana w naszym laboratorium. Kulczykowska [21] po ekstrakcji hormonów z osocza pstrąga za pomocą SPE a następnie rozdziale tych związków przy pomocy HPLC (Ryc. 2.) oznaczała wazotocynę i izotocynę (UV) na poziomie 10 pmol/ml.

Aby oznaczyć hormony występujące w osoczu w niewielkich stężeniach niezbędne jest zateżnienie nawet 10 ml osocza. W praktyce oznacza to pobieranie krwi do jednej analizy od kilku ryb, co w znacznym stopniu ogranicza stosowalność metody. Sposobem uniknięcia przedstawionej niedogodności może być zwiększenie czułości metody przez zastosowanie detekcji fluorescencyjnej. W tym celu należy przeprowadzić hormon we fluorozującą pochodną. Prowadzone przez nas wstępne prace wskazują, że odpowiednim odczynnikiem do modyfikacji nonapeptydów jest OPA (*o*-ftaldialdehyd). Może on być wprowadzany do cząsteczki hormonu niemal ze 100% wydajnością.



Ryc. 2. Chromatogram typowej próbki osocza pstraga tęczowego przygotowanej wstępnie metodą SPE; kolumna Ultrasphere ODS, 5 μ m, 45 \times 4.6 mm, 250 \times 4.6 mm; elucja gradientowa przy użyciu mieszaniny 0.12% TFA w wodzie (A) — 0.1% TFA w acetonitryl/woda (3:1) (B), 20-40% B w ciągu 20 min; natężenie przepływu fazy ruchomej — 1 ml/min; detektor UV, 215 nm; temperatura 22°C, [21]; stosowane skróty i oznaczenia: AVT — wazotocyna, --- profil gradientu

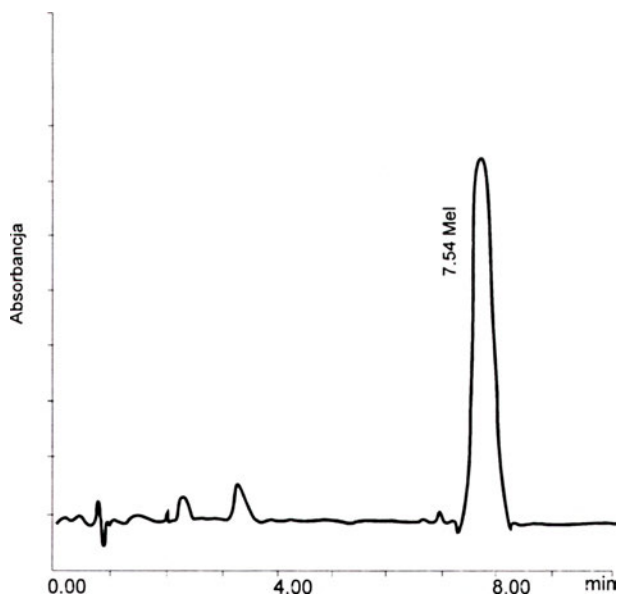
II-2. Pochodne aminokwasów (indoloaminy i katecholaminy)

Indoloaminy (np. melatonina) i katecholaminy (adrenalina, noradrenalina, dopamina) są neurohormonami lub/i neuroprzekaznikami działającymi w centralnym układzie nerwowym (CUN) i w tkankach obwodowych.

Tak jak w przypadku analizy innych związków biologicznie czynnych tak i tu integralną częścią metody jest wstępne oczyszczanie próbki, zawierającej aminy biogenne, z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [22] lub ciecz-ciecz [23, 24]. Sam rozdział HPLC przeprowadzany jest z wykorzystaniem kolumn ODS, najczęściej w układzie izokratycznym [23-24]. W procesie oznaczania pochodnych aminokwasów najbardziej użyteczne są detektory fluorescencyjny i elektrochemiczny, które wykorzystują naturalną fluorescencję oraz zdolność katecholamin i indoloamin do stosunkowo łatwego utleniania się już przy odpowiednio niskich potencjałach [22-23]. Zastosowanie obu typów detektorów daje porównywalne pod względem czułości wyniki. Przekształcenie hormonów w ich fluoryzujące pochodne [26-29] zwiększa poziom wykrywalności do dziesiątych części femtomola (Tabela 1).

Peniston-Bird i wsp. [25] stosując SPE i HPLC z fluorescencyjną detekcją uzyskali limit detekcji 11 fmol/ml, przy czym wydajność ekstrakcji wynosiła tylko 70%. Natomiast Chanut i wsp. [23] oraz Torano i wsp. [24] wstępnie przeprowadzali ekstrakcję ciecz-ciecz za pomocą dichlometanu z wydajnością odpowiednio 96-98% i 96%. Czułość detekcji elektrochemicznej i fluorescencyjnej w tych metodach, po rozdziale chromatograficznym, wynosiła odpowiednio 63.5 i 34 fmol/ml osocza krwi.

Jedną ze stosowanych obecnie metod oznaczania melatoniny została opracowana w naszym laboratorium. Kulczykowska i Iuvone [30] ekstrahowali i zagęszczali melatoninę z osocza na kolumnach, C₁₈, przy wydajności metody 96%. Następnie dokonali rozdziału za pomocą HPLC określając poziom wykrywalności hormonu (detekcja fluorescencyjna) na 13 fmol/ml (Ryc. 3.). Wiarygodność opracowanej metody sprawdzono stosując technikę HPLC z detekcją elektrochemiczną [31]. Zasto-



Ryc. 3. Chromatogram typowej próbki osocza stormi po zastosowaniu SPE; kolumna Ultrasphere ODS, 5 μ m, 45 \times 4.6 mm, 250 \times 4.6 mm; eluent: 60% metanol z natężeniem przepływu fazy ruchomej — 0.6 ml/min; detektor fluorescencyjny, 286 nm (wzbudzenie), 352 nm (emisja); temperatura 22°C, [30]; stosowane skróty: Mel — melatonina.

sowanie obydwu metod w odniesieniu do tych samych próbek osocza krwi pozwoliło stwierdzić, że otrzymane wyniki są niezwykle zbliżone do siebie [30].

II-3. Hormony sterydowe

Hormony sterydowe są to związki lipofilowe regulujące różnorodne procesy biologiczne w organizmie. W osoczu najczęściej oznaczane są kortyzol, kortykosteron, aldosteron, testosteron, estradiol i progesteron.

II-3.1. Oczyszczanie i zagęszczanie

Tak jak w przypadku poprzednio omawianych grup hormonów, również sterydy wymagają wstępnego oczyszczenia przed podaniem na kolumnę chromatograficzną. Podstawowe techniki to wielostopniowa ekstrakcja organiczna (ciecz-ciecz) i ekstrakcja do fazy stałej (SPE). Przy doborze metody trzeba brać pod uwagę oprócz właściwości fizyko-chemicznych badanych związków również fakt, że w osoczu są one częściowo związane z białkami (albuminami lub globulinami). Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, np. chlorkiem metylenu czy eterem etylowym, prowadzi do wyizolowania wolnych sterydów [32]. Przeprowadzana dodatkowo hydroliza połączeń hormon-białko przed ekstrakcją pozwala oznaczyć całkowitą ilość hormonu (związanego i wolnego) [33]. Ekstrakcja do fazy stałej skutecznie zatrzymuje zarówno wolne jak i połączone z białkami hormony na sorbencie (najczęściej używany — ODS) a zanieczyszczenia są wymywane roztworami wodnymi. Sterydy odzyskiwane są z fazy stałej po przemyciu kolumny metanolem. Metoda ta stosowana jest do wstępnego oczyszczania m.in. androgenów i estrogenów [34, 35].

II-3.2. HPLC i detekcja

Przy rozdziale sterydów za pomocą HPLC często wykorzystywana była krzemionka i tlenek glinu jako sorbenty umożliwiające satysfakcjonujące rozdziały. Obecnie popularne są kolumny z fazą odwróconą w tym szczególnie ODS. Z powodzeniem można również stosować wypełnienie z grupami fenyłowymi [32]. Eluent w rozdzielaczach sterydów stanowi mieszanina metanolu, dioksanu lub acetonitrylu z wodą. Hormony kory nadnerczy rozdzielane są w mieszaninie metanol-woda lub dioksan-woda, zaś hormony gonadowe acetonitryl-woda. Przy rozdziale mieszaniny hormonów sterydowych najczęściej stosowany jest gradient stężeń. Typowe kolumny mają długość 100-350 mm i średnicę wewnętrzną 5 mm.

Przy stosowaniu fazy odwróconej trzeba brać pod uwagę fakt, że niepolarny materiał (hormony) może nagromadzić się na kolumnie zmniejszając tym samym selektywność rozdziału. Z tego względu obo-

wiązkowe jest stosowanie przedkolumny, podobnie jak ma to miejsce w przypadku hormonów peptydowych.

Do detekcji i identyfikacji steroidów wykorzystywane są wszystkie wspomniane we wcześniejszych rozdziałach detektory. Poziom wykrywalności sterydów może być znacznie poprawiony przy równoczesnym użyciu dwóch uzupełniających się detektorów na przykład spektrometrów masowych (MS-MS) [32, 36, 37]. Limit detekcji wynosi w tym przypadku kilka femtomoli i jest lepszy w porównaniu np. z RIA.

III. Porównanie czułości metod HPLC z innymi technikami — wnioski

Przez długi czas metody radioimmunologiczne stanowiły podstawowe narzędzie analityczne stosowane przy ilościowym oznaczaniu hormonów. Wysoka czułość (dziesiąte części fmol/ml) jak i dostępność w sprzedaży gotowych zestawów do oznaczeń sprawiają, że metody te są stosowane w rutynowych badaniach do dnia dzisiejszego. Dużym minusem metod radioimmunologicznych jest możliwość wystąpienia reakcji sieciujących i oddziaływań przeciwciał z innymi substancjami mieszaniny, w rezultacie czego otrzymywany wynik jest zawyżony. Z tego względu często niezbędne jest oczyszczanie próbek przed analizą RIA za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Ilościowe techniki chromatograficzne w porównaniu z metodami radioimmunologicznymi wykazują często słabszą czułość i z tego względu przegrywają w konkurencji z RIA. Szczególnie dotyczy to hormonów peptydowych (Tabela 1).

Problem niskiej czułości metod HPLC może być rozwiązany dzięki zastosowaniu nowych detektorów o coraz wyższej czułości. Dla porównania, metoda HPLC daje oznaczenia ilościowe na poziomie kilku lub kilkadziesiąt pmol/ml z detekcją UV, PAD (np. w przypadku nonapeptydów przysadkowych), zaś sprzęgając HPLC z udoskonalonym detektorem MS można podwyższyć czułość metody do kilkadziesiąt fmol/ml [20]. Innym podejściem jest zastosowanie wspomnianej wcześniej derywatywacji hormonów z czułą detekcją fluorescencyjną [12, 26-29, 40] (Tabela 1).

Konkludując technika HPLC może być godna polecenia z uwagi na:

- brak konieczności stosowania izotopów,
- wysoką specyficzność,
- prostotę,

Tabela 1

Czułość różnych metod na przykładzie wybranych hormonów

Metoda	RP-HPLC	RIA
Hormon		
Wazotocyna	10 pmol/ml (UV), [21] 50 fmol/ml (FT-ICR-MS), [20]	1 fmol/ml, [38]
Wazopresyna	0.28 pmol/ml (PAD), [39] 50 pmol/ml (UV), [19] 0.5 pmol/ml (derywatywacja, FD), [40]	0.06 fmol/ml, [41] 0.3 fmol/ml, [42]
Melatonina	13 fmol/ml (FD), [30] 11 fmol/ml (FD), [25] 34 fmol/ml (FD), [24] 63.5 fmol/ml (ED), [23] 0.5 fmol/ml (derywatywacja, FD), [29]	22 fmol/ml, [43] 22 fmol/ml, [44]

- unikanie wielu etapów pośrednich (np. w RIA-otrzymywanie specyficznych przeciwciał),
- stosunkowo niski koszt przy wielu analizach wykonywanych seryjnie.

Należy się spodziewać, że technika ta zyska coraz większą liczbę zwolenników, zwłaszcza w sytuacji ciągłego udoskonalania metod detekcji.

Artykuł otrzymano 17 lutego 2002

Zaakceptowano do druku 4 października 2002

Piśmiennictwo

- Gilar M, Bouvier ESP, Compton BJ (2001) *J Chromatogr A* **909**:111-135
- McDowall RD, Doyle E, Murkitt GS, Picot VS (1989) *J Pharm Biomed Anal* **7**(9):1087-1096
- Herraiz T, Casal V (1995) *J Chromatogr A* **708**: 209-221
- Krishnan TR, Ibrahim I (1994) *J Pharm Biomed Anal* **12**(3):287-294
- Witkiewicz Z (2000) W: Ładny E (red) *Podstawy Chromatografii*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, str. 153-224
- Larive CK et al. (1999) *Anal Chem* **71**(12): 389R-423R
- Mant CT, Hodges RS (1996) *Method Enzymol* **271**: 3-50
- Schoneich Ch et al. (1993) *Anal Chem* **65**: 67R-84R
- Koller M, Eckert H (1997) *Anal Chim Acta* **352**: 31-59
- Boppana VK, Miller-Stein C (1997) *Anal Chim Acta* **352**: 61-69
- Roth M, Uebelhart D (2000) *Anal Lett* **33**(12): 2353-2372
- Kanazawa H, Nagatsuka T, Miyazaki M, Matsushima Y (1997) *J Chromatogr A* **763**: 23-29
- LaRochelle FT, North WG, Stern P (1980) *Pflugers Arch* **387**: 79-81
- Van de Heijning BJM, Koekkoek-Van Den Herik I, Ivanyi T, Van Wimersma Greidanus TB (1991) *J Chromatogr* **565**: 159-171
- Kukucka MA, Misra HP (1994) *J Chromatogr B* **653**: 139-145
- Krummen K, Frei RW (1977) *J Chromatogr B* **132**: 27-36
- Krummen K, Frei RW (1977) *J Chromatogr B* **132**: 429-436
- Lindberg G (1980) *J Chromatogr* **193**: 427-431
- Bi M, Singh J (1999) *J Liq Chrom & Rel Technol* **22**(4): 551-560
- Quenzer TL, Emmett MR, Hendrickson CL, Kelly PH, Marshall AG (2001) *Anal Chem* **73**(8): 1721-1725
- Kulczykowska E (1995) *J Chromatogr B* **673**: 289-293
- Raggi MA, Sabbioni C, Casamenti G, Gerra G, Colonghi N, Masotti L (1999) *J Chromatogr B* **730**: 201-211
- Chanut E, Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Trouvin J-H, Launay J-M (1998) *J Chromatogr B* **709**: 11-18
- Torano JS, Rijn-Bikker P, Merkus P, Guchelaar H-J (2000) *Biomed Chromatogr* **14**: 306-310
- Peniston-Bird JF, Di W-L, Street CA, Kadva A, Stalteri MA, Silman RE (1993) *Clin Chem* **39**(11): 2242-2247
- Ragab GH, Nohta H, Zaitso K (2000) *Anal Chim Acta* **403**(1-2): 155-160
- Chan ECY, Wee PY, Ho PY, Ho PC (2000) *J Chromatogr B* **749**: 179-189
- Hamase K, Tomita T, Kiyomizu A, Zaitso K (2000) *Anal Biochem* **279**: 106-110
- Iinuma F, Hamase K, Matsubayashi S, Takahashi M, Watanabe M, Zaitso K (1999) *J Chromatogr A* **835**: 67-72
- Kulczykowska E, Iuvone PM (1998) *J Chromatogr Sci* **36**: 175-178
- Zawilska J, Iuvone PM (1989) *J Pharmacol Exp Therap* **250**: 86-92

32. Fredline VF, Taylor PJ, Dodds HM, Johnson AG (1997) *Anal Biochem* **252**: 308-313
33. Mason SR, Ward LC, Reilly PEB (1992) *J Chromatogr* **581**: 267-271
34. Vallee M et al. (2000) *Anal Biochem* **287**(1): 153-166
35. Khan MN, Reddy PK, Renaud RL, Leatherland JF (1997) *Comparat Biochem Physiol C-Pharmacol Endocrinol* **118**(2): 221-227
36. Draisci R, Giannetti L, Lucentini L, Palleschi L, Purificato I, Moretti G (1997) *HRC-J High Resol Chromatogr* **20**(8): 421-426
37. Rule G, Hericon J (1999) *J Am Soc Mass Spectrom* **10**(12): 1322-27
38. Warne JM, Hazon N, Rankin JC, Balment RJ (1994) *Gen Comp Endocrinol* **96**: 438-444
39. Rao PS, Weinstein GS, Wilson DW, Rujikarn N, Tyras DH (1991) *J Chromatogr* **536**: 137-142
40. Rhodes GR, Boppana VK (1988) *J Chromatogr* **444**: 123-131
41. Kluge M, Riedl S, Erhart-Hofmann B, Hartmann J, Waldhauser F (1999) *Clin Chem* **45**(1): 98-103
42. Gerbes AL, Witthaut R, Samson WK, Schnizer W, Vollmar AM (1992) *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **30**(4): 229-233
43. Di W-J, Kadva A, Djahanbakhch O, Silman R (1998) *Clin Chem* **44**(2): 304-310
44. Lahiri DK, Davis D, Adkins M, Nurnberger JI (1993) *Biochem Med Metab Biol* **49**: 36-50

SPRAWOZDANIE Z IV KONFERENCJI IMIENIA JAKUBA KAROLA PARNASA

W dniach 15-17 września 2002 odbyła się we Wrocławiu IV Konferencja Parnasowska. Konferencje im. Jakuba Karola Parnasa mają charakter naukowych spotkań biochemików polskich i ukraińskich. Odbywają się dla uczczenia pamięci Jakuba Karola Parnasa, znakomitego polskiego biochemika, w latach 1920-1941 profesora Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, twórcy lwowskiej szkoły biochemicznej, tragicznie zmarłego w moskiewskim więzieniu. Pierwsza Konferencja Parnasowska odbyła się w 1996 roku we Lwowie. Wmurowano wtedy tablicę pamiątkową ku czci Profesora w budynku dawnej Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu, tym samym, w którym przed laty pracował Profesor Parnas. Postanowiono, że konferencje będą odbywały się co dwa lata, naprzemiennie, w Polsce i na Ukrainie, a za ich organizację odpowiadać będzie Polskie i Ukraińskie Towarzystwo Biochemiczne. Zgodnie z tym, następna, druga Konferencja odbyła się w roku 1998 w Gdańsku, a jej głównym organizatorem był prof. Angielski (Gdańsk). Kolejna, III Konferencja odbyła się w roku 2000, znowu we Lwowie, a jej głównym organizatorem był prof. Stoika (Lwów).

W roku bieżącym IV Konferencja Parnasowska odbywała się we Wrocławiu, organizowana, tak jak poprzednio, przez Towarzystwa Biochemiczne obu krajów. Należy dodać, że współpracę tych Towarzystw uważa się za wzorową. Ponadto, w tym roku, Konferencja odbywała się w ramach obchodów 300-lecia Uniwersytetu Wrocławskiego, a jej głównym organizatorem był prof. Andrzej Dżugaj (Wrocław).

W IV Konferencji Parnasowskiej wzięło udział 50 naukowców polskich i 60 ukraińskich. Tak liczny udział kolegów z Ukrainy był możliwy dzięki finansowemu wsparciu licznych instytucji w Polsce. Dzięki ich pomocy 35 kolegów z Ukrainy otrzymało stypendia, umożliwiające pobyt w Polsce. Były to głównie osoby młode, studenci, doktoranci, czy młodzi pracownicy nauki. Taki liczny udział w Konferencji młodych ludzi był jednym z celów polskich organizatorów. Należy dodać, że nikt z przyjeżdżających na Konferencję gości ukraińskich nie płacił wpisowego, a ponadto dzięki władzom Uniwersytetu Wrocławskiego wszyscy ukraińscy uczestnicy Konferencji uzyskali specjalne zniżki za pobyt w Hotelu Studenckim.

Tematyka Konferencji dotyczyła molekularnych mechanizmów aktywacji komórki — „MOLECULAR MECHANISM OF CELL ACTIVATION: BIOLOGICAL SIGNALS AND THEIR TARGET ENZYMES”. Inauguracja Konferencji odbyła się w przepięknej Auli Leopoldynowskiej. Plenarne wykłady wygłosili: prof. Jacek Otlewski (Wrocław) „Structural and energetic aspects of serine protease-protein inhibitor interaction”, Parnas Lecture, (Zwycięzca w Konkursie na Nagrodę Parnasa w roku 2001); prof. Sergiy Komisarenko (Kijów) „Molecular mechanisms of lymphocyte activation” (Prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego) oraz prof. Kai Simons (Drezno) „Lipid rafts in membrane trafficking and cell polarity” (President of European Life Science Organization).

Tematyka kolejnych Sesji Konferencji, które odbywały się w gmachu Instytutu Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego była następująca: I. Metabotropic receptors and cross-talk signalling, II. Signalling in cell differentiation, III. Immune system and intracellular signalling, IV. Target enzymes, V. Signalling mediated by ionotropic receptors, voltage dependent channels and low molecular weight molecules.

W Sesjach tych wygłoszono 30 wykładów, z tego 15 przez naukowców z Polski i 15 z Ukrainy. Należy dodać, że wszyscy uczestnicy Konferencji podkreślali stale rosnący poziom naukowy wykładów, jak również wysoki poziom ich prezentacji.

Na sesji plakatowej wystawiono 51 posterów, z tego 18 zgłoszono do konkursu na najlepszą prezentację. Raz wywieszane plakaty były do wglądu przez cały czas trwania Konferencji. Komisja Konkursowa, której przewodniczył prof. Andrzej Sybirny ze Lwowa i w skład której wchodził polscy i ukraińscy naukowcy, wyłoniła dwie młode osoby z Polski i z Ukrainy, które prezentowały najlepsze plakaty. Nagrody dostały: Katerina Shostak (Kijów) za prezentację posteru: Shostak K.O., Dmitrenko V.V., Garifulin O.M., Rozumenko V.D., Khomenko O.V., Zozulya Y.A., Zehetner G., Kavsan V.M. „Inactivation of putative suppressor gene Tsc-22 in human brain tumors”, oraz Rafał Czajkowski (Warszawa) za prezentację plakatu: Czajkowski R., Banachiewicz W., Sabała P., Ilnytska O., Drobot L., Barańska J. „Differential effects of P2Y1 and on proliferation of glioma C6 cells”. Nagrody, po 1000 zł każda, zostały ufundowane przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego

PAN, któremu organizatorzy pragną serdecznie podziękować, a w szczególności wyrazić wdzięczność prof. Jerzemu Duszyńskiemu.

Konferencja charakteryzowała się niezwykle miłą atmosferą. Sprzyjała jej ogromna życzliwość władz uniwersyteckich, miejskich i wojewódzkich. Na temat Konferencji ukazały się artykuły w miejscowej prasie i wywiady w Telewizji. Honorowy patronat nad Konferencją objął Rektor Uniwersytetu Wrocławskiego, prof. Zdzisław Latajka, Rektor Akademii Medycznej we Wrocławiu, prof. Leszek Paradowski, Prezydent Wrocławia, p. Stanisław Husakowski, Wojewoda i Marszałek Regionu Dolnośląskiego, pp. Ryszard Nawrat i Emilian Stanczyszyn, Arcybiskup Wrocławia, Ksiądz Kardynał Henryk Gulbinowicz, oaz Wiceprezydent Polskiej Akademii Nauk, prof. Włodzimierz Ostrowski, Ambasador Ukrainy w Polsce, p. Olexander Nykonenko, p. Jan Nowak-Jeziorański i p. Barbara Parnasowa. Wrocław jest miastem o starej, wielokulturowej tradycji i odbywająca się w tym właśnie mieście polsko-ukraińska Konferencja nabiera specjalnego znaczenia. Jesteśmy przekonani, że zadziergnięte w czasie jej trwania polsko-ukraińskie przyjaźnie oraz współpraca będą procentować w przyszłości.

Należy dodać, że następna Konferencja Parnasowska odbędzie się w Kijowie w roku 2005. Przesunięcie o rok jest spowodowane faktem wygrania przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne konkursu na organizację Konferencji Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), która odbędzie się w 2004 roku w Warszawie i w której to przewidujemy liczny udział naszych wschodnich przyjaciół. Na obydwie konferencje, FEBSu i Konferencję Parnasowską, już teraz wszystkich Państwa zapraszamy.

Profesor Andrzej Dżugaj

(Główny Organizator IV Konferencji
Parnasowskiej we Wrocławiu)

Profesor Jolanta Barańska

(Prezes Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego)

Polscy Organizatorzy Konferencji wyrażają ogromną wdzięczność następującym Osobom i Instytucjom za pomoc finansową, bez której udziału zorganizowanie Konferencji byłoby niemożliwe. Są to: Rektor Uniwersytetu Wrocławskiego, Komitet Badań Naukowych, Polska Akademia Nauk, Polska Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, Prezydent Wrocławia i Marszałek Sejmiku Regionu Dolnośląskiego.

Sprawozdanie z XXXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Kolejny Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbył się w dniach 18-22 września 2002 we Wrocławiu. Został włączony w uroczystości obchodów 300-lecia Uniwersytetu Wrocławskiego. Honorowy Patronat powierzono J.M.Rektorowi Uniwersytetu Wrocławskiego.

Program naukowy Zjazdu stanowiło XIII Sesji, o zróżnicowanej tematyce, składających się z wykładów i prezentacji plakatowych.

Organizację Sesji naukowych powierzono głównie Koleżankom i Kolegom ze środowiska wrocławskiego, reprezentującym Uniwersytet Wrocławski, Akademię Medyczną, Akademię Rolniczą, Politechnikę Wrocławską i Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej. Jednocześnie do przygotowania Sesji zaprosiliśmy profesorów z różnych środowisk naukowych w Polsce (np. z Warszawy, Poznania, Gdańska, Krakowa i Łodzi). I tak w programie naukowym Zjazdu znalazły się następujące tematy: STRUKTURA I FUNKCJA BIAŁEK (prof. dr hab. Jacek Otlewski); GLIKOBIOLOGIA I GLIKOPATOLOGIA (prof. dr hab. Elwira Lisowska, prof. dr hab. Iwona Kątnik-Prastowska i prof. dr hab. Jerzy Kościelak); STRUKTURA I FUNKCJA KWASÓW NUKLEINOWYCH (prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska); BIOLOGIA NOWOTWORÓW - ODDZIAŁYWANIA ADHEZYJNE-APOPTOZA (prof. dr hab. Czesław Radzikowski, prof. dr hab. Maciej Ugorski i prof. dr hab. Ewa Sikora); GENOMIKA (prof. dr hab. Stanisław Cebrat i dr hab. Jacek Leluk); BIOTECHNOLOGIA: AGROBIOTECHNOLOGIA (prof. dr hab. Jan Szopa) I BIOTECHNOLOGIA W PRODUKCJI ŻYWNOSCI (prof. dr hab. Justyna Chrzanowska); MOLEKULARNE PODSTAWY RUCHU KOMÓRKI (prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz i dr hab. Jolanta Rędownicz); BŁONY BIOLOGICZNE I TECHNOLOGIA LIPOSOMOWA (prof. dr hab. Aleksander Sikorski i prof. dr hab. Arkadiusz Kozubek); BIOLOGIA CHLOROPLASTÓW I MITOCHONDRIÓW (prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak i prof. dr hab. Hanna Jańska); BIOCHEMIA W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ; (prof. dr hab. Teresa Banaś i dr hab. Danuta Kwiatkowska); MOLEKULARNE PODSTAWY WYSIŁKU I TRENINGU W SPORCIE (prof. dr hab. Jerzy Popinigi i prof. dr hab. Jerzy Żołędź); DYDAKTYKA BIOCHEMII (prof. dr hab. Zofia Walter) i DONIESIENIA RÓŻNE oraz SESJA SPECJALNA „50 LAT PODWÓJNEJ SPIRALI” (prof. dr hab. Jan Barciszewski i prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska), poświęcona przypadającej w przyszłym roku rocznicy opisanie modelu struktury DNA.

Inauguracja Zjazdu odbyła się we Wrocławiu, w dniu 18 września o godz. 17-tej w nowo-wybudowanym hotelu Mercure-Panorama, dysponującym salą konferencyjną na 600 osób. Wykład inauguracyjny zat. „Białka szoku termicznego jako bufor ewolucyjny” wygłosił przy pełnej sali prof. dr hab. Maciej Żylicz.

W części oficjalnej po okolicznościowych wystąpieniach i powitaniach — Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr hab. Jolanta Barańska poinformowała zebranych o nagrodach przyznanych jak co-roczenie w różnych konkursach organizowanych pod patronatem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną, wykonaną w polskim laboratorium, opublikowaną w roku 2001 otrzymał prof. Czesław Cierniewski wraz z Zespołem: J. Bącela, I. Papiewska, I. Fijałkowska, B. Walkowiak. Nagrodę za badania w dziedzinie chemii i biochemii kwasów nukleinowych ufundowaną przez Sigma-Aldrich przyznano Zespołowi — A. Lochowska, R. Iwanicka-Nowicka, D. Płochocka, M. M. Hryniewicz. Nagrodę im. prof. Bolesława Skarżyńskiego uzyskali dr Andrzej Trzeciak i prof. Janusz Błasiak - za najlepszą pracę opublikowaną w „Postęпах Biochemii” w roku 2001. Nagrodę profesora Antoniego Dmochowskiego za publikację o walorach dydaktycznych otrzymał Zespół — A. Kozik, M. Rapala-Kozik i I. Guevara-Lora. Specjalne wyróżnienie w tym konkursie za wkład w rozwój dydaktyki biochemii otrzymał prof. Stefan Angielski.

Inaugurację uświetnił Wrocławski Zespół Solistów „Ricordanza” pod dyrekcją Wiktora Kuzniecowa — racząc nas muzyką Antonio Vivaldiego, Tomaso Albinioniego i Georga Fridricha Haendla. Wieczór inauguracyjny zakończyliśmy spotkaniem Uczestników Zjazdu w miłej i radosnej atmosferze, w wypełnionych po brzegi kularach hotelu Mercure-Panorama przy lampce wina i różnych smakołykach.

Wykłady i Sesje Plakatowe odbywały się wzorem roku 1993 (kiedy to miałam przyjemność przewodniczyć Komitetowi Organizacyjnemu XXIX Zjazdu PTBioch) — na terenie Wydziału Chemii i Instytutu Matematyki

Uniwersytetu Wrocławskiego, położonych obok siebie w malowniczej, ulubionej przez Wrocławian części miasta nad Odrą, pomiędzy Mostami Pokoju i Grunwaldzkim z widokiem na Ostrów Tumski — najstarszą część Wrocławia. Pogoda nam dopisała!

19 września rano rozpoczęliśmy obrady o godz. 8-jej wykładem plenarnym Profesora Czesława Cierniewskiego z Łodzi zat. „**Inhibitor aktywatorów plazminogenu — wczoraj, dziś i jutro**” — upamiętniającym otrzymaną przez Profesora wraz z Zespołem nagrodę J.K. Parnasa za osiągnięcia w roku 2001. Przyznam, że wczesna godzina wykładu budziła moje obawy, a jednak wielka sala wykładowa Wydziału Chemii (240 miejsc) była wypełniona!

O godzinie 9-tej trwały już obrady w poszczególnych Sesjach. I tak czwartek 19 września i piątek 20 września były dniami niezwykle pracowitymi. Obradowało równolegle sześć, a w piątek nawet siedem Sesji, z których każda zawierała oprócz wykładów także „blok czasowy” — poświęcony prezentacji prac w formie plakatów (od godz. 12:15 do 13:15, lub od godz. 17 do 18). W sobotę 21 września zaplanowaliśmy wykłady i dyskusje przy plakatach tylko do godz. 14-tej, wiedząc, że wielu uczestników naszego Zjazdu zechce zdążyć na niedzielę do domu!

Ogółem we wszystkich Sesjach wygłoszono **114 wykładów** i 12 krótkich komunikatów. Gościliśmy wykładowców z różnych polskich ośrodków naukowych i z zagranicy: USA, Francji, Niemiec, Anglii, Ukrainy i Białorusi. Niektóre Sesje — jak MOLEKULARNE PODSTAWY RUCHU czy GENOMIKA — z uwagi na obecność wielu Gości z zagranicy odbywały się całkowicie w języku angielskim. Najdalszą drogę — aby uczestniczyć w naszym Zjeździe przebyli wykładowcy z Bethesdy NIH (USA) Edward D. Korn, James R. Sellers i Hanna Brzeska — Goście Sesji nr VII „MOLEKULARNE PODSTAWY RUCHU KOMÓRKI”.

We wszystkich Sesjach zaprezentowano ogółem **502 plakaty**. I tak rekordową ich liczbę oglądaliśmy w Sesjach BIOLOGIA NOWOTWORÓW – ODDZIAŁYWANIA ADHEZYJNE – APOPTOZA (**94**); BIOCHEMIA W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ (**91**); w SESJI RÓŻNE (**83**); STRUKTURA I FUNKCJA KWASÓW NUKLEINOWYCH (**76**).

Na uwagę zasługuje wysoki poziom przygotowanych wykładów i posterów. Wszystkie Sesje cieszyły się dużym zainteresowaniem. Z uwagi na ich „upakowanie” w krótkim czasie wybory merytoryczne były trudne. Zgodnie z przewidywaniami, szczególnie „tłoczno” było w czasie obrad Sesji — powstałej z połączenia planowanych wcześniej trzech Sesji w jedną zat. „BIOLOGIA NOWOTWORÓW — ODDZIAŁYWANIA ADHEZYJNE — APOPTOZA”.

Wydarzeniem szczególnym była zaplanowana na późne godziny wieczorne (od 18-tej do 21-szej) Sesja Specjalna, poświęcona przypadającemu w roku 2003 jubileuszowi zaprezentowania modelu struktury DNA przez Watsona i Cricka. W ROK DNA, którego oficjalne obchody zaplanowano na rok 2003 weszliśmy tłumnie! W ostatniej chwili musieliśmy przenieść obrady (tj. wykład prof. dr hab. Włodzimierza Ostoji-Zagórskiego zat. „**Podwójna spirala — historia intuicji**” i film „Life story”), do największej z sal (250 osób) jakimi dysponowaliśmy! Wszyscy Uczestnicy Sesji otrzymali przywieziony z Poznania przez prof. Jana Barciszewskiego znaczek okolicznościowy — przedstawiający model struktury DNA.

W czasie trwania Zjazdu zgodnie z wieloletnią tradycją odbył się konkurs na najlepszą pracę prezentowaną przez Młodych Biochemików. I tak nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego otrzymały J. Grybel i D. Kaźmierczak z Wrocławia. Wyróżniono ponadto prace dwóch Zespołów- M. Kamiński, M. Karbowski, J. Kędzior, Y. Miyazaki, M. Woźniak, T. Wakabayashi z Gdańska i R. Hordejuk, A. Szewczyk, K. Dołowy z Warszawy. Nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth otrzymali studenci J. Kobiela i J. Krajewski z Gdańska. Wyróżniono także prace wykonane przez studentów z Koła Naukowego w Akademii Medycznej w Gdańsku i Zespół z Instytutu Onkologii w Gliwicach.

Podczas obrad Zjazdu mieliśmy też okazję do zapoznania się z bogatą ofertą wielu firm prezentujących wszystko to, co jest potrzebne we współczesnym laboratorium. Mogliśmy też wysłuchać wykładów na temat najnowszych zastosowań oferowanego sprzętu np. wykładu o mikrodysekcji laserowej czy analizie materiału genetycznego pojedynczej komórki.

Oficjalne zakończenie obrad, połączone z wręczeniem nagród w konkursie dla Młodych Biochemików, okolicznościowymi podziękowaniami i zaproszeniem Wszystkich na kolejny Zjazd do Gdańska — miało miejsce w Instytucie Chemii, o godz. 14-tej.

Pomimo bardzo napiętego programu obrad — wieczorem, w czwartek 19 września, po godz. 20-tej, ucztowaliśmy, a nawet tańczyli(!) w restauracji „Letnia”, pod pięknymi starymi dębami, na terenie wrocławskiego ZOO.

Powodzeniem cieszyły się przygotowane przez Organizatorów imprezy kulturalne. Wielu Uczestników Zjazdu znalazło czas na zwiedzanie Wrocławia z przewodnikiem, czy też wizytę w Panoramic Raclawickiej, której oglądanie za każdym razem dostarcza niezapomnianych wrażeń. Trochę było nam smutno, że nie znaleźli się chętni do udziału w zaplanowanej sobotnio-niedzielnej wyprawie w Karkonosze — z noclegiem w przepięknie położonym, zarezerwowanym dla nas schronisku „Samotnia”. Myślimy, że perspektywa zabierania specjalnego obuwia i spania w wieloosobowej sali nie była zbyt kusząca. Jest to również „znanie” przesładującego nas ciągłego braku czasu. Wiele osób gościło bowiem we Wrocławiu jedynie przez dwa dni.

Dziękujemy wszystkim Instytucjom i Organizacjom, które wsparły XXXVIII Zjazd PTBioch finansowo tj. Komitetowi Badań Naukowych, Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO PAN, Fundacji na rzecz Rozwoju Glikobiologii, Rektorowi Uniwersytetu Wrocławskiego, firmom - Sigma-Aldrich, Olympus Optical Polska, ICN Biomedicals. Bez tego wsparcia nie udałooby się nam zrealizować wszystkich planowanych zamierzeń.

Dziękuję Wszystkim Zaangażowanym w przygotowanie Zjazdu we Wrocławiu — Organizatorom tyłu Sesji naukowych, Członkom Komisji ds. Nagród, Koleżankom, Kolegom i Studentom — za pomoc w „najgorętszych” chwilach. Przygotowaniem Zjazdu towarzyszyły bowiem różnej natury „trudności techniczne” i obawy o prawidłowe funkcjonowanie poszczególnych „pionów” organizacyjnych.

Dniem przełomowym była sobota 14 września 2002, kiedy do Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego przy ul. Przybyszewskiego 63 „przyjechały” (również z przygodami!) wydrukowane Materiały Zjazdowe i Programy. Wszystkim się podobały! W wielkiej sali ćwiczeń nastąpiło ekspresowe pakowanie „toreb zjazdowych” przy pomocy studentów i osób zaprzyjaźnionych z Organizatorami. Widok 80 wielkich plastikowych worków, zawierających 800 toreb z wyposażeniem Uczestnika Zjazdu, gotowych do transportu na teren Biura Zjazdu w Instytucie Chemii — sprawił nam wszystkim wielką radość!

Na zakończenie dziękuję wszystkim Miłym Uczestnikom Zjazdu za tak liczne przybycie. W XXXVIII Zjeździe PTBioch uczestniczyło ponad 800 osób! Staraliśmy się uczynić Państwa pobyt we Wrocławiu interesującym naukowo, miłym towarzysko i owocnym w przyszłości. Proszę nam wybaczyć ewentualne niedociągnięcia.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego, jeszcze raz Wszystkim za Wszystko dziękuję. Koleżankom i Kolegom z Gdańska — organizatorom kolejnego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego życzymy sukcesu!

Z wyrazami szacunku
Przewodnicząca Wrocławskiego Oddziału PTBioch i
Komitetu Organizacyjnego XXXVIII Zjazdu

Prof. dr hab. Maria Malicka-Błaszkiwicz

Sprawozdanie z 28 Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS)

28 Zjazd Federacji odbył się w Stambule w dniach 20-25 października 2002 r, zorganizowany przez Izraelskie Towarzystwo Biochemiczne. Według wcześniejszych ustaleń miał się on odbyć w Jerozolimie. Zmiana lokacji Zjazdu w pewnej mierze odbiła się na frekwencji. W zjazdach Federacji dotąd brało na ogół udział ponad 1500 osób, tym razem jednak było tylko blisko 900 uczestników, w tym 107 z Izraela i 191 z Turcji. Polska delegacja, dość liczna, obejmowała 30 uczestników. W programie naukowym znalazły się następujące Sympozja: Genes — Structure to Function; Cellular Functions and Dynamics; Proteins: Life Machines; Regulatory Processes; Novel Concepts in Molecular Physiology; Coping with the Environment; Science and Society. Każde z sympozjów składało się z około siedmiu sesji (razem 42 sesje). Ponadto odbyły się warsztaty naukowe: Workshop Plant Transgenic Engineering, Enzyme Engineering, Nuclear Biology i Peptide Engineering. W dwóch sesjach posterowych przedstawiono około 500 plakatów.

Zjazd poprzedziło spotkanie młodych naukowców — FEBS Young Scientists Forum na temat „Cytokines and chemokines, their receptors and response”. W tym spotkaniu uczestniczyło 97 młodych ludzi z Europy, w tym 5 z Polski. Wszyscy uczestnicy otrzymali stypendia od władz FEBS, co umożliwiło im uczestnictwo w obradach Zjazdu FEBS.

W trakcie Zjazdu uczestnicy otrzymali First Announcement — informujące o organizacji 29 Kongresu FEBS w 2004 w Warszawie przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Każdy uczestnik otrzymał tę informację już z materiałami zjazdowymi. Jednocześnie w stoisku wystawowym FEBS rozdawano foldery turystyczne, propagujące piękno naszego kraju. Uczestnicy z Polski zaangażowani w organizację Kongresu FEBS w 2004 starali się poznać techniczną stronę organizacji Zjazdu, tak aby kongres warszawski wypadł jak najlepiej.

Podczas posiedzenia Council Meeting odbyły się wybory nowych członków różnych Komisji FEBS. Prof. Jerzy Duszyński (Instytut Nenckiego, Warszawa) został powołany do Komisji Publikacyjnej (Publications Committee). Ogółem cztery osoby z Polski pełnią funkcje kierownicze w komisjach. Prof. Maciej Nałęcz (Przewodniczący FEBS Fellowship Committee), prof. Jan Barciszewski (członek Advanced Courses Committee), prof. Jerzy Duszyński (członek Publications Committee) i prof. Jolanta Barańska (Working group on Ways to Assist Central and Eastern European Country).

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Prof. Jolanta Barańska

Roczny spis treści tom 48, nr 1, 2, 3, 4, 2002

ARTYKUŁY

- Izabela Piotrowska, Beata Dudzińska, Tomasz Twardowski** — Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego 2
- Barbara Nawrot** — Katalityczne DNA — deoksyrybosomy 20
- Barbara Grzelakowska-Sztabert** — Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego — udział ubiquitynacji. 34
- Krystyna Dzierzbicka, Jarosław Kawula, Aleksander M. Kołodziejczyk** — Batracylina (BAT) — potencjalny lek przeciwnowotworowy 48
- Małgorzata M. Doszczak, Lucyna Kaszubska, Arkadiusz Pierchalski, Jacek Bigda** — Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFB przez czynnik martwicy nowotworu 54
- Joanna Trojanek** — Zwierzęce kinazy tyrozynowe 66
- Maria Klimecka, Joanna Trojanek, Grażyna Muszyńska** — Roślinne kinazy białkowe fosforylujące tyrozinę 74
- Renata Dębowska** — Oksydazy polifenolowe roślin wyższych 81
- Jerzy Osipiuk** — Eukariotyczne i archebakteryjne białka opiekuńcze Cpn60 typu II 94
- Edward A. Czuryło** — Zjawisko zwijania łańcucha polipeptydowego białek 101
- Wojciech Poręba, Katarzyna Gawlik, Jan Gutowicz** — Katepsyna B a proces inwazji nowotworowej. 111
- Robert Wysocki, Ewa Wiśniewska** — Molekularne podstawy działania arseniku w komórkach białaczki promielocytowej 121
- Maciej Kmiecik, Artur Jarmołowski** — Rola jądrowych białek wiążących się z 7-metyloguanozyną na końcu 5' RNA 131
- Małgorzata Sidorkiewicz** — Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C 143
- Ireneusz Majsterek, Janusz Błasiak** — Chromosom Filadelfia 156
- Andrzej T. Wierzbicki** — Zagadka histonu H1 167
- Małgorzata Jakubiec, Magdalena Boguta** — Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 175
- Marek Koter, Jacek Hennig** — Wyciszenie ekspresji genów i nowe narzędzia biologii molekularnej roślin 182
- Monika Kamińska, Adrianna Zakrzewska, Maria Madajka, Jan Barciszewski** — Udział syntetaz aminoacylo-tRNA w procesach komórkowych 189
- Bożena Wieczorek, Jadwiga Gniot-Szulczycka** — Niedobór cholesterolu sygnałem do transdukcji informacji z endoplazmatycznego retikulum do jądra komórkowego — procesy proteolitycznego odszczepienia czynników transkrypcyjnych z błon ER. 200
- Krystyna Michalak, Andrzej B. Hendrich** — Rola lipidów błony komórkowej w zjawisku oporności wielolekowej MDR i jego modulacji 208
- Edyta Gendaszewska-Darmach** — Receptory nukleotydowe 220
- Małgorzata Romanowska, Michał Komozyński** — Adenozyna — neuroprzebieg i neuromodulator w centralnym układzie nerwowym 230

Dagmara Jakimowicz, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska — Segregacja materiału genetycznego u Prokaryota 242

Robert Lenartowski, Anna Goc — Rola macierzy jądrowej w przestrzennej organizacji procesów jądrowych 252

Dorota Piękna-Przybylska, Halina Augustyniak — Import białek do mitochondriów 262

Barbara Dołęgowska, Dariusz Chlubek — Nadrodzina lipoksygenaz — struktura i funkcje w metabolizmie 275

Marta Baksalerska-Pazera, Grażyna Niewiadomska — Budowa i rola białka tau . 287

Joanna Michalik, Zbigniew Bartoszewicz — Prolaktyna (PRL) — wielofunkcyjny, przysadkowy hormon peptydowy 296

Jarosław Ruczyński, Piotr Rekowski — Biologiczna aktywność galaniny i jej zna-

czenie w procesach fizjologicznych i patologicznych 306

Magdalena Gozdowska, Ewa Kulczykowska — Oznaczanie hormonów w osoczu krwi techniką HPLC 317

INNE

Sławomir Pikula — Recenzja książki “Inżynieria genetyczna — u progu nowej ery” . . 92

Sprawozdanie z XXXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 10-14 września 2001 151

Rezolucja Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. 154

Krzysztof Zabłocki — Recenzja 239

Sprawozdania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. 325

Roczny spis treści

Indeks autorów prac przeglądowych, tom 48, 2002

A

Augustyniak H — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Biologii Molekularnej Roślin, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

B

Baksalerska-Pazera M — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurofizjologii, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, mbaksal@nencki.gov.pl

Barciszewski J — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, jbarcisz@ibch.poznan.pl

Bartoszewicz Z — SP-CSK AM, Klinika Endokrynologii, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

Bigda J — Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Akademia Medyczna w Gdań-

sku, Katedra Histologii i Immunologii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, jbigd@amg.gda.pl

C

Chlubek D — Pomorska Akademia Medyczna, Zakład Biochemii i Chemii, ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, biochem@pam.szczecin.pl

Czuryło EA — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, eczurylo@nencki.gov.pl

D

Dębowska R — Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Zakład Fizjologii Wzrostu i Rozwoju Roślin, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, wania@biol.uw.edu.pl

Dołęgowska B — Pomorska Akademia Medyczna, Zakład Biochemii i Chemii, ul. Powstań-

ców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, ba-
siad@sci.pam.szczecin.pl

Doszczak MM — Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-AMG, Akademia Medyczna
w Gdańsku, Katedra Histologii i Immunologii, ul.
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Dudzińska B — Instytut Chemii Bioorganicznej
PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Dzierzbicka K — Politechnika Gdańska, Kate-
dra Chemii Organicznej, ul. Narutowicza 11/12,
80-952 Gdańsk, kd@chem.pg.gda.pl

G

Gawlik K — Uniwersytet Wrocławski, Instytut
Mikrobiologii, Zakład Fizykochemii Drobn-
oorganizmów, ul. Przybyszewskiego 63/77, 52-148
Wrocław

Gendaszewska-Darmach E — Centrum Badań
Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład
Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112,
90-363 Łódź, edyta@bio.cbmm.lodz.pl

Gniot-Szulżycka J — Uniwersytet Mikołaja Ko-
pernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut
Biologii, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 7/9,
87-100 Toruń, jgsz@biol.uni.torun.pl

Goc A — UMK, Instytut Biologii Ogólnej i Mole-
kularnej, Pracownia Genetyki, ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń, goc@cc.uni.torun.pl

Gozdowska M — Instytut Oceanologii PAN,
Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej w
Gdyni, ul. Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia,
magda@cbmpan.gdynia.pl

Grzelakowska-Sztabert B — Instytut Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pa-
steura 3, 02-093 Warszawa, bgs@nencki.gov.pl

Gutowicz J — Uniwersytet Wrocławski, Instytut
Mikrobiologii, Zakład Fizykochemii Drobn-
oorganizmów, ul. Przybyszewskiego 63/77, 52-148
Wrocław, gutowicz@microb.uni.wroc.pl

H

Hendrich A — Akademia Medyczna we
Wrocławiu, Katedra Biofizyki, ul. Chałubińskie-
go 10, 50-368 Wrocław, hendrich@bio-
fiz.am.wroc.pl

Hennig J — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Zakład Biochemii Roślin, ul. Pawińskiego 5A,
02-106 Warszawa, jacekh@ibb.waw.pl

J

Jakimowicz D — Instytut Immunologii i Terapii
Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN,
Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114
Wrocław

Jarmołowski A — Uniwersytet im. Adama Mic-
kiewicza w Poznaniu, Instytut Biologii Moleku-
larnej i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów,
ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

K

Kamińska M — Instytut Chemii Bioorganicznej
PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

Kaszubowska L — Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-AMG, Akademia Medyczna
w Gdańsku, Katedra Histologii i Immunologii, ul.
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Kawula J — Politechnika Gdańska, Katedra
Chemii Organicznej, ul. Narutowicza 11/12,
80-952 Gdańsk

Klimecka M — Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Kmieciak M — Uniwersytet im. Adama Mickie-
wicza w Poznaniu, Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów, ul.
Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Kołodziejczyk AM — Politechnika Gdańska,
Katedra Chemii Organicznej, ul. Narutowicza
11/12, 80-952 Gdańsk

Komoszyński M — Uniwersytet Mikołaja Ko-
pernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład
Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, mich-
kom@dove.boa.uni.torun.pl

Koter M — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Zakład Biochemii Roślin, ul. Pawińskiego 5A,
02-106 Warszawa, koterm@megapolis.pl

Kulczykowska E — Instytut Oceanologii PAN,
Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej w
Gdyni, ul. Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia

L

Lenartowski R — UMK, Instytut Biologii Ogól-
nej i Molekularnej, Pracownia Genetyki, ul. Ga-
garina 9, 87-100 Toruń, rlenart@eagle.biol.
uni.torun.pl

M

Madajka M — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

Michalak K — Akademia Medyczna we Wrocławiu, Katedra Biofizyki, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław, michalak@biofiz.am.wroc.pl

Michalik J — Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów POLATOM, 05-400 Otwock-Świerk, joanna_mi@poczta.onet.pl

Muszyńska G — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, muszynsk@ibb.waw.pl

N

Nawrot B — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, bnawrot@mail.lodz.pdi.pl

Niewiadomska G — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurofizjologii, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

O

Osipiuk J — EURX sp. z o.o., ul. Jaśkowa Dolina 29, 80-286 Gdańsk, osipiuk@eurx.com.pl

P

Pierzchalski A — Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Akademia Medyczna w Gdańsku, Katedra Histologii i Immunologii, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Piękna-Przybylska D — Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Biologii Molekularnej Roślin, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, piekna@main.amu.edu.pl

Pikuła S — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, slawek@nencki.gov.pl

Piotrowska I — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Poręba W — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Mikrobiologii, Zakład Fizykochemii Drobnoustrojów, ul. Przybyszewskiego 63/77, 52-148 Wrocław

R

Rekowski P — Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Zakład Chemii Związków Biologicznie Czynnych, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk

Romanowska M — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, malgrom@biol.uni.torun.pl

Ruczyński J — Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Zakład Chemii Związków Biologicznie Czynnych, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk, jarecki@chemik.univ.gda.pl

S

Sidorkiewicz M — Akademia Medyczna w Łodzi, Instytut Fizjologii i Biochemii, Zakład Biochemii, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, msidor@csk.am.lodz.pl

T

Trojanek J — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa, joanna@ibb.waw.pl

Twardowski T — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

W

Wieczorek B — Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii, Zakład Biochemii, ul. Gagarina 7/9, 87-100 Toruń, bowiecz@biol.uni.torun.pl

Wiśniewska E — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Genetyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Wysocki R — Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Genetyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, robby@microb.uni.wroc.pl

Z

Zabłocki Krzysztof — Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Zakrzewska A — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, adazak@go2.pl

Zakrzewska-Czerwińska J — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, zakrzew@immuno.iitd.pan.pl

Krajowa Nagroda Naukowa im. Stefana Barbackiego z Zakresu Genetyki Roślin 2002

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów.

Nagroda przyznawana jest przez Kapitułę Nagrody od 1994 roku corocznie za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

W roku 2002 Kapituła przyznała

nagrodę II stopnia mgr **KATARZYŃIE NUC**

(Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego
w Poznaniu)

za: "Charakteryzowanie genów kodujących enzymy stanu symbiozy za pomocą metod molekularnych i komórkowych".

Sponsorami funduszu nagród byli: Agencja Własności Rolnej Skarbu Państwa – Warszawa, "Spójnia" Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Nochowo, HR "Danko", HR Szelejewo, HR Kobierzyce, Poznańska Hodowla Roślin.

Wskazówki dla Autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwiska (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 tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Dele 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 posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ółwkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ółwkiem, 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

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

Składka członkowska w 2003 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych 80.- zł.

dla Członków studentów 40.- zł

w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.

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

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

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

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

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

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

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

Jolanta Barańska

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

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

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego