

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 50, NR 2, 2004

Regulatorowe ncRNA	90
Inicjacja replikacji chromosomu	103
Czynnik transkrypcyjny NFκB	118
Receptory CysLTR ₁ i CysL TR ₂	131
Tratwy lipidowe w błonach płytek krwi	144
Transport jądrowy białek	153
Preseriliny	162
Biosynteza proteoglikanów	170
Flawonoidy w terapii	182

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. (22) 589 24 41
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EDWARD BAŃKOWSKI (Białystok)
ZYGMUNT CIEŚLA (Warszawa)
BARBARA GRZELAKOWSKA-
SZTABERT (Warszawa)
ARTUR JARMOŁOWSKI (Poznań)
MAREK KULUS (Warszawa)
MAŁGORZATA
ŁOBOCKA (Warszawa)
JOANNA
STROSZNAJDER (Warszawa)
ANDRZEJ TRZECIAK (Baltimore)
CEZARY WATAŁA (Łódź)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

- Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA**
Diversity and functions of noncoding regulatory RNAs
MAREK ŻYWICKI, MACIEJ SZYMAŃSKI, JAN BARCISZEWSKI 90
- Inicjacja replikacji chromosomu - podobieństwa i różnice między eubakteriami, archebakteriami i eukariontami**
Similarities and differences of the initiation process in eubacteria, archaea, and eukarya
ANNA MAGDALENA ZAWILAK, JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA 103
- Czynnik transkrypcyjny NFκB - nowa perspektywa w leczeniu nowotworów**
Transcription factor NFκB - a new perspective in anticancer therapy
BEATA MARIA GRUBER 118
- Receptory leukotrienów cysteinylowych**
Cysteinyl leukotriene receptors
MILENA SOKOŁOWSKA, MAREK L. KOWALSKI, RAFAŁ PAWLICZAK . . . 131
- Czy błonowe tratwy lipidowe biorą udział w aktywacji płytek krwi?**
Do membrane lipid rafts take part in blood platelet activation?
BEATA OLAS 144
- Transport białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym: rola białka Ran**
Nucleocytoplasmic transport of proteins: the role of Ran protein
JOANNA MIKULSKA 153
- Preseniliny i ich funkcja w patogenezie choroby Alzheimera**
The presenilins and Alzheimer disease
TADEUSZ PIETRAS, PIOTR WIERZBIŃSKI, PAWEŁ GÓRSKI 162
- Biosynteza proteoglikanów keratanosiarczanowych, chondroitynosiarczanowych i dermatanosiarczanowych**
Biosynthesis of keratan sulfate, chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans
ANDRZEJ GŁOWACKI, EWA M. KO MA, KRYSZYNA OLCZYK 170
- Flawonoidy - charakterystyka i znaczenie w terapii**
Flavonoids - characteristics and significance for the therapy
DOMINIKA MALIŃSKA, ANNA KIERSZTAŃ 182

Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA

Diversity and functions of noncoding regulatory RNAs

MAREK ŻYWICKI¹, MACIEJ SZYMAŃSKI², JAN BARCISZEWSKI³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Ogólna charakterystyka niekodujących RNA
- III. Charakterystyka regulatorowych ncRNA
 - III-1. Regulatory transkrypcji
 - III-2. Regulatory posttranskrypcyjne
 - III-3. Modulatory aktywności białek
 - III-4. Regulatory lokalizacji RNA
- IV. Poszukiwanie genów ncRNA
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ICR — ang. *imprinting control region* — region kontroli imprintingu; IGF2 — ang. *insulin-like growth factor 2* — insulinopodobny czynnik wzrostu 2; IMP — ang. *IGF2 mRNA binding protein* — białko wiążące mRNA IGF2; kz — kilozasad (tysięcy zasad); mRNA — ang. *messenger RNA* — matrycowy RNA; MSL — ang. *male-specific-lethal* — letalne białko specyficzne dla płci męskiej; ncRNA — ang. *noncoding RNA* — niekodujący RNA; ORF — ang. *open reading frame* — otwarta ramka odczytu; pre-mRNA — ang. *pre-messenger RNA* — pierwotny matrycowy RNA; RISC — ang. *RNA-induced silencing complex* — indukowany przez RNA kompleks wyciszający; RNP — ang. *ribonuclein particle* — kompleks białkowo-rybonukleinowy; rRNA — ang. *ribosomal RNA* — RNA rybosomalny; siRNA — ang. *small interfering RNA* — małe przechwytyjące, interferencyjne RNA; snRNA — ang. *small nuclear RNA* — mały jądrowy RNA; SRA — ang. *steroid receptor activator* — aktywator receptora steroidowego; stRNA — ang. *small temporal RNA* — małe okresowe, czasowe RNA; tRNA — ang. *transfer RNA* — RNA transportujący, przenoszący; UTR — ang. *untranslated region* — region nie ulegający translacji; Xic — ang. *X inactivation center* — centrum inaktywacji chromosomu X

Contents:

- I. Introduction
- II. General description of noncoding RNAs
- III. Characteristic of noncoding regulatory RNAs
 - III-1. Transcriptional regulators
 - III-2. Posttranscriptional regulators
 - III-3. Protein activity modulators
 - III-4. RNA distribution regulators
- IV. ncRNA gene finding
- V. Conclusions

I. Wprowadzenie

Odkrycie na początku lat 80-tych katalitycznych właściwości kwasów rybnukleinowych (RNA) doprowadziło do sformułowania teorii pierwotnego „świata RNA”, w którym cząsteczki RNA, oprócz funkcji materiału genetycznego pełnić miałyby również rolę enzymów. Współczesne organizmy w ograniczonym stopniu wykorzystują katalityczne RNA, a większość procesów enzymatycznych i regulacyjnych realizowanych jest przez białka.

W ostatnich latach pojawiło się coraz więcej doniesień na temat cząsteczek RNA zaangażowanych w różnorodne procesy komórkowe, które wykraczają poza tradycyjnie przypisywane RNA funkcje w procesie biosyntezy białek. Te nowoodkrywane cząsteczki, określane jako niekodujące RNA (ang. *noncoding RNA*, ncRNA), pełnią kluczowe role w procesach regulacji ekspresji genów na praktycznie wszystkich jej etapach, począwszy od zmian struktury chromatyny, poprzez bezpośrednią regulację transkrypcji, składanie (ang. *splicing*) i redagowanie (ang. *editing*) mRNA a skończywszy na modulacji translacji poprzez wpływ na stabilność transkryptów oraz ich lokalizację wewnątrz komórki.

¹Mgr, ²dr, ³prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań, tel. (61) 8528503 w.132, e-mail: ¹marekz@ibch.poznan.pl, ²mszyman@ibch.poznan.pl, ³jan.barciszewski@ibch.poznan.pl

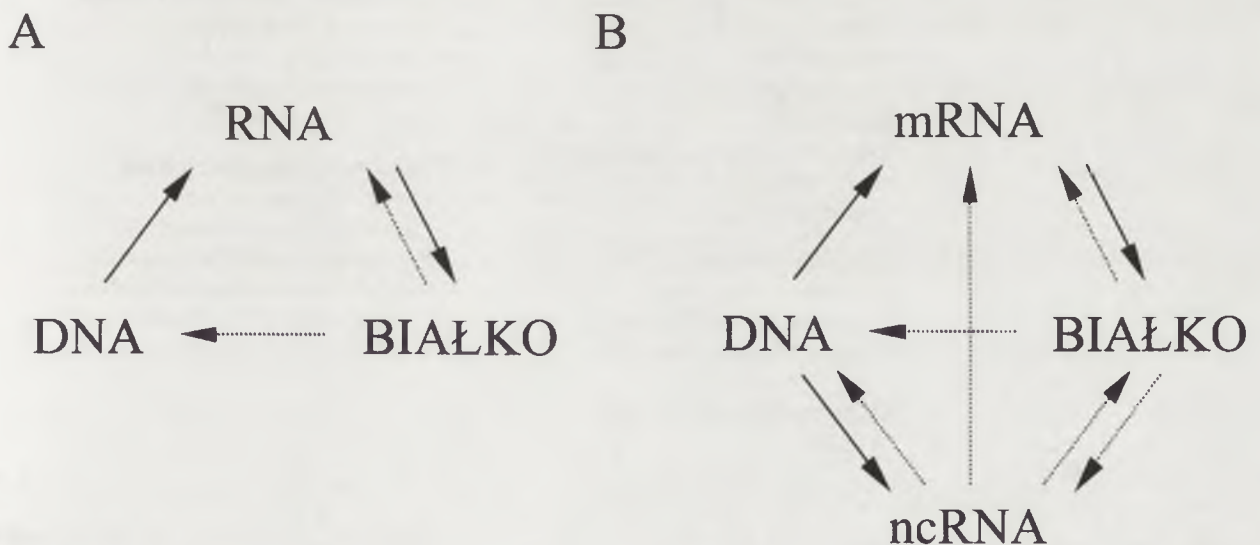
W szerokim znaczeniu, termin „niekodujące RNA” używany jest niekiedy dla określenia wszystkich transkryptów nie mających zdolności kodowania białek. Częściej jednak oznacza on wszystkie RNA z wyłączeniem mRNA, tRNA i rRNA i w tym znaczeniu używany jest w niniejszym tekście.

II. Ogólna charakterystyka niekodujących RNA

Pierwsze doniesienia o niekodujących RNA (ncRNA) pochodzą z 1979 roku. Zauważono wówczas, że wśród czynników uczestniczących w składaniu pre-mRNA tworzących kompleks odpowiedzialny za katalizę reakcji składania (spliceosom) znajduje się pięć cząsteczek RNA nie pochodzących z dojrzewającego mRNA [1]. Te małe jądrowe RNA (ang. *small nuclear RNA*, snRNA) pełnią kluczową rolę w rozpoznaniu miejsc na połączeniach egzonów i intro-

heterogenność strukturalna. Jedyną wspólną cechą wszystkich tych RNA jest brak otwartej ramki odczytu i co za tym idzie niezdolność do kodowania białek [5]. W organizmach eukariotycznych wiele z ncRNA wykazuje jednak pewne cechy mRNA. Są one transkrybowane przez RNA polimerazę II, podlegają poliadenylacji i mają na końcu 5' strukturę *cap* [4].

Odkrycie funkcjonalnych cząsteczek ncRNA wymaga rewizji obowiązującego dogmatu o przepływie informacji genetycznej od DNA przez RNA do białek. Ten prosty schemat zaproponowany pod koniec lat 50-tych zakładał, że RNA stanowią jedynie bierne elementy mechanizmu ekspresji informacji zawartej w DNA, a białka są odpowiedzialne za wszystkie procesy życiowe (Ryc. 1). W świetle odkryć ostatnich 20 lat oczywistym jest, że RNA odgrywają znacznie większą rolę nie tylko jako katalizatory, ale również jako regulatory w procesach komórkowych (Ryc.1).



Ryc. 1. Dwa modele przepływu informacji genetycznej. (A) Klasyczny, w którym wszystkie funkcje katalityczne, strukturalne, sygnałowe i regulacyjne są realizowane przez białka. (B) Alternatywny, w którym uwzględniono ncRNA jako nośniki tych samych funkcji. Linie ciągłe wyrażają przepływ informacji genetycznej, natomiast przerywane możliwości realizacji zakodowanych funkcji [6].

nów w pre-mRNA oraz asocjacji kompleksu białkowo-nukleinowego spliceosomu. Podobnie jak w przypadku rybosomu funkcję enzymatyczną pełni tu RNA [2]. Inną, stosunkowo dobrze poznaną klasę niekodujących RNA stanowią małe jądrowe RNA (ang. *small nucleolar RNA*, snoRNA), biorące udział w tworzeniu pseudouridyliny i 2'-O-metylocytydyny w rybosomalnych RNA [3].

Obecnie znanych jest kilkaset ncRNA zarówno eukariotycznych jak i prokariotycznych, ale tylko w nielicznych przypadkach udało się uzyskać dane dotyczące ich funkcji [4]. Wraz ze wzrostem liczby poznawanych ncRNA, coraz bardziej widoczna jest ich

Komórkowe RNA można podzielić na dwie główne grupy: a) kodujące matrycowe RNA — mRNA (ang. *messenger RNA*) oraz b) RNA, które nie stanowią matrycy dla białek (ncRNA) (Tabela 1). Ze względu na pełnione funkcje, wśród niekodujących RNA można dalej wyróżnić konstytutywne oraz regulatorowe RNA. Konstytutywne ncRNA ulegają ciągłej ekspresji na stałym poziomie i są niezbędne do przebiegu podstawowych procesów komórkowych. Należą do nich tRNA, rRNA, czy snRNA. Regulatorowe ncRNA odpowiedzialne są najczęściej za utrzymanie oraz modulację poziomu ekspresji genów. Ich obecność w komórce jest zwykle zależna od

Tabela 1.

Podział cząsteczek RNA ze względu na właściwości kodujące i funkcjonalne [4]

Transkrypty		
kodujące białka	niekodujące (ncRNA)	
	Konstytutywne RNA	Regulatorowe RNA
<ul style="list-style-type: none"> • mRNA 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Translacja <ul style="list-style-type: none"> • tRNA – translacja informacji genetycznej • rRNA – składnik rybosomu, kataliza formowania wiązań peptydowych • tmRNA – trans-translacja, kontrola jakości translacji 2. Dojrzwianie RNA <ul style="list-style-type: none"> • snRNA – splicing pre-mRNA, komponenty spliceosomu • snoRNA – modyfikacje RNA: 2'-O-metylacje i pseudourydylacje • RNaza MRP – dojrzwianie RNA • RNaza P RNA – dojrzwianie 5'-końca pre-tRNA 3. Replikacja <ul style="list-style-type: none"> • RNA telomerazy – komponent telomerazy, synteza telomerycznego DNA 4. Lokalizacja białek <ul style="list-style-type: none"> • 4.5S RNA, 7SL RNA – translokacja białek przez błony u bakterii i <i>Eukaryota</i> 5. Nieznane funkcje <ul style="list-style-type: none"> • hY RNA 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Regulatory transkrypcji <ul style="list-style-type: none"> • regulacja ekspresji genów podlegających imprintingowi (H19, IPW, LIT1) • zmiana struktury chromatyny związana z inaktywacją chromosomu X i kompensacją dawki genów u <i>Eukaryota</i> (roX, Xist/Tsix) 2. Regulatory posttranskrypcyjne <ul style="list-style-type: none"> • interakcje z docelowym mRNA na zasadzie antysensu (DsrA, MicF, lin-4, let-7, microRNAs) 3. Modulatory aktywności białek <ul style="list-style-type: none"> • interakcje RNA-białko zmieniające zdolności katalityczne białek (6S RNA, OxyS, SRA RNA) 4. Regulatory lokalizacji RNA <ul style="list-style-type: none"> • specyficzny wpływ na lokalizację komórkowych mRNA lub pre-mRNA poprzez specyficzną lokalizację ncRNA (hsr-ω, Xlsirt, BC1, BC200)

etapu rozwoju lub czynników środowiskowych. Niekodujące RNA wykazują dużą różnorodność mechanizmu działania oraz zaangażowanie w licznych procesach. Sekwencje znanych regulatorowych RNA dostępne są w internecie pod adresem <http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA/> [7].

III. Charakterystyka regulatorowych ncRNA

III-1. Regulatory transkrypcji

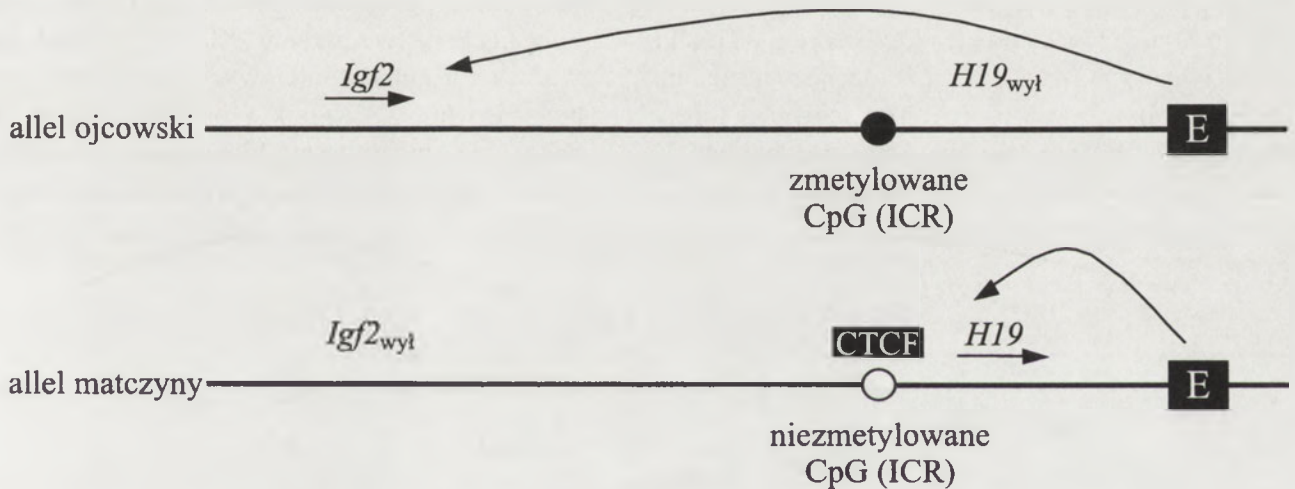
Do grupy tej należą ncRNA modulujące ekspresję danego genu poprzez inhibicję lub aktywację transkrypcji. Prawdopodobnych jest kilka mechanizmów ich działania. Jeden z nich jest charakterystyczny dla regulacji genów podlegających specyficznemu znakowaniu epigenetycznemu (ang. *imprinting*). Do-

tychczas zidentyfikowano wiele cząsteczek ncRNA uczestniczących w tym procesie, które również odgrywają kluczową rolę w genecie złożonych jednostek chorobowych, takich jak zespół Pradera-Williego czy Beckwitha-Wiedemanna, będących wynikiem utraty prawidłowego imprintingu określonego segmentu genów. Najlepiej poznanym niekodującym RNA biorącym udział w tym procesie u ssaków jest H19 RNA, który ma wpływ na poziom ekspresji genu *IGF2* (ang. *insulin-like growth factor II*) [8,9], kodującego białko odpowiedzialne za wzrost i podziały komórek oraz regulację ich metabolizmu [10,11]. H19 RNA ma długość ~2,5 kZ, jest poliadenylowany na końcu 3', a na końcu 5' znajduje się modyfikowana czapeczka (ang. *cap*). Pierwotne transkrypty, syntetyzowane przez polimerazę RNA II podlegają składaniu, ale nie mają długiej otwartej ramki odczytu. Dojrzały H19 RNA jest eksportowa-

ny z jądra do cytoplazmy. Ekspresja *H19* zachodzi w okresie rozwoju płodowego w tkankach pochodzenia mezo- i ektodermalnego, a w okresie późniejszym w tkankach, które wykazywały ekspresję w okresie płodowym i uległy procesom nowotworowym [12]. U człowieka, gen kodujący H19 RNA znajduje się w *locus* 11p15.5, (u myszy region homologiczny występuje na chromosomie 7), w odległości około 110-200 kb od genu *IGF2*. Zaburzenia ekspresji *IGF2* związane są z procesami nowotworowymi [13,14]. Geny *H19* i *IGF2* podlegają przeciwnemu znakowaniu genetycznemu: *H19* ulega ekspresji z allelu matczynego, natomiast *IGF2* z allelu ojcowskiego. Elementami regulującymi ten proces są znajdujące się w pobliżu *H19* sekwencje wzmacniające - E (ang. *enhancer*), oraz region kontrolny - ICR (ang. *imprinting control region*) zawierający liczne wyspy CpG (Ryc.2). Obniżony poziom metylacji ICR po-

[15]. Wydaje się, że jest to mechanizm zabezpieczający przed ewentualną aktywacją ekspresji wyciszonego genu. Jego zaburzenie wywołuje procesy nowotworowe, związane z przywróceniem ekspresji *H19*.

Oprócz zaangażowania w imprinting *IGF2*, wykazano, że wprowadzenie do komórki dodatkowych kopii *H19* powoduje spadek poziomu zarówno mRNA *IGF2*, jak i samego białka w komórce [8]. W sekwencji *H19* RNA znaleziono trzy miejsca wiązania białek IMP (ang. *IGF2 mRNA-binding protein*), oraz stwierdzono że mRNA *IGF2*, *H19* i białka IMP znajdują się w tej samej przestrzeni subkomórkowej [9]. Białka IMP wiążą się z sekwencjami nie ulegającymi translacji przy końcu 5' mRNA *IGF2*, co z kolei ma wpływ na poziom syntezy tego białka podczas rozwoju. Wiązanie białek IMP przez *H19* RNA sugeruje, że jego rola w regulacji ekspresji *IGF2*



Ryc. 2. Ekspresja genów *H19* i *Igf2*. E — sekwencje wzmacniające (ang. *enhancer*), CTCF — czynnik białkowy (opis w tekście) [9,10].

zwala na przyłączenie się w tym regionie białkowego czynnika CTCF, co z kolei umożliwia oddziaływanie sekwencji wzmacniających z pobliskim regionem promotorowym genu *H19* i jego ekspresję. Z drugiej strony, hipermetylacja regionu ICR i brak wiązania CTCF powoduje oddziaływanie sekwencji wzmacniających z odległym promotorem genu *IGF2* warunkującym inicjację jego transkrypcji [15]. Ten stosunkowo prosty mechanizm nie jest jednak jedynym elementem kontroli ekspresji tych genów. Przypuszcza się, że jest również inny mechanizm kontroli imprintingu, który ujawnia się dopiero podczas rozwoju zarodkowego i ma znaczenie w tkankach już zróżnicowanych. Delecja ICR w komórkach pochodzących z tych tkanek nie warunkuje ekspresji *H19*. Pod koniec rozwoju płodowego region promotorowy *H19* ulega hipermetylacji uniemożliwiając ekspresję tego genu nawet przy braku metylacji ICR

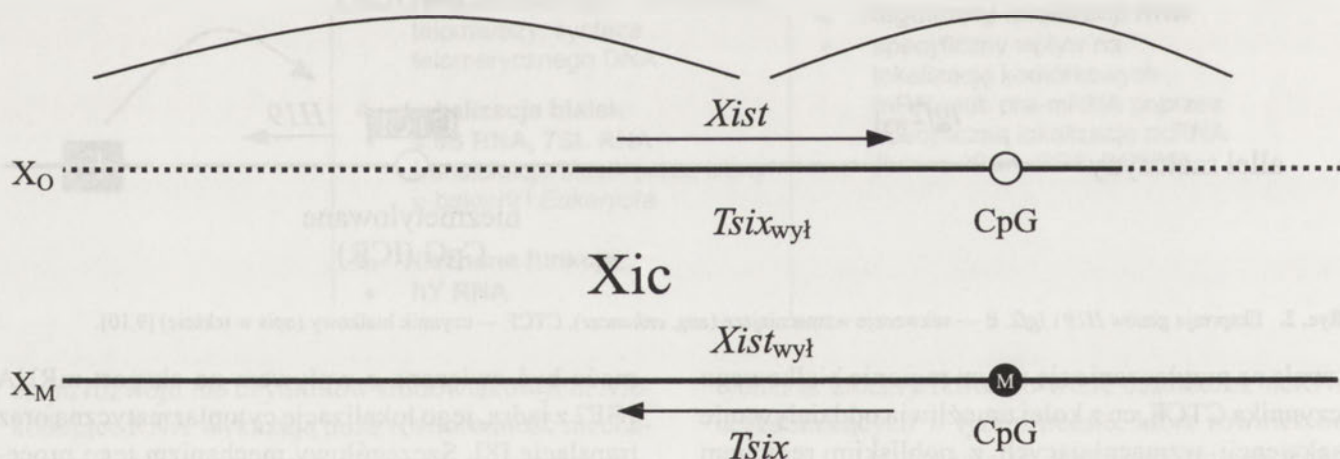
może być związana z wpływem na eksport mRNA *IGF2* z jądra, jego lokalizację cytoplazmatyczną oraz translację [8]. Szczegółowy mechanizm tego procesu nie jest jednak jeszcze poznany.

Inną grupą ncRNA działających jako regulatory transkrypcji są cząsteczki odpowiedzialne za wyrównanie poziomu ekspresji genów znajdujących się na chromosomie X między komórkami XX i XY. Proces ten może odbywać się poprzez wyłączenie jednego z chromosomów u płci posiadającej dwa chromosomy X lub poprzez podwojenie poziomu ekspresji u płci posiadającej jeden chromosom X. Pierwszy z tych mechanizmów charakterystyczny jest dla ssaków, gdzie płeć zdeterminowana jest obecnością lub brakiem chromosomu Y. W zarodkach żeńskich uruchomiona zostaje kaskada sygnałów prowadząca do inaktywacji jednego z chromosomów X pozostającego w jądrze w postaci skon-

dosowanej i widocznego pod mikroskopem jako ciało Barra [16]. Za mechanizm ten odpowiedzialny jest region chromosomu X określany jako centrum inaktywacji *Xic* (ang. *X inactivation center*), którego delecja uniemożliwia zajście całego procesu. W 1991 r. u myszy zidentyfikowano gen ulegający ekspresji wyłącznie z nieaktywnego chromosomu X. Produktem jego transkrypcji jest długi (15-17 kb) RNA nazwany *Xist* (ang. *X-inactive specific transcript*). Odpowiedni transkrypt (*XIST*) został również znaleziony w komórkach ludzkich. Podobnie jak H19 RNA, *Xist* i *XIST* RNA wykazują cechy mRNA (składanie, poliadenylacja, transkrypcja przez polimerazę RNA II) lecz nie zawierają otwartej ramki odczytu sugerującej syntezę białka [17]. *Xist* RNA jest odpowiedzialny za inicjację procesu inaktywacji, a jego późniejsza utrata nie powoduje ponownej aktywacji wyciszzonego chromosomu. Powstaje pytanie, w jaki sposób dokonywany jest wybór chromosomu X dla wyciszenia? Do zygoty trafia jeden chromosom X pochodzący od ojca (X_o), a drugi od matki (X_m). U myszy już na etapie gametogenezy następuje imprinting będący wynikiem zróżnicowanej hipermetylacji wysp CpG znajdujących się w pobliżu 3' końca genu *Xist* (Ryc.3). W zygocie allel pochodze-

rodka w macicy. Na tym etapie następuje demetylacja wysp CpG i losowo zostaje wybrany chromosom, na którym hipermetylacja zostaje przywrócona.

U człowieka chromosomy X trafiają do zygoty bez żadnych informacji co do ich wyciszenia. Wybór chromosomu X mającego ulec dezaktywacji wydaje się losowy. Odmienność tego mechanizmu związana jest ze zmianami w strukturze ludzkiego genu *TSIX* [18,19]. W pobliżu jego końca 3' nie ma wysp CpG odpowiedzialnych u myszy za „wskazanie” chromosomu mającego ulec dezaktywacji oraz nie zawiera on fragmentu sekwencji komplementarnej do *XIST*. Fakty te oraz możliwość alternatywnego składania *Tsix* RNA myszy, w wyniku którego powstają izoformy o skróconym końcu 5', komplementarnym do *Xist* [20], zmuszają do rewizji poglądów na temat roli *TSIX* i *Tsix* w akumulacji *XIST/Xist* RNA i w selekcji chromosomu do wyciszenia [21-23]. Obecnie proponowane są cztery możliwe mechanizmy działania *TSIX/Tsix*: i) maskowanie polegające na wyciszaniu *XIST/Xist* RNA przez tworzenie z nim dwuniciowych kompleksów przez antysensowny *TSIX/Tsix*, ii) interferencja polegająca na możliwości blokowania transkrypcji *XIST/Xist* poprzez transkrypcję *TSIX/Tsix* z tego sa-



Ryc. 3. Regulacja ekspresji genów *Xist* i *Tsix* u myszy i ich wpływ na inaktywację chromosomu X. Brak metylacji wysp CpG umożliwia transkrypcję *Xist*, który nakłada się na cały chromosom X i powoduje jego inaktywację. Metylacja (M) powoduje aktywację promotora genu *Tsix* i dezaktywację *Xist*, co prowadzi do pozostawienia aktywnego chromosomu. X_o — chromosom ojcowski, X_m — chromosom matczyzny, *Xic* — centrum inaktywacji chromosomu X, linia przerywana wskazuje na brak transkrypcji [9].

nia matczyne jest zawsze hipermetylowany, natomiast allel ojcowski pozostaje niezmodyfikowany. Efektem takiego stanu jest inaktywacja chromosomu X pochodzącego od ojca poprzez ekspresję *Xist*. Drugi chromosom X jest chroniony przed inaktywacją poprzez transkrypcję z tego samego *locus* innego niekodującego RNA-*Tsix*, o sekwencji częściowo komplementarnej do *Xist* RNA. Mechanizm ten dodatkowo zabezpiecza przed ewentualnym wpływem *Xist* transkrybowanego z chromosomu ojcowskiego. Taki stan utrzymuje się do momentu implantacji za-

meo *locus*, iii) represja polegająca na umożliwieniu wiązania czynnika blokującego transkrypcję *XIST/Xist* w pobliżu 3'-końca tego genu poprzez transkrypcję *TSIX/Tsix*, iv) otwarcie chromatyny polegające na rozluźnieniu chromatyny poprzez transkrypcję *TSIX/Tsix*, co umożliwiłoby asocjacje dodatkowych czynników regulacyjnych [21].

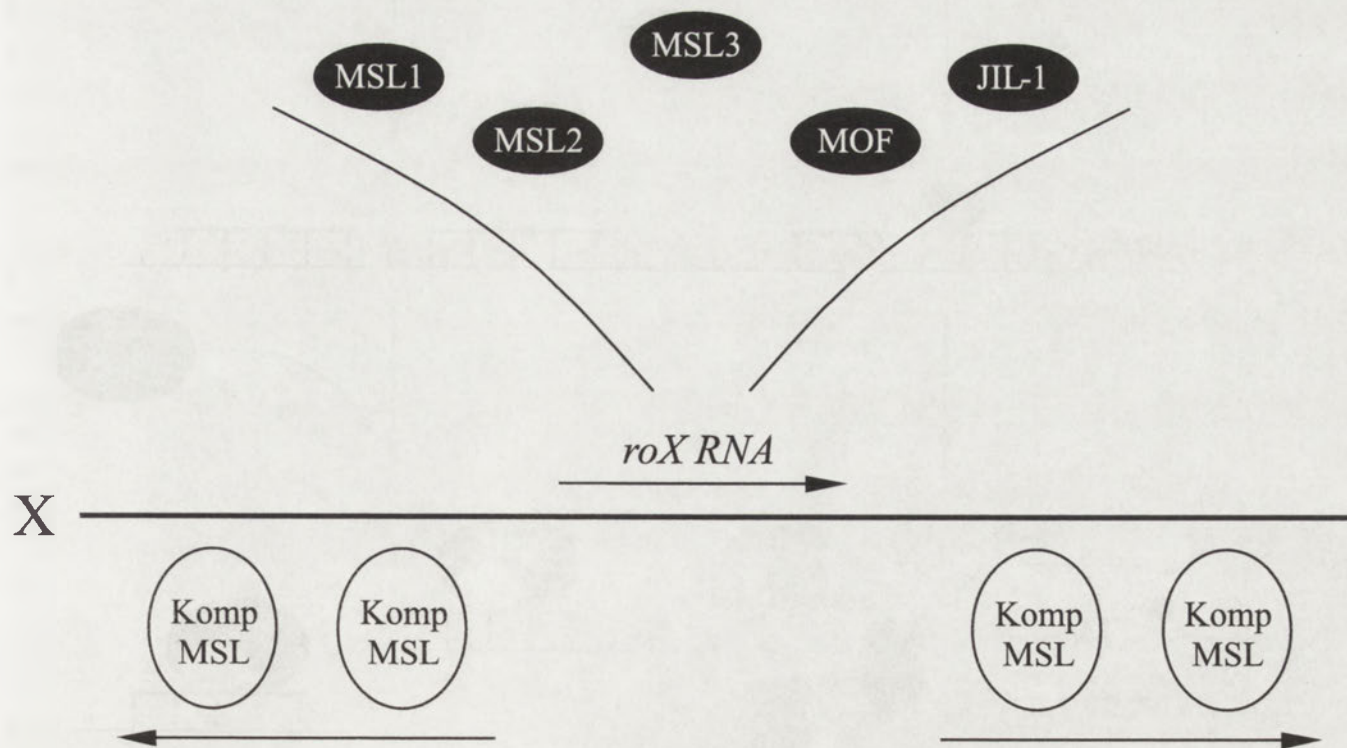
Chociaż mechanizm działania *Xist* RNA nie jest do końca poznany, to wiadomo, że wiąże się on na całej długości z chromosomem X, z którego uległ ekspresji i pełni kluczową rolę w przebiegu procesu

dezaktywacji. Nieaktywny chromosom X charakteryzują typowe cechy konstytutywnej heterochromatyny, jak: hipoacetylacja histonów, hipermetylacja wysp CpG i późna replikacja. Nie jest jednak do końca wyjaśniona rola Xist w powstawaniu tych zmian. Przypuszcza się, że możliwe jest wiązanie z Xist białek zdolnych do wprowadzania stałych zmian w strukturze chromatyny, co tłumaczyłoby tak silne ograniczenie roli Xist RNA do okresu inicjacji [21]. Do tej pory nie udało się jednak potwierdzić tej tezy, ani zidentyfikować białek wiążących Xist.

Mechanizmy determinacji płci, jak i kompensacji dawki genów z chromosomu X u *Drosophila* są odmiennie. Podobnie jak u ssaków, komórki męskie i żeńskie zawierają odpowiednio jeden i dwa chromosomy X. Determinacja płci zależy jednak nie od obecności chromosomu Y, lecz od stosunku liczby chromosomów X do liczby autosomów [17]. Wyrównanie ekspresji genów z chromosomu X następuje poprzez dwukrotne zwiększenie poziomu ekspresji pojedynczego chromosomu X w komórkach męskich. W procesie tym kluczową rolę pełnią białka MSL (ang. *male-specific-lethal*), acetylotransferaza histonu H4 (MOF) oraz fosforylaza histonu H3 (JIL-1). Istotną rolę odgrywają tu również transkrypty dwóch genów *roX* — *roX1* i *roX2* RNA (ang. *RNA on X*), funkcjonujące jako ncRNA. Białka MSL,

MOF i JIL-1 tworzą z RNA kompleksy białkowo-nukleinowe określane jako kompleksy MSL lub kompensosomy (ang. *compensosome*). Cząsteczki *roX1* i *roX2* RNA podlegają dojrzewaniu i poliadenylacji a ich wielkość wynosi odpowiednio 3,7 i 0,6 kb. Ich ekspresja zachodzi z chromosomu X, który podlega kompensacji [24].

Kompleks MSL wiąże się w kilkuset miejscach do chromosomu X. Uszkodzenie białek kompleksu redukuje jego asocjację do zaledwie 30-40 miejsc, zwanych miejscami dostępu do chromatyny (ang. *chromatin entry sites*), z których dwa zidentyfikowano jako *loci* genów *roX1* i *roX2* [24]. Wydaje się, że w miejscach tych zachodzi składanie kompleksu MSL. Prawidłowy kompleks przemieszcza się wzdłuż chromosomu X powodując rozluźnienie chromatyny i wzmożoną ekspresję genów (Ryc. 4). Mechanizm migracji kompleksów MSL nie jest poznany i nie wiadomo, jaką rolę pełnią w nim *roX* RNA. Wiadomo jednak, iż są one istotne dla procesu kompensacji, o czym świadczy fakt, iż insercja genu *roX* do autosomu umożliwia asocjację na nim kompleksów MSL i podwyższenie poziomu ekspresji genów znajdujących się w rejonie miejsca insercji [25]. Wynika z tego, że *roX1* i *roX2* RNA są odpowiedzialne za rozpoznanie chromosomu mającego ulec kompensacji poprzez asocjacje i poprawne złożenie kompleksu MSL.



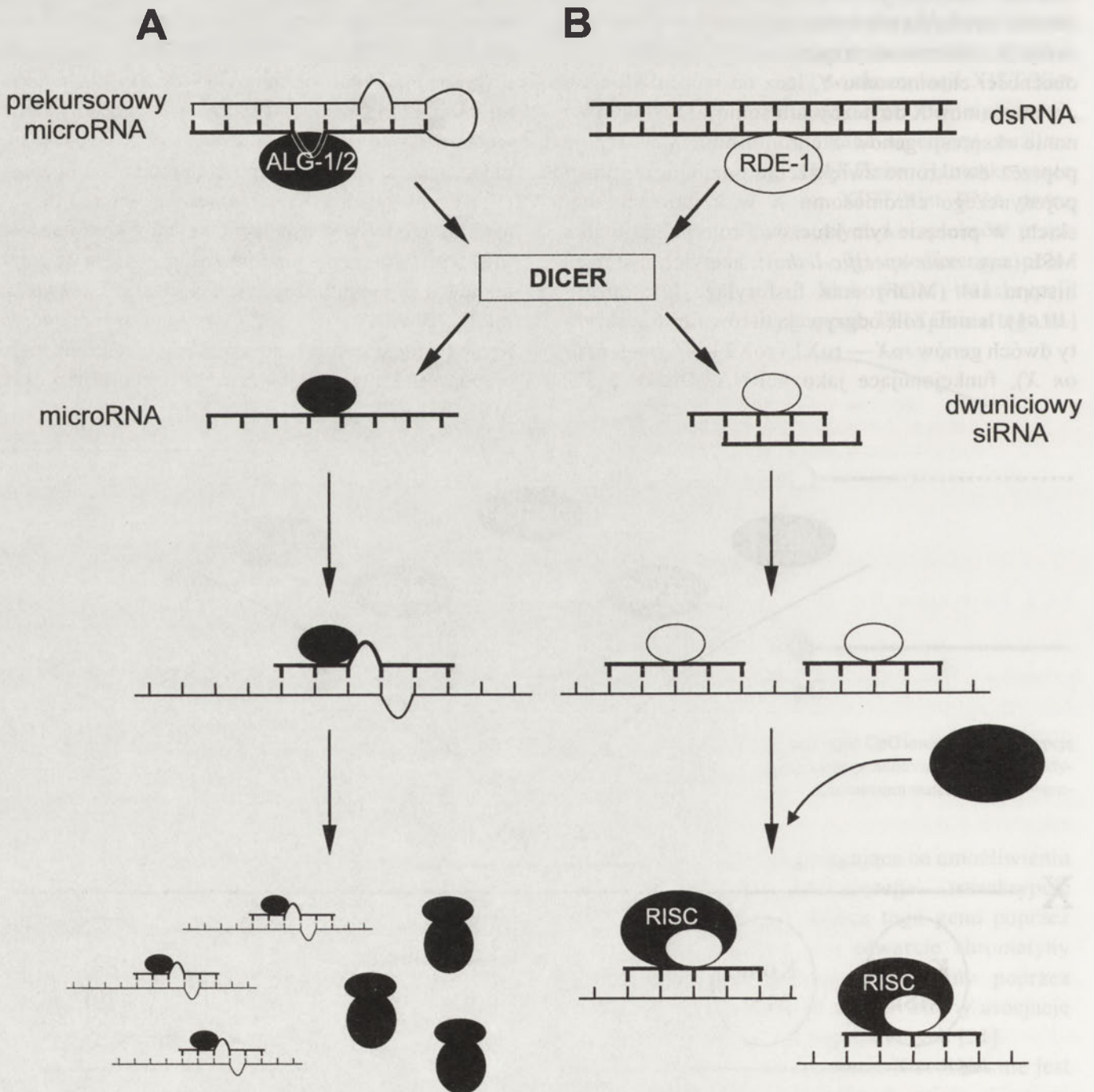
Ryc. 4. Kompensacja dawki genów chromosomu X u *Drosophila*. Białka MSL1-3, MOF — acetylotransferaza histonu H4 oraz JIL-1 — fosforylaza histonu H3 tworzą kompleks MSL w miejscu transkrypcji genu *roX* RNA. Kompleks wiąże się do chromosomu powodując wzmożenie ekspresji genów z chromosomu X.

III-2. Regulatory posttranskrypcyjne

Cząsteczki RNA należące do grupy regulatorów posttranskrypcyjnych (w odróżnieniu od regulatorów transkrypcyjnych) oddziałują bezpośrednio z komplementarnymi regionami docelowych mRNA. RNA biorące udział w takiej regulacji można podzielić na dwie grupy. Regulatory *cis*, kiedy cząsteczka regulatorowego i docelowego RNA ulegają transkrypcji w odwrotnych kierunkach z tego samego *locus*, oraz *trans*, kiedy obie cząsteczki pochodzą z odrębnych *loci*. Przykładem pierwszego z tych mechanizmów jest występująca u człowieka regulacja eks-

presji genu *KvLQT1* przez antysensowny transkrypt *LIT1* [26]. W wyniku tych oddziaływań tworzą się długie duplekisy o pełnej homologii, co ogranicza translację mRNA podlegającego regulacji.

Przykładem *trans*-regulatorowych RNA są krótkie (~20nt) cząsteczki określane jako mikroRNA (miRNA). U *Caenorhabditis elegans* zidentyfikowany został gen *lin-4*, którego mutacje powodowały zaburzenia w rozwoju embrionalnym. Szczegółowa analiza wykazała obecność dwóch RNA o długości 63 i 22 nt, odpowiadających prekursorowi i funkcjonalnej cząsteczce RNA. *Lin-4* RNA jest odpowiedzialny za inhibicję translacji mRNA przynajmniej



Ryc. 5. Geneza i funkcje mikroRNA (A) i siRNA (B). Elementem wspólnym obu szlaków jest enzym DICER hydrolizujący pre-RNA odpowiednio do mikroRNA i siRNA. Białka odpowiadające za skierowanie danego RNA na drogę mikroRNA zaznaczone są czarnym kolorem (ALG-1/2), natomiast na drogę RNAi białym (RDE-1) [27].

dwóch genów — *lin-14* i *lin-28*. *Lin-14* ulega ekspresji tylko we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego, a jego represja koreluje w czasie z akumulacją *lin-4* RNA. Za regulację translacji odpowiedzialne jest oddziaływanie *lin-4* RNA z kilkoma częściowo komplementarnymi sekwencjami *lin-14* mRNA w rejonie nie ulegającym translacji przy końcu 3' (3'-UTR). W wyniku tych oddziaływań tworzą się niedokładne dupлексы RNA, zawierające niesparowane nukleotydy lub niewielkie wypełnienia, z których niektóre są istotne dla inhibicji translacji [27,28]. MikroRNA wydają się występować powszechnie w organizmach eukariotycznych. Ich występowanie stwierdzono u zwierząt, roślin i grzybów. Wspólną cechą wszystkich dotychczas opisanych miRNA jest ich biogeneza. Pierwotne transkrypty ich genów tworzą długie struktury spinki do włosów, z których funkcjonalne cząsteczki wycinane są przy udziale rybonukleazy Dicer — enzymu homologicznego do bakteryjnej rybonukleazy III.

Długość funkcjonalnych miRNA oraz udział nukleazy Dicer w ich powstawaniu wykazuje analogie do mechanizmu interferencji RNA (ang. *RNA interference, RNAi*). W procesie tym, Dicer rozcina dwuniciowe RNA na ok. 20-nukleotydowe dupлексы tworzące tzw. krótkie interferencyjne RNA (ang. *short interfering RNA, siRNA*) [29]. Interferencyjne RNA stanowią elementy kompleksu białkowo-nukleinowego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który odpowiedzialny jest za degradację docelowego RNA o sekwencji komplementarnej do siRNA. W odróżnieniu od *lin-4* RNA, którego działanie polega na hamowaniu translacji poprzez tworzenie niedokładnie sparowanych dupлексов RNA, mechanizm działania RNAi wymaga obecności dokładnie komplementarnej sekwencji w docelowym RNA. Proces RNAi wydawał się początkowo być systemem obronnym skierowanym przeciwko wirusom oraz rozprzestrzeniającym się transpozonom. Obecnie jednak uważa się, że może on mieć duże znaczenie w regulacji ekspresji genów. Niektóre roślinne miRNA działają poprzez indukowanie przecinania mRNA w regionach o komplementarnej sekwencji [30].

Wydaje się zatem, że pierwotne rozróżnienie między mechanizmami działania mikroRNA i RNAi w oparciu o naturę samych aktywnych cząsteczek RNA (dwuniciowe siRNA i jednoniciowe miRNA) nie jest w pełni zasadne. Decyzja o skierowaniu RNA na odpowiednią drogę i późniejszy mechanizm działania jest dokonywana jeszcze przed fragmentacją prekursorowego RNA na funkcjonalne cząsteczki (Ryc. 5). Realizowana jest ona na etapie przyłączenia się

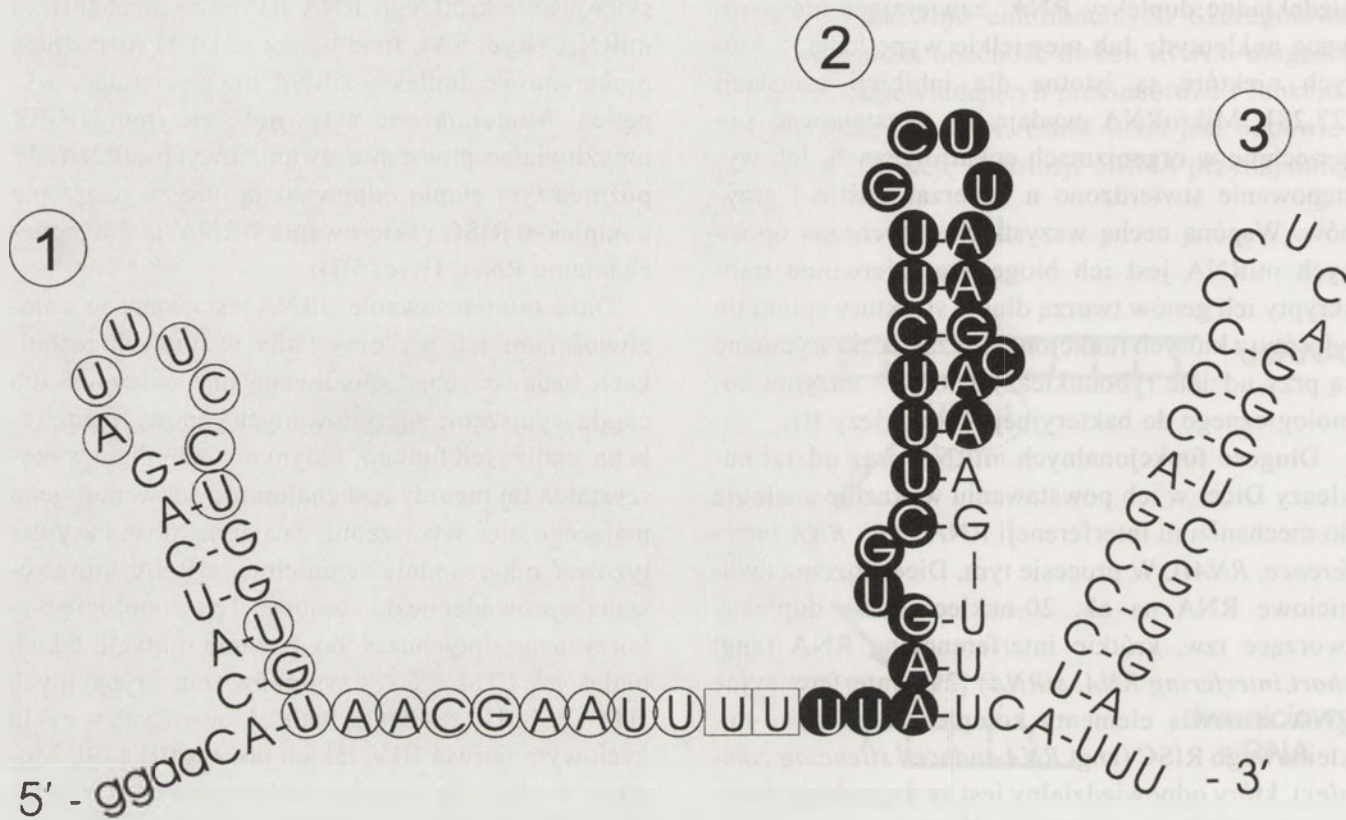
białek (ALG1/2, RDE1) do prekursorowych RNA, co umożliwia asocjację enzymu DICER. Niektóre z tych białek (ALG1/2) rozpoznają wypełnienia w prekursorowym stRNA. Pozostają one zasocjowane z powstałą cząsteczką, zmniejszając jej podatność na degradację i blokując przyłączenie białek tworzących kompleks RISC odpowiedzialny za degradację mRNA w procesie RNAi, co powoduje skierowanie krótkiego RNA na drogę mechanizmu miRNA (Ryc. 5A). Inne białka (RDE1) rozpoznają prekursorowe dupлексы siRNA nie zawierające wypełnień. Modułują one aktywność enzymu DICER umożliwiając powstanie dwuniciowych siRNA. W późniejszym etapie odpowiadają one za tworzenie kompleksu RISC i skierowanie siRNA na drogę mechanizmu RNAi (Ryc. 5B).

Duże zainteresowanie siRNA jest związane z możliwościami ich wykorzystania w nowych technikach badawczych. Umożliwiają one okresowe lub ciągle wyciszanie zdefiniowanych genów, co pozwala na analizę ich funkcji. Jedynym wymogiem wykorzystania tej metody jest znajomość sekwencji genu mającego ulec wyciszeniu. Znając ją można zsyntetyzować odpowiednie dwuniciowe siRNA, które zostaną wprowadzone do komórki. Tę technologię wykorzystano dotychczas do badania funkcji takich białek jak CD4, CD8, czynników transkrypcyjnych HTF i PSKH1 oraz badań białek kluczowych w cyklu życiowym wirusa HIV, takich jak Tsg101 [29]. Możliwe wydaje się również wykorzystanie RNAi do identyfikacji genów w zsekwencjonowanych genomach oraz badania funkcji zakodowanych w nich białek.

W komórkach bakterii stwierdzono występowanie cząsteczek ncRNA modulujących translację docelowych mRNA poprzez oddziaływanie z krótkimi fragmentami w rejonach 3'- lub 5'-UTR. Przykładem takiej cząsteczki jest DsrA RNA z *Escherichia coli*. Jest to cząsteczka o długości 87 nt uczestnicząca w regulacji ekspresji dwóch podstawowych białkowych regulatorów transkrypcji: H-NS, będącego globalnym represorem transkrypcji oraz RpoS, czynnika transkrypcyjnego sigma o działaniu antagonicznym do H-NS. RpoS ulega ekspresji podczas fazy stacjonarnej wzrostu bakterii oraz w odpowiedzi na stresowe warunki środowiska. Jest on odpowiedzialny za zniesienie działania H-NS i zwiększenie poziomu transkrypcji niektórych genów. DsrA RNA wpływa w różny sposób na poziom ekspresji tych białek: powoduje wzrost ilości RpoS oraz obniżenie poziomu H-NS, przyczyniając się tym samym do ogólnego wzrostu poziomu transkrypcji [32,33].

Jednoczesne działanie DsrA RNA jako supresora i aktywatora translacji umożliwia obecność dwóch fragmentów komplementarnych odpowiednio do mRNA H-NS i RpoS (Ryc. 6). Wyciszenie H-NS zachodzi w wyniku oddziaływań fragmentu położonego w obrębie drugiej spinki DsrA RNA z regionami inicjacji i terminacji translacji mRNA kodującego H-NS (Ryc. 6). Utworzenie kompleksu H-NS

skrypcji oraz skrócenie czasu półtrwania DsrA RNA z 23 do 4 minut [34], co powoduje 30-krotnie zmniejszenie ilości transkryptu. Wydaje się, że za zależność poziomu transkrypcji od temperatury odpowiada fragment sekwencji promotorowej o długości 36 pz. Innym czynnikiem wpływającym na poziom RpoS za pośrednictwem DsrA jest szok osmotyczny. Aktywność DsrA RNA zależy również od regulatorowego



Ryc. 6. Model struktury drugorzędowej DsrA RNA. Zaznaczone nukleotydy oddziałujące z H-NS (czarne koła), z RpoS (białe koła) oraz wspólne dla obu oddziaływań (kwadraty). Kolejne spinki mają numery 1-3 [29].

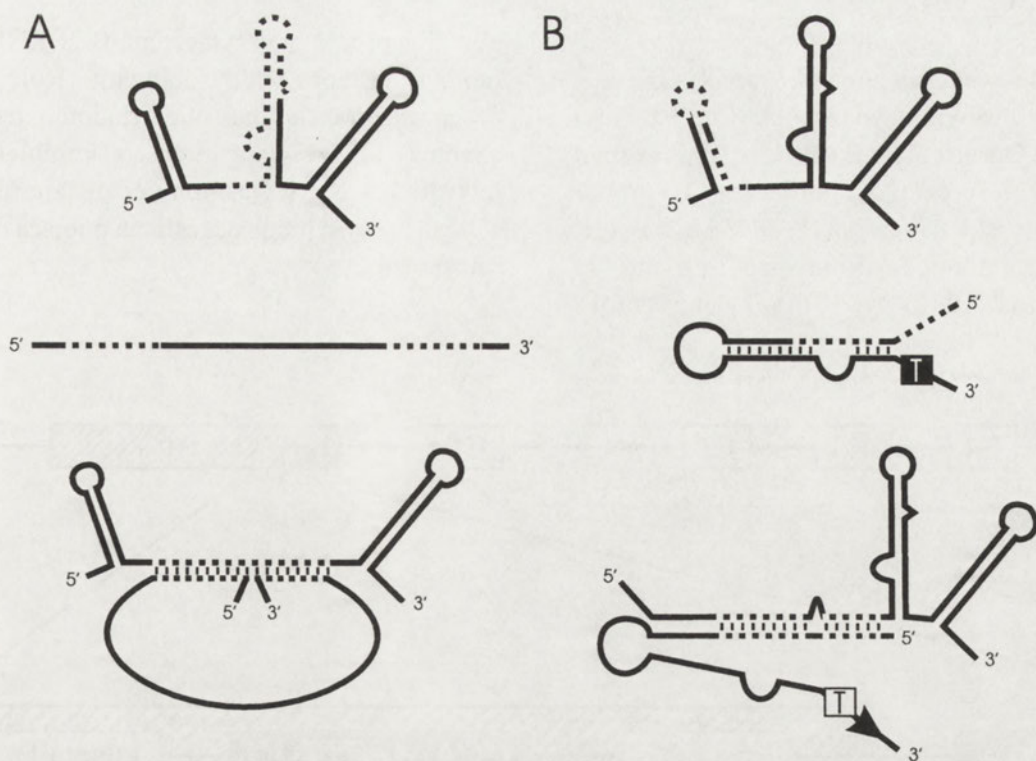
mRNA-DsrA RNA uniemożliwia przyłączenie rybosomu (Ryc. 7A). W odmienny sposób zachodzi proces regulacji translacji mRNA RpoS. Niska wydajność translacji tego mRNA związana jest z obecnością struktury drugorzędowej RNA przy końcu 5', która obejmuje między innymi region miejsca wiązania rybosomu (Ryc. 7B). W DsrA RNA, w obrębie pierwszej spinki, występują dwa krótkie odcinki komplementarne do sekwencji uczestniczącej w formowaniu helis oraz do sekwencji znajdującej się w sąsiednim odcinku jednoniciowym. Sekwencje te preferencyjnie wiążą się do mRNA RpoS, co powoduje uwolnienie regionu inicjatorowego i umożliwia przyłączenie mRNA do rybosomu [33].

Chociaż dokładny mechanizm ekspresji *dsrA* nie jest poznany, przypuszcza się, że jest on zależny od czynników środowiskowych. Stwierdzono wpływ temperatury na poziom transkrypcji oraz na stabilność DsrA RNA. Podwyższenie temperatury z 25°C do 42°C powoduje sześciokrotne obniżenie tran-

skrypcji oraz skrócenie czasu półtrwania DsrA RNA z 23 do 4 minut [34], co powoduje 30-krotnie zmniejszenie ilości transkryptu. Wydaje się, że za zależność poziomu transkrypcji od temperatury odpowiada fragment sekwencji promotorowej o długości 36 pz. Innym czynnikiem wpływającym na poziom RpoS za pośrednictwem DsrA jest szok osmotyczny. Aktywność DsrA RNA zależy również od regulatorowego

III-3. Modulatory aktywności białek

Regulacyjna rola RNA nie ogranicza się wyłącznie do oddziaływań z innymi kwasami nukleinowymi. Coraz liczniejsze stają się doniesienia o wpływie ncRNA na funkcjonowanie białek nie tylko za pośrednictwem mRNA, lecz również poprzez bezpośrednie wiązanie i modulację aktywności samego białka. Przykładem takiej cząsteczki jest SRA RNA (ang. *steroid receptor activator*). Cząsteczka ta występuje w kilku specyficznych tkankowo izoformach o długości 0,7-1,5 kb [36]. Forma I o długości około



Ryc. 7. Mechanizm oddziaływania DsrA RNA z docelowym mRNA. A) Wyciszenie mRNA H-NS poprzez wiązanie sekwencji inicjacji i terminacji translacji. B) Aktywacja mRNA RpoS poprzez uwolnienie sekwencji inicjacji translacji (T). Kropkowane fragmenty oznaczają sekwencje homologiczne [29]

0,7-0,85 kb syntetyzowana jest w największej ilości, natomiast w mniejszych ilościach występują formy II i III o długości około 1,3-1,5 kb. Wszystkie izoforny mają wspólny rdzeń o długości 687 pb oraz są poliadenylowane, różnią się natomiast fragmentami sekwencji przy końcach 3' i 5'. W obrębie rdzenia znajduje się otwarta ramka odczytu, sugerująca możliwość translacji, jednak dotychczas nie zidentyfikowano żadnego produktu białkowego. Wykazano natomiast funkcjonowanie SRA jako RNA. Wprowadzanie dodatkowych kodonów STOP oraz obecność cykloheksimidu nie powodowały utraty funkcjonalności.

Chociaż mechanizm działania SRA jest bardzo słabo poznany, wiadomo, że wiąże się on z domeną przy N-końcu receptorów steroidowych. Wiązanie to odbywa się za pośrednictwem białek, z którymi SRA tworzy kompleks białkowo-nukleinowy SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator 1*) [36,37]. Ostatnio zidentyfikowano motywy strukturalne w obrębie SRA RNA odpowiedzialne za asocjacje powyższych białek [38]. Podejrzewa się, że obecność SRA w kompleksie odpowiedzialna jest za jego wysoką specyficzną wiązania się z receptorami. SRA bierze również udział w aktywacji genów zależnych od receptorów steroidowych. Jest on wiązany przez białkowy represor indukowany przez hormony sterydowe, SHARP [39]. Okazało się, że poziom SRA jest podwyższony w komórkach pobranych z nowotworu piersi [40]. Co więcej, zmniejszenie poziomu SRA w

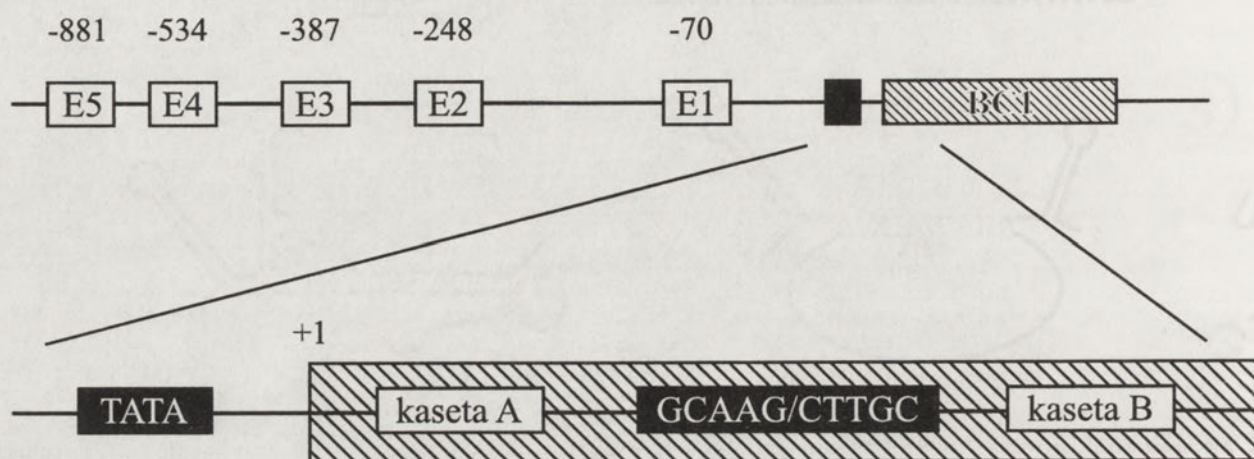
komórkach nowotworowych poprzez wprowadzenie antysensownych RNA powoduje zahamowanie ich proliferacji [41].

Innym RNA stanowiącym kofaktor czynnika transkrypcyjnego jest 7SK RNA, który powoduje hamowanie aktywności kompleksu P-TEFb (ang. *positive transcription elongation factor b*) w komórkach HeLa [42,43].

III-4. Regulatory lokalizacji RNA

Regulacja ekspresji genów odbywa się również poprzez specyficzną lokalizację mRNA. Ma to szczególne znaczenie w komórkach o dużej specjalizacji poszczególnych przedziałów subkomórkowych. Takimi właśnie komórkami są neurony, w których za lokalizację mRNA niektórych genów odpowiedzialne są również ncRNA. Takimi cząsteczkami są występujące u gryzoni BC1 oraz u naczelnych BC200. Obie cząsteczki wykazują podobieństwo zarówno budowy, ekspresji jak i mechanizmu działania, pomimo że wykazano ich zróżnicowane pochodzenie ewolucyjne. Oba RNA ulegają ekspresji w późnych stadiach rozwojowych tkanki nerwowej oraz ulegają poliadenylacji. Pomimo że transkrypcja prowadzona jest przez polimerazę III, w sekwencji promotorowej obu genów występują sekwencje regulatorowe charakterystyczne dla mechanizmu transkrypcji realizowanego przez polimerazę II. Do elementów tych zaliczyć można między inny-

mi znajdujące się w regionie promotorowym kasety E stanowiące sekwencje wzmacniające (Ryc. 8) wraz ze zidentyfikowanymi wiążącymi się z nimi białkami [44]. Oprócz nich dla transkrypcji niezbędny jest charakterystyczny dla polimerazy III promotor wewnętrzny składający się z kaset A i B oraz znajdującego się pomiędzy nimi specyficznego motywu GCAAG/CTTGC (Ryc. 8). Sekwencja ta jest



Ryc. 8. Organizacja sekwencji regulatorowych genu *BC1*. Pozycje kaset E zaznaczono jako E1-E5. Powiększony fragment przedstawia sekwencje inicjatorową TATA oraz elementy promotora wewnętrznego: kasety A i B oraz zachowawczą sekwencję GCAAG/CTTGC [38].

odpowiedzialna za regulację zwrotną *BC1* RNA zależną od ilości transkryptu w komórce [45].

BC1 i *BC200* w komórkach nerwowych wpływają na specyficzną lokalizację wybranych mRNA w dendrytach, chociaż są również doniesienia o roli *BC1* w transporcie mRNA wazopresyny do aksonów [46]. Oba rodzaje RNA występują w komórce w postaci kompleksów białkowo-nukleinowych (RNP). Dużym problemem jest wyjaśnienie sposobu przenoszenia kompleksu *BC1/BC200* z mRNA do zdefiniowanego miejsca. Istotną rolę w tym procesie przypisuje się kilku białkom kompleksu *BC1* RNP. Za lokalizację *BC1* odpowiedzialna jest sekwencja znajdująca się przy końcu 5' tej cząsteczki. Wiąże się z nią specyficznie białka uważane za regulatory replikacji i transkrypcji DNA — *purα* i *purβ* [47]. Białka te mają zdolność do asocjacji z mikrotubulami, co świadczy o możliwości ich do udziału w transporcie cytoplazmatycznym. Jednak oddziaływania białek *purα* i *purβ* z *BC1* okazały się słabe i okresowe (nie są one częścią *BC1* RNP). Innym białkiem o podobnych właściwościach będącym częścią *BC1* RNP jest translatyna. Jest to represor translacji. Wiąże ona mRNA zawierające motywy Y i H do mikrotubul [48]. Motywy takie odnaleziono również w *BC1* RNA. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano przypuszczalny sposób inicjacji transportu mRNA przez *BC1* RNA. Zakłada on, że białka *pur* biorą

udział w procesie przyłączania *BC1* RNP do mikrotubul a następnie oddysocjują. Rolę „uchwyty” przejmuje translatyna. Nie wiadomo jednak, jakie czynniki umożliwiają migrację kompleksu wzdłuż mikrotubul. Nie wyjaśniony pozostaje również sposób tak precyzyjnego określenia miejsca docelowego transportu.

IV. Poszukiwanie genów ncRNA

Sekwencjonowanie kompletnych genomów postawiło przed biologią nowe wyzwania. Jest to szczególnie wyraźnie widoczne w dziedzinie bioinformatyki. Podstawowym problemem, obok opracowania metod składania sekwencji całych chromosomów z fragmentów jest identyfikacja genów *in silico*. Dotyczy to w szczególności identyfikacji genów niekodujących RNA. W odróżnieniu od genów białkowych, geny kodujące strukturalne RNA nie wykazują znaczących sygnałów w sekwencji, takich jak otwarte ramki odczytu czy częstotliwość wykorzystania kodonów. W niektórych wypadkach, możliwe jest wyszukiwanie RNA w oparciu o konserwatywne elementy struktury drugorzędowej (tRNA, snoRNA), nawet przy niewielkim podobieństwie sekwencyjnym [49,50]. Osobny problem stanowi jednak wyszukiwanie sekwencji potencjalnych nowych genów ncRNA bez dodatkowych informacji o ich strukturze. Stosowane obecnie metody opierają się głównie na trzech strategiach [5]. Pierwsza z nich jest podobna do poszukiwania genów kodujących białka. Polega na próbie znalezienia charakterystycznych wspólnych cech genów RNA, które umożliwiłyby ich identyfikację [51]. Druga odnosi się wyłącznie do poszukiwania jednostek transkrypcyjnych, czyli regionów promotorowych i terminatorów transkrypcji. Wyszuk-

kiwane są jednostki nie posiadające otwartej ramki odczytu. Metody te nie są jednak dokładne ze względu na ogromne różnice w genach strukturalnych RNA, jak i obszarze promotorowym (ncRNA mogą ulegać transkrypcji przez wszystkie trzy typy polimeraz RNA). Trzecie podejście opiera się na próbie porównywania zachowawczości sekwencji i struktury drugorzędowej homologicznych fragmentów sekwencji międzygenowych ze spokrewnionych organizmów [52]. Najbardziej obiecująca wydaje się obecnie metoda zaproponowana przez R i v a s i E d d y i zastosowana w programie Q-RNA [53]. Oprócz poszukiwania homologii uwzględnia ona kilka kryteriów. Analizie poddawane są mutacje występujące w obrębie homologicznego fragmentu. Metoda zakłada trzy rodzaje rozkładu mutacji: losowe - charakterystyczne dla rejonów niefunkcjonalnych, kompensacyjne - charakterystyczne dla rejonów kodujących białka, polegające na zmianie nukleotydu, która nie wpływa jednak na zmianę odczytywanego z tego miejsca aminokwasu oraz kompensacyjne - charakterystyczne dla rejonów kodujących RNA, polegające na zamianie nukleotydu lub pary nukleotydów z zachowaniem struktury drugorzędowej kodowanego RNA. Dzięki temu homologiczne sekwencje można podzielić na trzy grupy: o dużym potencjale kodowania białka, o dużym potencjale kodowania ncRNA oraz „inne”. Testy programu przy użyciu sekwencji 7SL RNA wykazały, że najlepsze wyniki uzyskiwane są dla sekwencji o homologii 65-85%. Czułość programu w tym przypadku wynosi około 80.7-97.3% przy specyficzności 100-79%. Nieco gorsze wyniki uzyskano podczas testów przeprowadzonych na całych genomach. Metoda ta nie jest doskonała, a jej główną wadą jest duży spadek parametrów (czułości i specyficzności) dla sekwencji o homologii spoza przedziału 65-85%.

V. Podsumowanie

Niekodujące RNA wydają się być niezwykle istotnym elementem w regulacji ekspresji informacji genetycznej w komórce. Różnorodność procesów, w których biorą udział, wskazuje na ich wielką uniwersalność. Specyficzność reakcji w wielu przypadkach jest wyższa, niż mogłyby osiągnąć białka. Liczba znanych obecnie cząsteczek ncRNA stale rośnie. Projekt mający na celu zidentyfikowanie kompletnego transkryptomu myszy ujawnił 15815 nowych kandydatów na ncRNA, spośród których wyłoniono 4280 najbardziej prawdopodobnych [54]. Pośród nich znaleziono 2431 (1573 wcześniej nie zidentyfikowanych) par ncRNA-mRNA mogących od-

działywać na zasadzie komplementarności sekwencji. Uzasadnione wydają się pytania dotyczące rzeczywistego udziału ncRNA w genomie, a co z tym związane, ogromu ich znaczenia w regulacji procesów komórkowych. Znajomość całego transkryptomu otwiera szansę na poznanie odpowiedzi na te pytania. Prawdziwy obraz potęgi ncRNA ujawni się jednak dopiero, gdy zostanie zbadana rola nowych ncRNA oraz dokładnie poznane mechanizmy kierujące ich działaniem. Wiedza w tym zakresie rokuje nadzieje na nowe metody terapii licznych schorzeń, w które uwikłane są niekodujące RNA, jak zespół Beckwitha-Wiedemana, czy różne odmiany nowotworów.

Artykuł otrzymano 13 marca 2003
Zaakceptowano do druku 6 maja 2004

Piśmiennictwo:

1. Seifert H, Scheurlen M, Northermann W, Heinrich PC (1979) *Biochim Biophys Acta* **564**: 55-66
2. Valadkhan S, Manley JL (2001) *Nature* **413**: 701-7
3. Kiss T (2002) *Cell* **109**: 145-8
4. Szymański M, Barciszewski J (2002) *Genome Biol* **3**: 00051-00058
5. Eddy SR (2002) *Cell* **109**: 137-140
6. Mattick JS (2001) *EMBO Rep* **21**: 986-991
7. Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**: 421-431
8. Wilkin F, Paquette J, Ledru E, Hamelin C, Pollak M, Deal CL (2000) *Eur J Biochem* **267**: 4020-4027
9. Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J (2000) *J Biol Chem*, **275**: 29562-29569
10. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W (2002) *Nature* **417**: 945-948
11. Ukkola O, Sun G, Bouchard C (2001) *Diabetologia* **44**: 2231-2236
12. Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Shneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N, Hochberg A (1997) *Mol Pathol* **50**: 34-44
13. Kim SJ, Park SE, Lee C, Lee SY, Jo JH, Kim JM, Oh YK (2002) *Biochim Biophys Acta* **1586**: 307-315
14. Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, Haber DA, Uejima H, Feinberg AP (2001) *J Natl Cancer Inst* **93**: 1698-1703
15. Srivastava M, Hsieh S, Grinberg A, Williams-Simons L, Huang SP, Pfeifer K (2000) *Genes Dev* **14**: 1186-1195
16. Krzanowska H (1998) W: Wegleński P (red) *Genetyka Molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 307-321
17. Kelley RL, Kuroda MI (2000) *Cell* **103**: 9-12
18. Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I (2001) *Am J Hum Genet* **69**: 951-960
19. Migeon BR, Lee CH, Chowdhury AK, Carpenter H (2002) *Am J Hum Genet* **71**: 286-293
20. Shibata S, Lee JT (2003) *Hum Mol Genet* **12**: 125-136
21. Avner P, Heard E (2001) *Nat Rev Genet* **2**: 59-67
22. Morey C, Arnaud D, Avner P, Clerc P (2001) *Hum Mol Genet* **10**: 1403-1411

23. Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 8512-8520
24. Kelley RL, Meller VH, Gordadze PR, Roman G, Davis RL, Kuroda MI (1999) *Cell* **98**: 513-522
25. Meller VH, Gordadze PR, Park Y, Chu X, Stuckenholtz C, Kelley RL, Kuroda MI (2000) *Current Biol* **10**: 136-143
26. Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP, Oshimura M (1999) *Hum Mol Genet* **8**: 1209-1217
27. Zamore PD (2001) *Nat Struct Biol* **8**: 746-750
28. Llave C, Xie Z, Kasschau KD et al. (2002) *Science* **297**: 2053-2056.
29. McManus MT, Sharp P (2002) *Nat Rev Genet* **3**: 737-747
30. Ha I, Wightman B, Ruvkun G (1996) *Genes Dev* **10**: 3041-3050
31. Banarjee D, Slack F (2002) *Bioessays* **24**: 119-129
32. Majdalani N, Cunniff Ch, Sledjeski D, Elliot T, Gottesman S (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12462-12467
33. Lease RA, Belford M (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9919-9924
34. Repoila F, Gottesman S (2001) *J Bacteriol* **183**: 4012-4023
35. Sledjeski DD, Whitman Ch, Zhang A (2001) *J Bacteriol* **183**: 1997-2005
36. Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999) *Cell* **97**: 17-27
37. Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arao Y, Suzawa M, Kobayashi Y, Yano T, Yoshikawa H, Masuhiro Y, Karo S (2001) *EMBO J*, **20**: 1341-1352
38. Lanz RB, Razani B, Goldberg AD, O'Malley B (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16081-16086
39. Shi Y, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai CC, Hon M, Evans RM (2001) *Genes Dev* **15**: 1140-1151
40. Murphy LC, Simon SL, Parkes A, Leygue E, Dotzlaw H, Snell L, Troup S, Adeyinka A, Watson PH (2000) *Cancer Res* **60**: 6266-6271
41. Cavarretta IT, Mukopadhyay R, Lonard DM, Cowser LM, Bennett CF, O'Malley BW, Smith CL (2002) *Mol Endocrinol* **16**: 253-70
42. Yang Z, Zhu Q, Luo, Ki w sp. (2001) *Nature* **414**: 317-322
43. Nguyen VT, Kiss T, Michels AA i w sp. (2001) *Nature* **414**: 322-325
44. Kobayashi S, Anzai K (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 59-63
45. Kobayashi S, Anzai K (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 407-411
46. Trembleau A, Melia KR, Bloom FE (1995) *Eur J Neurosci* **7**: 2249-2260
47. Ohashi S, Kobayashi S, Omori A, Ohara S, Omae A, Muramatsu T, Li Y, Anzai K (2000) *J Neurochem* **75**: 1781-1790
48. Muramatsu T, Ohmae A, Anzai K (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 7-11
49. Lowe TM, Eddy SR (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 955-964
50. Lowe TM, Eddy SR (1999) *Science* **283**: 1168-1171
51. Carter JR, Dubchak I And Holbrook SR (2001) *Nucleic Acids Res* **29**: 3928-3938
52. Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR (2001) *Curr Biol* **11**: 1369-1373
53. Rivas E, Eddy SR (2001) *BMC Bioinformatics* **2**: 8
54. The FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team (2002) *Nature* **420**: 563-573

Inicjacja replikacji chromosomu — podobieństwa i różnice między eubakteriami, archebakteriami i eukariontami

Similarities and differences of the initiation process in eubacteria, archea, and eukarya

ANNA MAGDALENA ZAWILAK¹,
JOLANTA ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Regiony inicjacji replikacji
- III. Białka inicjatorowe
- IV. Mechanizmy inicjacji replikacji chromosomu u eubakterii, archebakterii i eukariontów
- V. Regulacja częstości inicjacji replikacji
- VI. Analiza procesu inicjacji replikacji - metody badawcze
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AAA+ — białka o aktywności ATP-azowej zaangażowane w różne procesy komórkowe (ang. *ATPases associated with various cellular activities*); ACS — 11. nukleotydowy fragment ARS o ściśle zachowawczej sekwencji (ang. *ARS consensus sequence*); ARS — sekwencje inicjacyjne replikacji (ang. *autonomously replicating sequence*); CDK — kinazy białkowe zależne od cyklin (ang. *cyclin dependent kinase*); DDK — (ang. *Dbf4-dependent kinase*); DUE — sekwencja w obrębie której rozplatana jest helisa DNA (ang. *DNA unwinding element*); Fis — zasadowe białko „histonopodobne” (ang. *factor for inversion stimulation*); HTH — helisa-skret-helisa (ang. *helix-turn-helix*); IHF — zasadowe białko „histonopodobne” (ang. *integration host factor*); MCM — białka o aktywności helikazowej (ang. *minichromosome maintenance proteins*); OBP — (ang. *origin binding proteins*); ORB — sekwencje wiązane przez inicjatorowe białko Orc1/Cdc6 archebakterii (ang. *origin recognition boxes*); ORC — kompleks sześciu białek inicjujący replikację (ang. *origin recognition complex*); *oriC* — region inicjacji replikacji chromosomu (ang. *origin of chromosomal replication*); pz — par zasad; SSB — białka stabilizujące jednoniciową strukturę DNA (ang. *single-strand binding proteins*); z — zasada

Contents:

- I. Introduction
- II. Origins of replication
- III. Initiator proteins
- IV. Mechanisms of initiation of chromosomal replication in eubacteria, archebacteria and eukaryotes
- V. Regulation of the initiation of chromosome replication
- VI. Methods of analysis of the initiation of replication
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Podział każdej komórki pro- i eukariotycznej musi być poprzedzony podwojeniem materiału genetycznego. Replikacja DNA zapewnia wierne przekazywanie informacji genetycznej z komórek rodzicielskich do komórek potomnych. Inicjacja replikacji jest pierwszym i najważniejszym, bo podlegającym ścisłej kontroli, etapem powielania chromosomu. Ponad czterdzieści lat temu J a c o b i wsp. [1] przedstawili hipotezę dotyczącą przebiegu inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego, która zakładała, że proces ten jest regulowany poprzez swoiste związanie się białka (inicjatora) z określonym fragmentem chromosomu (replikatora). Dwa-dziesiąt lat później hipoteza ta została doświadczalnie potwierdzona u *Escherichia coli* [2], a w 1988 B r a m h i l l i K o r n b e r g [3] przedstawili prawdopodobny przebieg procesu inicjacji replikacji chromosomu *E. coli*. Późniejsze badania nad inicjacją replikacji innych chromosomów bakteryjnych oraz chromosomów archebakterii i eukariontów pokazały, że hipoteza J a c o b a i wsp. [1] jest uniwersalna; w organizmach tak ewolucyjnie odległych, jak bakterie i ssaki, inicjacja replikacji przebiega w podobny sposób — związanie się inicjatorowego białka

¹Dr, ²prof. dr hab., Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Zakład Mikrobiologii, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, tel.: 071 337 11 72; fax: 071 337 13 82, e-mail: zakrzew@immuno.iitd.pan.wroc.pl

(białek) z regionem *ori* prowadzi do utworzenia kompleksu nukleoproteinowego, a następnie do miejscowego rozplecenia helisy DNA i powstania oczka replikacyjnego. W miejscu rozdzielenia nici DNA tworzy się para widełek replikacyjnych [4]. Różnice w przebiegu procesu inicjacji replikacji DNA dotyczą liczby miejsc *ori* i ich cech strukturalnych oraz liczby i rodzaju białek uczestniczących w inicjacji replikacji.

Wielkość chromosomu prokariotycznego waha się od 0,6 Mbp (*Mycoplasma*) do prawie 30 Mbp (*Bacillus megaterium*) [5] (<http://www.tigr.org/>, <http://ergo.integratedgenomics.com/GOLD/>). Do niedawna uważano, że komórka bakteryjna, w odróżnieniu od organizmów eukariotycznych, ma jeden chromosom, który jest kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką dwuniciowego DNA. Jednakże chromosomy niektórych bakterii (np. *Borrelia burgdorferii* [6], *Streptomyces coelicolor* A3(2) [7]) występują w postaci liniowej, typowej dla organizmów eukariotycznych. Ponadto, istnieją bakterie, które mają więcej niż jeden chromosom. Ciekawym przykładem jest *Agrobacterium* — organizm zawierający dwa chromosomy, z których jeden jest liniową, a drugi kolistą zamkniętą cząsteczką DNA (<http://ergo.integratedgenomics.com/GOLD/>; <http://www.tigr.org/>). Chromosom archebakterii, podobnie jak większość bakteryjnych chromosomów, występuje w postaci kolistej, a jego wielkość mieści się w granicach od 1,6 Mbp (*Thermoplasma volcanium*) do 5,7 Mbp (*Methanosarcina acetivorans*) (<http://ergo.integratedgenomics.com/GOLD/>). Chromosomy organizmów eukariotycznych są liniowe, a ich liczba w zależności od organizmu waha się od kilku do kilkudziesięciu, a w niektórych przypadkach do ponad stu (np. 108 chromosomów w *Equisetum arvense*, skrzyp polny). W skład poszczególnych chromosomów wchodzi cząsteczki DNA o różnej długości; przykładowo najmniejszy i największy ludzki chromosom zawiera cząsteczkę DNA o długości odpowiednio 55 Mbp i 250 Mbp (cały genom ~3000 Mbp).

Bez względu na to, czy komórka ma jeden chromosom, czy też ma ich wiele, replikacja DNA zachodzi tylko raz w każdym cyklu podziałowym [4]. Inicjacja replikacji nie tylko jest pierwszym etapem powielania chromosomu (ów), ale również sygnałem rozpoczynającym podział komórki, i dlatego podlega ścisłej kontroli. Replikacja kolistego chromosomu bakteryjnego postępuje dwukierunkowo począwszy od regionu *oriC* aż do miejsca terminacji (*ter*) (oddalonego od *oriC* w przybliżeniu o połowę długości chromosomu), w którym widełki replikacyjne są zatrzymywane. Replikacja bakteryjnych li-

niowych chromosomów rozpoczyna się w środku cząsteczki DNA i podąża dwukierunkowo do końców chromosomu. Natomiast w chromosomach organizmów eukariotycznych replikacja jest inicjowana w wielu miejscach rozmieszczonych wzdłuż chromosomalnego DNA, a kończy w chwili zetknięcia się widełek replikacyjnych podążających ku sobie z przeciwnych kierunków. Synteza telomerów występujących na końcach liniowych chromosomów eukariotycznych i niektórych chromosomów prokariotycznych przebiega w sposób odmienny niż synteza pozostałej części chromosomalnego DNA.

Proces inicjacji replikacji eubakterii i eukariontów został najlepiej poznany na przykładzie odpowiednio *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Badania nad minichromosomami *E. coli* oraz drożdżowymi plazmidami zawierającymi sekwencje ARS (ang. *autonomously replicating sequence*) umożliwiły poznanie funkcji poszczególnych elementów strukturalnych regionu inicjacji replikacji oraz białek uczestniczących w tym procesie. Coraz więcej wiadomo też na temat inicjacji replikacji u archebakterii, chociaż problem ten został podjęty stosunkowo niedawno (pierwsza praca doświadczalna dotycząca tego zagadnienia ukazała się dopiero w 2000 roku).

Szybkość syntezy chromosomalnego DNA eukariontów jest mniejsza niż u bakterii i archebakterii (Tabela 1), ale dzięki obecności wielu miejsc inicjacji replikacji w chromosomach organizmów eukariotycznych szybkość replikacji całego genomu (wszystkich chromosomów) może przewyższać szybkość replikacji genomu bakteryjnego (Tabela 1).

II. Regiony inicjacji replikacji

Jednostką replikacji jest replikon — stanowi on odcinek DNA zawierający miejsce inicjacji replikacji, oraz wszystkie sekwencje, które są pod jego kontrolą i replikują się wraz z nim [8]. Liczba miejsc inicjacji replikacji chromosomu waha się od jednego w przypadku nukleoidów bakteryjnych, do kilkuset u drożdży, a nawet kilkudziesięciu tysięcy u organizmów wielokomórkowych (liczba *ori* dla całego genomu), np.: w największym spośród czterech chromosomów *Drosophila melanogaster* liczącym 51 Mbp replikacja rozpoczyna się w ponad 6 tys. miejsc.

Regiony *ori* występują w odcinkach międzygenowych. Bakteryjne regiony *oriC* są zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie genów kodujących białka zaangażowane w inicjację replikacji; z reguły przed 5' lub za 3' końcem genu *dnaA* (Ryc. 1). Chromosomy archebakterii mogą zawierać jedno lub kilka miejsc

Tabela 1.

Porównanie replikacji chromosomów eubakterii, archebakterii i eukariontów

	Eubakterie	Archebakterie*	Eukarionty**
Region <i>ori</i>	180 – 1000 pz	~500-800 pz	150 – 200 pz
- liczba regionów <i>ori</i>	1	1 lub kilka	kilka do kilkudziesięciu tys.
- sekwencje wiążące inicjatorowe białka	9-merowe sekwencje DnaA	odwrócone sekwencje powtórzone IR ?	11-merowe nukleotydowe sekwencje ACS domeny A
Inicjatorowe białko	DnaA pojedyncze białko	Cdc6/Orc1 jedno lub dwa białka	ORC (Orc1-6) kompleks 6 białek
Wprowadzenie helikazy do kompleksu inicjacyjnego	DnaC pojedyncze białko	Cdc6/Orc1 jedno lub dwa białka	Cdc6, Cdt1 w kompleksie z ORC
Rozwijanie dwuniciowego DNA	DnaB pojedyncze białko - heksamer	MCM ?	MCM (Mcm2-7) 6 białek - heksamer
Długość fragmentów Okazaki	1- 2 kz	40 – 60 z	< 125 z
Szybkość syntezy DNA	20 - 50 kz min ⁻¹	15 – 20 kz min ⁻¹	0,5 – 5 kz min ⁻¹

*, ** - dane dotyczące odpowiednio *P. abyssi*, *S. solfataricus* oraz *S. cerevisiae*

ori [9-15]. Miejsca inicjacji replikacji zlokalizowane są zwykle w pobliżu genów kodujących inicjatorowe białka Orc1/Cdc6 (Ryc. 1). Do wyjątków należą *Archaeoglobus fulgidus*, u którego, jak wskazuje analiza sekwencji, miejsce *ori* oddalone jest od genu *orc1/cdc6* [16], oraz *Methanococcus jannaschii*, na chromosomie którego nie zidentyfikowano genu *orc1/cdc6* [15].

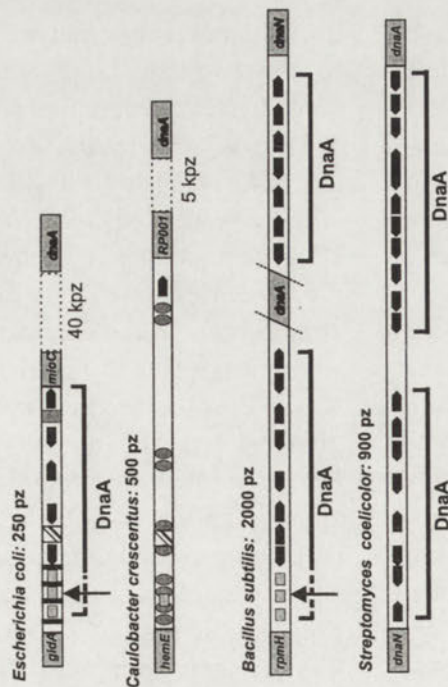
Podsumowując, replikon niektórych archebakterii oraz wszystkich dotychczas poznanych bakterii obejmuje cały chromosom — długość replikonu równa się długości chromosomu. Natomiast w chromosomach eukariontów i prawdopodobnie również niektórych archebakterii występuje wiele replikonów — ich długość waha się w granicach od kilkudziesięciu do kilkuset tysięcy par zasad [4, 17]. Co więcej, liczba miejsc *ori* chromosomów komórek organizmów tkankowych ulega zmianie w zależności od fazy rozwoju np. w komórkach embrionalnych jest około 20 razy więcej miejsc inicjacji replikacji

niż w komórkach somatycznych [18]; w różnych fazach rozwoju te same miejsca inicjacji replikacji mogą być aktywne lub nieaktywne.

Długość regionu *oriC* eubakterii wynosi od 180 pz u *H. pylori* [19] do 1000 - 2000 pz u *Streptomyces coelicolor* A3(2) [20] i *Bacillus subtilis* (Ryc. 1) [21]. Długość regionu *oriC* archebakterii *P. abyssi* wstępnie oszacowano na około 600 - 800 pz [22]. U drożdży *S. cerevisiae* długość regionu *ori* mieści się w granicach 100-150 pz [23]; drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe* mają dłuższy region *ori* (od 800 do 1000 pz) niż *S. cerevisiae*. Długość i lokalizacja regionów *ori* wyższych organizmów eukariotycznych nie są tak ściśle sprecyzowane jak w przypadku bakterii, archebakterii czy drożdży; w zależności od zastosowanej metody badawczej długość regionu *ori* oszacowano na kilkaset do kilku tysięcy par zasad [17].

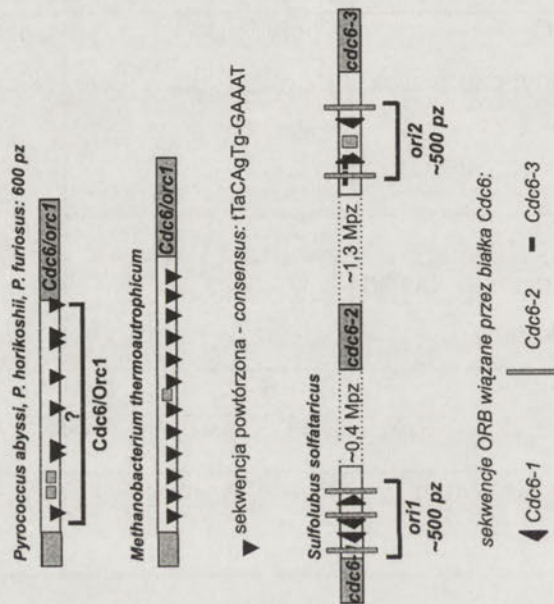
W obrębie chromosomalnych miejsc *ori* eubakterii, archebakterii i niższych eukariontów (drożdże)

Eubakterie



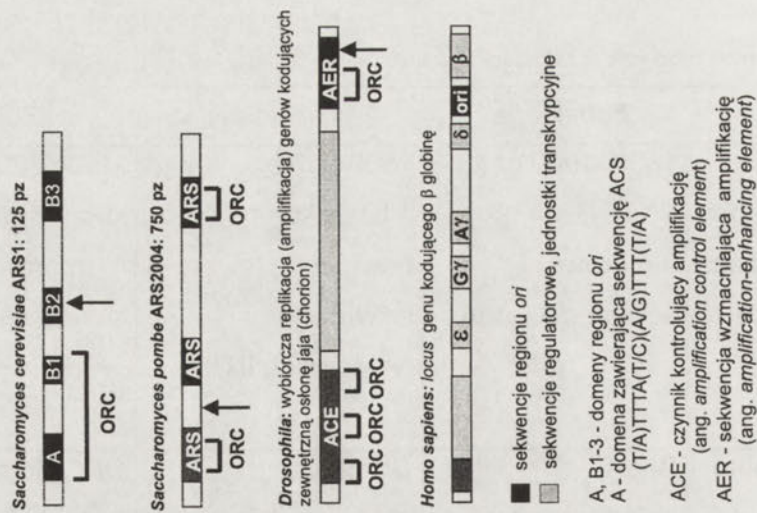
- 9-merowa sekwencja DnaA - consensus: TT(A/G)TNCACA
- ▬ 6-merowa sekwencja DnaA-ATP
- sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny CtrA
- ▩ sekwencja wiążąca białko Fis
- ▨ sekwencja wiążąca białko IHF

Archebakterie



- sekwencja bogata w parę A-T ▬ miejsce wiązania inicjatorowego białka ↑ miejsce rozplecenia DNA

Eukarionty



Ryc. 1. Struktura regionu ori u eubakterii, archebakterii i eukariontów (szczegółowy opis w tekście).

występują charakterystyczne sekwencje związane przez białka inicjujące replikację. U bakterii są to dziewięcionukleotydowe, niepalindromowe sekwencje DNA (sekwencja zgodności 5'-TTATCN ACA-3') swoiście rozpoznawane przez inicjatorowe białko DnaA [4, 24] i dlatego nazywane sekwencjami DnaA. W bakteryjnych regionach *oriC* występuje od kilku (*E. coli*) do kilkunastu (*Streptomyces*) sekwencji DnaA (Ryc. 1). Wyjątkowe pod tym względem są regiony *oriC* chromosomów *Coxiella burnetii* i *Caulobacter crescentus* zawierające odpowiednio dwie i jedną sekwencję DnaA [25, 26]. U archebakterii ostatnie badania pozwoliły na zdefiniowanie sekwencji charakterystycznych dla regionu *ori* chromosomu, tzw. miejsca ORB (ang. *origin recognition boxes*) [13]. Są to kilkunastonukleotydowe sekwencje zawierające w swoim rdzeniu powtórzoną sekwencję odwróconą. Miejsca ORB związane przez każdy z ortologów białka Orc1/Cdc6 (patrz rozdział III) różnią się sekwencją nukleotydową. Jeżeli chromosom zawiera dwa miejsca *ori*, każde z nich może posiadać inne sekwencje ORB. Wykazano, że białka Orc1/Cdc6 obecne w komórkach *S. solfataricus* swoiście rozpoznają sekwencje ORB w regionach *oriC1* (Cdc6-1 i Cdc6-2) i *oriC2* (Cdc6-1, Cdc6-2 i Cdc6-3) chromosomu tego organizmu. Sekwencje ORB znaleziono w regionach *ori* kilku archebakterii należących do grup *Crenarchaea* i *Euryarchaea*, oraz wykazano, że białko Cdc6-1 *S. solfataricus* wiąże sekwencje ORB w regionach *ori* *Pyrococcus furiosus* (2 sekwencje ORB) i *Halobacterium* (5 sekwencji ORB) [13]. Nie udało się znaleźć sekwencji ORB na chromosomach *P. aerophilum* i *M. thermoautotrophicum*. U drożdży *S. cerevisiae*, kompleks inicjatorowych białek wiąże się swoiście z jedenasto nukleotydową sekwencją DNA zlokalizowaną w domenie A regionu ARS zwanej ACS (ang. *ARS consensus sequence*) [23]. Sekwencja ACS jest ściśle zachowawcza (5'-(T/A)TTTA(T/C)(A/G)TT T(T/A)-3'), identyczna dla wszystkich ARS *S. cerevisiae* [27-30]. Ponadto stwierdzono, że inicjatorowe białka wiążą się dodatkowo z domeną B1 regionu ARS (Ryc. 1). Region *ori* *S. pombe* ma strukturę bardziej złożoną niż *S. cerevisiae*. Nie wyróżniono w nim charakterystycznych dla *S. cerevisiae* sekwencji ACS [23]. Znaleziono jednak długie sekwencje bogate w pary A-T, podobne do centromerowych sekwencji, które są związane przez białka wykazujące powinowactwo do sekwencji bogatych w pary A-T (tzw. ang. *AT-hook proteins*) [17]. W przypadku wyższych eukariontów trudno jest zdefiniować cechy regionów *ori*, a nawet przypuszcza się, że w regionach *ori* chromosomów organizmów wielokomórko-

wych nie występują żadne określone sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez kompleks białek inicjatorowych [17, 31]. O rozpoczęciu replikacji z danego miejsca i o liczbie miejsc *ori* decydują inne czynniki, których wpływ nie został do końca wyjaśniony, np. struktura chromosomu, transkrypcja zachodząca z pobliskich genów, faza rozwoju danego organizmu [31], a także poziom nukleotydów w komórce [32, 33].

W regionach *ori* organizmów pro- i eukariotycznych obecne są również sekwencje bogate w pary A-T, w obrębie których dochodzi najczęściej do miejscowego rozplatania podwójnej nici DNA [3, 4], tzw. regiony DUE (ang. *DNA unwinding element*). U bakterii są to odcinki DNA o długości kilkunastu-kilkudziesięciu nukleotydów, na ogół kilkakrotnie powtórzone; przykładowo w pobliżu 5' końca regionu *oriC* *E. coli* występują 3 odcinki DNA bogate w pary A-T o długości 13 pz każdy (Ryc. 1). U wielu bakterii nie udało się dotychczas zidentyfikować sekwencji, w obrębie których dochodzi do miejscowego rozplecenia DNA i utworzenia oczka replikacyjnego (np., *S. coelicolor* A3(2), Ryc. 1). Region *ori* *S. cerevisiae* charakteryzuje się podwyższoną zawartością par A-T na całej swej długości. Rozplatanie DNA rozpoczyna się w domenie B2, ale zaobserwowano także tworzenie jednoniciowego DNA we fragmencie A (Ryc. 1) [34]. Obie te sekwencje prawdopodobnie biorą udział w tworzeniu oczka replikacyjnego. W regionie *oriC* archebakterii, *P. abyssi* i *M. thermoautotrophicum* występują odpowiednio dwie i jedna sekwencje bogate w pary A-T. Stosując dwukierunkową elektroforezę wykazano, że w regionach *oriC* *P. abyssi* oraz *oriC1* i *oriC2* *S. solfataricus* dochodzi do utworzenia oczek replikacyjnych [13, 35].

Regiony *ori* organizmów pro- i eukariotycznych zawierają dodatkowo sekwencje wiążące różne białka wpływające na częstość inicjacji replikacji, m.in. białka zmieniające topologię kompleksu inicjacyjnego i czynniki transkrypcyjne. Białka te i ich rola zostały omówione w rozdziale V, poświęconym regulacji częstości inicjacji replikacji DNA.

III. Białka inicjatorowe

Białka inicjujące replikację DNA wiążą się swoiście z sekwencjami umiejscowionymi w regionie *ori* i dlatego w literaturze anglojęzycznej oznacza się je często skrótem OBP (ang. *origin binding proteins*). Rolę inicjatora replikacji chromosomu bakteryjnego pełni pojedyncze białko, DnaA, natomiast u organizmów eukariotycznych kompleks sześciu białek

ORC (ang. *origin recognition complex*). U archebakterii wstępne badania wykazały, że prawdopodobnie jedno białko inicjuje replikację chromosomu.

Najlepiej scharakteryzowanym inicjatorem replikacji jest białko DnaA *E. coli*. Gen *dnaA*, kodujący inicjatorowe białko DnaA, został zidentyfikowany w chromosomach wszystkich badanych mikroorganizmów, poza dwoma wyjątkami; na chromosomach *Blochmannia floridanus* [35] i *Wigglesworthia glossinidia* [36] nie znaleziono genu *dnaA*. Są to Gram-ujemne, endosymbiotyczne organizmy, należące do rodziny enterobakterii, blisko spokrewnione z *E. coli*. Przymuszcza się, że inicjacja replikacji chromosomów tych bakterii, podobnie jak ich metabolizm, są w dużym stopniu zależne od gospodarza (mrówka, łac. *Camponotus spp* — *B. floridanus*; mucha tse-tse — *W. glossinidia*).

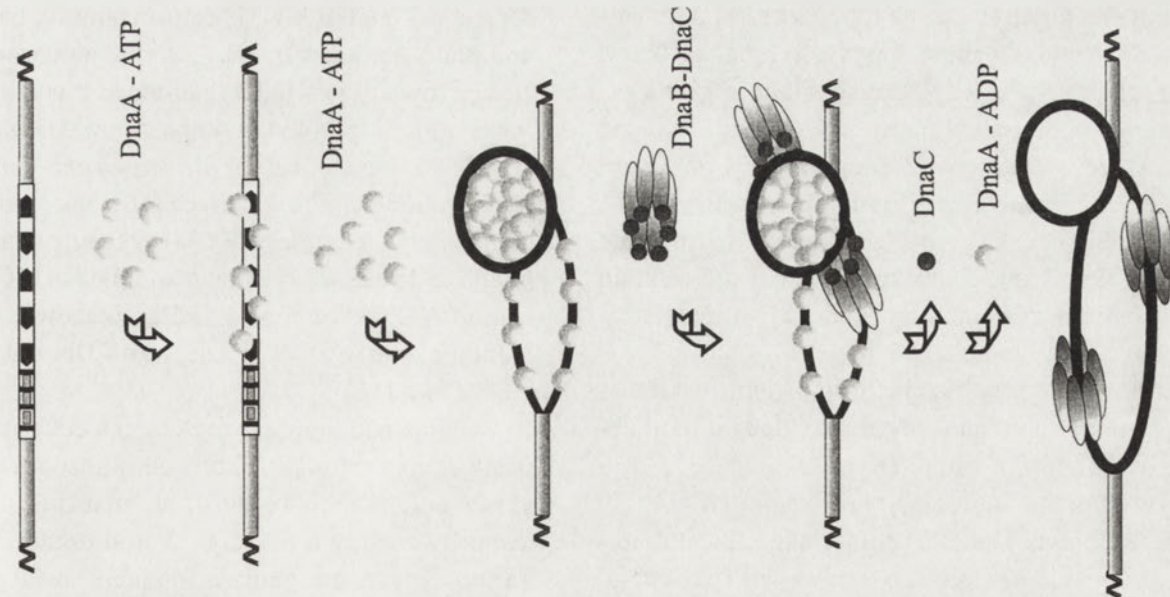
Białko DnaA wiąże swoiście sekwencje DnaA i rozplata dwuniciowy DNA w regionie *oriC*. DnaA występuje w dwóch formach: aktywnej replikacyjnie związanej z ATP (DnaA-ATP) oraz nieaktywnej, związanej z ADP (DnaA-ADP); obie formy wiążą z wysokim powinowactwem sekwencje DnaA, ale tylko białko DnaA-ATP jest w stanie rozpleść helisę DNA w regionie *oriC* [37]. Białko DnaA-ATP dodatkowo wiąże heksamerowe sekwencje tzw. sekwencje DnaA-ATP (5'-AGATCT-3' lub różniące się jednym nukleotydem) obecne w 5' regionie *oriC*, bogatym w pary A-T (Ryc. 1), w obrębie którego dochodzi do destabilizacji helikalnej struktury DNA [38, 39]. Białko DnaA w kompleksie z ATP wiąże specyficznie jednoniciowe sekwencje DnaA-ATP, stabilizując tworzone oczko replikacyjne [38, 39]. Za oddziaływanie białka z DNA odpowiedzialny jest motyw strukturalny helis-pętla-helisa (ang. *helix-turn-helix*), zlokalizowany w C-końcowej części białka [37, 40, 41, 42]. Środkowa część białka zawiera sekwencje, które biorą udział w wiązaniu nukleotydów adeninowych (ATP/ADP) i hydrolizie ATP, charakterystyczne dla białek AAA+ [42, 43]. Natomiast N-końiec białka DnaA bierze udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych [37].

Pomimo tego, że archebakterie są organizmami prokariotycznymi, w żadnym dotychczas sekwencjonowanych genomów archebakterii nie stwierdzono obecności genu *dnaA*. Natomiast prawie każdy z nich ma co najmniej jeden gen, którego produkt wykazuje stosunkowo wysoką homologię do eukariotycznych białek Cdc6 i Orc1 (patrz poniżej). Ponieważ dotychczas nie wiadomo, jaką funkcję pełnią produkty tych genów (czy podobną do białka Cdc6 czy też Orc1, a może obu naraz?), w komórkach archebakterii oznacza się je podwójnym symbolem

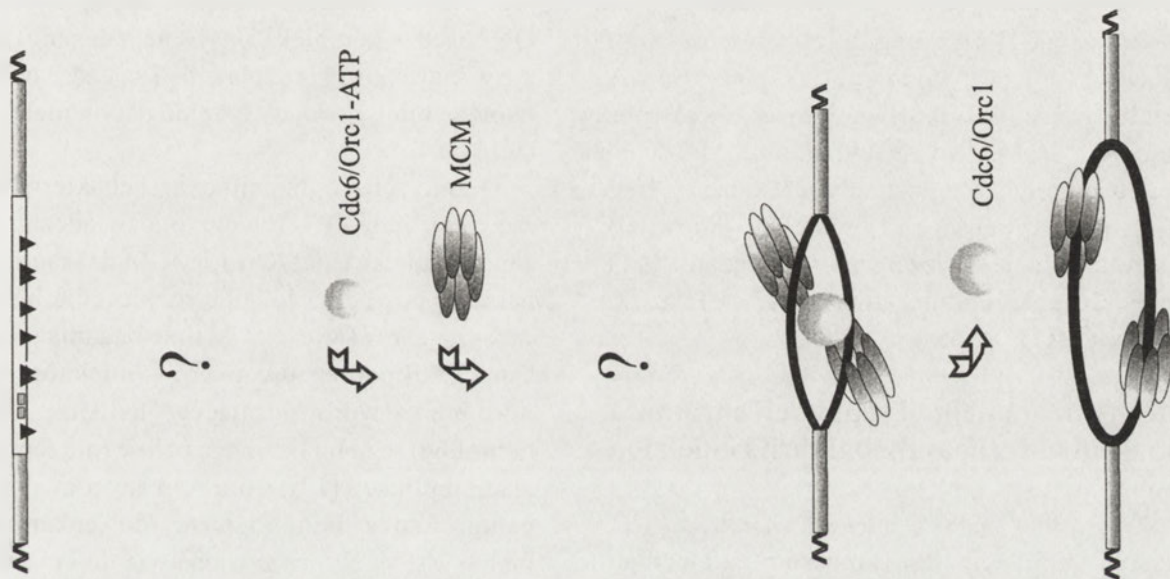
Orc1/Cdc6. Na chromosomie *M. jannaschii* i *Methanopyrus kandlerii* nie zidentyfikowano genu homologicznego do *orc1/cdc6*, natomiast zlokalizowano kilka kopii genów *mcm* (patrz poniżej) [15]. Przeważnie w genomach archebakterii występuje jeden lub dwa homologi genu *cdc6/orc1*, natomiast w genomie *Halobacterium* sp. NRC-1 zidentyfikowano aż 10 takich homologów, a u *H. marismotui* i *H. volcanii* aż 15 [12]. Analiza porównawcza sekwencji znanych homologów białek Orc1/Cdc6 pozwoliła na ich pogrupowanie w trzy rodziny reprezentowane przez białka Orc1-6, Orc1-7 i Orc1-8 *Halobacterium* [12]. Na podstawie badań nad *S. solfataricus*, na którego chromosomie znaleziono trzy homologi genu Orc1/Cdc6, wiadomo, że poszczególne ortologi białka Orc1/Cdc6 wiążą różne sekwencje ORB w obrębie *ori* i ulegają ekspresji w różnych fazach cyklu komórkowego archebakterii [13]. Możliwe jest, że poszczególne ortologii pełnią w komórce różne funkcje, np. aktywatora lub represora inicjacji replikacji DNA [13]. Niedawno poznana została przestrzenna struktura białka Cdc6/Orc1 z *Pyrobaculum aerophilum* [44]. Należy ono podobnie jak DnaA i trzy eukariotyczne białka kompleksu ORC (Orc1p, Orc4p, Orc5p), do rodziny białek typu AAA+. Organizacja przestrzenna białka Cdc6/Orc1 przypomina strukturę C-końcowej części białka DnaA. Jedyną istotną różnicą dotyczy domeny wiążącej DNA: w białku DnaA występuje motyw HTH, natomiast w białku Cdc6/Orc1 motyw strukturalny WH (ang. *winged helix*). Motyw WH jest charakterystyczny dla wielu czynników transkrypcyjnych (np. E2F4/Dp2) i odpowiada za wiązanie DNA.

Zespół białek ORC inicjujących replikację chromosomów eukariotycznych został po raz pierwszy wykryty u drożdży *S. cerevisiae* [45]. Wykazano, że wszystkie sześć podjednostek kompleksu, nazwanych wraz ze zmniejszającą się masą cząsteczkową od Orc1p do Orc6p, jest niezbędnych dla przeżycia komórek drożdżowych [46-48]. Geny kodujące białka ORC występują we wszystkich dotychczas badanych organizmach eukariotycznych począwszy od drożdży, a skończywszy na człowieku [23, 49]. Sekwencja białek ORC jest ewolucyjnie stosunkowo dobrze zachowana. Białka te są niezbędne, ale niewystarczające do inicjacji replikacji. Kompleks ORC niektórych eukariontów (np. *S. cerevisiae* i *S. pombe*) jest związany z regionem *ori* prawie przez cały czas trwania cyklu komórkowego, a jego aktywność inicjacyjna modulowana jest przez wiązanie innych białek (patrz poniżej). ORC innych organizmów oddysocjuje od DNA w niektórych fazach cyklu komórkowego, np.: u *X. laevis* tuż przed mi-

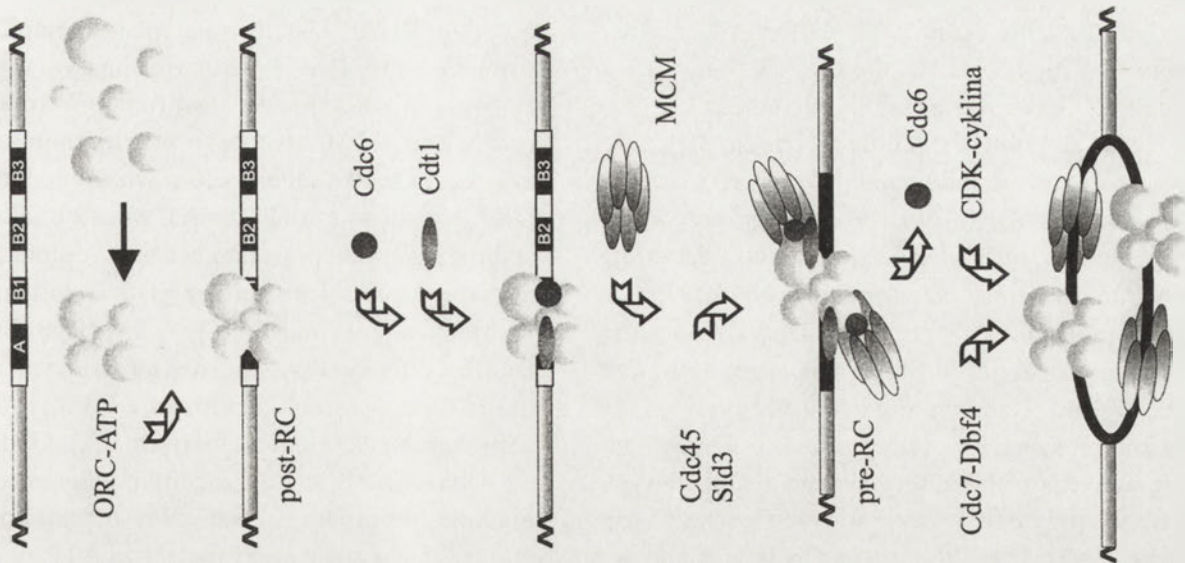
Eubakterie



Archebakterie



Eukarionty



Ryc. 2. Porównanie inicjacji replikacji chromosomów u eubakterii, archebakterii i eukariontów (szczegółowy opis w tekście).

toż, u ssaków w metafazie [23]. Najlepiej scharakteryzowane są białka ORC drożdży *S. cerevisiae*. Kompleks ORC wiąże swoiście odcinek DNA (domeny A i B1 regionu *ori*) o długości około 30 pz. Za wiązanie DNA jest odpowiedzialnych pięć z sześciu białek kompleksu ORC (Orc1p — Orc5p) przy czym cztery z tych pięciu białek bezpośrednio oddziałują z DNA (Orc1p, Orc2p, Orc4p, Orc5p) [23, 49, 50]. Podobnie jak w przypadku białka DnaA, kompleks ORC wymaga obecności ATP, a także jego hydrolizy dla zachowania aktywności replikacyjnej. Trzy białka kompleksu ORC, (Orc1p, Orc4p, Orc5p) zawierają sekwencje charakterystyczne dla białek typu AAA+ [43], przy czym wykazano, że Orc1p i Orc5p wiążą się z ATP [51-53], a tylko Orc1p posiada aktywność ATPazową [51, 53]. ATP indukuje zmiany konformacyjne kompleksu ORC niezbędne do swobodnego związania DNA i reguluje stabilność kompleksu ORC [53, 54]. Podobnie jak białko DnaA, białka ORC wiążą nie tylko dwuniciowy, ale również jednoniciowy DNA. Do specyficznego związania jednoniciowego DNA wymagany jest dłuższy fragment (odcinek o długości co najmniej 80 - 85 zasad); oddziaływanie to jest niezależne od związania ATP i jednocześnie stymuluje aktywność ATPazową kompleksu ORC [23].

IV. Mechanizm inicjacji replikacji chromosomu u eubakterii, archebakterii i eukariontów

Inicjacja replikacji jest procesem wieloetapowym, w trakcie którego powstają nukleoproteinowe kompleksy o złożonej strukturze trzeciorzędowej z udziałem pojedynczego lub kilku białek inicjujących, białek wspomagających oraz helikazy. Białka inicjatorowe przyłączając się do regionu *ori* powodują zmiany strukturalne DNA (m. in. zagięcie DNA), które w dalszych etapach inicjacji replikacji prowadzą do rozwinięcia podwójnej helisy DNA i utworzenia oczka replikacyjnego. Rozplatanie DNA jest wynikiem charakterystycznej dla regionu *ori* niestabilności helikalnej, dodatkowo zwiększonej po związaniu białek.

Proces inicjacji replikacji chromosomu został najlepiej poznany u eubakterii na przykładzie modelowego organizmu *E. coli* (Ryc. 2) [24, 37, 40]. W pierwszym etapie inicjacji replikacji około 20-30 cząsteczek białka DnaA *E. coli* wiąże się z 9-merowymi sekwencjami DnaA i 6-merowymi sekwencjami ATP-DnaA w regionie *oriC*. Cząsteczki białka DnaA przyłączając się do regionu *oriC* oddziałują ze sobą tworząc rdzeń białkowy, wokół którego zostaje

owinięty DNA. Następnym etapem inicjacji jest rozplecenie helisy DNA w regionie bogatym w pary A-T i utworzenie kompleksu otwartego. W trakcie tworzenia kompleksu otwartego przyłączane są kolejne cząsteczki białka DnaA, które wiążąc jednoniciowy DNA (sekwencje ATP-DnaA), wraz z białkami SSB stabilizują nowopowstałe oczko replikacyjne — miejsce przyłączenia helikazy DnaB do tworzonego kompleksu preprimosomu [37, 55] (Ryc. 2). Białko DnaB występuje w postaci heksameru i jest wprowadzane do oczka replikacyjnego w formie nieaktywnej przez białko DnaC (DnaB₆DnaC₆). Oddziaływanie DnaA-DnaB jest niezbędnym etapem rozdzielania kompleksu DnaB₆DnaC₆. Dysocjacji kompleksu DnaB₆DnaC₆ towarzyszy hydroliza ATP zwiazanego z białkiem DnaC i aktywacja helikazy DnaB. Heksamer helikazy DnaB owinięty wokół jednoniciowego DNA (jeden kompleks DnaB₆ na jedną nić) przesuwa się w kierunku 3' i rozplata dalszą część helisy DNA tworząc miejsce do utworzenia pary widełek replikacyjnych.

O inicjacji replikacji u archebakterii wiadomo niewiele. Jedynie u *P. abyssi* doświadczalnie wykazano, że białka Cdc6/Orc1 i MCM wiążąc się z regionem *ori* powodują lokalne rozplecenie helisy DNA w regionie *ori* (Ryc.2). Ostatnie badania sugerują, że Cdc6/Orc1 pełni podwójną rolę; inicjatora replikacji oraz białka wprowadzającego helikazę, a niektóre homologii tego białka mogą pełnić rolę represora inicjacji replikacji [13]. Rolę helikazy prawdopodobnie pełnią białka homologiczne do eukariotycznych białek MCM. W przeciwieństwie do eukariotycznego heteroheksameru MCM, u archebakterii kompleks MCM tworzony jest przez sześć takich samych cząsteczek białka MCM, co przypomina bakteryjny kompleks helikazy DnaB₆. Zwykle na chromosomie zlokalizowany jest jeden gen *mcm*, z wyjątkiem *M. jannaschii*, który ma 4 kopie oraz *Methanopyrus kandleri* i *Methanosarrina acetivorans* mających 2 kopie genów homologicznych [56]. Jak pokazały badania *in vivo*, kompleks MCM wykazuje właściwości podobne do eukariotycznego kompleksu MCM: zależną od ATP aktywność 3'→5' helikazową, wiązanie jednoniciowego DNA, i zależną od DNA aktywność ATPazową [56].

Badania nad inicjacją replikacji u eukariontów, ze względu na złożoną strukturę chromosomu oraz brak systemu replikacji *in vitro*, są znacznie mniej zaawansowane niż u bakterii. Wśród organizmów eukariotycznych mechanizm inicjacji został najlepiej poznany na przykładzie drożdży *S. cerevisiae*. W przeciwieństwie do *E. coli*, gdzie rdzeń białkowy powstaje w trakcie związania białka DnaA z regionem

oriC, kompleks sześciu białek ORC tworzy się jeszcze przed związaniem z DNA (Ryc. 2) [48]. Białka ORC mogą wiązać się z *ori* tylko wtedy, jeżeli występują w kompleksie z ATP. Wykazano, że u drożdży ORC pozostaje związany z ARS przez większą część cyklu komórkowego (nawet podczas mitozy) [23, 57, 58]. Analiza kompleksu białkowego w regionie inicjacji replikacji pozwoliła na wyodrębnienie dwóch rodzajów kompleksów: pre-RC (ang. *prereplicative complex*) i post-RC (ang. *postreplicative complex*) (Ryc. 2) [57, 59]. Kompleks post-RC zbudowany jest tylko z białek ORC i tworzy się po zakończeniu syntezy nowych nici DNA. Kompleks post-RC nie jest zdolny do zainicjowania replikacji; białka ORC w przeciwieństwie do DnaA nie są w stanie samodzielnie rozpleść helisy DNA w regionie *ori*. Kompleks pre-RC powstaje w fazie G1 i oprócz ORC zawiera inne białka niezbędne do uruchomienia inicjacji replikacji: Cdc6, Cdt1 oraz MCM. Pod koniec mitozy, białka Cdc6 i Cdt1 niezależnie od siebie wiążą się do kompleksu ORC. Uważa się, że oba białka odpowiedzialne są za dostarczenie helikazy MCM do kompleksu pre-RC [60]. Cdc6, podobnie jak niektóre z białek ORC, należy do rodziny białek typu AAA+. O białku Cdt1 dotychczas niewiele wiadomo; nie wykazuje ono znaczącej homologii do żadnych z dotychczas poznanych białek. Aktywność obu białek podlega regulacji w zależności od fazy cyklu komórkowego (patrz niżej). Białka MCM (Mcm2-7) tworzą heterogeniczny heksamer, który pełni prawdopodobnie rolę helikazy. Białka te są wprowadzane do tworzącego się kompleksu pre-RC w fazie G1 [23, 59] i oddziałują nie tylko z Cdc6, Cdt1, ale również z ORC. Pod koniec fazy G1 do powstającego kompleksu pre-RC przyłączają się kolejne białka, w tym Cdc45 i Sld3 [23, 59]. Białko Cdc45 oddziałuje z białkami ORC i MCM i podobnie jak MCM uczestniczy nie tylko w inicjacji replikacji, ale również w syntezie DNA. Na początku fazy S wprowadza ono do kompleksu replikacyjnego polimerazę DNA α , która jest odpowiedzialna za syntezę starterów. Sld3 jest również niezbędne w tworzeniu aktywnego kompleksu inicjacyjnego; białko to oddziałuje z Cdc45. Przyłączenie się białek Cdc45 i Sld3 do kompleksu pre-RC poprzedza przejście komórki przez punkt kontrolny pomiędzy fazami G1 i S i aktywuje kompleks pre-RC (tworzy się tzw. kompleks pre-IC). O uruchomieniu inicjacji replikacji decyduje wówczas wiele innych czynników, w tym zależne od cyklin kinazy białkowe, CDK (ang. *cyclin dependent kinase*), które odgrywają główną rolę w regulacji cyklu komórkowego (patrz poniżej). Dochodzi do rozplecenia helisy DNA i następują dalsze etapy repli-

kacji, które wymagają dostarczenia białek uczestniczących w tym procesie np. RPA (wiązących jednoniciowy DNA) oraz kompleksu polimerazy- α [58]. Odpowiednie czynniki regulacyjne zapobiegają reinicjacji replikacji przed zakończeniem cyklu podziałowego komórki (patrz poniżej).

V. Regulacja częstości inicjacji replikacji

Inicjacja replikacji jest pierwszym i najważniejszym, bo podlegającym ścisłej kontroli, etapem powielania chromosomu. W normalnych warunkach wzrostu chromosom ulega powieleniu tylko raz w danym cyklu komórkowym. Złożone systemy regulacji częstości inicjacji replikacji chromosomu obecne są w komórkach pro- i eukariotycznych. Kontroli podlegają zarówno miejsca *ori* (modyfikacja DNA, wiązanie białek zmieniających strukturę chromosomu bądź uniemożliwiających wiązanie się białek inicjatorowych z *ori*) jak i białka inicjatorowe (regulacja poziomu i/lub lokalizacji aktywnego białka w komórce, regulacja aktywności białek przez wiązanie i hydrolizę ATP).

U bakterii mechanizm regulacji częstości replikacji został najlepiej poznany na przykładzie *E. coli*. Aktywność inicjatorowego białka DnaA podlega regulacji przez wiązanie nukleotydów adeninowych — tylko białko związane z ATP jest w stanie inicjować replikację; białko DnaA-ADP wiąże się z *oriC*, ale nie jest w stanie rozpleść helisy DNA. Aktywność ATPazowa DnaA jest stymulowana przez oddziaływanie z podjednostką β polimerazy DNA III oraz białkami IdaB i Hda (tzw. system RIDA, ang. *regulatory inactivation of DnaA*); białko DnaA-ADP nie jest zdolne do rozpoczęcia nowej rundy replikacji [61, 62]. Reaktywacja białka (wymiana związanego ADP na ATP, tzw. ang. *rejuvenation*) zachodzi przez oddziaływanie z kwaśnymi fosfolipidami błony komórkowej [63-65]. Regulacji podlega też poziom cytoplazmatycznego białka DnaA w komórce. Nadmiar białka ulega związaniu przez błonę komórkową [66] oraz przez chromosomalny region *datA* (ang. **DnaA titration**). *DataA*, znajdujący się w pobliżu regionu *oriC*, jest w stanie wiązać około 300-400 cząsteczek DnaA, podczas gdy w procesie inicjacji replikacji uczestniczy tylko około 20-30 cząsteczek [67]. W trakcie replikacji, region *datA* ulega podwojeniu, dzięki czemu gwałtownie spada liczba cząsteczek wolnego białka DnaA (przez ich wiązanie z noworeplikowanym miejscem *datA*). Trzecim mechanizmem kontroli częstości inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* jest regulowanie dostępności regionu *oriC* dla białka DnaA. Uczestniczą w tym białka spe-

cyficznie wiążące się z regionem *oriC* (np. SeqA, Rob, ArcA, IHF i Fis) lub niespecyficycznie oddziałujące z DNA i zmieniające jego strukturę (np. H-NS, HU, IciA) [67, 68]. Wśród tych białek szczególną rolę odgrywa białko SeqA, swoiście wiążące się z ulegającymi metylacji miejscami GATC. Miejsca te statystycznie częściej występują w regionie *oriC* niż w całym chromosomie. Białko SeqA wiąże się z hemimetylowanymi sekwencjami GATC zapobiegając metylacji nowopowstałej nici DNA, wiązaniu się białka DnaA z regionem *oriC* i przedwczesnej reinicjacji replikacji chromosomu [67]. Pozostałe białka, zarówno wiążące się specyficznie jak i niespecyficznie z DNA, należą do grupy czynników transkrypcyjnych, bądź ich synteza podlega regulacji przez swoiste białka należące do systemów odpowiedzi komórki na warunki środowiska. Przykładem są tu dwa białka: ArcA i IciA. ArcA (ang. *aerobic respiration control protein*) wraz z przezbłonowym białkiem ArcB (ang. *aerobic respiration control sensor protein*) uczestniczy w regulacji transkrypcji genów w zależności od warunków tlenowych środowiska. W przypadku obniżenia poziomu tlenu, białko ArcB ulega autofosforylacji i fosforyluje białko ArcA [69]. Fosforylowane białko ArcA-P wpływa na transkrypcję około 9% genów *E. coli* [70] a także wiąże się z regionem *oriC* hamując inicjację replikacji chromosomu [69]. Transkrypcja genu *iciA* (ang. *inhibitor of chromosomal initiation of replication*) podlega aktywacji przez białko PhoB należące do systemu przekazywania sygnału zależnego od poziomu fosforanów w środowisku. Przy niskim stężeniu fosforanów, aktywowane przez fosforylację białko PhoB-P zwiększa syntezę białka IciA; w warunkach *in vitro* IciA, wiążąc się do regionu *oriC*, uniemożliwia rozplecenie helisy DNA [71]. Możliwe jest, że w warunkach *in vivo* białko IciA wpływa na częstość inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* przez związanie z regionem *oriC* lub przez wpływ na transkrypcję innych genów (np. IciA aktywuje transkrypcję *dnaA* i *nrd* *E. coli*) [71]. Proces regulacji częstości inicjacji replikacji u innych bakterii został znacznie słabiej poznany. Prawdopodobnie u wszystkich bakterii aktywność białka DnaA podlega regulacji na poziomie wiązania cząsteczki kofaktora (ATP/ADP). Przypuszczalnie poziom białka DnaA jest regulowany we wszystkich komórkach bakteryjnych. Ekspresja genu *dnaA* niektórych bakterii jest autoregulowana, np. *E. coli*, *B. subtilis* czy *Streptomyces* [72-75], a innych nie, np. *Thermus thermophilus* [76]. Białko DnaA niektórych bakterii jest ściśle związane z błoną komórkową, np. *E. coli* czy *Helicobacter pylori* [66, 77]. Natomiast u innych

bakterii np., *B. subtilis* [78] czy *Streptomyces* (B. R u b a n - O ś m i a ł o w s k a, dane niepublikowane), DnaA jest białkiem cytoplazmatycznym; jego poziom prawdopodobnie podlega regulacji przez miaręczkowanie za pomocą regionów chromosomu analogicznych do miejsca *datA E. coli* (miejsca *inc B. subtilis* czy zgrupowania sekwencji DnaA na chromosomie *Streptomyces*). Inicjacja replikacji jest również kontrolowana przez czynniki zależne od fazy i warunków wzrostu danej bakterii, np. u *Caulobacter crescentus* przez białko CtrA. *C. crescentus* jest bakterią o złożonym cyklu rozwojowym, obejmującym przekształcenie urzęsionych komórek ruchliwych w komórki osiadłe [79]. Replikacja DNA następuje tylko w komórkach osiadłych. CtrA (ang. *cell cycle transcription regulator*) jest nie tylko czynnikiem odpowiedzialnym za regulację transkrypcji genów (wpływa na ekspresję ponad 26% genów), ale również kontrolę inicjacji replikacji, morfogenezę i podział komórek *C. crescentus*. Aktywność CtrA podlega regulacji zależnej od fazy wzrostu komórki [26]. Ufosforylowane CtrA-P wiąże się z wysokim powinowactwem z regionem *oriC* i hamuje proces replikacji chromosomu [80]. Podczas przejścia komórki ruchliwej w osiadłą białko CtrA ulega proteolizie i może dojść do inicjacji replikacji chromosomu *C. crescentus*. W regulacji częstości inicjacji replikacji bakterii prawdopodobnie biorą udział białka zmieniające topologię DNA, np. IHF u *C. crescentus* [26]. Geny kodujące białka HU, IHF i H-NS występują w chromosomach enterobakterii i niektórych innych bakterii Gram-ujemnych; homologi białka HU znaleziono w chromosomach Gram-dodatnich bakterii *Bacillus stearothermophilus* i *Anabaena* spp [81]. Rola tych białek w procesie replikacji chromosomów została najlepiej poznana u *E. coli* [82-84], natomiast u innych bakterii nie jest dokładnie wyjaśniona; przypuszcza się, że wpływając na topologię chromosomu mogą regulować częstość powielania DNA [81].

Prace zmierzające do wyjaśnienia procesu inicjacji replikacji chromosomu archebakterii prowadzone są od stosunkowo niedługo czasu, dlatego prawie nic nie jest wiadomo na temat mechanizmów regulujących częstość powielania DNA archebakterii.

Problem kontroli replikacji DNA u eukariontów jest w ostatnim czasie przedmiotem dużego zainteresowania naukowców; wyniki badań zostały przedstawione w kilku obszernych pracach przeglądowych (m. in. 23, 85-87). Replikacja chromosomów eukariotycznych musi być ściśle powiązana z fazami cyklu komórkowego. Proces ten jest bardzo złożony i obejmuje wiele czynników, działających na pozio-

mie zarówno DNA (organizacja chromatyny), jak i białek inicjatorowych. Synteza nowych chromosomów rozpoczyna się w fazie S (choć kompleks preinicjacyjny tworzy się w miejscach *ori* jeszcze pod koniec fazy M lub we wczesnej fazie G1) i musi się zakończyć przed fazą G2 [58]. Jednoczesna aktywacja kompleksów pre-inicjacyjnych i późniejsza hamowanie aktywności białek inicjatorowych w trakcie syntezy DNA tak, aby nie dochodziło do reinicjacji replikacji, jest warunkiem właściwej synchronizacji procesu. Aktywność białek inicjatorowych podlega kontroli przez wiązanie i hydrolizę ATP, fosforylację przez kinazy, degradację lub kontrolę lokalizacji komórkowej w różnych fazach cyklu (translokacja białka z jądra do cytoplazmy), lub przez inne cząsteczki, np. gemininę. Aby kompleks ORC mógł związać się z DNA i być aktywnym w procesie inicjacji replikacji musi być związany z ATP. Hydroliza ATP jest stymulowana przez jednoniciowy DNA, tak, że po inicjacji replikacji kompleks jest nieaktywny i nie dochodzi do reinicjacji replikacji [23]. Aktywność białka Cdc6 jest nie tylko kontrolowana przez wiązanie i hydrolizę ATP, ale również przez zmianę jego lokalizacji lub indukowaną proteolizę białka w odpowiednich fazach cyklu. U *S. cerevisiae*, *S. pombe* i *X. laevis* zależna od kinazy CDK fosforylacja białka Cdc6 na początku fazy S indukuje jego degradację [87]. W komórkach ssaków ufosforylowane białko Cdc6-P ulega natomiast w fazie S częściowej translokacji do cytoplazmy. Kontrola aktywności białek przez zależną od cyklin fosforylację zdaje się być swoista dla komórek eukariotycznych. Co prawda, jak już wcześniej wspomniano, inicjacja replikacji chromosomów bakteryjnych jest również pośrednio regulowana przez fosforylowane białka, jednak nie są to białka zaangażowane bezpośrednio w proces inicjacji replikacji (nie są to białka inicjatorowe). U eukariontów dotychczas scharakteryzowano dwie kinazy wpływające na częstość procesu inicjacji replikacji: wspomniana już CDK oraz kinaza DDK (ang. *Dbf4-dependent kinase*). Obie kinazy (aktywne w fazie S) są niezbędne do zajścia inicjacji replikacji. Jednak dokładny sposób działania CDK i DDK nie jest do końca wyjaśniony; nie zidentyfikowano też wszystkich białek, które są substratami dla wymienionych kinaz [23]. Inicjacja replikacji chromosomów komórek zwierząt tkankowych (łac. *metazoa*, ale nie roślin lub grzybów) podlega regulacji przez gemininę. Cząsteczka ta jest niewielkim białkiem, które oddziałując z białkiem Cdt1 hamuje jego zdolność do dostarczania helikazy MCM do kompleksu pre-RC [87]. Wysokie stężenie gemininy obserwo-

wane w fazie M ulega obniżeniu w fazie G1, aby następnie wzrosnąć znów w fazie S. U ssaków aktywność gemininy jest regulowana przez indukowaną degradację białka, natomiast w jajach *X. laevis* białko nie ulega degradacji w fazie G1, ale jego aktywność inhibitorowa jest unieczynniana przez modyfikacje posttranslacyjne [87]. Wiele z czynników regulujących replikację chromosomów eukariotycznych nie zostało jeszcze dokładnie zbadanych, np. wpływ struktury chromatyny na aktywność miejsc *ori*. Przypuszcza się, że czynniki regulujące transkrypcję genów również wpływają na proces inicjacji replikacji [31, 88-90].

VI. Analiza procesu inicjacji replikacji — metody badawcze

Analiza procesu inicjacji replikacji DNA obejmuje identyfikację regionów *ori* chromosomów i wyróżnienie białek inicjatorowych oraz charakterystykę ich wzajemnego oddziaływania. Badanie czynników regulujących częstość inicjacji replikacji jest dalszym etapem prac zmierzających do pełnego wyjaśnienia procesu powielania chromosomu. Identyfikację regionów *ori* umożliwiają stosowane od dawna techniki: analiza replikacji minichromosomów oraz badanie wbudowywania analogów nukleotydów (zwykle znakowanych radioaktywnie) w chromosomalny DNA synchronizowanych hodowli komórkowych. Minichromosom jest plazmidem zawierającym chromosomalny region *ori* jako jedyne miejsce inicjacji replikacji DNA; jego niezależna replikacja w komórkach danej bakterii świadczy o tym, że jest to miejsce, w którym na chromosomie rozpoczyna się powielanie DNA. Badanie replikacji plazmidów stanowiących swoistą bibliotekę fragmentów chromosomalnego DNA pozwala na identyfikację regionu *ori* chromosomu bez uprzedniego wyznaczenia przypuszczalnych, prawdopodobnych miejsc inicjacji replikacji. Metoda ta ma jednak ograniczenia: stosuje się ją tylko do wyznaczania regionów *ori* bakterii i niższych eukariontów (*S. cerevisiae*), a ostatnio archebakterii, nie można jej jednak stosować u wyższych eukariontów. Nie wszystkie organizmy tolerują dodatkową kopię *ori* obecną w komórce i u nich technika konstrukcji minichromosomu nie może być stosowana. Ponadto, jak wykazały badania, wymagania co do długości i sekwencji regionu *ori* dla minichromosomu i chromosomu są różne [91], i zależą od rodzaju użytego plazmidu czy sekwencji okalających umożliwiających rozplecenie DNA [92]. Nie mniej jednak, technika ta wciąż jest jednym z podstawowych sposobów identyfikacji re-

gionów inicjacji replikacji chromosomów. Wyznaczanie miejsc inicjacji replikacji chromosomów przez analizę wbudowywania analogów nukleotydów w DNA jest również powszechnie stosowane zarówno u pro- jak i eukariontów. Metoda opiera się na analizowaniu regionów DNA, w które zostały wbudowane odpowiednio znakowane nukleotydy, i porównania intensywności wyznakowania DNA w zależności od położenia na chromosomie. Region DNA, który najwcześniej ulega zaznaczeniu jest miejscem, w którym rozpoczyna się replikacja DNA. Podstawową wadą stosowanej metody jest konieczność synchronizacji wzrostu komórek, co nie w każdym przypadku jest możliwe, i zwykle wymaga konstruowania zmutowanych szczepów. Metodę tę można wykorzystać również do badania hodowli komórek niezynchronizowanych [6, 93], jednak w takich przypadkach niezbędne jest wcześniejsze, przybliżone wyznaczenie regionów *ori* innymi metodami (np. *in silico*, patrz poniżej). Podobne wymagania dotyczą techniki identyfikacji regionu *ori* metodą elektroforezy dwukierunkowej DNA (tzw. ang. *two dimensional gel*) [94]. Wykorzystuje się ją do identyfikacji regionów *ori* zarówno bakterii, archebakterii jak i niższych eukariontów (drożdże). Niezbędna w przypadku tej metody jest znajomość przybliżonej lokalizacji regionu *ori* oraz wskazane jest izolowanie DNA z synchronizowanych hodowli (DNA izolowany z komórek z niezynchronizowanych hodowli jest uboższy w intermediały replikacyjne). W ostatnich latach opracowano wiele nowych technik służących do wyznaczania regionów *ori*, takie jak: detekcja fragmentów DNA metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* tzw. FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*, [95-97]), technika tzw. ang. *molecular combing* [32, 98] czy wyznaczanie miejsca inicjacji replikacji metodą RIP (ang. *replication initiation point mapping*, [11, 99-101]). Ostatnia z wymienionych metod pozwala wyznaczyć miejsce startu replikacji DNA z dokładnością do kilku nukleotydów, pozostałe z dokładnością kilkuset par zasad. Większość z wymienionych metod opiera się na wcześniejszym, przybliżonym wyznaczeniu przypuszczalnego miejsca inicjacji replikacji, zwykle metodą komputerowej analizy sekwencji DNA (tzw. analiza *in silico*). Analiza sekwencji nukleotydowej całych chromosomów umożliwia wyznaczanie regionów *ori* chromosomów bakterii i archebakterii, niestety nie można jej wykorzystać do identyfikacji miejsc *ori* chromosomów eukariotycznych. Badając skład nukleotydowy nici chromosomu pod kątem częstości występowania na niej cytozyny (C) i guaniny (G) zauważono, że nić wiodąca statystycznie zawiera więcej guaniny

niż cytozyny [102, 103]. Podobną zależność zaobserwowano analizując częstość występowania określonych krótkich sekwencji nukleotydowych na jednej z nici [104]. Można to zilustrować graficznie na wykresie przedstawiającym względną zmianę składu nukleotydowego jednej z nici (występowanie G, C lub krótkich sekwencji). Obserwowane na wykresie minimum i maksimum (związane ze zmianą sposobu syntezy nici z wiodącej na opóźnioną i odwrotnie) odpowiada miejscom na chromosomie, w których rozpoczyna i kończy się replikacja chromosomu.

Białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji identyfikuje się najczęściej przez konstrukcję zmutowanych szczepów i analizę wybranych mutantów, u których obserwuje się zaburzenia procesu replikacji DNA. W ten sposób znaleziono m. in. białko DnaA *E. coli* [105, 106] czy drożdżowe białka MCM [107, 108]. Do analizy oddziaływania białek inicjatorowych *in vivo* stosuje się drożdżowe systemy dwu- i trójhybrydowe. Poznanie białek inicjatorowych oddziałujących z DNA pozwala również na identyfikację regionów *ori* za pomocą immunoprecypitacji *in vivo*; dysponując przeciwciałem skierowanym przeciwko danemu białku możemy „wyłapać” z komórki nukleoproteinowy kompleks tego białka z regionem *ori*. Co więcej, możliwość zastosowania białek fluorescencyjnych w fuzji z białkami inicjatorowymi lub białkami aparatu replikacyjnego umożliwia śledzenie procesu replikacji i segregacji chromosomu *in vivo* [109].

VII. Podsumowanie

Hipoteza dotycząca mechanizmu inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego, ogłoszona po raz pierwszy ponad 40 lat temu, okazała się być prawdziwa i uniwersalna dla organizmów wszystkich trzech królestw: bakterii, archebakterii i eukariontów. Inicjacja replikacji rozpoczyna się zawsze w określonym miejscu (lub miejscach) chromosomu. U bakterii jest to jedno, zawsze to samo miejsce *oriC* rozpoznawane przez pojedyncze białko inicjatorowe DnaA. U niższych eukariontów (*S. cerevisiae*) miejsc inicjacji replikacji DNA jest więcej i zawierają one ściśle zdefiniowane elementy strukturalne rozpoznawane przez kompleks inicjatorowych białek ORC. U wyższych eukariontów, miejsca inicjacji replikacji nie zawierają żadnej określonej, powtarzającej się sekwencji (poza zwiększonym udziałem par AT), a co więcej, w różnych fazach rozwoju komórkowego miejsca *ori* są różne. Jednak jak dotychczas pokazano, *ori* nie jest regionem przypadkowym, a o wyborze miejsca startu syntezy DNA de-

cydują czynniki, które nie zostały jeszcze do końca poznane. U archebakterii, najmniej zbadanej grupy mikroorganizmów, miejsce *ori* może być jedno, dwa lub kilka.

Białka inicjatorowe odpowiedzialne są za swoiste wiązanie regionów *ori*, a ich aktywność podlega ścisłej regulacji. U organizmów prokariotycznych jest tylko jedno białko inicjujące replikację (bakteryjne DnaA i Orc1/Cdc6 u archebakterii), które odpowiada za rozpoznanie i związanie regionu *ori*, rozplecenie helisy DNA, oddziaływanie z białkami towarzyszącymi (np. helikazą DnaB czy MCM). Białko inicjatorowe bierze także udział w regulacji procesu inicjacji replikacji. U archebakterii białko Orc1/Cdc6 dodatkowo wprowadza helikazę MCM do kompleksu otwartego, pełniąc funkcję analogiczną do białek: bakteryjnego DnaC i eukariotycznego Cdc6. U eukariontów kompleks ORC złożony z 6 białek pełni rolę inicjatora. Białka wchodzące w skład kompleksu spełniają różne, nie do końca jeszcze poznane funkcje. Aktywność niektórych podlega regulacji przez związanie i hydrolizę ATP, inne uczestniczą w oddziaływaniach międzycząsteczkowych, prawdopodobnie nie wszystkie też wiążą DNA, np. u *S. cerevisiae* do oddziaływania z DNA niezbędnych jest 5 z 6 podjednostek ORC (Orc1p-Orc5p).

Replikacja chromosomu musi być powiązana z cyklem komórkowym. W proces regulacji zaangażowane są zarówno białka inicjatorowe jak i białka przekazujące sygnał w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska. Najbardziej złożony system regulacyjny występuje u eukariontów, u których w skoordynowaniu inicjacji replikacji z wielu miejsc chromosomu w ściśle określonym momencie przejścia fazowego G1/S uczestniczy wiele czynników, m. in. zależne od poziomu cyklin kinazy białkowe i struktura chromatyny.

Inicjacja replikacji chromosomu archebakterii jest stosunkowo najmniej poznana, chociaż badania zostały w ostatnim okresie znacznie zintensyfikowane. Proces ten zdaje się łączyć cechy systemu bakteryjnego (przeważnie jedno *ori* w chromosomie) z eukariotycznym (homologia białek inicjatorowych). Co ciekawe, dalsze etapy replikacji są podobne albo do procesu zachodzącego u bakterii, albo u eukariontów. Szybkość syntezy chromosomalnego DNA archebakterii jest zbliżona do szybkości syntezy chromosomu eubakterii; u eukariontów synteza DNA przebiega znacznie wolniej (Tabela 1). Natomiast, podobnie jak u eukariontów, fragmenty Okazaki archebakterii są znacznie krótsze od analogicznych fragmentów syntetyzowanych w komórkach bakterii

(Tabela 1). Dalsze badania zmierzające do poznania mechanizmów regulacyjnych u archebakterii pozwolą na pełniejszą charakterystykę procesu inicjacji i kontroli replikacji DNA oraz wyróżnienie uniwersalnych elementów zaangażowanych w procesy komórkowe zarówno bakterii, archebakterii jak i eukariontów.

Praca finansowana przez KBN
(projekty grantowe nr 3 P04A 079 22 I 3 PO4A 013 22).

Artykuł otrzymano 15 września 2003
Zaakceptowano do druku 6 maja 2004

Piśmiennictwo:

1. Jacob S, Brenner S, Cuzin F (1963) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 28: 329-348
2. Fuller R S, Kornberg A (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5817-5821
3. Bramhill D, Kornberg A (1988) *Cell* 52: 743-755
4. Kornberg A, Baker T (1992) *The DNA replication, Second Edition, W.H. Freeman & Co., New York*
5. Brown T A (1998) *Molecular Biology Labfax. 2nd edition, Volume I. Academic Press, London*
6. Picardeau M, Lobry J R, Hinnebusch B J (1999) *Mol Microbiol* 32: 437-445
7. Lin Y S, Kieser H M, Hopwood D A, Chen C W (1993) *Mol Microbiol* 10: 923-933
8. Jachymczyk W (1995) W: Węgleński P. (red) *Genetyka Molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa*, str. 59-109
9. Myllykallio H, Forterre P (2000) *Trends Microbiol* 8: 537-539
10. Matsunaga F, Forterre P, Ishino Y, Myllykallio H (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11152-11157
11. Matsunaga F, Norais C, Forterre P, Myllykallio H (2003) *EMBO Rep.* 4: 154-158
12. Berquist B R, Das Sarma S (2003) *J Bacteriol.* 185: 5959-5966
13. Robinson N P, Dionne I, Lundgren M, Marsh V L, Bernander R, Bell S D (2004) *Cell* 116: 25-38
14. Zhang R, Zhang C T (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 302:728-34
15. Maisnier-Patin S, Malandrin L, Birkeland N K, Bernander R (2002) *Mol Microbiol* 45: 1443-1450
16. Lopez P, Phillippe H, Myllykallio H, Forterre P (1999) *Mol Microbiol* 32: 881-891
17. De Pamphilis M L (1999) *Bioessays* 21: 5-16
18. Harvey K J, Newport J (2003) *J Biol Chem.* 278: 48524-48528
19. Zawilak A, Cebrat S, Mackiewicz P, Król-Hulewicz A, Jakimowicz D, Messer W, Gościński G. & Zakrzewska-Czerwińska J (2001) *Nucl Acids Res* 29: 2251-2259
20. Jakimowicz D, Majka J, Messer W, Speck C, Fernandez M, Martin M C, Sanchez J, Schauwecker F, Keller U, Schrempf H, Zakrzewska-Czerwińska J (1998) *Microbiol* 144: 1281-1290
21. Ogasawara N, Yoshikawa H (1992) *Mol Microbiol* 6: 629-634
22. Myllykallio H, Lopez P, Lopez-Garcia P, Heilig R, Saurin W, Zivanovic Y, Philippe H, Forterre P (2000) *Science* 288: 2212-2215
23. Bell S P, Dutta A (2002) *Annu Rev Biochem* 71: 333-374

24. Messer W, Weigel C (1996) W: Neidhardt F C, Curtiss R, Ingraham J, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E (red) *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1579-1601
25. Suhan M, Chen S Y, Thompson H A, Hoover T A, Hill A, Williams J C (1994) *J Bacteriol* **176**: 5233-5243
26. Marczyński G T, Shapiro L (2002) *Annu Rev Microbiol* **56**: 625-656
27. Toone W M, Aerne B L, Morgan B A, Johnston L H (1997) *Annu Rev Microbiol* **51**: 125-149
28. Stinchcomb D T, Struhl K, Davis R W (1979) *Nature* **282**: 39-43
29. Donovan S, Diffley J F (1996) *Curr Opin Genes & Dev* **6**: 203-207
30. Bell S P, Stillman B (1992) *Nature* **357**: 128-134
31. Gilbert D M (2001) *Science* **294**: 96-100
32. Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M (2003) *Cell* **114**: 385-394
33. DePamphilis M. L (2003) *Cell* **114**: 274-275
34. Natale D A, Umek R M, Kowalski D (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 555-560
35. Gil R, Silva F J, Zientz E, Delmotte F, González-Candelas F, Latorre A, Rausell C, Kamerbeek J, Gadau J, Hölldobler B, van Ham R C H J, Gross R, Moya A (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9388-9393
36. Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, Aksoy S (2002) *Nat Genet* **32**: 402-407
37. Messer W (2002) *FEMS Microbiol Rev* **26**: 355-374
38. Speck C, Messer W (2001) *EMBO J* **20**: 1469-1476
39. Speck C, Weigel C, Messer W (1999) *EMBO J* **18**: 6169-6176
40. Messer W, Blaesing F, Jakimowicz D, Krause M, Majka J, Nardmann J, Schaper S, Seitz H, Speck Ch, Weigel Ch, Węgrzyn G, Welzeck M, Zakrzewska-Czerwińska J (2001) *Biochimie* **83**: 5-12
41. Fujikawa N, Kurumizaka H, Nureki O, Terada T, Shirouzu M, Katayama T, Yokoyama S (2003) *Nucleic Acids Res* **31**: 2077-2086
42. Erzberger J P, Pirruccello M M, Berger J M (2002) *EMBO J* **21**: 4763-4773
43. Neuwald A F, Aravind L, Spouge J L, Koonin E V (1999) *Genome Res* **9**: 27-43
44. Liu J, Smith Ch L, DeRyckere D, DeAngelis K, Martin G S, Berger J M (2000) *Mol Cell* **6**: 637-648
45. Li J J, Herskowitz I (1993) *Science* **262**: 1870-1874
46. Bell S P, Kobayashi R, Stillman B (1993) *Science* **262**: 1844-1849
47. Baker T A, Bell S P (1998) *Cell* **92**: 295-305
48. Micklem G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley J F (1993) *Nature* **366**: 87-89
49. Quintana D G, Dutta A (1999) *Front Biosci* **4**: D805-815
50. Lee D G, Bell S P (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 7159-7168
51. Klemm R D, Austin R J, Bell S P (1997) *Cell* **88**: 493-502
52. Klemm R D, Bell S P (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8361-8367
53. Makise M, Takenaka H, Kuwae W, Takahashi N, Tsuchiya T, Mizushima T (2003) *J Biol Chem* **278**: 46440-46445
54. Takenaka H, Takahashi N, Lee J R, Makise M, Yamaguchi Y, Tsuchiya T, Mizushima T (2002) *Biol Pharm Bull* **25**: 652-655
55. Krause M, Ruckert B, Lurz R, Messer W (1997) *J Mol Biol* **274**: 365-380
56. Kelman L M, Kelman Z (2003) *Mol Microbiol* **48**: 605-615
57. Bell S P, Stillman B (1992) *Nature* **357**: 128-134
58. Diffley J F X, Labib K (2002) *J Cell Sci* **115**: 869-872
59. Diffley J F (1998) *Curr Biol* **8**: R771-773
60. Mendez J, Stillman B (2003) *Bioessays* **25**: 1158-1167
61. Katayama T (2001) *Mol Microbiol* **41**: 9-17
62. Kato J, Katayama T (2001) *EMBO J* **20**: 4253-4262
63. Sekimizu K, Kornberg A (1988) *J Biol Chem* **263**: 7131-7135
64. Yung B Y, Kornberg A (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7202-7205
65. Ichihashi N, Kurokawa K, Matsuo M, Kaito C, Sekimizu K (2003) *J Biol Chem* **278**: 28778-28786
66. Newman G, Crooke E (2000) *J Bacteriol* **182**: 2604-2610
67. Boye E, Lobner-Olesen A, Skarstad K (2000) *EMBO Rep* **1**: 479-483
68. Azam T A, Ishihama A (1999) *J Biol Chem* **274**: 33105-33113
69. Lee Y S, Han J S, Jeon Y, Hwang D S (2001) *J Biol Chem* **276**: 9917-9923
70. Liu X, De Wulf P (2004) *J Biol Chem* **279**: 12588-12597
71. Han J S, Park J Y, Lee Y S, Thony B, Hwang D S (1999) *Mol Gen Genet* **262**: 448-452
72. Braun R E, O'Day K, Wright A (1985) *Cell* **40**: 159-169
73. Smith R W, McAteer S, Masters M (1997) *Mol Microbiol* **23**: 1303-1315
74. Ogura Y, Imai Y, Ogasawara N, Moriya S (2001) *J Bacteriol* **183**: 3833-3841
75. Jakimowicz D, Majka J, Lis B, Konopa G, Węgrzyn G, Messer W, Schrempf H, Zakrzewska-Czerwińska J (2000) *Mol Gen Genet* **262**: 1093-1102
76. Nardmann J, Messer W (2000) *Gene* **261**: 299-303
77. Zawilak A, Durrant M C, Jakimowicz P, Backert S, Zakrzewska-Czerwińska J (2003) *J Mol Biol* **334**: 933-947
78. Imai Y, Ogasawara N, Ishigo-Oka D, Kadoya R, Daito T, Moriya S (2000) *Mol Microbiol* **36**: 1037-1048
79. McAdams H H, Shapiro L (2003) *Science* **301**: 1874-1877
80. Quon K C, Yang B, Domian I J, Shapiro L, Marczyński G T (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 120-125
81. Beach M. B, Osuna R (1998) *J Bacteriol* **180**: 5932-5946
82. Ryan V T, Grimwade J E, Camara J E, Crooke E, Leonard A C (2004) *Mol Microbiol* **51**: 1347-1359
83. Ryan V T, Grimwade J E, Nievera C J, Leonard A C (2002) *Mol Microbiol* **46**: 113-124
84. Atlung T, Hansen F G (2002) *J Bacteriol* **184**: 1843-1850
85. Nasheuer H P, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 41-94
86. DePamphilis M. L (2003) *Gene* **310**: 1-15
87. Kearsy S E, Cotterill S (2003) *Mol Cell* **12**: 1067-1075
88. Mechali M (2001) *Nat Rev Genet* **2**: 640-645
89. Gilbert D M (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**: 377-383
90. Grewal S I, Moazed D (2003) *Science* **301**: 798-802
91. Weigel C, Messer W, Preiss S, Welzeck M, Morigen, Boye E (2001) *Mol Microbiol* **40**: 498-507
92. Asai T, Bates D B, Boye E, Kogoma T (1998) *Mol Microbiol* **29**: 671-675
93. Vassilev L T, DePamphilis M. L (1992) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 445-472
94. Brewer B J, Fangman W L (1987) *Cell* **51**: 463-471
95. Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S (2000) *Genes Dev.* **14**: 212-223
96. Toledo F, Lachages A M, Mayau V, Debatisse M (1999) *Nucleic Acids Res* **27**: 1600-1608
97. Debatisse M, Toledo F, Anglana M (2004) *Cell Cycle* **3**: 19-21
98. Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, vanSlegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann J S, Bensimon A (1997) *Science* **277**: 1518-1523
99. Gerbi S A, Bielinsky A K (1997) *Methods* **13**: 271-280
100. Bielinsky A K, Gerbi S A. (2001) *J Cell Sci* **114**: 643-651
101. Abdurashidova G, Deganuto M, Klima R, Riva S, Biamonti G, Giacca M, Falaschi A (2000) *Science* **287**: 2023-2026

102. Mackiewicz P, Gierlik A, Kowalczyk M, Dudek M R, Cebrat S (1999) *J Appl Genet* **40**: 1-14
103. Mrazek J, Karlin S (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3720-3725
104. Salzberg S L, Salzberg A J, Kerlavage A R, Tomb J F (1998) *Gene* **217**: 57-67
105. Kohiyama M, Cousin D, Ryter A, Jacob F (1966) *Ann Inst Pasteur (Paris)* **110**: 465-486
106. Kohiyama M (1968) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33**: 317-324
107. Maine G T, Sinha P, Tye B K (1984) *Genetics* **106**: 365-385
108. Sinha P, Chang V, Tye B K (1986) *J Mol Biol* **192**: 805-814
109. R u b a n - O ś m i a ł o w s k a B, Zakrzewska-Czerwińska J (2003) *Post Mikrobiol* **42**: 359-368

Czynnik transkrypcyjny NFκB — nowa perspektywa w leczeniu nowotworów

Transcription factor NFκB — a new perspective in anticancer therapy

BEATA MARIA GRUBER

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka strukturalno-funkcjonalna
- III. Mechanizmy aktywacji NFκB
- IV. NFκB a programowana śmierć komórki
 - IV-1. Antyapoptotyczna aktywność NFκB
 - IV-2. Proapoptotyczna aktywność NFκB
- V. Znaczenie białek grupy Rel/NFκB
- VI. NFκB a nowotwory
- VII. NFκB - nowe możliwości w terapii przeciwnowotworowej

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 — białko aktywatorowe (ang. *activator protein*); ARD — domena wielokrotnych powtórzeń ankirynowych (ang. *ankiryn repeat domain*); cIAP — komórkowy inhibitor apoptozy (ang. *cellular inhibitor of apoptosis*); DIL — ligandy indukujące śmierć (ang. *death inducing ligands*); FeTBAP — metaloporfiryna o własnościach enzymu przeciwutleniającego (ang. *Fe III tetrakis(4 benzoic acid) porphyrin*); NAK — kinaza aktywująca NFκB (ang. *NFκB activating kinase*); NFκB — czynnik transkrypcyjny κB (ang. *nuclear factor κB*); NIK — kinaza indukująca NFκB (ang. *NFκB inducing kinase*); NLS — sekwencja odpowiedzialna za translokację do jądra (ang. *nuclear localization signal*); RHD — domena homologiczna z białkiem Rel (ang. *Rel homology domain*); TAD — domena aktywująca transkrypcję (ang. *transcription activating domain*); TNF — czynnik nekrozy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*); IL — interleukina; IκB — inhibitor κB; IKK — kinazy fosforylujące IκB; MAPKK — kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (ang. *mitogen — activated protein kinase kinase*); FAS — antygen powierzchniowy, jeden z receptorów z nadrodziny TNF; JAK-2 — kinaza z rodziny Janus; MAPK — kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. *mitogen — activated protein kinase*); MEKK 1,3 — kinazy kinazy białkowej aktywowanej mitogenem, których aktywność regulują czynniki pozakomórkowe (ang. *mitogen — activated protein/extracellular signal — regulated kinase kinases 1,3*); TRAF — czynnik związany z receptorem z nadrodziny TNF; TNF-R — receptor TNF; MAPKKK-ERK1/2 — kinazy kinazy kinazy

Contents:

- I. Introduction
- II. General characterization of structure and functions
- III. Mechanisms of NFκB activation
- IV. NFκB and programmed cell death
 - IV-1. Antiapoptotic activity of NFκB
 - IV-2. Proapoptotic activity of NFκB
- V. Role of Rel/NFκB proteins
- VI. NFκB and cancers
- VII. NFκB - new chance in anticancer therapy

białkowej, których aktywność regulują czynniki pozakomórkowe (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase kinases — extracellularly regulated 1/2*); Akt — kinaza białkowa; TRADD — białko z domeną śmierci wiążące się z receptorem TNF-R₁; FADD — białko z domeną śmierci wiążące się z receptorem FAS; IKKi — kinaza spokrewniona z IKKα i IKKβ; PEST — sekwencja bogata w reszty proliny, kwasy glutaminowego, seryny i treoniny; NEMO/IKKAP-1 — inaczej, kinaza IκB-IKKγ (ang. *NFκB essential modulator IKK — associated protein*); Bcl-2 — białko antyapoptotyczne; Bcl-xL — białko antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 regulujące apoptozę w komórkach nerwowych; Bfl-1/A1 — białko homologiczne z białkiem Bcl-2; Src(p56^{lck}) — kinaza tyrozynowa z rodziny Src; RIP — kinaza serynowo-treoninowa, białko oddziaływujące z receptorem (ang. *receptor interacting protein*); TRAIL — ligand indukujący apoptozę, związany z TNF (ang. *TNF — related apoptosis inducing ligand*); IEX 1L — gen kodujący białko blokujące apoptozę, indukowaną przez FAS lub TNFα; SRD — domena przejmująca sygnał(ang. *signal receiving domain*)

I. Wstęp

Czynnik transkrypcyjny NFκB (ang. *nuclear factor kappa B*) odkryto w jądrach dojrzałych limfocytów B. Prowadzone w ciągu ostatnich lat badania pozwoliły określić jego rolę w procesach rozwoju, różnicowania i wzrostu komórek [1]. Bardzo istotnym wydarzeniem w dziedzinie biologii molekularnej było odkrycie w czterech niezależnych ośrodkach w roku 1996, że czynnik transkrypcyjny NFκB pod wpływem działania różnego rodzaju czynników takich jak m.in. promieniowanie UV, cytostatyki,

Dr n. farm., Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. 841-39-91, fax: 841-06-52, e-mail: b-gruber@il.waw.pl

czynnik nekrozy nowotworu, ulega aktywacji i w formie aktywnej może hamować procesy apoptotyczne w komórkach [1]. Zauważono też korelację między zjawiskiem hamowania aktywności NFκB a wzrostem wrażliwości nowotworów dotychczas opornych na terapię m.in. doksorubicyną i etopozydem [2-5]. Odkrycie to wzbudziło duże nadzieje naukowców na wyjaśnienie zjawiska oporności komórek nowotworowych oraz na zaprojektowanie terapii skojarzonej skutecznej w leczeniu nowotworów lekoopornych. Niniejsza praca przeglądowa stanowi próbę przybliżenia funkcji czynnika NFκB, pełnionej w organizmie, mechanizmów jego aktywacji i wpływu na procesy apoptotyczne, a także, co za tym idzie, wskazania kierunków wykorzystania NFκB w terapii przeciwnowotworowej.

II. Ogólna charakterystyka strukturalno-funkcjonalna

Czynnik transkrypcyjny NFκB został odkryty przez Sena i Baltimore'a w 1986 r. jako konstytutywny czynnik transkrypcyjny w dojrzałych limfocytach B, gdzie wiąże się z sekwencją promotora GGGGACTTCC, obecną w rejonie wzmacniającym (ang. *enhancer region*) pomiędzy genami J i C łańcucha lekkiego kappa immunoglobulin [1,6]. W komórkach ssaków występuje pięć różnych podjednostek NFκB, których wspólną cechą jest domena RHD znajdująca się w rejonie N-końcowym, składająca się z 300 aminokwasów, a odpowiedzialna za dimeryzację z sekwencją NLS, translokację czynnika, wiązanie z DNA i udział w transkrypcji ok. 300 genów [6,7].

Miejsca w DNA, z którymi specyficznie wiąże się aktywny czynnik NFκB określa się mianem miejsc "κB" [9]. Aktywne kompleksy NFκB są dimerami, zawierającymi różnorakie kombinacje polipeptydów z rodziny Rel: p50 (NF-κB1); p52 (NF-κB2); Rel A (p65), Rel B, c-Rel [1,7,8,10-13]. Białka z rodziny Rel wykazują zmienną stabilność i specyficzność w tworzeniu homo- lub heterodimerów. I tak, podjednostka Rel B nie jest zdolna do żadnych połączeń z c-Rel czy Rel A, a homodimery p50 bądź p65 są formami mniej stabilnymi.

Z uwagi na różnice w rejonie C-końcowym, białka Rel/NFκB można podzielić na dwie klasy. Do pierwszej zalicza się białka p50 i p52, które powstają w wyniku proteolizy nieaktywnych białek prekursorowych: p105 i p100. Do drugiej klasy zalicza się białka nie wymagające prekursorów: RelA (p65), Rel B i c-Rel, zawierające w rejonie C-końcowym niehomologiczną domenę TAD [6-8,13].

Nieaktywny kompleks NFκB pozostaje w cytoplazmie komórek, połączony z dodatkową podjednostką — inhibitorem. Inhibitorami są w tym przypadku białka z rodziny IκB (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ itd). Ich funkcją jest blokowanie translokacji aktywnego kompleksu NFκB do jądra [1,6,8,9,14,15]. Każde z tych białek zawiera trzy istotne funkcjonalnie regiony: domenę ARD, która odpowiada za interakcję podjednostki inhibitora z dimerem NFκB; domenę SRD, mieszczącą się w rejonie N-końcowym, zaangażowaną w proces fosforylacji i ubiquitynacji podjednostki inhibitorowej i wreszcie sekwencję PEST w rejonie C-końcowym, która wraz z sekwencją ARD stabilizuje kompleks NFκB/IκB [6,8]. Ostatnio wykryto kolejne białko z rodziny IκB — IκBζ, blokujące przemieszczenie białek NFκB z jądra do cytoplazmy [7]. Działanie podjednostek inhibitorowych IκB polega na stymulowaniu zmian konformacyjnych w podjednostkach RelA (p65), w wyniku których następuje przesłonięcie sekwencji NLS, odpowiedzialnej za translokację czynnika do jądra komórki. Interakcja inhibitorów z domeną RHD hamuje wiązanie NFκB z DNA [6]. Funkcję inhibitora może też pełnić duża cząsteczka prekursora p100 lub p105. Dzięki wielu powtórzeniom ankrynowym, prekursor p100 i p105 wpływają hamująco na translokację dimeru do jądra i jego wiązanie z DNA [6,15].

Ekspresja podjednostki IκBα może decydować o wzmożonej aktywności funkcjonalnie zróżnicowanych kompleksów NFκB. Zróżnicowane kompleksy, np. pozbawione podjednostki p65 mogą w określony sposób sprawować kontrolę nad wzrostem i procesami różnicowania w zależności od typu komórek i rodzaju stymulatora [16].

Spośród wielu możliwych połączeń podjednostek białkowych w kompleksy NFκB, najczęściej spotykany jest heterodimer: RelA (p65); NFκB1 (p105/p50), połączony z inhibitorem IκBα [7,9,13].

W ostatniej dekadzie bardzo poszerzył się stan wiedzy o odpowiedzi komórkowej na różnego rodzaju stymulatory zewnętrzne. Wykazano, że w dużej mierze prowadzą one do aktywacji czynnika NFκB [7]. Rodzaj czynników indukujących NFκB pozwolił stwierdzić, że odpowiedź komórki w postaci zaktywowania NFκB jest reakcją na stres i występuje zwykle przy poddawaniu komórki stymulacji apoptotycznej [7,12].

Wśród stymulatorów NFκB można wymienić: cytokiny, uwalniane w procesie zapalnym; lipopolisacharydy — produkowane w infekcjach wywołanych przez *Staphylococcus aureus*; hemaglutyninę, wytwarzaną przez wirusa grypy, substancje wytwarzane

przez wirusa HIV-1 [7,13]. Spośród czynników fizycznych, aktywujących NFκB wyróżnić można: promieniowanie UV, dym z papierosów, stres oksydacyjny. Do aktywatorów należą także związki takie jak: haloperydol, taksol, inhibitory topoizomeraz I i II, antymetabolity, winkrystyna, winblastyna, insulina itd. [7,12,13,18,19].

Sekwencja κB znajduje się w obrębie genów istotnych dla procesów odpowiedzi immunologicznej, proliferacji, apoptozy, procesów zapalnych. Są to geny kodujące: interferon β; białka adhezyjne; cytokiny; białka TRAF-1,2 (wiążące się z receptorem TNF); inhibitory białek apoptotycznych jak, c-IAP1, c-IAP2, X-IAP, IEX-1L; manganozależną dysmutazę ponadtlenkową. Ostatnio zidentyfikowano także geny kodujące białka antyapoptotyczne Bcl-xL i Bfl-1/A1 z rodziny białek Bcl-2 jako zależne od czynnika transkrypcyjnego NFκB [1, 6, 7, 10, 11, 13, 19].

Pula genów aktywowanych przez NFκB zmienia się w zależności od składu zaktywowanego kompleksu czynnika. Mogą bowiem występować subtelne różnice w swoistości względem wiązanej sekwencji DNA. Możliwe jest, że różne podjednostki NFκB wykazują niski stopień homologii domen transaktywujących [6].

III. Mechanizmy aktywacji NFκB

Mechanizm aktywowania kompleksu NFκB zależy od rodzaju stymulatora, a także od rodzaju komórki, poddawanej działaniu czynnika stresującego [7]. Jednym z bardzo silnych stymulatorów NFκB jest TNF [3,7,12].

Związanie liganda z receptorem TNF R uruchamia kaskadę reakcji z udziałem białek TRADD, TRAF-2, RIP [3,20]. To ostatnie z białek współdziałając z kinazą MEKK3 odgrywa rolę w fosforylacji i jednoczesnej aktywacji kompleksu kinazy IκBα (IKK) [1,7,10]. IKK to seryno-specyficzny kompleks katalityczny, składający się z trzech polipeptydów. Dwa z nich, IKKα (IKK-1) i IKKβ (IKK-2) stanowią podjednostki katalityczne, podczas gdy trzeci, dimer lub trimer IKKγ (inaczej NEMO lub IKKAP-1) jest regulatorem. IKKα i IKKβ tworzą dimery połączone suwakiem leucynowym i razem z NIK są elementami makromolekularnego kompleksu enzymatycznego. Nieaktywny kompleks IKK nie jest ufosforylowany. Dopiero pod wpływem stymulatora, np. TNF, następuje aktywacja szeregu kinaz za pośrednictwem podjednostki NEMO i fosforylacja IKKβ, a następnie pozostałej części kompleksu (IKKα lub IKKβ, jeśli jest to homodimer).

Tak zaktywowany kompleks zdolny jest do fosforylacji IκBα [6,8,19]. Orange i Geha [21] podają, że podjednostka IKKα wykazuje także, niezależną od kompleksu IKK, zdolność do indukowania przekształcania prekursora – białka p100 w aktywne białko p52, wchodzące w skład aktywnego kompleksu NFκB.

W ostatnim czasie pojawiły się prace opisujące nową funkcję regulatorową IKKα-podjednostki kompleksu IKK. Zaobserwowano, że IKKα pod wpływem cytokin, jak TNF czy IL-6, ulega kumulacji w jądrze i bierze udział w procesie fosforylacji Ser 10 w histonie H₃, znajdującym się na odcinku promotorowym w genie *IκBα*. W ten sposób IKKα może oddziaływać na strukturę chromatyny i wpływać na odsłanianie sekwencji κB w genie *IκBα*, pośrednicząc w resyntezie białka IκBα. Potwierdzeniem takiej funkcji IKKα są wyniki, uzyskane przez Anesta i wsp.[22]. Autorzy wykazali, że w płodowych fibroblastach (MEFs) myszy pozbawionych genu IKKα, resynteza białka IκBα była opóźniona w stosunku do resyntezy w komórkach zawierających ten gen. Ci sami autorzy wykazali, że IKKα jest zdolny do bezpośredniej fosforylacji histonu H₃ *in vitro*.

Kompleks IKK fosforyluje białko IκBα (wchodzące w skład struktury NFκB) w pozycjach Ser 32 i Ser 36 [8,16]. Ufosforylowanie dwóch reszt serynowych w N-końcowym fragmencie cząsteczki IκB prowadzi do ubikwitynacji reszt Lys 21 i Lys 22 i w konsekwencji do degradacji białka przy udziale proteasomu 26S, co w efekcie końcowym powoduje przemieszczenie aktywnego dimeru p50/p65 do jądra, gdzie wiąże się on z sekwencją 5'-GGGA CTTTC-3' [1,6,7,10,13]. Aktywacja NFκB wymaga całkowitego rozpadu podjednostki IκBα [23]. W aktywację kompleksu IKK mogą być także włączone inne kinazy z grupy MAPKKK, a wśród nich kinazy MEKK1-3 i NIK, indukujące jedną z kinaz MAPKKK-ERK1/2 [8,24]. Wykazano też udział kinazy C, Akt, IKKi oraz NAK [6].

Ta różnorodność białek o aktywności kinazowej w szlaku sygnałowym, aktywującym NFκB, daje przynajmniej częściową odpowiedź na pytanie, dlaczego tak wiele mechanizmów może prowadzić do stymulacji tego czynnika transkrypcyjnego. Dokładny udział każdego ze szlaków nie jest poznany i może ulegać zmianie w zależności od warunków eksperymentu i stanu fizjologicznego komórki [6].

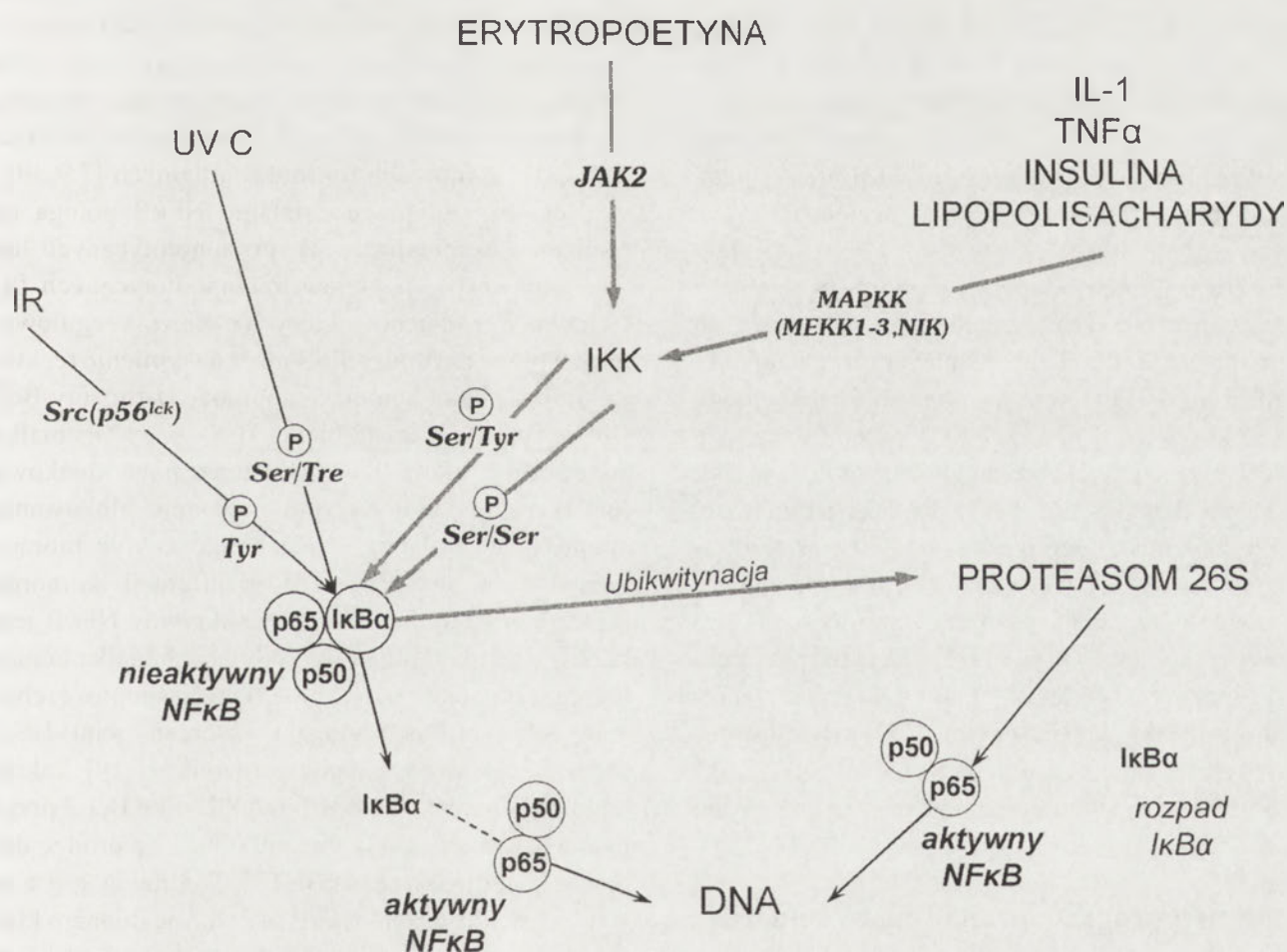
Intensywne badania ostatnich lat wykazały, że procesy aktywacji NFκB wymagają udziału około 20 różnych kinaz białkowych, tworzących pod wpływem aktywatora kaskadę reakcji, pro-

wadzących do fosforylacji kompleksu IKK (Ryc. 1). Poszczególne etapy tej drogi dotąd stanowią cel poszukiwań naukowców. Uważa się, że stymulacja komórek czynnikami takimi jak: interleukina 1, lipopolisacharydy czy insulina aktywuje kinazy z rodziny MAPK. Aktywacja mitogenem uruchamia fosforylację z udziałem kinazy rybosomalnej S6 (p90^{rsk1}) [25]. Rodzaj kinaz, istotnych dla aktywacji NFκB zależy nie tylko od stymulatora, ale także od rodzaju komórek [7].

Mechanizm aktywacji może być różny w zależności od rodzaju czynnika stymulującego NFκB. Zaobserwowano np., że pod wpływem promieniowania X lub stresu oksydacyjnego aktywacja NFκB nie wymaga rozpadu podjednostki IκBα, ale zachodzi z udziałem procesu fosforylacji tyrozyny w pozycji

42. Mechanizm ten nie jest do końca wyjaśniony. Ostatnio wykazano, że erytropoetyna aktywuje NFκB przy udziale kinazy JAK2 i kompleksu IKK przez fosforylację reszt tyrozynowych i serynowych jednocześnie [7]. Z kolei, aktywacja czynnika NFκB pod wpływem promieniowania UV C (254nm) wymaga fosforylacji reszt serynowo-treoninowych [8]. W obu przypadkach procesy fosforylacji poprzedzają proteolizę podjednostki IκBα [7,8].

Przypuszcza się, że istnieją przynajmniej dwie alternatywne drogi aktywacji NFκB. Pierwsza ma miejsce z udziałem kinaz IKK-α (lub IKK-1) i IKKβ (lub IKK-2), które są odpowiedzialne za fosforylację dwóch reszt serynowych. Ufosforylowane formy tworzą z ubikwityną kompleksy, które następnie ulegają degradacji proteasomalnej z udziałem proteaso-



Ryc. 1. Mechanizmy prowadzące do aktywacji NFκB w komórkach, zróżnicowane w zależności od czynnika indukującego. Na rysunku zaznaczono dwa rodzaje aktywacji NFκB: z udziałem kompleksu kinaz IKK i procesów ubikwitynacji i degradacji proteasomalnej podjednostki IκBα (jasne strzałki) oraz aktywację zachodzącą niezależnie od IKK i nie wymagającą degradacji IκBα (ciemne strzałki). Pierwszy z przedstawionych rodzajów aktywacji ma miejsce w przypadku stymulacji komórek lipopolisacharydami, IL-1, TNFα, insuliną, erytropoetyną. Aktywowaniu ulegają wówczas kinazy z rodziny MAPKK (MEKK-1,3; NIK) lub JAK-2 w przypadku stymulacji erytropoetyną. Pod ich wpływem ufosforylowaniu ulega kompleks IKK. Aktywny kompleks IKK jest zdolny do fosforylacji reszt serynowo-treoninowych w podjednostce IκBα w przypadku stymulacji erytropoetyną lub serynowo-serynowych w przypadku stymulacji IL-1, TNFα, insuliną, lipopolisacharydami. Fosforylacja poprzedza proces ubikwitynacji i degradacji IκBα z udziałem proteasomu 26S prowadząc do aktywacji NFκB. Szlaki aktywacji NFκB, niezależne od kompleksu IKK i proteasomu 26S, mają miejsce w komórkach stymulowanych promieniowaniem IR bądź UV C. Pod wpływem tych czynników zachodzi fosforylacja niezależna od IKK, w resztach tyrozynowych IκBα za pośrednictwem kinazy z rodziny Src w resztach serynowo-treoninowych, odpowiednio. Fosforylacja poprzedza proces oddysocjowania IκBα od reszty kompleksu NFκB i tym samym, aktywacji tego czynnika bez potrzeby degradacji IκBα. Objasnienia symboli w wykazie skrótów.

mu 26S. Kompleks ten składa się z proteasomu 20S (700 kDa) i zasocjowanych na jego końcach dwóch kompleksów regulatorowych 19S. Te z kolei zawierają ok. 15-20 różnych podjednostek, mają aktywności ATP-azowe, izopeptydazowe oraz wiążą ubikwitynę. Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do białka substratowego jest głównym sygnałem do proteolizy. Proteasom 20S zawiera ok. 14 różnych podjednostek typu α lub β (zależnie od podobieństwa sekwencji). Katalityczna aktywność proteasomu ograniczona jest do podjednostek β [25,26].

Druga droga aktywacji NF κ B prowadzi przez fosforylację niezależną od kompleksu IKK [25]. Takim szlakiem aktywacji NF κ B, niezależnym od kompleksu IKK, jest wspomniana stymulacja fosforylacji I κ B α przez promieniowanie UV C w resztach serynowo-treoninowych, znajdujących się w obrębie domeny PEST w C-końcu podjednostki I κ B α między 277 a 287 aminokwasem [8]. Promieniowanie IR aktywuje NF κ B m.in. poprzez fosforylację reszt tyrozynowych w cząsteczce I κ B α z udziałem kinaz z rodziny Src. Ten sposób aktywacji NF κ B nie wymaga rozpadu białka I κ B α z udziałem proteasomu 26S [25].

Struktury NF κ B, odpowiedzialne za wiązanie z DNA, są obecne także w genach białek p50 i I κ B α , co stanowi o istnieniu mechanizmu autoregulacji aktywności omawianego czynnika transkrypcyjnego [10]. Zaktywowany dimer NF κ B przemieszcza się do jądra przyczyniając się do zwiększenia ekspresji m.in. także genu kodującego I κ B α i, co za tym idzie, szybkiej resyntezy tego białka. Tak więc, w rezultacie aktywność NF κ B jest zależna od stanu równowagi między degradacją i resyntezą inhibitora I κ B, co stanowi o regulacji aktywności NF κ B na poziomie transkrypcyjnym [10,16,27]. Głównym jednak punktem kontroli aktywności czynnika NF κ B jest cytoplazmatyczna retencja dimeru RelA (p65); NF κ B1 (p105/p50), zapewniana przez białko I κ B α [10,16,25,28].

IV. NF κ B a programowana śmierć komórki

IV-1. Antyapoptotyczna aktywność NF κ B

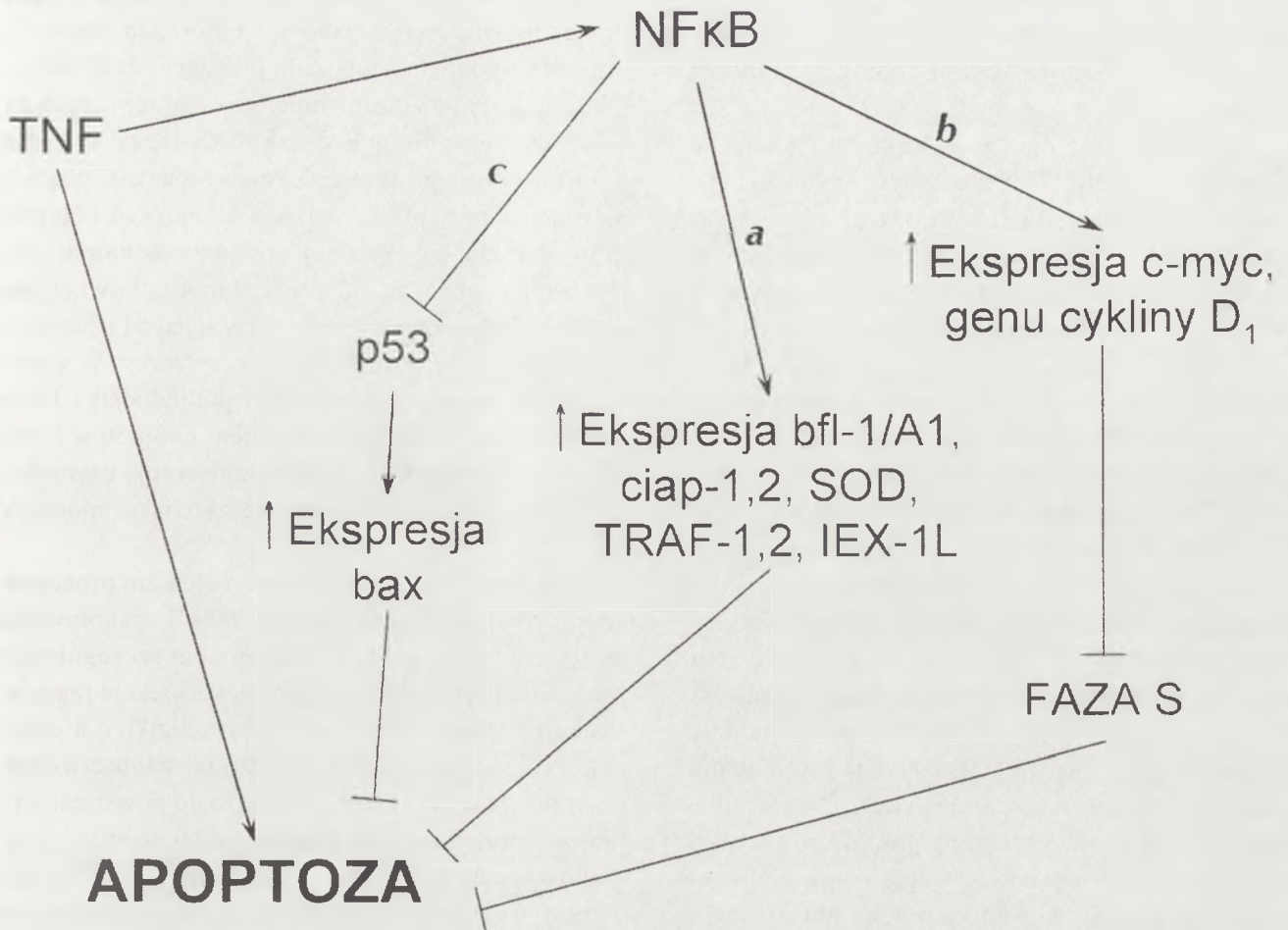
W przypadku stymulowania procesów apoptotycznych w organizmie mamy do czynienia z efektem "akcja-reakcja". I tak, TNF jest jednym z głównych czynników apoptogennych. Jednocześnie jednak uruchamia procesy obronne organizmu, stając się o hamowaniu zjawiska apoptozy. Taką drogą jest właśnie aktywacja czynnika NF κ B [5,12,16,25,29]. Dowodem na hamujące apoptozę

działanie NF κ B jest eksperyment, w którym stwierdzono, że poddawanie działaniu TNF mysich fibroblastów i makrofagów, pozbawionych białka Rel A (jedna z podjednostek kompleksu NF κ B) powodowało znaczny wzrost apoptozy, podczas gdy komórki z nadekspresją RelA wykazywały oporność na apoptogenne działanie TNF [3].

W 1996 roku ukazały się doniesienia z czterech niezależnych ośrodków, wskazujące na zależność między występowaniem zjawiska apoptozy a aktywnością NF κ B. Wykazano, że aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego zapewnia komórkom przeżycie, natomiast blokada NF κ B uwrażliwia komórki na apoptozę, stymulowaną cytokinami z rodziny TNF, czy IL i chemioterapeutykami [1,29-34].

Antyapoptotyczne działanie NF κ B wykazano w wielu różnych typach komórek, w tym w komórkach ludzkiego raka piersi, fibroblastach, makrofagach, komórkach śródbłonna, komórkach ludzkiego raka jajnika, raka macicy, liniach komórek raka trzustki, kardiomiocytach, a także w zainfekowanych wirusem EBV komórkach limfoblastoidalnych [7,9,30].

Blokujące apoptozę działanie NF κ B polega na obniżeniu ekspresji genów proapoptotycznych lub nasileniu ekspresji genów antyapoptotycznych [9] (Ryc.2). Wśród genów, których ekspresja regulowana jest przez czynnik NF κ B można wymienić te, które kodują białka hamujące apoptozę, z rodziny Bcl: Bcl-2, Bcl-xL, a także białka IEX-1L, IAP; białka adaptorowe: TRAF-1, -2; dysmutazę ponadtlenkową (nadekspresja tego enzymu powoduje blokowanie apoptozy wywołanej TNF); białko c-Myc biorące udział m.in. w procesach proliferacji komórek [1,3,9,11,14,16]. Wykazano, że aktywny NF κ B jest zdolny do indukcji genów, kodujących białka homologiczne do białek Bcl-2, blokujących apoptozę, chociaż bezpośrednia regulacja ekspresji genu *bcl-2* przez NF κ B nie została potwierdzona [11,14]. Takim homologiem jest białko Bfl-1/A1. Białku Bcl-2 przypisuje się rolę w aktywowaniu NF κ B na drodze degradacji podjednostki I κ B α [3]. Według Aggarwal [3], aktywację NF κ B określa się mianem klucza do antyapoptotycznych funkcji, które badano w dojrzałych limfocytach B. Aktywacja NF κ B w tych komórkach zapewniała także wpływ czynnika na ekspresję genu, kodującego inne białko antyapoptotyczne — Bfl-1, co w efekcie chroniło dojrzałe limfocyty B przed apoptozą, indukowaną antygenem. Limfoblastoidalne komórki HuT-78, wykazujące konstytutywną nadekspresję NF κ B, charakteryzowały się podwyższonym poziomem białka Bcl-xL i w konsekwencji okazały się odporne na działanie czynników stymulujących apoptozę takich jak an-



Ryc. 2. Regulacja ekspresji genów pro- i antyapoptotycznych przez NFκB prowadząca do zablokowania apoptozy stymulowanej w komórkach przez TNF. Jak pokazano na rysunku, działanie NFκB (aktywowanego przez TNF) blokujące apoptozę polega na: nasileniu ekspresji genów antyapoptotycznych (a); ekspresji genów związanych z przebiegiem cyklu komórkowego jak gen cykliny D₁, a co za tym idzie, na zahamowaniu apoptozy pośrednio, przez zablokowanie cyklu komórkowego w fazie S (b); nasileniu ekspresji genów antyapoptotycznych jak *bax* pośrednio, przez hamujący wpływ na ekspresję genu *p53* blokującego transaktywację genu *bax* (c). SOD – dysmutaza nadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*); pozostałe objaśnienia symboli w wykazie skrótów.

ti-FAS; TNFα. Te same stymulatory w komórkach Jurkat z nieaktywnym czynnikiem NFκB indukowały apoptozę i nie wpływały na poziom białka Bcl-xL [9].

Rodzina genów *iap*, związana jest funkcjonalnie z ochroną komórek przed apoptozą, stymulowaną różnego rodzaju czynnikami [9]. Wspomniane geny *iap* ulegają silnej aktywacji w trakcie oddziaływania cytokin stanu zapalnego na komórki śródbłonna. Skutkiem wzmożonej ekspresji genów *iap* jest też aktywacja czynnika NFκB.

Białka IAP zawierają w N-końcu specyficzne domeny tzw. BIR (*baculovirus IAP repeats*), biorące udział w interakcjach IAP z innymi białkami i stanowiące o inhibitorowej funkcji IAP. Dokładny mechanizm hamowania apoptozy przez IAP nie został poznany. Przypuszcza się, że białka IAP wiążą się z cytoplazmatycznym fragmentem receptora TNF-R₁ za pośrednictwem białka adaptorowego TRADD oraz czynnika TRAF-2. Wiązać się też mogą (jak np. białka cIAP-1 i cIAP-2) z receptorem TNF-R₂ przy

udziale czynników TRAF-1 i TRAF-2. W ten sposób zapobiegają pośrednio aktywacji białek efektorowych — kaspaz. Wykazano, że podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu białek cIAP, występujące w wyniku działania na komórki Jurkat cytokiny TNF-α, jest niezbędne do proteolitycznej degradacji podjednostki IκBα [35,36].

Antyapoptotyczne działanie NFκB warunkowane jest podwyższonym poziomem cIAP-1 i cIAP-2 oraz TRAF-1 i TRAF-2. Polega zaś na hamowaniu uwalniania z mitochondriów cytochromu C i hamowaniu aktywności kaspaz prawdopodobnie z udziałem białek cIAP. Z kolei, jak wykazano, NFκB stymuluje ekspresję genów kodujących czynniki TRAF-1 i TRAF-2 oraz białka cIAP-1 i cIAP-2 w ludzkich limfocytach linii Jurkat i komórkach fibrosarkomy [35,36]. B o u r s i wsp. [14] zaobserwowali, że NFκB wpływał na transaktywację rejonu promotorowego genu antyapoptotycznego *bax* na drodze hamowania transaktywacji tego genu przez białko p53, nie wpływał natomiast na rejon promotorowy genów

p53 czy *p21*. Autorzy wskazują na fakt, że antagonizm funkcjonalny między NFκB i *p53* wiąże się z wybiórczym oddziaływaniem na rejony promotorowe genów.

Antyapoptotyczne działanie NFκB może wiązać się również z nasileniem przez ten czynnik transkrypcji genów *c-myc* lub *cykliny D₁* [3,14,16]. Nadekspresja cykliny *D₁* prowadzi m.in. do zahamowania cyklu komórkowego w fazie S i zablokowania apoptozy [16]. Podkreślenia wymaga fakt, że NFκB blokuje apoptozę stymulowaną przez czynniki, które go aktywują [3]. Często aktywacja czynnika NFκB nie zachodzi na tej samej drodze, co stymulacja apoptozy, a bywa że jest od niej niezależna [9,12,17,20]. Na przykład, indukcja apoptozy wywołana przez TNF, uruchamia szlak sygnalizacyjny z udziałem białek adaptorowych jak FADD, które wiążą się z tzw. domenami śmierci w białkach efektorowych, co w efekcie prowadzi do aktywacji kaspaz, nukleaz i zniszczenia materiału genetycznego komórki [12,17,30]. Proces aktywacji NFκB może zachodzić na drodze niezależnej od białka FADD i uruchamia inne cząstki adaptorowe jak TRADD, a następnie TRAF-2, która aktywuje kinazę NIK [6,9,12,17,20]. Zarówno białko NIK jak RIP, wiążące się z białkiem TRADD, mogą aktywować kompleks kinazy IκBα (IKK), prowadząc do degradacji podjednostki inhibitorowej NFκB — IκBα i tym samym, aktywacji czynnika NFκB [9]. Aktywacja NFκB zachodzić może także poprzez uruchomienie apoptotycznej kaskady przez ligandy DIL jak CD-95-L i TRAIL, należące do rodziny TNF [12,20]. Oya i wsp. [37] wykazali, że komórki raka nerki, odporne na apoptozę, zachodzącą z udziałem receptora TRAIL, charakteryzowały się konstytutywną nadekspresją NFκB.

Jak podają Shishodia i Aggarwal [9], jednym z mechanizmów działania antyapoptotycznego NFκB jest również znoszenie aktywności kinazy *c-jun* (JNK) przez omawiany czynnik.

W zwiększoną przeżywalność komórek włączony może być też szlak, związany z grupą kinaz Ras/fosfatydylinozytol-3-kinaza/Akt, odpowiedzialnych za aktywację kompleksu IKK i fosforylację IκBα [3].

Postępujący proces śmierci komórki blokuje aktywność czynnika NFκB, podczas gdy aktywacja czynnika NFκB blokuje procesy apoptozy. Na przykładzie komórek śródbłonna, ulegających apoptozie na skutek braku czynników wzrostu, wykazano, że komórki żywe charakteryzowały się podwyższoną aktywnością NFκB, a w komórkach apoptotycznych stwierdzono kaspazozależną destrukcję podjednostki RelA (*p65*). Utrata domeny transaktywującej w cząsteczce *p65* powodowała jej unieczyn-

nienie i tym samym, uwrażliwienie komórek na apoptozę. Jak zaobserwowano w komórkach Jurkat T, proteoliza podjednostek *p50* i *p65* zachodziła w wyniku procesów uruchamianych przez ligandy związane z receptorem FAS jak, FAS-L czy TNF. Na tej drodze następowała indukcja kaspazy-3, pośredniczącej w proteolizie. Rozpad kompleksu *p50/p65* prowadził do zwiększonej apoptozy komórek [9]. Wykazano także, że apoptoza zapoczątkowuje destrukcję podjednostki IκBα, polegającą na usuwaniu końcowych grup aminowych w cząsteczce. W wyniku takich zmian strukturalnych podjednostka IκBα zostaje trwale związana z dimerem *p65/p50* w kompleksie NFκB uniemożliwiając aktywację czynnika. W efekcie występuje nasilenie zjawiska apoptozy [9].

Odwrotną korelację między nasileniem procesów apoptotycznych a aktywacją NFκB zanotowano ostatnio z jednoczesnym wykazaniem szczególnego znaczenia białka IKKγ (NEMO) w aspekcie jego interakcji z genem *CYLD* kodującym białko o nieznannej, do niedawna, funkcji [38-40]. Jak zaobserwowano, mutacje w tym genie prowadzą do powstania cylindromatozy (gruczolakorak obłakowaty). Prawidłowy gen *CYLD* jest supresorem nowotworowym. Brummelkamp i wsp. [39] wykazali, że następstwem zablokowania transkrypcji genu *CYLD* była aktywacja NFκB i rozwój cylindromatozy, co wskazuje na zahamowanie procesów apoptotycznych.

Prawidłowe białko *CYLD* jest enzymem pośredniczącym w reakcjach deubikwitynacji i hamuje proces aktywacji NFκB, zachodzący na drodze aktywacji receptorów z rodziny TNF-R jak, CD40, XEDAR, EDAR [38]. Zahamowanie aktywacji NFκB przez białko *CYLD* jest m.in. skutkiem deubikwitynacji białka TRAF-2 (czynnika wiążącego się z receptorem TNF-R) i w mniejszym stopniu białka TRAF-6 [35,38]. Jak stwierdzono, w strukturze białka *CYLD* znajduje się sekwencja aminokwasowa, biorąca udział w wiązaniu z białkiem IKKγ. Połączenie obu białek warunkuje proces wspomnianej deubikwitynacji TRAF. Pozbawione łańcucha poliubikwitynowego białka nie mogą uczestniczyć w procesach fosforylacji kompleksu IKK. W następstwie, nie zachodzi fosforylacja i ubikwitynacja IκBα i nie zostaje zaktywowany czynnik NFκB. Jak dotąd, nie stwierdzono wiązania białka *CYLD* z żadną inną podjednostką IKK oprócz IKKγ [38].

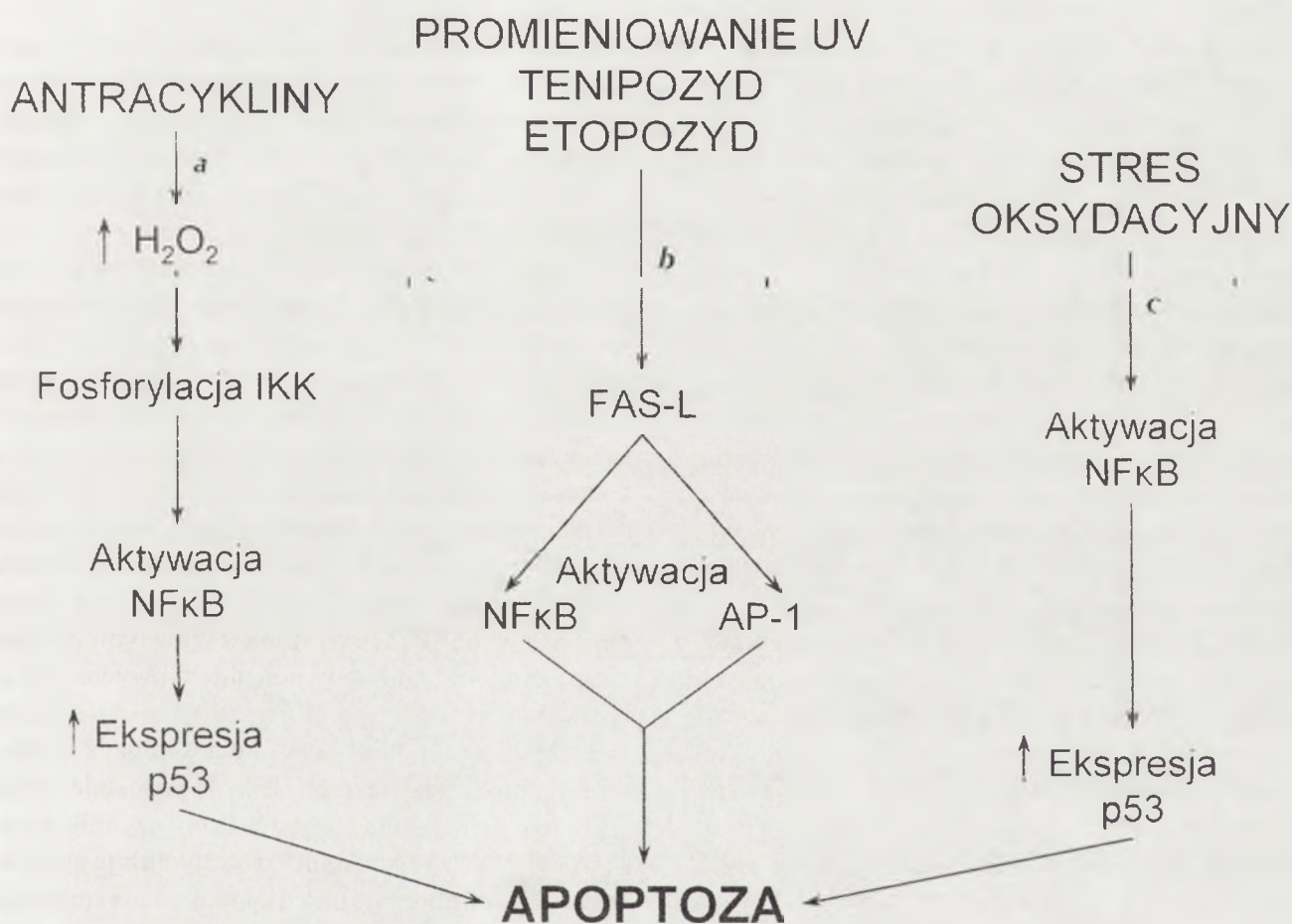
IV-2. Proapoptotyczna aktywność NFκB

W zdrowych komórkach istnieje równowaga w zachodzeniu procesów, decydujących o przeżyciu lub śmierci. Zależnie od rodzaju sygnału z zewnątrz, komórki wyzwalają mechanizmy w konsekwencji pro — lub antyapoptotyczne. Nie zaskakuje zatem fakt stwierdzenia roli czynnika NFκB także jako induktora apoptozy (Ryc.3).

W wyniku stresu oksydacyjnego, w ludzkich ko-

Bo r s [14], w rejonie promotorowym ludzkiego i mysiego genu *p53* wykryto sekwencje specyficzne dla NFκB.

Według W e b s t e r a [15], mechanizmy regulacyjne procesów proliferacji i apoptozy zależą m.in. od wzajemnych relacji funkcjonalnych białka NFκB i białka *p53*. Q i n i w s p . [42], badając wpływ NFκB na apoptozę zachodzącą na drodze aktywacji receptora NMDA (N-metylo-D-aspartanian) w prążkowie szczura, podawali zwierzętom agonistę receptora



Ryc. 3. Mechanizmy prowadzące do apoptozy z udziałem NFκB, zróżnicowane w zależności od czynnika stymulującego komórki. Jak pokazano na rysunku, w przypadku stymulacji H_2O_2 (generowanego przez antracykliny), aktywacja NFκB i apoptoza następują poprzez fosforylację kompleksu IKK, który następnie pośredniczy w aktywacji NFκB. Aktywny NFκB powoduje wzmożenie ekspresji genu *p53*, co prowadzi do apoptozy komórek (a); stymulacja promieniowaniem UV bądź chemioterapeutykami jak etopozyd, tenipozyd wywołuje apoptozę poprzez etap jednoczesnej aktywacji czynników NFκB i AP-1 przy udziale ligandu FAS-L (b); stres oksydacyjny wywołuje w komórkach apoptozę na drodze aktywacji NFκB, która prowadzi m.in. do zwiększonej aktywności białka *p53* (c). Objaśnienia symboli w wykazie skrótów.

mórkach śródbłonna aortalnego wykazano zahamowanie aktywności białka Bcl-2, translokację białka Bax i zwiększoną aktywność białka *p53*, następującą po aktywacji NFκB. Zjawiska te prowadziły do nasilenia procesów apoptotycznych [9,14]. Pomimo stwierdzonej antyapoptotycznej roli NFκB, która wiąże się m.in. z antagonistyczną relacją NFκB — *p53*, istnieją dowody potwierdzające znaczenie czynnika NFκB jako regulatora ekspresji genu *p53* oraz faktu, że NFκB jest wręcz niezbędny, aby zaszła apoptoza zależna od *p53* [14,16,41]. Jak podaje

NMDA — kwas chinolinowy. Obserwowali wówczas zależną od czasu translokację NFκB do jądra z równoczesnym wzrostem poziomów mRNA c-Myc i *p53*. Podobny efekt zanotowali H e l l i n i w s p . [35] w komórkach raka okrężnicy HCT116, poddawanych działaniu daunomycyny. Autorzy wykazali, że aktywacja transkrypcyjna genu *p53* zachodziła na skutek wiązania podjednostek *p50/p65* czynnika NFκB z częścią promotorową genu. D u m o n t i w s p . [18] indukowali apoptozę nadtlaniem wodoru

(H₂O₂) w limfocytach T. H₂O₂ powodował aktywację czynnika NFκB, rozszczepienie i aktywację kaspazy-3 (jednego z białek efektorowych w procesie apoptozy). Na skutek obniżenia potencjału transbłonowego, H₂O₂ przyczyniał się także do uwolnienia z mitochondriów cytochromu C (Apaf-2)-czynnika apoptogennego. W komórkach zaobserwowano pozytywną korelację między wzmożoną aktywacją NFκB i zwiększoną ekspresją genu p53.

Proapoptotyczne działanie NFκB potwierdziły badania, w których wykazano pozytywną korelację między zahamowaniem przez TNF wzrostu limfocytów CD34⁺ a aktywacją NFκB [9]. Zauważono także, że aktywacja NFκB prowadząca do apoptozy, nie musi wiązać się ze stymulacją czynnikiem TNF [9]. K a s i b h a t l a i wsp. [44] wykazali, że apoptoza stymulowana w limfocytach T związkami takimi jak etopozyd, tenipozyd, czy promieniowaniem UV zachodziła na drodze aktywacji ligandu FAS-L [20] z jednoczesną aktywacją czynników transkrypcyjnych NFκB i AP-1. Potwierdzeniem dla propoptotycznej roli NFκB jest też obserwacja odnośnie apoptozy indukowanej w komórkach ludzkiego czerniaka przez promieniowanie UV. Otóż, obniżona aktywność NFκB i receptora FAS stanowiły o zahamowaniu szkodliwych dla komórek procesów apoptotycznych, wywoływanych promieniami UV [9].

Aktywacja NFκB poprzedzała apoptozę w komórkach ludzkiego śródbłonna aortalnego, poddanych stresowi oksydacyjnemu [9]. Również apoptoza stymulowana w komórkach białaczki HL60 chemioterapeutykami takimi jak etopozyd czy 1-β-D-arabino-furanozylocytozyna wymagała aktywacji NFκB. Wykazano, że supresja NFκB spowodowana przez ditiokarbaminian pyrolidyny (PDTC) blokowała apoptozę, indukowaną wspomnianymi związkami [45]. W komórkach T Jurkat aktywacja receptora FAS stymulowała za pośrednictwem kaspazy-3, proteolizę podjednostek p50 i p65 czynnika NFκB, uwrażliwiając tym samym komórki na apoptozę [9].

Zdecydowanym potwierdzeniem roli NFκB jako czynnika proapoptotycznego był eksperyment wykonany przez B e s s h o i wsp. [45] z użyciem tymocytów i komórek białaczkowych HL60. W badanych komórkach, poddawanych działaniu etopozydu, dek-sametazonu lub 1β-D-arabino-furanozylocytozyny obserwowano zjawisko apoptozy, poprzedzone aktywacją NFκB. Potwierdzeniem tej zależności było zahamowanie apoptozy przez inhibitor NFκB-PDTC.

Jednym z proponowanych mechanizmów aktywacji apoptozy przez NFκB jest wpływ tego czynnika m.in. na obniżenie aktywności białek antyapopto-

tycznych czy wpływ na przebieg cyklu komórkowego [7,31]. Rezultaty badań W a n g a i wsp. [46] wskazują na znaczącą rolę wewnątrzkomórkowego poziomu H₂O₂ w aktywacji NFκB. Ostatnio wykazano, że H₂O₂ wpływa na fosforylację podjednostki IKKα kompleksu IKK pośrednicząc w ten sposób w procesie degradacji podjednostki inhibitorowej IκBα i aktywacji NFκB [46]. Należy podkreślić, że indukcyjny wpływ reaktywnych postaci tlenu na aktywność NFκB zależy od miejsca ich powstawania w komórce i równoczesnego poziomu związków i enzymów przeciwutleniających [46].

Obiektem zainteresowania naukowców w ostatnim czasie stały się związki antracyklinowe w związku ze stwierdzeniem pozytywnej korelacji między aktywacją NFκB a nasileniem zjawiska apoptozy [46, A s h i k a w a niepubl., G r u b e r niepubl.].

Jednym z mechanizmów cytotoksycznego oddziaływania związków antracyklinowych na komórki nowotworowe jest generowanie reaktywnych postaci tlenu czyli bezpośrednio powstającego anionu nadadtlenkowego, H₂O₂ i rodnika hydroksylowego. Jak wykazał W a n g i wsp. [46], wstępna ekspozycja komórek śródbłonna i kardiomiocytów na FeTBAP — metaloporfirynę o właściwościach enzymu przeciwutleniającego, w istotnym stopniu powodowała obniżenie aktywności NFκB, indukowanej przez doksorubicynę. FeTBAP jest efektywnym zmiataczem zarówno anionów nadadtlenkowych, jak i H₂O₂.

Podwójna rola NFκB jako induktora bądź inhibitora apoptozy jest faktem. Jednak pozostaje mnóstwo pytań m.in. dlaczego ten sam czynnik transkrypcyjny w jednych komórkach stymuluje apoptozę, a w innych chroni je przed apoptotyczną śmiercią. L i n i wsp. [47] wykazali, że pro-lub antyapoptotyczne działanie NFκB zależy od proporcji między czasem działania danego czynnika stresogennego a czasem, w jakim zachodzi regulacja aktywności NFκB. Należy też wskazać na fakt, że NFκB jest jednym z wielu czynników transkrypcyjnych. Stąd, w określonych przypadkach, sam może być niewystarczający do regulacji apoptozy [9].

Dane literaturowe świadczą o ogromnym zróżnicowaniu mechanizmów apoptotycznych, zarówno w zależności od rodzaju induktora, jak i typu komórek [9]. Chociaż, jak twierdzą K u h n e l i wsp. [48], rola NFκB zależy bardziej od właściwości czynników indukujących śmierć komórek niż od ich rodzaju. Na przykład, w przypadku indukowania apoptozy przez H₂O₂ czy antracykliny zasadnicza rola w stymulacji NFκB przypisywana jest reaktywnym postaciom tle-

nu, wspólnemu produktowi przemian wspomnianych związków.

V. Znaczenie białek grupy Rel / NFκB dla organizmu

Niewłaściwa regulacja transkrypcji za pośrednictwem czynnika NFκB wiąże się ze stanami patologicznymi takimi jak ostre reakcje zapalne, szoki septyczne, nasilona replikacja wirusów, nowotwory, jak również patologię układu nerwowego [28]. W mózgach pacjentów obciążonych schorzeniami neurologicznymi wykryto podwyższony poziom białek NFκB. Pierwsze doniesienie, w 1995 roku, dotyczyło pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera. Immunohistochemiczna analiza fragmentów mózgu pozwoliła stwierdzić aktywację podjednostki p65 kompleksu NFκB tylko w rejonach objętych zmianami chorobowymi [28]. Jądrową translokację czynnika transkrypcyjnego NFκB wykazano też w 70-krotnie wyższej liczbie neuronów pacjentów z chorobą Parkinsona w porównaniu z kontrolą (zdrowi pacjenci) [28].

Omawianemu czynnikowi przypisuje się też rolę regulatora ekspresji genów wirusowych [25,28]. Okazało się, że obecne w wirusach HIV-1 białko powierzchniowe gp 120 nasila aktywację NFκB na drodze zwiększonej produkcji reaktywnych postaci tlenu takich jak H₂O₂ oraz za pośrednictwem kinazy tyrozynowej p56^{lck} [25]. Zaktywowany czynnik NFκB odgrywa rolę w replikacji wirusa HIV-1 [28].

Doświadczenia, przeprowadzone na myszach pozbawionych określonych genów, kodujących białka z grupy Rel/NFκB, wykazały istotne znaczenie czynnika transkrypcyjnego NFκB dla organizmu. Stwierdzono ścisłą zależność między delecją poszczególnych genów tej grupy a zaburzeniami prawidłowego funkcjonowania narządów i układów [7]. Okazało się m.in. że myszy pozbawione genu *p50* były bardziej podatne na infekcje, wywołane *Listeria monocytogenes* i *Streptococcus pneumoniae*. Wiąże się to z faktem, że białka p105/p50 mają istotne znaczenie dla przeżywalności nie — aktywowanych limfocytów B [7].

Stwierdzono, że p50 i p52 są białkami wysoce konserwatywnymi i myszy pozbawione jednego z genów kodujących te białka rozwijają się prawidłowo, w odróżnieniu od mutantów, które pozbawione obu genów, wykazywały defekt w różnicowaniu się osteoklastów, prowadzący do upośledzenia układu kostnego i osteoporozy [6]. Delecja genu *rel A* powodowała śmierć mysich płodów na skutek apoptozy płodowych komórek wątrobowych i granulocytów [7,15], co wskazuje na wpływ genu *rel A* na przeżywalność komórek. Gen ten okazał się też istotny dla proliferacji limfocytów [7]. Myszy pozbawione genu *c-rel* rozwijały się normalnie, jednak nie miały limfocytów T i B [7]. Z kolei limfocyty B pozbawione genu *c-rel* nie były zdolne do podziałów komórkowych w odpowiedzi na czynnik immunostymulujący, ze względu na zablokowanie fazy G₁ cyklu komórkowego i zaburzenia w regulacji białka A1 — homologu Bcl-2, co prowadziło do nasilonej apoptozy komórek [7]. Brak genu *NFκB2 (p100/p52)* wywoływał u myszy "knockout" defekty w gruczolach limfatycznych i śledzionie, prowadzące do zaburzeń w odpowiedzi immunologicznej [7]. Delecja genu, kodującego podjednostkę IκBα powodowała utratę wagi ciała i śmierć myszy na skutek rozprzestrzeniającego się zapalenia skóry i granulocytoty. Jednocześnie obserwowano niedorozwój śledziony, będący skutkiem ostrego niedoboru komórek erytro — i limfoidalnych [7].

Istnieje kilka powodów, dla których NFκB stanowić może nadzieję na opracowanie skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej. Przede wszystkim, czynnik ten wpływa na ekspresję szeregu genów, związanych z fazą promocji nowotworu (m.in. angiogenezą) i zjawiskiem metastazy (przerzutów komórek nowotworowych do innych narządów) [1]. Wykazano też, że mikrośrodowisko wokół rozwijającego się nowotworu (kwaśne pH czy obniżone stężenie tlenu) sprzyja aktywacji NFκB [45].

VI. NFκB a nowotwory

Jak opisano wcześniej, NFκB w aktywnej formie może hamować apoptozę i stymulować proliferację komórek. W kilku typach nowotworów zauważono trwałą konstytutywną aktywność NFκB [49]. Zano- towano również, że omawiany czynnik transkrypcyjny wywołuje oporność komórek na określone chemioterapeutyki [49]. Jak podaje B a l d w i n [16], w niektórych typach nowotworów, np. w chronicznych białaczkach limfocytarnych, występuje translokacja chromosomalna genu *bcl-3* kodującego białko, zaliczane do grupy IKK. W białaczkach Hodgkina wykazano mutację w genie *IκBα* i co za tym idzie, konstytutywną aktywację czynnika NFκB.

Omawiany czynnik transkrypcyjny może być też aktywowany przez transformujące białka wirusowe i niejednokrotnie jest wymagany dla transformacji indukowanej przez wirusy [16]. Na przykład, białko Tax z ludzkiej białaczki wirusowej HTLV-1 aktywuje NFκB, prawdopodobnie poprzez bezpośrednią interakcję z kompleksem IKK. Z kolei, zaktywowany

NFκB partycypuje w transformacji szczyrzych fibroblastów, indukowanej przez białko Tax [16]. Aktywność transkrypcyjną NFκB stymulują również białka kodowane przez wirusy EB i adenowirusy. Czynniki NFκB okazał się też induktorem protoonkogenów *c-myc* i *c-myb*, a także czynnika *groα* stymulującego wzrost czerniaka [16].

Komórki guza nowotworowego potrzebują do rozwoju tlenu, tak jak komórki prawidłowe. Stąd, procesem zachodzącym w obrębie guza jest tworzenie nowych naczyń krwionośnych, tzw. angiogeneza. Komórki guza nabywają też zdolności łatwego przenikania przez ściany naczyń krwionośnych. Z krwioobiegu przedostają się do innych tkanek i narządów czasem bardzo odległych od pierwotnego ogniska nowotworowego. Fazę tę nazywa się fazą przerzutów (metastazą). Procesy te wymagają m.in. czynników wzrostu takich jak, VEGF, MCP-1, ale także szeregu innych białek: cytokin, chemokin i enzymów, jak: metaloproteinazy 9 matrix (MMP-9), metaloproteinazy-2 matrix (MP-2), cyklooksigenazy-2 (COX2), aktywatora plazminogenu (uPA), syntazy tlenu azotu [1,7]. Rolę NFκB w karcynogenezie podkreśla fakt, że geny odpowiedzialne za syntezę tych białek, regulowane są przez ten czynnik transkrypcyjny [1]. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że supresja aktywacji NFκB może powodować zahamowanie rozwoju nowotworu poprzez "wygaszenie" ekspresji wspomnianych białek [1,7].

NFκB wiąże się nie tylko z wpływem na zdolność nowotworów do angiogenezy i przerzutów, ale także na formowanie guza [1,14,16,50]. Miejsca wiązania NFκB w łańcuchu DNA wykryto w rejonach promotorowych genów kodujących cząsteczki adhezyjne m.in. białka ECM, ICAM-1, ELAM-1, VCAM, cytokiny, czynniki wzrostu i proteazy powierzchniowe jak, MMP-9 [14,16,50]. Białko ICAM-1 wykryto w 70% guzów pierwotnych czerniaka oraz w 90% czerniaków o wysokiej złośliwości [16]. NFκB aktywuje również transkrypcję białka COX-2, związanego z procesami zapalnymi i procesami angiogenezy. Podwyższoną ekspresję tego białka zaobserwowano w złośliwych postaciach nowotworu okrężnicy i odbytu [16].

Jak do tej pory, nie udało się jednoznacznie wyjaśnić, w jaki sposób NFκB może wpływać na zwiększoną zdolność czerniaka do przerzutów, jak i angiogenezy. Sugeruje się pośrednictwo interleukiny-8, białka regulującego tworzenie naczyń. Zauważono bowiem, że blokowanie aktywności NFκB powodowało jednocześnie zahamowanie procesu unaczyniania ludzkiego czerniaka, wszczepionego myszom i

obniżenie ekspresji genu kodującego interleukinę — 8, zarówno na poziomie m-RNA, jak i białka [49].

Stwierdzenie aktywności konstytutywnej NFκB w szeregu rodzaju nowotworów m.in. w czerniaku, raku trzustki, białaczce typu T, raku piersi, prostaty, okrężnicy, pęcherza, płuc, etc. [1-3] nasuwa sugestię wpływu NFκB na oporność komórek na czynniki cytotoksyczne. Potwierdzają to obserwacje, że podwyższona aktywność NFκB jako cecha konstytutywna występuje w wielu przypadkach w komórkach nowotworowych o zmniejszonej wrażliwości na chemio- i radioterapię [1-3]. Jak podaje Aggarwal [3], komórki fibrosarkomy ze zmodyfikowanym białkiem IκBα, niewrażliwym na fosforylację, były bardziej wrażliwe na apoptozę, wywoływaną promieniowaniem niż komórki kontrolne o niezmienionej aktywności NFκB. Podobnie było w przypadku komórek glioblastoma A172 i MO54. Ouyang i wsp. [37] zaobserwowali, że oporność na apoptozę z udziałem receptora TRAIL wykazują komórki raka nerki RCC z konstytutywną aktywnością NFκB i to niezależnie od obecności receptorów śmierci. Zablockowanie czynnika NFκB w komórkach ludzkiego raka trzustki, uwrażliwiało je na apoptozę, wywoływaną przez etopozyd i doksorubicynę [2]. Zahamowanie aktywacji NFκB w komórkach raka piersi MCF-7 powodowało znaczące obniżenie przeżywalności komórek, przyczyniając się do nasilenia procesów apoptotycznych indukowanych przez paklitaksel czy TNF [5]. Ma i wsp. [4] wykazali, że po zastosowaniu inhibitora proteasomu PS-341, wrażliwość lekoopornych komórek białaczkowych wzrosła bardzo znacząco (10^5 - 10^6 razy). Muenchen i wsp. [51] uzyskali podobny efekt w odniesieniu do czynnika TNF-α w komórkach ludzkiego raka prostaty po zablockowaniu aktywacji NFκB przez zastosowanie "super-represora" genu *IκBα* — *pR-IκB_{S32+S36}*. W efekcie, zmienione białko IκBα było niewrażliwe na proces fosforylacji prowadzącej do jego rozpadu.

Interesujący związek wykryto między NFκB a transportem dokomórkowym daunomycyny. Okazuje się, że NFκB jako czynnik transkrypcyjny wiąże się ze specyficznym dla siebie miejscem w DNA, w rejonie pierwszego intronu ludzkiego genu *mdr 1* i transaktywuje rejon promotorowy tego genu [52]. Jak wykazali Bentires-Alj [52], zahamowanie aktywacji NFκB w komórkach ludzkiego raka okrężnicy HCT115 powodowało osłabienie transkrypcji *mdr-1* i ekspresji glikoproteiny Pgp, odpowiedzialnej za transport błonowy antracyklin i wzrost oporności komórek.

Jak wspomniano wcześniej, NFκB może być także aktywatorem procesów apoptotycznych. Stąd niekiedy, zahamowanie czynnika NFκB może dać przeciwny efekt w stosunku do opisanego powyżej, czyli decydować o zwiększonej oporności na związki apoptogenne. H e l l i n i i wsp. [43] wykazali na przykładzie komórek raka okrężnicy HCT116, że daunomycyna indukuje rejon promotorowy propop-totycznego genu *p53* za pośrednictwem zaktywowa-nego czynnika NFκB. Po translokacji jądrowej hete-rodimer p50/p65 wiąże się ze specyficznym miej-scem w DNA-κB, które znajduje się w genie *p53*. Według K a s i b h a t l i i wsp. [44], dla wywołania ekspresji ligandu FAS, indukowanej przez etopozyd, tenipozyd czy promieniowanie UV jest konieczna aktywacja dwóch czynników transkrypcyjnych: NFκB i AP-1. Aktywacja NFκB z następstwem w po-staci apoptozy wystąpiła też w komórkach białacz-kowych HL-60 i Jurkat T, poddawanych działaniu daunorubicyny [53]. Uważa się, że czynnikiem akty-wującym NFκB w komórkach może być synteza ce-ramidu bądź reaktywne postaci tlenu jako produkty przemian metabolicznych w komórce [18,53,54].

VII. NFκB — nowe możliwości w terapii przeciwnowotworowej

Pomysł wykorzystania czynnika transkrypcyjne-go NFκB w strategii przeciwnowotworowej zrodził się w oparciu o poznane właściwości tego białka, za-leżnie od warunków, pro — lub antyapoptotyczne. Jak opisano wcześniej, w wielu przypadkach obser-wowano zależność między odpowiedzią komórek nowotworowych na dany czynnik a poziomem aktywności NFκB. Bardzo obiecujące wydają się być wyniki uzyskane w badaniach komórek ludzkiej neu-roblastomy, ludzkiego raka płuc czy komórek ludzkiej białaczki. Wykazano, że w komórkach tych pod-dawanych działaniu antracyklin, lekowrażliwość ko-relowała ze stymulacją aktywności czynnika NFκB [1,16,55, A s h i k a w a niepubl., G r u b e r — nie-publ.]. Ostatnio zanotowano, że NFκB jest nie-zbędny dla efektów apoptotycznych wywoływanych w komórkach przez taksol — związek o działaniu przeciwnowotworowym [16].

Na efektywność radio — i chemioterapii rzutować może także blokowanie aktywacji NFκB, uwzględ-niając właściwości antyapoptotyczne czynnika [3,7]. Wykazano, że komórki fibrosarkomy HT1080 z mu-tacją w genie *IκBα*, w miejscach specyficznych dla fosforylacji i ubikwitinacji, procesów zapew-niających aktywację NFκB, były bardziej wrażliwe na apoptozę indukowaną naświetlaniem niż komórki

genetycznie niezmienione [7,16]. Stosowanie łącznie leku CPT-11 i inhibitorów NFκB znacząco wpłynęło na efekt cytotoksyczny na drodze nasilonej apoptozy w komórkach raka odcinka okrężnicy i od-bytu — LoVo [16]. B a l d w i n [16] podaje, że blo-kowanie inicjacji i progresji tego nowotworu, stwier-dzone w przypadku zastosowania aspiryny i nieste-roidowych leków zapalnych wiązało się właśnie z jednoczesnym hamowaniem aktywności NFκB.

Powyzsze obserwacje nasunęły naukowcom idee wspomaganie leczenia nowotworów, poddawanych działaniu naświetlań, związkami z ang. zw. *chemo-preventive agents*, stymulującymi apoptozę bez jed-noczesnego indukowania mechanizmów obronnych (tu: antyapoptotycznych) w komórkach. Większość związków o takich właściwościach jest pochodzenia roślinnego m.in., kurkumina, sylimaryna, polifenole z zielonej herbaty [1,16]. Jak podaje B h a r t i [1], większość związków tego rodzaju jest supresorami aktywności NFκB. Jednakże, jaki jest mechanizm efektywnego działania nasilającego apoptozę komó-rek dokładnie nie wiadomo.

Istnieje kilka strategii blokowania aktywacji NFκB, a co za tym idzie, oczekiwanego efektu nasi-lenia procesów apoptotycznych:

- stosowanie przeciwutleniaczy hamujących akty-wację NFκB przez wpływ na status redoks w komór-kach [25];
- stosowanie inhibitorów kompetycyjnych, wiążących się z miejscem κB w łańcuchu DNA jak np. peptyd TFD, zwany “przynętą” (ang. *transcrip-tion factor decoy*); interleukina IL-4; metale: chrom, kadm, złoto, rtęć, cynk; rybawiryna, czynnik wzros-tu naczyńowego endothelium VEGF [7];
- stosowanie inhibitorów proteasomu 26S, niezbęd-nego w degradacji podjednostki *IκBα*, a wśród nich: aldehydy peptydowe ALLnI, LLM, Z-LLnV, Z-LLL, cyklosporyna A, laktacystyna, inhibitor proteasomu PS-341 [4,7,25];
- stosowanie inhibitorów fosforylacji *IκBα* jak: aspiryna, ibuprofen, prostaglandyna A1, sangwina-ryna, tlenek azotu [7,16,56];
- stosowanie inhibitorów aktywacji NFκB o niezna-nym, jak dotąd, mechanizmie działania jak: disulfir-ram, glutation, witamina C [7];
- stosowanie związków blokujących jądrową trans-lokację podjednostek NFκB m.in. peptydów “imi-tujących” sekwencję w p50 odpowiedzialną za trans-port aktywnego dimeru do jądra [7];
- wprowadzenie do komórek genów kodujących zmodyfikowane białka supresorowe z mutacjami w miejscach specyficznych dla fosforylacji i ubikwity-nacji [7,17];

- wprowadzenie genu kodującego deacetylazę histonową (HDAC3), oddziaływującą bezpośrednio z białkiem p50/RelA, co pozwala na efektywne wiązanie nowosyntezywanego białka IκBα z dimerem p65/p50 i wydalanie kompleksu NFκB z jądra [6,7].

Należy mieć nadzieję, że intensywne badania w celu wyjaśnienia wszystkich "białych plam" w historii NFκB stworzą większą szansę dla chorych, poprawiając skuteczność terapii przeciwnowotworowej.

Artykuł otrzymano 4 września 2003
Zaakceptowano do druku 1 kwietnia 2004

Piśmiennictwo:

1. Bharti AC, Aggarwal BB (2002) *Biochem Pharmacol* **64**: 883-888
2. Arlt A (2002) *Int J Clin Pharm Th* **40**: 336-347
3. Aggarwal BB (2000) *Biochem Pharmacol* **60**: 1033-1039
4. Ma M H, Yang H H, Parker K, Manyak S, Friedman J M, Altamirano C, Wu Z, Borad M J, Frantzen M, Roussos E J, Mikail A, Adams J, Sjak-Shic N, Vescio R, Berenson J R (2003) *Clin Cancer Res* **9**: 1136-1144
5. Weldon CB, Burow ME, Rolfe KW, Clayton J L, Jaffe B M, Beckman B S (2001) *Surgery* **130**: 143-150
6. Siednienko J, Gorczyca W A (2003) *Post Hig Med Dośw* **1**: 19-32
7. Garg A, Aggarwal B B (2002) *Leukemia* **16**: 1053-1068
8. Schoonbrodt S, Piette J (2000) *Biochem Pharmacol* **60**: 1075-1083
9. Shishodia S, Aggarwal B B (2002) *J Biochem Mol Biol* **35**: 28-40
10. Shattuck-Brandt R L, Richmond A (1997) *Cancer Res* **57**: 3032-3039
11. Bureau F, Vanderplasschen A, Jaspar F, Minner F, Pastoret P P, Merville M-P (2002) *Blood* **99**: 3683-3691
12. Jeremias B J, Kupatt C, Baumann B, Herr J, Wirth T, Debatin K M (1998) *Blood* **91**: 4624-4631
13. Piret B, Piette J (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 4242-4248
14. Bours V, Bentires-Alj M, Hellin A-C, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville M-P (2000) *Biochem Pharmacol* **60**: 1085-1090
15. Webster G, Perkins N D (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 3485-3495
16. Baldwin A S (2001) *J Clin Invest* **107**: 241-246
17. Bentires-Alj M, Hellin A-C, Ameyar M, Chouaib S, Merville M-P, Bours V (1999) *Cancer Res* **59**: 811-815
18. Dumont A, Hehner S P, Hofmann T G, Ueffing M, Droge W, Schmitz M L (1999) *Oncogene* **18**: 747-757
19. Rivera-Walsh I, Cvijic M E, Xiao G, Sun S-C (2000) *J Biol Chem* **275**: 25222-25230
20. Gruber B M (2002) *Biul IL* **46**: 155-174
21. Orange J S, Geha R S (2003) *J Clin Invest* **112**: 983-985
22. Anest V, Hanson J L, Cogswell P C, Steinbrecher K A, Strahl B D, Baldwin A S (2003) *Nature* **423**: 659-663
23. Sulejczak D (2000) *Post Biol Kom* **27**: 527-568
24. Dhawan P, Richmond A (0000) *J Biol Chem* (w druku)
25. Waddick K G, Uckun F M (1999) *Biochem Pharmacol* **57**: 9-17
26. Staszczak M, Zdunek E (1999) *Post Biochem* **45**: 32-41
27. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville M-P, Castronovo V (1994) *Biochem Pharmacol* **47**: 145-149
28. Grilli M, Memo M (1999) *Biochem Pharmacol* **57**: 1-7
29. Wang C Y, Mayo M W, Baldwin A S Jr (1996) *Science* **274**: 784-787
30. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel J-L, Milano G, Peyron J-F (2001) *Cancer Res* **61**: 7785-7791
31. Wang C Y, Cusack J C Jr, Lin R, Baldwin A S Jr (1999) *Nat Med* **5**: 412-417
32. Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Folsch U R, Kalthoff H, Schmidt W E, Schafer H (2001) *Oncogene* **20**: 859-868 Errata w *Oncogene* (2002); **21**: 2611
33. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I (2002) *Cancer Cell* **1**: 493-503
34. Bakker T R, Reed D, Renno T, Jongeneel C V (1999) *Int J Cancer* **80**: 320-323
35. Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
36. Grzelakowska-Sztabert B (1999) *Post Biochem* **45**: 167-176
37. Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M (2001) *Oncogene* **20**: 3888-3896
38. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritsis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G (2003) *Nature* **424**: 793-796
39. Brummelkamp T R, Nijman S M B, Dirac A M G, Bernards R (2003) *Nature* **424**: 797-801
40. Kovalenko A, Chable-Bessia Ch, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G (2003) *Nature* **424**: 801-805
41. Ryan K M, Ernst M K, Rice N R, Vousden K H (2000) *Nature* **404** (6780): 892-897
42. Qin Z H, Chen R W, Wang Y, Nakai M, Chuang D M, Chase T N (1999) *J Neurosci* **19**: 4023-4033
43. Hellin A C, Calmant P, Gielen J, Bours V, Merville M P (1998) *Oncogene* **16**: 1187-1195
44. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green D R (1998) *Mol Cell* **1**: 543-551
45. Besho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin Y W, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R, Heike T (1994) *Biochem Pharmacol* **48**: 1883-1889
46. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kaiivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) *Biochem J* **367**: 729-740
47. Lin K I, DiDonato J A, Hoffmann A, Hardwick J M, Ratan R R (1998) *J Cell Biol* **141**: 1479-1487
48. Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tietze M K, Trautwein C, Manns M, Kubicka S (2000) *J Biol Chem* **275**: 6421-6427
49. Huang S, De Guzman A, Bucana C D, Fidler I J (2000) *Clin Cancer Res* **6**: 2573-2581
50. Sharma H W, Narayanan R (1996) *Anticancer Res* **16**: 589-596
51. Muenchen H J, Lin D-L, Walsh M A, Keller E T, Pienta K J (2000) *Clin Cancer Res* **6**: 1969-1977
52. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville M-P, Bours V (2003) *Oncogene* **22**: 90-97
53. Boland M P, Foster S J, O'Neill L A (1997) *J Biol Chem* **272**: 12952-12960
54. Kitajima I, Soejima Y, Takasaki I, Beppu H, Tokioka T, Maruyama I (1996) *Bone* **19**: 263-270
55. Bian X, McAllister-Lucas L M, Shao F, Schumacher K R, Feng Z, Porter A G, Castle V P, Pipari A W Jr (2001) *J Biol Chem* **276**: 48921-48929
56. Mayo M W, Baldwin A S (2000) *Biochim Bioph Acta* **1470**: M55-M62

Receptory leukotrienów cysteinylowych

Cysteinyl leukotriene receptors

MILENA SOKOŁOWSKA¹, MAREK L. KOWALSKI²,
RAFAŁ PAWLICZAK³

Spis treści:

- I. Od SRS-A do leukotrienów cysteinylowych
- II. Charakterystyka receptorów leukotrienów cysteinylowych
 - II-1. Budowa
 - II-2. Charakterystyka molekularna i powinowactwo leukotrienów cysteinylowych do CysLTR₁ i CysLTR₂
 - II-3. Wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnału
- III. Ekspresja receptorów leukotrienów cysteinylowych w tkankach zwierzęcych i ludzkich
- IV. Regulacja ekspresji CysLTR₁ i CysLTR₂
- V. Funkcje CysLTR₁ i CysLTR₂
 - V-1. Astma
 - V-2. Układ sercowo-naczyniowy
 - V-3. Układ nerwowy i hormonalny
 - V-4. Nowotwory
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ASA — kwas acetylosalicylowy; cAMP- cykliczny adenozyńmonofosforan; COX — cyklo-oxygenaza; CysLTR₁, CysLTR₂ — receptor leukotrienów cysteinylowych typ 1, 2; DAG — diacyloglicerol; EC₅₀ — stężenie agona powodujące wystąpienie 50% maksymalnej odpowiedzi; FLAP — białko aktywujące 5-lipooksygenazę; GPCR — receptor związany z białkami G; HUVEC — śródbłonek ludzkiej żyły pępowinowej; IC₅₀ — stężenie antagona powodujące zahamowanie 50% odpowiedzi; IFN-γ — interferon gamma; IL — interleukina; IP3 — 1,4,5-trifosforan inozytolu; LTA₄ — leukotrien A₄; LTC₄, LTD₄, LTE₄ — leukotrien C₄, D₄, E₄; LH — hormon luteinizujący; LHRH — hormon uwalniający LH; 5-LOX — 5-lipooksygenaza; mRNA — matrycowy kwas rybonukleinowy; NLPZ — niesteroidowe leki przeciwzapalne; NO — tlenek azotu; PIP2 — 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu; PLC_{1,3} — fosfolipaza C 1-3; PLCγ1 — fosfolipaza C gamma 1; PKA — kinaza białkowa A; PKC — kinaza białkowa C; PTX — toksyna krztuśca; SRS-A — wolno reagująca substancja anafilaksji; TM — przezłonowe domeny

Contents:

- I. From SRS-A to cysteinyl leukotrienes
- II. Characteristics of cysteinyl leukotriene receptors
 - II-1. The structure
 - II-2. Molecular characteristics and ligand binding studies
 - II-3. Intracellular signalling pathways
- III. Expression of cysteinyl leukotriene receptors in animal and human tissues
- IV. Regulation of the CysLTR₁ and CysLTR₂ expression
- V. Function of CysLTR₁ and CysLTR₂
 - V-1. Asthma
 - V-2. Neuroendocrine system
 - V-3. Cardiovascular system
 - V-4. Neoplasms
- VI. Summary

I. Od SRS-A do leukotrienów cysteinylowych i ich receptorów

Leukotrieny cysteinyłowe są to eikozanoidy, powstające *de novo* z kwasu arachidonowego fosfolipidów błon komórkowych. Odgrywają istotną rolę w patologii wielu chorób zapalnych i alergicznych. Powodują skurcz komórek mięśni gładkich, wzrost przepuszczalności naczyń i nasilają produkcję śluzu [1]. Są mediatorami reakcji zapalnej w astmie oskrzelowej, alergicznym nieżycie nosa i w atopowym zapaleniu skóry [2,3]. U pacjentów chorych na astmę LTC₄ i LTD₄ są 1000-krotnie silniejszym czynnikiem kurczącym mięśnie oskrzeli niż histamina [4]. LTE₄ jest stabilny i wydzielany do moczu, może więc służyć jako wskaźnik całkowitej produkcji leukotrienów cysteinyłowych [5].

Istnienie leukotrienów zostało przewidziane wiele lat temu wraz z opisem substancji stymulującej skurcz mięśni gładkich, występującej w płucach świnki morskiej po ekspozycji na jad kobry [6]. Związek ten, nazwany później wolno działającą substancją anafilaksji (SRS-A - ang. *slow reacting substance of anaphylaxis*), jest wydzielany przez immunologicznie pobudzone komórki tuczne [7,8]. Nazwa wzięła się stąd, że zarówno początek skurczu komó-

¹lek. med., ²prof. dr hab. n. med., ³dr hab. n. med., Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 91-213 Łódź, faks: (42) 678 22 92, tel.: (42) 675 73 09
e-mail: rafal.pawliczak@csk.am.lodz.pl

rek mięśni gładkich wywołany przez SRS-A, a także skurcz maksymalny, są opóźnione w stosunku do skurczu wywołanego histaminą [9,10]. Próby scharakteryzowania struktury SRS-A wykazały, że związek ten jest polarnym lipidem, zawierającym siarkę, który pochłania promieniowanie ultrafioletowe [10-12]. Późniejsze badania ze znakowanym kwasem arachidonowym zasugerowały, że wchodzi on w skład SRS-A [13,14]. W tym samym czasie intensywne badania grupy S a m u e l s s o n a nad wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi zaowocowały odkryciem szlaku przemian kwasu arachidonowego w kierunku prostaglandyn i tromboksanu [15,16]. Na ich rolę w reakcji zapalnej zwrócono uwagę po odkryciu V a n e' a [17], że kwas acetylosalicylowy (ASA) i niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) blokują cyklooksyzgenazę (COX), odpowiedzialną za ten szlak przemian. Glikokortykosteroidy także hamują powstawanie prostaglandyn, ale poprzez blokowanie uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błon komórkowych. Fakt, że przeciwzapalne działanie NLPZ i sterydów ma odmienny efekt biologiczny, wpłynął na poszukiwanie przez S a m u e l s s o n a i współpracowników innych pochodnych kwasu arachidonowego, niezależnych od szlaku cyklooksyzgenazy, mogących tłumaczyć te różnice. Doprowadziło to ostatecznie do odkrycia leukotrienów jako produktów przemiany kwasu arachidonowego poprzez 5-lipooksyzgenazę (5-LOX), jak i do zidentyfikowania SRS-A, jako mieszaniny trzech leukotrienów cysteinylowych: LTC₄, LTD₄ i LTE₄ [10,11]. B.I. S a m u e l s s o n, J.R. V a n e i S.K. B e r g s t r o m otrzymali nagrodę Nobla w 1982 roku.

Istnieją dwie grupy leukotrienów o odmiennej funkcji biologicznej, mające duże znaczenie w patologii: LTB₄ oraz leukotrieny cysteinylowe czyli LTC₄, LTD₄ i LTE₄. Spośród nich LTB₄ jest jednym z najsilniejszych znanych obecnie chemoatraktantów leukocytów, zwłaszcza neutrofilii i eozynofili [18].

Ludzkie eozynofile, bazofile, mastocyty i makrofagi płucne mają zdolność przekształcania prekursorowego LTA₄ w macierzysty leukotrien cysteinylowy - LTC₄, dzięki obecności LTC₄-syntazy, enzymu sprzęgającego leukotrien A₄ z glutationem [19]. LTC₄ jest następnie aktywnie transportowany do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie po odłączeniu kwasu glutaminowego przez γ -glutamylotranspeptydazę i glicyny przez dipeptydazę cysteinylglicynową, przechodzi kolejno w LTD₄ i LTE₄ [20].

Choć leukotrieny odkryto ponad 20 lat temu i choć pojawiła się generacja skutecznych leków antyleukotrienowych, aż do końca ubiegłego wieku opi-

sywano istnienie co najmniej dwóch rodzajów specyficznych receptorów leukotrienów cysteinylowych. jedynie na podstawie badań biochemicznych i farmakologicznych [21]. Dopiero w 1997 roku Y o k o m i z o i wsp. po raz pierwszy sklonowali gen receptora LTB₄, nazwanego receptorem BLT [22]. Natomiast w roku 1999 dwóm niezależnym zespołom: L y n c h' a i S a r r a u udało się sklonować gen i tym samym uzyskać molekularną charakterystykę receptora typu pierwszego CysLTR₁ w tkankach ludzkich [23,24]. Rok później T a k a s a k i i wsp. oraz N o t h a c k e r i i wsp. oraz H e i s e i i wsp. sklonowali gen i podali lokalizację tkankową drugiego z przewidywanych receptorów leukotrienów cysteinylowych, czyli CysLTR₂ [25-27].

II. Charakterystyka receptorów leukotrienowych

II-1. Budowa

Badania farmakologiczne dowiodły, że istnieją co najmniej dwa typy receptorów leukotrienów cysteinylowych: CysLTR₁ i CysLTR₂. Analiza miejsc hydrofobowych wykazała, że receptory te składają się z siedmiu przezłonowych, hydrofobowych domen, połączonych przez sześć hydrofilowych pętli, czyli mają typową budowę receptorów związanych z białkami G (GPCR- ang. *G protein coupled receptor*) [28]. Prawdopodobnie leukotrieny cysteinylowe wiążą się z tymi receptorami poprzez przezłonowe domeny TM3, TM6 i TM7. CysLTR₁ i CysLTR₂ charakteryzują się wysoką homologią w domenach TM3 i TM7 i stosunkowo niską w TM4, TM5 i TM6. Te różnice w budowie mogą implikować różnice w powinowactwie do poszczególnych ligandów [28,29].

II-2. Charakterystyka molekularna i powinowactwo leukotrienów cysteinylowych do receptorów CysLTR₁ i CysLTR₂

Badania eksperymentalne ukierunkowano na poszukiwanie ligandów nadrodziny receptorów GPCR [23,24]. Wyodrębniono linię komórkową z wprowadzonym materiałem genetycznym receptora, która uległa aktywacji pod wpływem LTC₄ i LTD₄. Receptor ten odpowiadał więc poszukiwanemu CysLTR₁. Analizując sekwencję wprowadzonego genu odkryto, że wykazuje on 32% zgodności z genem receptora purynowego P2Y₁ oraz 28% zgodności z genem receptora BLT₁. Składa się z 1579 par zasad, które kodują 337 aminokwasów. Gen tego receptora zlokalizowano w *locus* X q13-21.

W badaniach Lynech'a i wsp. komórki transfekowane plazmidem, powodującym powstanie białka CysLTR₁, były pobudzone przez LTD₄ z EC₅₀ około 2-35 nM. LTC₄ był pełnym agonem, ale około 10-krotnie słabszym od LTD₄, natomiast LTE₄ był słabym agonem. Badania Sarrau doprowadziły do podobnych wyników. Siła pobudzenia receptora rozkładała się: LTD₄>LTC₄>LTE₄ z EC₅₀ odpowiednio: 2,5 nM, 24 nM i 240 nM. Dodatkowo po wprowadzeniu do tych układów komórkowych specyficznych antagonistów CysLTR₁: pranlukastu, zafirlukastu, montelukastu i pobilukastu, zaobserwowano inhibicję receptorów, na podstawie hamowania efektu wewnątrzkomórkowej mobilizacji Ca²⁺ z IC₅₀ odpowiednio: 0,1 nM, 0,26 nM, 2,3 nM i 5,5 nM.

Sklonowanie receptora typu drugiego zostało osiągnięte w podobny sposób jak opisano powyżej, przez trzy niezależne zespoły [25-27]. Ludzki CysLTR₂ składa się z 346 [25,27] lub z 347 aminokwasów [26]. Wykazuje 31% [25], 36% [26] lub 38% [27] homologii z CysLTR₁.

CysLTR₂ jest wybiórczo aktywowany przez nanomolowe stężenia leukotrienów cysteinylowych. Według Northackera i wsp. komórki transfekowane genem CysLTR₂ odpowiadały na leukotrieny cysteinylowe odpowiednio: LTD₄=LTC₄>LTE₄ z EC₅₀: 4,4 nM, 8,9 nM i 293 nM. Badania Heise i wsp. potwierdzają te wyniki. LTE₄ jest częściowym agonem CysLTR₂. Żaden z antagonistów CysLTR₁: LY-17883, MK-571, montelukast i zafirlukast, nie blokuje w stężeniach fizjologicznych aktywacji receptora drugiego typu. Opisano także, że wspólny antagonist receptorów CysLTR₁ i CysLTR₂ - BAYu9773 jest częściowym agonem receptora CysLTR₂

z EC₅₀=100 nm. Gen CysLTR₂ znajduje się w locus 13q14.12-12-21.1.

Powinowactwo do obu typów receptorów podsumowano w Tabeli 1.

II-3. Wewnątrzkomórkowa transdukcja sygnału

Mierzalnym efektem połączenia agona z receptorem CysLTR typu GPCR jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Na ten efekt składają się dwie ścieżki sygnałowe: aktywacja wrażliwego na PTX i niewrażliwego na PTX białka G (PTX-ang. *pertussis toxin*- toksyna krztuśca) [30].

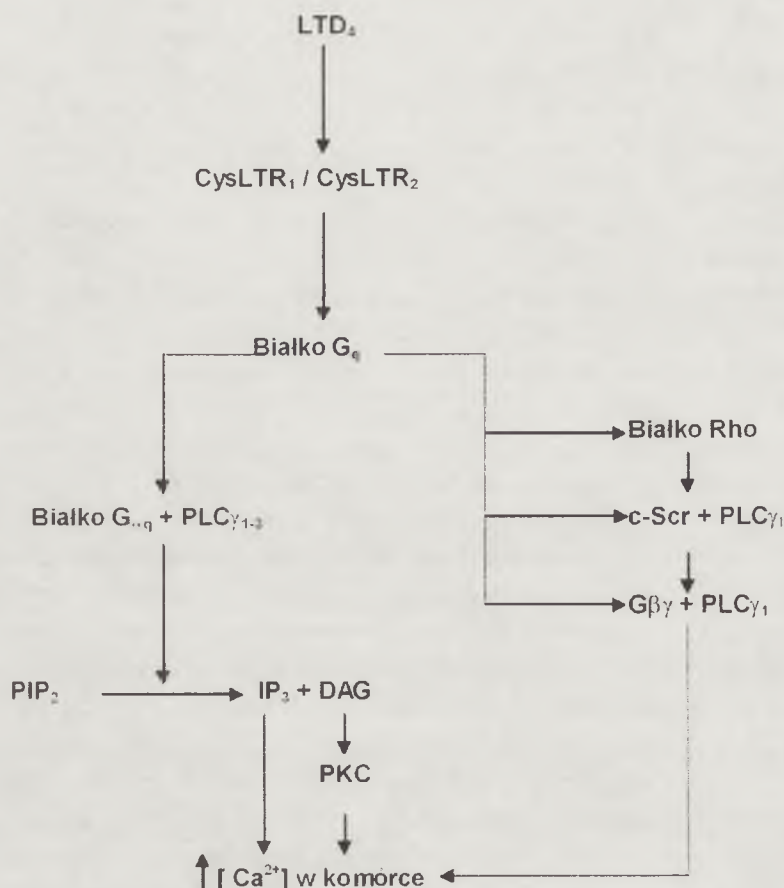
Pierwszym zjawiskiem, zachodzącym gwałtownie po połączeniu się agona z receptorem, jest wewnątrzkomórkowa mobilizacja wapnia, czyli uwolnienie Ca²⁺ z magazynów komórkowych. Efekt ten jest spowodowany „współpracą” receptora z białkiem G niewrażliwym na toksynę krztuśca, należącym do rodziny białek G_{q/11} [31]. Jest to faza przejściowa, niezależna od zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [32].

Drugą drogą, prowadzącą do wzrostu stężenia wapnia cytoplazmatycznego jest napływ jonów wapniowych, który następuje zaraz po mobilizacji wewnątrzkomórkowej. Jest to faza przedłużonego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺, zależna od stężenia wapnia w płynie międzykomórkowym [32,33]. Efekt ten jest uwarunkowany wrażliwością na PTX białkami G_i, a w szczególności G_{α13} [34]. Prawdopodobnie napływ jonów wapniowych pełni główną rolę w transdukcji sygnału wywołanego połączeniem się LTD₄ z receptorem [35]. Odpo-

Tabela 1.

Porównanie wpływu agonów i antagonistów receptorów CysLTR₁ i CysLTR₂

Agon	Cys LTR ₁		Cys LTR ₂	
	EC ₅₀ [nM]	Piśmiennictwo	EC ₅₀ [nM]	Piśmiennictwo
LTD ₄	2.5	[24]	4.4	[26]
LTC ₄	24	[24]	8.9	[26]
LTE ₄	240	[24]	293	[26]
BAYu9773	>10 000	[26]	92	[26]
Antagon	IC ₅₀ [nM]		IC ₅₀ [nM]	
Zafirlukast	0.26	[24]	>1000	[26]
Montelukast	2.3	[24]	>5000	[26]
Pranlukast	0.1	[24]	nie badano	[26]
BAYu9773	440	[26]	300	[26]



Ryc 1. Schemat wewnątrzkomórkowej mobilizacji wapnia za pośrednictwem receptora CysLTR. LTD₄ — leukotrien D₄, PLC γ — fosfolipaza C γ , PIP₂ — 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu, IP₃ — 1,4,5-trifosforan inozytolu, DAG — diacyloglicerol, PKC — kinaza białkowa C.

wiedź na LTD₄ jest redukowana o 80-90% w buforze pozbawionym wapnia [36].

Do wzrostu stężenia Ca²⁺ wewnątrzkomórkowego dochodzi za pomocą kilku różnych, ale wzajemnie nakładających się i nie do końca poznanych mechanizmów.

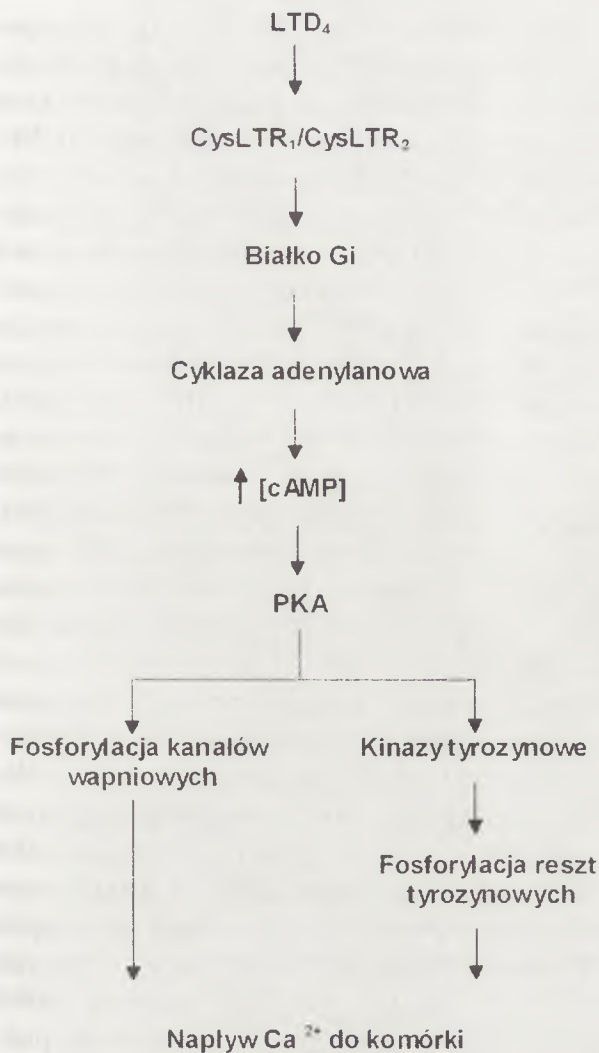
LTD₄ po połączeniu z receptorem CysLTR powoduje sprzężanie białka G niewrażliwego na PTX ze specyficzną fosfolipazą C₁₋₃ (PLC₁₋₃) powodującą hydrolizę 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂) do diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP₃) [30,37].

IP₃ uwalnia Ca²⁺ ze zbiorników siateczki śródplazmatycznej. Dochodzi również do aktywacji kinazy białkowej C (PKC) [38], jej redystrybucji z cytosolu na frakcje błonowe komórki i w efekcie do wzrostu stężenia Ca²⁺ w cytosolu [39], wskutek wewnątrzkomórkowej mobilizacji wapnia [40]. Specyficzną izoformą fosfolipazy C, biorącą udział w transdukcji sygnału wapniowego po aktywacji LTD₄, jest PLC γ [30,40,41]. LTD₄ indukuje fosforylację reszt tyrozynowych PLC γ i jej translokację do błon komórkowych [30,41]. Fosforylacja PLC γ jest z kolei warunkowana aktywacją monomerycznego białka G-białka Rho [30,42]. Udowodniono, że egzoenzym C-3 *Clostridium botulinum*, inhibitor białka Rho, całkowicie blokuje zależny od LTD₄ sygnał wapniowy [30]. Dodatkowo stwierdzono, że LTD₄ indukuje

gwałtowną, bezpośrednią asocjację podjednostek G $\beta\gamma$ (białka G niewrażliwego na PTX) z PLC γ . Efektem towarzyszącym, i jak się okazuje niezbędnym, dla tej reakcji jest połączenie jednej z kinaz tyrozynowych c-Src z PLC γ . Selektywny inhibitor kinaz tyrozynowych rodziny Src, PPI, blokuje zarówno fosforylację tyrozynową PLC γ , jak i powstawanie kompleksu sygnałowego G $\beta\gamma$ z PLC γ [41], blokując wewnątrzkomórkową mobilizację wapnia (Ryc. 1).

Napływ wapniowy, uwarunkowany przede wszystkim połączeniem receptora zaktywowanego przez LTD₄ z wrażliwym na PTX białkiem G, jest związany ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP [32,33]. cAMP prawdopodobnie aktywuje kinazę białkową A (PKA), która fosforyluje kanały wapniowe w błonie komórkowej [33]. Toksyna krztuśca całkowicie hamuje ten efekt, podczas gdy inhibitor PKA (RP-cAMPs) zmniejsza sygnał wapniowy o 60%. Aktywacja kinaz tyrozynowych jest kolejnym procesem doprowadzającym w efekcie do napływu Ca²⁺ do komórek pobudzonych przez LTD₄ [34,40]. Dodatkowo przyłączenie LTD₄ do receptora powoduje natychmiastową fosforylację reszt tyrozynowych, która jest niezbędna do napływu wapnia do komórki (Ryc. 2).

Ostatnio poznana została nowa droga transdukcji sygnału wewnątrz komórki aktywowanej przez leukotrieny cysteinylowe. Udowodniono, że w drogach



Ryc. 2. Schemat napływu wapnia do komórki za pośrednictwem receptora CysLTR. LTD₄ — leukotrien D₄, cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan, PKA - kinaza białkowa A.

oddechowych u człowieka skurcz komórek mięśni gładkich jest częściowo niezależny od Ca²⁺. Zależy natomiast od aktywacji kinazy białkowej Cα (PKC_α) [43]. Podobne wyniki uzyskali H o s h i n o i wsp. na komórkach THP1 (ludzkich monocytach białaczkowych) [44]. Udowodnili oni, że CysLTR₁ sprzęga się pod wpływem LTD₄ z białkiem G niewrażliwym na PTX (G_{q/11}) i wywołuje przejściową mobilizację Ca²⁺ wewnątrzkomórkowego. To doprowadza do aktywacji PKC_α i jej redystrybucji na błonę komórkową. Aktywna PKC_α aktywuje Raf 1, który odgrywa główną rolę w aktywacji kinazy MAP, kluczowego enzymu przekazującego sygnały z powierzchni komórek do jądra komórkowego (Ryc. 3). Odpowiedź chemotaktyczna tych samych komórek THP 1 na LTD₄ jest natomiast zależna od białek G_i wrażliwych na PTX.

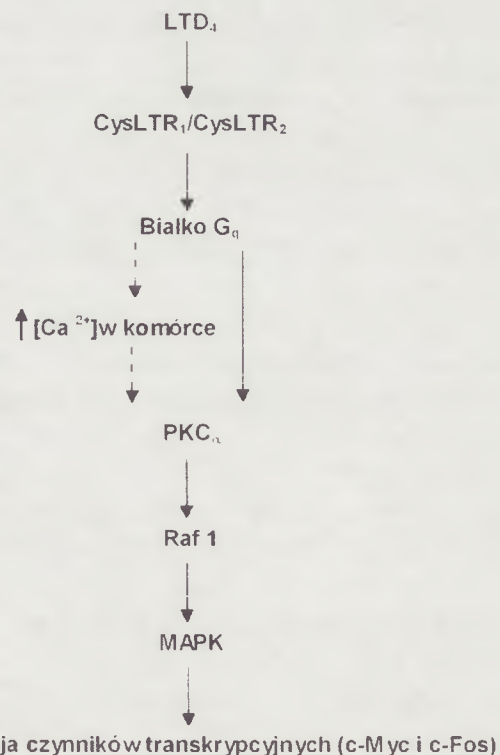
Taka różnorodność ścieżek sygnałowych wewnątrz komórki pobudzanej przez leukotrieny cysteinylowe poprzez swoje receptory, częściowo

tłumaczy szeroki zakres aktywności leukotrienów w trakcie odpowiedzi alergicznej i zapalnej.

III. Ekspresja receptorów leukotrienów cysteinylowych w tkankach zwierzęcych i ludzkich

Dodatkowym czynnikiem mogącym tłumaczyć różnorodną odpowiedź organizmu na bodziec zapalny i alergiczny, jest zróżnicowana ekspresja receptorów leukotrienów cysteinylowych w tkankach.

Klasyczne badania farmakologiczne polegające na obserwacji wpływu leukotrienów cysteinylowych na wycinki tkankowe, a następnie cofanie się wywołanych efektów po zastosowaniu antagonistów, pozwoliły na wyodrębnienie przynajmniej dwóch typów receptorów [45,46]. Odkryto, że w śledzionie, oskrzelach tchórzofretki [47,48] oraz w tchawicy i oskrzelach owcy znajdują się receptory CysLTR₂ [49]. Natomiast w jelicie krętym [50], oskrzelach [51] i płucach [52,53] świnki morskiej i płucach szczura [54,55] wykazano obecność obu typów receptorów. Istnieje wiele efektywnych, swoistych antagonistów receptorów CysLTR₁, które od kilku lat są stosowane w terapii astmy oskrzelowej i innych chorób atopowych. Natomiast poznano dotychczas tylko jeden rodzaj i to częściowego antagona CysLTR₂ - BAYu9773 [21], który jest także częściowym antagonistem CysLTR₁. Ten fakt utrudnia badania farmakologiczne CysLTR₂. Dlatego też sklonowanie genów



Ryc. 3. Schemat aktywacji MAP-kinazy za pośrednictwem receptora CysLTR. LTD₄ — leukotrien D₄, PKC_α — kinaza białkowa C alfa, MAPK — kinaza aktywowana mitogenem.

obu typów receptorów, pozwoliło na wdrożenie metod biologii molekularnej m.in. hybrydyzacji *in situ*, metody *Northern blotting* i RT-PCR, celem jeszcze dokładniejszej lokalizacji tkankowej CysLTR₁ i CysLTR₂ oraz weryfikacji wcześniejszych wyników [23,24,27]. U myszy mRNA CysLTR₁ znaleziono głównie w skórze, płucach i jelicie cienkim, natomiast mRNA CysLTR₂ w śledzionie, płucach oraz jelicie cienkim [56], a także w grasicy, nadnerczach i sercu [57]. Należy wspomnieć, że badania farmakologiczne na tkankach zwierzęcych wykazały odmienną ekspresję CysLTR₁ i CysLTR₂ u różnych gatunków [46]. Sklonowanie genów obu typów receptorów u myszy pozwoliło z kolei odkryć różnice ich budowy w porównaniu z receptorami ludzkimi. Mysi CysLTR₁ jest homologiczny do ludzkiego CysLTR₁ w 87,3%, natomiast myszy CysLTR₂ do ludzkiego CysLTR₂ w 73,4% [56]. Może to mieć znaczenie przy interpretacji wyników przeprowadzanych na zwierzętach badań, m.in. dotyczących astmy.

Największą ekspresję mRNA CysLTR₁ u człowieka wykryto w śledzionie i leukocytach krwi obwodowej. Niższą ekspresję wykazano w płucach, łożysku, jelicie cienkim, nadnerczach, gruczole krokowej, mięśniach szkieletowych, mózgu, okrężnicy, sercu, nerkach i wątrobie [23,24]. Ponieważ leukotrieny cysteinylowe odgrywają szczególną rolę w etiopatogenezie astmy oskrzelowej [58], szczególny nacisk położono na poszukiwanie ich receptorów w układzie oddechowym [23]. Zastosowanie czulszej metody, jaką jest hybrydyzacja *in situ*, zaowocowało wykryciem ekspresji mRNA CysLTR₁ na wszystkich poziomach drzewa oskrzelowego, w okołoskrzelowych i okołoskrzelikowych mięśniach gładkich, jak również w makrofagach płucnych [23,24]. Należy dodać, że ekspresja mRNA CysLTR₁ w płucach ludzi zdrowych i chorych z astmą, jest porównywalna [24]. W populacji leukocytów krwi obwodowej około 20% wykazuje ekspresję mRNA i białka receptorowego CysLTR₁. Z kolei spośród CysLTR₁(+) komórek najwyższą ekspresję, zarówno mRNA jak i białka receptorowego, wykazują eozynofile [59,60]. Wykazano również, że komórki HL-60 różnicujące się w kierunku eozynofiliów (HL-60/eos), także wykazują wyższą ekspresję mRNA dla CysLTR₁ niż nieodróżnicowane HL-60 [61,24,26]. Wśród CysLTR₁(+) leukocytów krwi obwodowej, ekspresję mRNA i białka receptorowego wykazano także w monocytach oraz w limfocytach B [59,62]. Natomiast co do obecności CysLTR₁ w limfocytach T CD4⁺ i T CD8⁺ oraz w neutrofilach uzyskano sprzeczne wyniki. Grupa F i g u e r o a [59] nie wykazała ekspresji CysLTR₁ w tych komórkach, podczas

gdzie badania M i t a i wsp. [60], przy użyciu kompetencyjnej metody RT-PCR, wykazały ją w obu typach komórek. Dodatkowo, wśród leukocytów krwi obwodowej jeszcze komórki macierzyste CD 34⁺ wykazują ekspresję mRNA i białka CysLTR₁ [59]. Prawdopodobnie pod wpływem CysLTR₁ mogą różnicować się w kierunku eozynofili lub monocytów i makrofagów, a nawet komórek tucznych u pacjentów atopowych [63]. mRNA CysLTR₁ wykryto oprócz HL60/eos również w innych liniach komórkowych, takich jak U937 [24, 64] czy też THP 1 [36,60,65]. Ekspresję mRNA CysLTR₁ wykazano również w śródbłonku ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC-ang. *human umbilical vein endothelial cells*) [66]. Natomiast badania farmakodynamiczne [67] sugerują dodatkowo istnienie receptorów leukotrienów cysteinylowych w komórkach śródbłonka tętnic i żył płucnych.

Lokalizacja CysLTR₂ nie pokrywa się z umiejscowieniem receptora pierwszego typu [25-27]. Wprawdzie ekspresję CysLTR₂ stwierdza się także w śledzionie, leukocytach krwi obwodowej, łożysku i płucach, ale dodatkowo wykryto obecność tylko CysLTR₂ w sercu, nadnerczach i ośrodkowym układzie nerwowym [25-27]. Jednak w obrębie układu oddechowego rozmieszczenie CysLTR₂ jest odmienne od CysLTR₁. Silniejszą ekspresją mRNA CysLTR₂ charakteryzują się makrofagi płucne, podczas gdy w mięśniach gładkich oskrzeli ekspresja jest słabsza [27]. Obecności CysLTR₂ nie wykazano natomiast w tchawicy [25]. Spośród leukocytów krwi obwodowej najsilniejszą ekspresję mRNA CysLTR₂ wykazują eozynofile [27,60]. Co więcej, stosunek mRNA CysLTR₁ do CysLTR₂ w tych komórkach jest najniższy w porównaniu z pozostałymi subpopulacjami komórkowymi leukocytów krwi obwodowej [60]. Poza eozynofilami obecność mRNA CysLTR₂ wykryto także w monocytach [27,60], neutrofilach i limfocytach T [60]. Natomiast ani komórki HL-60, ani U-973, nieodróżnicowane, jak i różnicujące się w kierunku poszczególnych subpopulacji komórkowych, nie wykazują ekspresji mRNA CysLTR₂ [26]. Obecność receptorów leukotrienów cysteinylowych w układzie sercowo-naczyniowym, przewidywana wcześniej na podstawie badań czynnościowych [68] została obecnie potwierdzona za pomocą metod molekularnych. mRNA CysLTR₂ zostało wykryte w przedsionkach, komorach, przegrodzie i na koniuszku serca [26,60] oraz w naczyniach wieńcowych [69]. Szczegółowe badania metodą hybrydyzacji *in situ* doprowadziły do zlokalizowania mRNA CysLTR₂ w kardiomiocytach, fibroblastach, włóknach Purkiniego [27] oraz mięśniach gładkich naczyń

wieńcowych [69]. Natomiast wykluczono ich obecność w śródbłonku naczyń wieńcowych [69]. Wśród komórek śródbłonkowych obecność mRNA CysLTR₂ została potwierdzona w śródbłonku ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC) [60]. Niemniej jednak, badaniami farmakodynamicznymi wykryto ich obecność w śródbłonku tętnicy płucnej oraz w śródbłonku i mięśniach gładkich żył płucnych [70]. Zaskakującym efektem poznania charakterystyki molekularnej CysLTR₂ było wykrycie mRNA tego receptora w obrębie ośrodkowego układu nerwowego i gruczołu nadnerczowego [26,27]. W ośrodkowym układzie nerwowym szczególnie wysoką ekspresję opisywano w obrębie rdzenia kręgowego i przysadki mózgowej [26]. W żadnym z tych miejsc nie znaleziono mRNA CysLTR₁. W gruczole nadnerczowym mRNA CysLTR₂ jest obecny zarówno w komórkach chromochłonnych i zwojowych rdzenia, jak i w warstwie siateczkowatej kory [26,27]. Silna ekspresja mRNA CysLTR₂ w gruczole nadnerczowym, ośrodkowym układzie nerwowym oraz w sercu, przy braku ekspresji mRNA CysLTR₁ o tej lokalizacji, wskazuje prawdopodobnie na odmienną rolę tych receptorów w procesach fizjologicznych i patologicznych. Lokalizacja tkankowa CysLTR₁ i CysLTR₂ w tkankach człowieka została szczegółowo przedstawiona w Tabeli 2.

IV. Regulacja ekspresji receptorów leukotrienów cysteinylowych

Podobnie jak niewiele wiadomo na temat wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału przez pobudzone leukotrienem receptory, także regulacja ich ekspresji pozostaje w sferze badań. Udowodniono, że IL-5 powoduje gwałtowny wzrost ekspresji CysLTR₁ mRNA i białka receptorowego w komórkach HL-60/Eos, nie wpływając wcale na nie zróżnicowane komórki HL-60 [61]. IL-5 odgrywa istotną rolę w stymulacji różnicowania, chemotaksji i aktywacji eozynofili. Bierze także udział w zahamowaniu apoptozy w miejscu zapalenia eozynofilowego. Wykazano, że IL-4 i IL-13 zwiększają poziom mRNA i białka CysLTR₁ w ludzkich monocytach i makrofagach [62]. INF- γ powoduje zwiększenie ekspresji obu typów receptorów w komórkach mięśni gładkich oskrzeli człowieka [71]. Te wyniki sugerują, że podwyższone poziomy INF- γ u pacjentów z astmą mogą wywoływać nadreaktywność oskrzeli i zaostrzenia astmy poprzez bezpośredni wpływ na skurcz mięśni gładkich oskrzeli. W pozostałych miejscach, w których wykryto obecność receptorów CysLTR₁/CysLTR₂, zbadano jeszcze komórki ludz-

kiej żyły pępowinowej (HUVEC) [72]. Czynnikiem, który powoduje wyraźny wzrost mRNA CysLTR₁ w tych komórkach jest IL-1 β .

V. Funkcje receptorów leukotrienów cysteinylowych CysLTR₁ i CysLTR₂

Leukotrieny cysteinyłowe biorą udział w patofizjologii wielu chorób, u podłoża których leży proces zapalny. Największy nacisk kładziono do tej pory na wyjaśnienie roli leukotrienów w etiopatogenezie astmy oskrzelowej. Owocem tych badań było pojawienie się w połowie lat dziewięćdziesiątych leków antyleukotrienowych, stosowanych w leczeniu tej choroby. Tymczasem w świetle najnowszych badań nad strukturą i ekspresją tkankową receptorów leukotrienów cysteinyłowych wydaje się, że ich rola może wykraczać daleko poza etiologię astmy oskrzelowej. Zastanawiające jest szczególnie odmienne rozmieszczenie obydwu typów receptorów w tej samej tkance, co może implikować ich odmienne funkcje. Dodatkowo, tak bogata ekspresja receptorów leukotrienowych w sercu, ośrodkowym układzie nerwowym i w nadnerczach zwraca uwagę na ich możliwą rolę w układzie sercowo-naczyniowym i neuroendokrynnym, co przewidywano w nielicznych badaniach farmakodynamicznych.

V-1. Astma

Leukotrieny cysteinyłowe biorą udział zarówno w odpowiedzi skurczowej oskrzeli, jak i w rozwoju zapalenia astmatycznego. Działanie skurczowe leukotrienów na mięśnie gładkie oskrzeli zostało udowodnione *in vitro* na izolowanym oskrzeliu ludzkim [73,74] oraz *in vivo* [75]. Wywołują one skurcz oskrzeli zarówno u ludzi zdrowych, jak i u pacjentów z astmą [76,77], które to efekty są znoszone przez antagonony CysLTR₁, takie jak pranlukast i zafirlukast [78,79]. Leukotrieny cysteinyłowe zwiększając także sekrecję śluzu [80], przy jednoczesnym hamowaniu aktywności nabłonka migawkowego oskrzeli [81], przyczyniają się do wzrostu obturacji w oskrzelach. Skuteczność antagonistów receptora CysLT₁ w blokowaniu powyższych efektów została potwierdzona w wielu badaniach klinicznych. Zarówno montelukast jak i zafirlukast poprawiały kontrolę astmy ograniczając dzienne i nocne objawy. Powodowały istotny wzrost pierwszosekundowej natężonej objętości wydechowej - FEV₁ i szczytowego przepływu wydechowego - PEF, zmniejszenie zapotrzebowania na doraźne β -mimetyki i redukcję zaostrzeń astmy [82-84].

Tabela 2.

Lokalizacja receptorów CysLTR₁ i CysLTR₂ w tkankach człowieka

Rodzaj tkanki	CysLTR ₁		CysLTR ₂	
	Poziom ekspresji	Pismienictwo	Poziom ekspresji	Pismienictwo
Płuca		[23,24,59]		[27]
Mięśnie gładkie oskrzeli	++		+	
Makrofagi płucne	++		++	
Leukocyty krwi obwodowej		[23,24,59,60,62]		[25,26,27,60]
Eozynofile	++		++	
Monocyty/makrofagi	+		+	
Neutrofile	+/-		+	
Limfocyty B	+		?	
Limfocyty T	+/-		+	
Komórki CD 34+	+		?	
Komórki tłuszczowe	+	[63]	?	
Sledziona	++	[23,24]	++	[25,26,27]
Łożysko	+	[23,24]	?	
Serce	+/-	[23,24]		[25,26,27]
Kardiomiocyty			++	
Fibroblasty			++	
Włókna Purkiniego			++	
Mięśnie gładkie naczyń wieńcowych			++	
Żyła płucna		[67]		[67]
Śródbłonek	obecny		obecny	
Mięśnie gładkie	nieobecny		obecny	
Tętnica płucna		[67]		[67]
Śródbłonek	nieobecny		obecny	
Żyła pępowinowa		[66]		[66]
Śródbłonek	+		+	
OUN	+	[23,24]	++	[25,26,27]
Nadnercza	-	[23,24]	++	[25,26,27]
Linie komórkowe		[23,24,65]		[24,25,65]
HL60/Eos	+		-	
U 937	+		-	
THP1	+		?	

++ wysoka ekspresja

+ niska ekspresja

+/- przeciwstawne wyniki w różnych badaniach

- brak ekspresji

obecny - wynik uzyskano jedynie na podstawie badań farmakodynamicznych

nieobecny - wynik uzyskano jedynie na podstawie badań farmakodynamicznych

? dotychczas nie zbadane

Odpowiedź zapalna na działanie leukotrienów cysteinylowych składa się jeszcze z kilku elementów. Zwiększają one przepuszczalność naczyń w mikrokrojeniu poprzez skurcz komórek śródbłonka w postkapilarnych naczyniach żylnych [85,86] oraz stymulują chemotaksję eozynofili, głównych komórek nacieku zapalnego w drogach oddechowych u pacjentów z astmą. Leukotrieny cysteinylowe są chemotraktantami eozynofili poprzez CysLTR₁. Indukują wzrost ekspresji selektywnych P zarówno w leuko-

cytach [87] i w śródbłonku, gdzie działają prawdopodobnie poprzez CysLTR₂ [88], co powoduje zwiększoną adhezję eozynofili do ściany naczynia. Inhalacja LTD₄ spowodowała nacieki z eozynofili w drogach oddechowych świnki morskiej, który utrzymywał się przez cztery tygodnie. Efekt ten był blokowany przez pranlukast [89]. Także u ludzi, leukotrieny cysteinylowe podawane drogą wziewną, powodowały wzrost odsetka eozynofili w błonie śluzowej oskrzeli [90] oraz w indukowanej płwocinie u pa-

centów chorujących na astmę [91]. Leki blokujące CysLTR₁ hamowały powstawanie nacieku z eozynofilów, w odpowiedzi także na inne związki niż leukotrieny cysteinylowe [92], co świadczy o tym, że mechanizmie tym biorą udział leukotrieny endogenne. Przekonującym dowodem na rolę endogennych leukotrienów cysteinylowych w chemotaksji eozynofilów, jest doświadczenie na myszach 5 LOX^{-/-} (pozbawionych 5-lipooksygenazy), u których zachodzi pięćdziesięcioprocentowa redukcja nacieku eozynofilowego, po prowokacji owalbuminą [93]. Eozynofile są zaś miejscem syntezy leukotrienów cysteinylowych, co pozwala przypuszczać, że są transportarami leukotrienów do miejsca zapalenia [94] i głównymi ogniwami łańcucha dodatnich sprzężeń zwrotnych, skutkującego obfitym naciekiem zapalnym w oskrzelach. Dlatego też terapia lekami indukującymi apoptozę eozynofili, takimi jak glikokortykosterydy, powodująca zmniejszenie nacieku zapalnego, jest skuteczna w kontroli astmy. W związku z tym, bardzo ważnym aspektem stosowania antagonistów receptora CysLT₁ w leczeniu astmy jest możliwość łączenia ich z wziewnymi glikokortykosterydami. Połączenie takie zapewnia poprawę kontroli astmy u pacjentów, u których dotychczasowe leczenie nie dawało zadowalających wyników [95]. Jest to szczególnie istotne w przypadku dzieci i pacjentów leczonych wysokimi dawkami wziewnych leków sterydowych [96,97]. W wielu przypadkach umożliwia zredukowanie dawki glikokortykosterydów, utrzymując dobrą kontrolę objawów astmy, zmniejszając tym samym ryzyko powikłań po steroidoterapii [98]. Kolejnym punktem działania leukotrienów cysteinylowych w astmie, jest ich prawdopodobny udział w procesie przebudowy dróg oddechowych, czyli tzw. „remodelingu” [99,100]. Morfologicznymi wykładnikami tego procesu jest zwłóknienie podnabłonkowe, pogrubienie mięśniówki gładkiej, proliferacja naczyń, zniszczenie komórek nabłonka i przerost komórek kubkowych. Leukotrieny cysteinylowe mogą brać udział w tym procesie poprzez ich bezpośredni wpływ na mięśniówkę gładką, eozynofile, komórki nabłonka i wiele innych komórek, zawierających ich receptory. U myszy uczulonych na owalbuminę montelukast odwraca prawie wszystkie morfologiczne objawy przewlekłej astmy [101]. Leukotrieny cysteinylowe nasilają proliferację komórek mięśni gładkich działając synergistycznie z innym mitogenem-EGF (naskórkowym czynnikiem wzrostu) [102], którego stężenie w astmie jest podwyższone. Montelukast i pobelukast, ale nie zafirlukast znoszą ten efekt [103]. Wszystkie te zmiany mogą doprowadzić w efekcie do nieodwracalnej obturacji dróg od-

dechowych i znacznego ubytku przestrzeni wentylacyjnej [104].

Badania nad funkcją leukotrienów cysteinylowych i ich receptorów w patogenezie astmy oskrzelowej wymagają dalszej analizy, co w przyszłości może zaowocować jeszcze skuteczniejszą kontrolą astmy oraz zapobieganiem jej skutkom.

V-2. Układ sercowo-naczyniowy

Leukotrieny cysteinylowe powodują skurcz naczyń wieńcowych, zmniejszając przepływ wieńcowy u ludzi i zwierząt oraz działają inotropowo ujemnie [105-107]. *In vitro* udowodniono, że osłabienie siły skurczu serca nie jest wtórne do zmniejszonego przepływu wieńcowego [105]. Efekty takie wywołują nie tylko leukotrieny egzogenne, ale także leukotrieny endogenne, powstające *in situ*, w efekcie współpracy leukocytów z komórkami śródbłonka naczyń wieńcowych [108,109]. Antagon receptora CysLTR₁ - SKF88406 efektywnie hamuje osłabienie siły skurczu serca, w mniejszym stopniu przeciwdziałając skurczowi naczyń wieńcowych [110]. Badania te wskazują na możliwość działania leukotrienów cysteinylowych na serce przez różne receptory. Poprzez pomiar stężenia leukotrienów w moczu, udowodniono zwiększoną syntezę leukotrienów cysteinylowych u pacjentów, którzy przeszli epizody niedokrwienia mięśnia sercowego: zawał mięśnia sercowego i napady duszniczy bolesnej, w porównaniu do pacjentów z bólami w klatce piersiowej, nie wynikającymi z niedokrwienia [111,112]. Leukotrieny mają wpływ prawdopodobnie nie tylko na bezpośredni skurcz naczyń wieńcowych, ale także na uszkodzenia tkanek po następnej reperfuzji niedokrwionego obszaru. Blokowanie tych efektów osiągnano poprzez stosownie selektywnych inhibitorów 5-LOX i FLAP, a także substancji blokujących jednocześnie 5-LOX i COX, z redukcją obszaru zawału [113-116]. Znacznie bardziej różnorodny obraz wynika z badań nad antagonistami ich receptora typu pierwszego. Wyniki sugerujące udział leukotrienów cysteinylowych w powiększaniu obszaru niedokrwienia i uszkodzeniu tkanek po następnej reperfuzji [111,117,118] są zrównoważone przez dowody, które przeczą takiej ich roli w układzie sercowo-naczyniowym [119,120]. W świetle najnowszych badań, w których wykazano ekspresję mRNA CysLTR₂, a nie CysLTR₁ w naczyniach wieńcowych i mięśniu sercowym [25], wydaje się, że wyniki, w których nie zahamowano niedokrwienia i uszkodzeń po reperfuzji za pomocą antagonistów receptora CysLTR₁, są bliższe rzeczywistości. Wpływ leukotrie-

nów cysteinylowych na serce poprzez receptory CysLTR₂, będzie prawdopodobnie dokładniej zbadany na zwierzętach pozbawionych genu tego receptora, jeśli nie zostanie wcześniej opracowany jego swoisty inhibitor.

Dale i Laidl w udowodnili, że wykładnikiem ciężkiej reakcji anafilaktycznej jest nie tylko duszność, ale także ciężka hipotensja, będąca skutkiem zmiany napięcia naczyniowego poprzez pobudzone alergenem komórki zapalne [121].

Wielu badaczy zauważyło, że leukotrieny cysteinylowe regulują napięcie ścian naczyń w łożysku naczyniowym u różnych gatunków, będąc zarówno mediatorami skurczu, jak i rozkurczu. Walch i wsp. opierając się na wynikach wielu badaczy zaproponowali model rozmieszczenia receptorów leukotrienów cysteinylowych w krążeniu płucnym [67]. Rozkurcz indukowany przez leukotrieny cysteinylowe zachodził, według nich, poprzez stymulację receptorów obecnych w śródbłonku tętnicy płucnej. Śródbłonek ludzkiej tętnicy płucnej miał zawierać CysLTR₂, a jego aktywacja indukowałaby uwalnianie tlenku azotu (NO). Nieznany receptor w komórkach mięśni gładkich tętnicy miał być natomiast odpowiedzialny za skurcz. W śródbłonku żyły płucnej obecne są oba typy receptorów. Aktywacja CysLTR₁ indukuje uwalnianie czynników kurczących naczynia, podczas gdy aktywacja CysLTR₂ indukuje rozkurcz poprzez NO. Pobudzenie CysLTR₂ w komórkach mięśni gładkich żyły płucnej powoduje jej skurcz [67].

Model ten później zmodyfikowano, ze względu na to, że receptor w śródbłonku tętnicy płucnej nie był wrażliwy ani na antagony CysLTR₁, ani na częściowego antagona CysLTR₁/CysLTR₂ i prawdopodobnie pośredniczył w rozkurczu poprzez prostacyklinę [122]. Ostatecznie wydaje się, że rozkurcz naczyń żylnych w krążeniu płucnym wywołany przez leukotrieny cysteinylowe, odbywa się poprzez tlenek azotu, podczas gdy w naczyniach żylnych krążenia systemowego raczej poprzez metabolity ścieżki cyklooksygenazy [70,123].

V-3. Układ nerwowy i hormonalny

Ekspresja receptorów CysLTR₁ i jeszcze bogatsza ekspresja CysLTR₂ w ośrodkowym układzie nerwowym zwraca uwagę na ich prawdopodobną i na razie słabo poznaną funkcję w tym obszarze. Obecność leukotrienów cysteinylowych w mózgu szczura i ich wiązanie się z jeszcze wówczas niezdefiniowanymi receptorami, zauważono już w latach osiemdziesiątych [124]. Prawdopodobnie leukotrieny odgry-

wają rolę w patogenezie udaru niedokrwiennego. Zwiększone stężenie LTC₄ wykrywano od 0 do 6 godzin po incydencie niedokrwienia u gerbilla i po pierwszej dobie, czemu towarzyszyło uszkodzenie bariery krew-mózg i narastanie obrzęku mózgu [125]. Zauważono, że zastosowanie inhibitora CysLTR₁ ONO-1078 istotnie zmniejsza obszar udaru niedokrwiennego i w mniejszym stopniu wpływa na zmniejszenie ubytków neurologicznych u myszy [126] i szczurów [127,128]. Zwiększoną syntezę leukotrienów cysteinylowych wykazano również w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym [129] i krwotokiem wewnątrzczaszkowym [130]. Dodatkowo, u myszy 5 LOX^{-/-} stwierdzono mniejszą skłonność do niepokoju i lęku, co zwraca uwagę na prawdopodobną funkcję 5-LOX i jej produktów w kształtowaniu zachowań o podłożu afektywnym [131]. Opisane są także dwa przypadki dzieci z defektem syntezy leukotrienów cysteinylowych [132]. Cechami charakterystycznymi tego zespołu są: ciężka hipotonia mięśniowa, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, brak prawidłowego rozwoju i wzrostu, mikrocefalia i całkowity brak leukotrienów cysteinylowych w płynach ustrojowych.

Bogata ekspresja CysLTR₂ w rdzeniu nadnerczy, jest jednym z najbardziej nieoczekiwanych odkryć wynikających ze sklonowania genu tego receptora. Do tej pory nie opisywano wpływu leukotrienów cysteinylowych na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Badano zaś ich wpływ na podwzgórze i przysadkę. Wykryto, że LTC₄ stymuluje uwalnianie hormonu luteinizującego - LH z przedniego płata przysadki szczurów [133] oraz hormonu uwalniającego hormon luteinizujący - LHRH z wyniosłości środkowej [134] zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [135]. Żaden z antagonów CysLTR₁ nie blokował stymulacji uwalniania LHRH, wywołanego przez leukotrieny cysteinylowe, co w świetle obecnej wiedzy wskazuje na udział CysLTR₂ w tym procesie.

V-4. Nowotwory

Ostatnio pojawiają się także doniesienia na temat udziału leukotrienów cysteinylowych i ich receptorów w patogenezie nowotworów. Ohd i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję CysLTR₁ w komórkach raka jelita grubego (Caco-2), korelującą ze zwiększonym stężeniem 5-lipooksygenazy (5-LOX) i cyklooksygenazy-2 (COX-2), w porównaniu ze zdrowym nabłonkiem jelitowym [136]. Co więcej, w grupie pacjentów z wysoką ekspresją CysLTR₁ zaobserwowano niższą przeżywalność, w porównaniu do

grupy z niską ekspresją tego receptora [136]. Wykazano także, że LTD₄ podwyższa stężenie COX-2 oraz białka anty-apoptotycznego Bcl-2 w komórkach Caco-2 [137]. Dodatkowo odkryto, że LTD₄ poprzez CysLTR₁ indukuje wzrost ekspresji i aktywację $\alpha_2\beta_1$ integrzyn w komórkach Caco-2, co powoduje ich zwiększoną adhezję do kolagenu typu I [138]. Wyniki te sugerują, że leczenie antyleukotrienowe mogłoby wspomagać farmakoterapię przeciwnowotworową.

Wykazano także, że antagonistą CysLTR₁ - ONO 1078 hamuje funkcję białka MRP (MRP - ang. *Multi-drug Resistant Proteine*), zwiększając tym samym wrażliwość komórek raka płuca na leczenie winkrystyną [139]. W piśmiennictwie pojawiają się też wzmianki o poszukiwaniu możliwości stosowania antagonistów CysLTR₁ oraz inhibitorów różnych produktów przemiany kwasu arachidonowego w farmakoterapii nowotworów trzustki, płuc, gruczołu krokowego, piersi i skóry [140,141].

VI. Podsumowanie

Identyfikacja receptorów i ich rozmieszczenia w tkankach, zwłaszcza CysLTR₂ w sercu, ośrodkowym układzie nerwowym i nadnerczach, zwróciły uwagę na możliwe, szersze znaczenie leukotrienów cysteinylowych w fizjologii i patofizjologii niż tradycyjnie przypisywana im do tej pory rola mediatorów zapalenia. Badania na zwierzętach pozbawionych genów kodujących te receptory oraz opracowanie skutecznego inhibitora receptora typu drugiego, pozwolą przyjrzeć się „nowym” funkcjom leukotrienów cysteinylowych. Ponadto, zbadanie wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału poprzez te receptory, a także regulacji ich ekspresji fizjologicznej i w czasie wielu stanów chorobowych, pozwoli na opracowanie jeszcze skuteczniejszych metod terapeutycznych.

Artykuł otrzymano 4 grudnia 2003

Zaakceptowano do druku 20 maja 2004

Piśmiennictwo:

- Leff AR (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S125-S132
- Izumi T, Yokomizo T, Obinata H, Ogasawara H, Shimizu T (2002) *J Biochem* **132**: 1-6
- O'Byrne PM (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S68-S72
- Drazen JM (1998) *NY Acad Sci* **524**:289-95
- Kumlin M (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S102-S106
- Feldberg W, Kellaway CH (1938) *J Physiol* **94**:187-226
- Kellaway CH, Trethewie (1940) *J Exp Med* **30**:121-145
- Garrity ER, Stimler N, Munoz MN *et al.* (1983) *J Appl Physiol* **55**:1803-10
- Blocklehurst WE (1960) *J Physiol* **151**:416-435
- Morris HR, Taylor W, Piper PJ, Sirois P, Tippins (1978) *FEBS Lett* **87**:203-206
- Orange RP, Murphy RC, Austen KF (1974) *J Immunol* **113**:316
- Strandberg K, Uvnäs B (1971) *Acta Physiol Scand* **82**:358-374
- Bach MK, Brashler JR, Gorman RR (1977) *Prostaglandins* **14**:21
- Jakschik BA, Falkenhein S, Parkr CW (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:4577-4581
- Samuelsson B (1983) *Science* **220**:568-575
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987) *Science* **237**:1171-1176
- Vane JR (1971) *Nature New Biol* **231**:232-235
- Yokomizo T, Masuda K, Kato K, Toda A, Izumi T, Shimizu T (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S51-S55
- Lam BK, Austen KF (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S16-S19
- Peters-Golden M, Brock TG (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S36-S40
- Coleman RA, Eglen RM, Jones RL, Narumiya S, Shimizu T, Smith WL, Dahlen SE, Drazen JM, Gardiner PJ, Jackson WT *et al.* (1995) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* **23**:283-285
- Yokomizo T, Masuda K, Kato K, Toda A, Izumi T, Shimizu T (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S51-S55
- Lynch KR, O'Neil GP, Liu Q, Im D-S, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N *et al.* (1999) *Nature* **399**:799-793
- Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB *et al.* (1999) *Mol Pharm* **56**:657-663
- Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T *et al.* (2000) *Bioch Biophys Res Comm* **274**:316-322
- Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid RK, Lin SHS, Civelli O (2000) *Mol Pharmacol* **58**:1601-1608
- Heise CE, O'Dowd FD, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im D-S, Stocco R, *et al.* (2000) *J Biol Chem* **275**:30531-30536
- Funk CD, Furci L, Moran N, Fitzgerald GA (1993) *Mol Pharmacol* **44**:934-939
- Kobayashi T, Kiriyama M, Hirata T, Ushikubi F, Narumiya S (1997) *J Biol Chem* **272**:15154-15160
- Gronroos E, Andersson T, Schippert A, Zheng L, Sjolander A. (1996) *Biochem J* **15**:316(Pt 1):239-245
- Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Krueger KM, Touhara K, Lefkowitz RJ (1997) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31**:263-277
- Simonson MS, Mene P, Dubyak GR, Dunn MJ (1988) *Am J Physiol* **255** (6 Pt 1) : C771-80
- Sjolander A, Gronroos E (1994) *Ann N Y Acad Sci* **15**:744:155-60
- Gronroos E, Thodeti CK, Sjolander A. (1998) *Cell Calcium* **24**(1): 9-16
- Dumitriu D, Prie S, Bernier SG, Guillemette G, Sirois P (1997) *J Pharmacol Exp Ther* **280**(3):1357-1365
- Chan CC, Ecclestone P, Nicholson DW, Metters KM, Pon DJ, Rodger IW (1994) *J Pharmacol Exp Ther* **269**(3):891-896
- Mong S, Wu HL, Wong A, Sarau HM, Crooke ST (1988) *J Pharmacol Exp Ther* **247**(2):803-813
- Liu M, Simon M (1996) *Nature* **382**(6586):83-87
- Bouchelouche PN, Berild D. (1991) *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **204**:47-55
- Gronroos E, Schippert A, Engstrom M, Sjolander A (1995) *Cell Calcium* **17**(3):177-186
- Thodeti CK, Adolfsson J, Juhas M, and Sjölander A (2000) *J Biol Chem* **275**

- (13)pp9849-9853 42.Saegusa S, Tsubone H, Kuwahara M (2001) *Eur J Pharmacol* **413** (2-3):163-171
43. Accomazzo MR, Rovati GE, Viganò T, Hernandez A, Bonazzi A, Bolla M, Fumagalli F, Viappiani S, Galbiati E, Ravasi S, Albertoni C, Di Luca M, Caputi A, Zannini P, Chiesa G, Villa AM, Doglia SM, Folco G, Nicosia S (2001) *Am J Respir Crit Care Med* **163**(1):266-72
 44. Hoshino M, Izumi T, Shimizu T (1998) *J Biol Chem* **273** (9) pp 4878-4882
 45. Dahlen SE (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S41-S45
 46. Nicosia S, Capra V, Ravasi S, Rovati GE (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S46-S50
 47. Gardiner PJ, Norman P, Cuthbert NJ, Tudhope SR, Abram TS (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **238**:19-26
 48. Snyder DW, Krell RD (1986) *Prostaglandins* **32**:189-200
 49. Cuthbert NJ, Abram TS, Gardiner PJ (1991) *Ann NY Acad Sci* **629**:402-404
 50. Gardiner PJ, Abram TS, Cuthbert NJ (1990) *Eur J Pharmacol* **182**:291-299
 51. Snyder DW, Krell RD (1984) *J Pharmacol Exp Ther* **231**:616-622
 52. Tudhope SR, Cuthbert NJ, Abram TS, Jennings MA, Maxey RJ, Thompson AM, Norman P, Gardiner PJ (1994) *Eur J Pharmacol* **264**:317-323
 53. Hogaboom GK, Mong S, Wu H-L, Crooke ST (1983) *Biochem Biophys Res Commun.* **116**:1136-1143.
 54. Pong S-S, DeHaven RN, Kuehl FAJ, Egan RW (1983) *J Biol Chem* **258**:9616-9619
 55. Norman P, Abram TS, Cuthbert NJ, Tudhope SR, Gardiner PJ (1994) *Eur J Pharmacol* **271**:73-78
 56. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T, Izumi T (2002) *J Biol Chem* **277**:18763-18768
 57. Hui Y, Yang G, Galczynski H, Figueroa DJ, Austin CP, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Funk C (2001) *J Biol Chem* **276**:47489-47495
 58. Nicosia S, Capra V, Rovati GE (2001) *Pharmacology & Therapeutics* **14**:3-19
 59. Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP, Evans JF (2001) *Am J Respir Crit Care Med* **163**: 226-233
 60. Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K. (2001) *Clin Exp Allergy* **31**:1714-1723
 61. Thivierge M, Doty M, Johnson J, Staňková J, Rola-Pleszczyński M (2000) *J Immunol* **165**:5221-5226
 62. Thivierge M, Staňková J, Rola-Pleszczyński M (2001) *J Immunol* **167**: 2855-2860
 63. Mellor EA, Mackawa A, Austen KF, Boyce JA (2001) *PNAS* **98**(14):7964-7969
 64. Frey EA, Nicholson DW, Metters KM (1993) *Eur J Pharmacol* **244**:239-250
 65. Rochette C, Nicholson DW, Metters KM (1993) *Biochem Biophys Acta* **1177**(3):283-290
 66. Sjöstrom M, Jakobsson P-J, Heimburger M, Palmblad J, Haeggstrom JZ (2001) *Eur J Biochem* **268**:2578-2586
 67. Walch L, Norel X, Gascard J-P, and Brink C (2000) *Functional Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S107-S111
 68. Folco G, Rossoni G, Buccellati C, Berti F, Maclouf J, and Sala A (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** S112-S116
 69. Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto S-I, Saito T, Soga T, Matsushime H, Fumichi K (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **287**:1088-1092
 70. Ortiz J L, Gorenne I, Cortijo J, Seller A, Labat C, Sarria B, Abram T S, Gardiner P J, Morcillo E, Brink C (1995) *Br. J. Pharmacol.* **115**:1382-1386
 71. Amrani Y, Moore PE, Hoffman R, Shore SA, Pannetieri Jr RA (2001) *Am J Respir Crit Care Med* **164**:2098-2101
 72. Gronert K, Martinsson-Nikansen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN (2001) *Am J Pathol* **158**:3-9
 73. Dahlen S.-E., Hedqvist P, Hammarström S, Samuelsson B (1980) *Nature* **288**:484-486
 74. Jones TR, Davis C, Daniel EE (1982) *Pharmacological Can J Physiol Pharmacol* **60**:638-643
 75. Bisgaard H, Groth S (1987) *Clin Sci* **72**:585-92
 76. Gorenne I, Norel X, Brink C (1996) *Trends Pharmacol Sci* **17**:342-345 77. Davidson A B, Lee TH, Scanlon PD, Solway J, McFadden ER, Ingram RH, Corey EJ, Austen KF, Drazen JM (1987) *Am Rev Respir Dis* **135**:333-337
 78. Shida T, Yui Y (1993) *Rinsho Iyaku* **9**:209-216
 79. Smith L. J, Glass M, Minkwitz MC (1993) *Clin Pharmacol Ther* **54**:430-436
 80. Marom Z, Shelheimer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M (1982) *Am Rev Respir Dis* **126**:449-451
 81. Bisgaard H, Pedersen M (1987) *Clin Allergy* **17**:95-103
 82. Noonan MJ, Chervinsky P et al. (1998) *Eur Respir J* **11**:1232-1239
 83. Fish JE, Kemp JP, Lockey RF, Glass M, Hanby LA, Bonuccelli CM. (1997) *Clin Ther* **19**(4):675-90
 84. Nathan RA, Bernstein JA et al. (1998) *J Allergy Clin Immunol* **102**:935-42
 85. Dahlen S-E, Björk J, Hedqvist P, Arfors K-E, Hammarström S, Lindgren J-Å, Samuelsson B (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:3887-3891
 86. Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA (1987) *Am J Pathol* **126**:19-24
 87. Kanwar S, Johnston B, Kubes P (1995) *Circ Res* **77**:879-887
 88. Pedersen KE, Bochner BS, Undem BJ (1997) *J Pharmacol Exp Ther* **281**:655-662
 89. Chan C-C, McKee K, Tagari P, Chee P, Ford-Hutchinson A (1990) *Eur J Pharmacol* **191**:273-280
 90. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkkä V, Spur BW, Lee TH (1993) *Lancet* **341**:989-990
 91. Diamant Z, Hiltermann JT, van Rensen EL, Callenbach PM, Veslic-Charvat M, van der Veen H, Sont JK, Sterk PJ (1997) *Am J Respir Crit Care Med* **155**:1247-1253
 92. Turner CR, Smith WB, Andersen CJ, Swindell AC, Watson JW (1994) *Pulm Pharmacol* **7**:49-58
 93. Irvin CG, Tu YP, Sheller JR, Funk CD (1997) *Am J Physiol* **272**(6 Pt 1):L 1053-1058
 94. Leff AR (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161** pp S125-S132
 95. Laviolette M, Malmstrom K, Lu S, Chervinsky P, Pujet JC, Peszek I, Zhang J, Reiss TF (1999) *Am J Respir Crit Care Med* **160**(6):1862-1868
 96. Simons FE, Villa JR, Lee BW, Teper AM, Lyttle B, Aristizabal G, Laessig W, Schuster A, Perez-Frias J, Sekerel BE, Menten J, Leff JA. (2001) *J Pediatr* **138**(5):694-698
 97. Virchow CJ, Prasse A, Naya I, Summerton L, Harris A. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **162**(2 Pt 1):578-585
 98. Tohda Y, Fujimura M, Taniguchi H, Takagi K, Igarashi T, Yasuhara H, Takahashi K, Nakajima S (2002) *Clin Exp Allergy* **32**(8):1180-1186
 99. Kips JC, Pauwels RA (1999) *Clin Exp Allergy* **29**:1457-1466
 100. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ (1999) *J Clin Invest* **104**:1001-1006
 101. Henderson Jr WR, Tang LO, Cho SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi E Y (2002) *Am J Respir Crit Care Med* **165**:108116
 102. Amishima M, munakata M, Nashuhara Y, Sato A, Takahashi T, Homama Y, Kawakami Y (1998) *Am J Respir Crit Care Med* **157**:1907-1912
 103. Pannetieri Jr RA, Tan EML, Ciocca V, Luttmann MA, Leonard TB, Hay DWP (1998) *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**:453-461
 104. Bisgaard H (2000) *Paediatr Pulmonol* **30**:166-176
 105. Burke JA, Levi R, Guo Z-G, Corey E-J (1982) *J Pharmacol Exp Ther* **221**:235-241

106. Roth DM, Lefer DJ, Hoch CE, Lefer AM (1985) *Am J Physiol* **249**:H477-484
107. Michelassi F, Landa L, Hill RD, Lowenstein E, Watkins WD, Petkau AJ, Zapol WM (1982) *Science* **217**:841-843
108. Folco G, Rossoni G, Buccellati C, Berti F, Maclouf J, Sala A (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161**: S112-S116
109. Sala A., G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, G. C. Folco, and J. Maclouf. (1993) *Br J Pharmacol* **110**:1206-1212
110. Burke JA, Levi R, Gleason JG (1984) *J Cardiovasc Pharmacol* **6**: 122-125
111. Carry M, Korley V, Willerson JT, Weigelt L, Ford-Hutchinson AW, Tagari P (1992) *Circulation* **85**:230-236
112. Hock CE, Beck LD, Papa LA (1992) *Cardiovasc Res* **26**:1206-1211
113. Hashimoto H, Miyazawa K, Hagiwara M, Miyasaka K, Nakashima M (1990) *Arzneim Forsch* **40**:126-129
114. Sasaki K, Ueno A, Kawamura M, Katori M, Shigehiro S, Kikawada R (1987) *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* **17**:381-383
115. Amsterdam EA, Pan HL, Rendig SV, Symons JD, Fletcher MP, Longhurst JC (1993) *J Am Coll Cardiol* **22**:1738-1744
116. Toki Y, Hieda N, Torii T, Hashimoto H, Ito T, Ogawa K, Satake T (1988) *Prostaglandins* **35**:555-571
117. Ito BR, Roth DM, Engler RL (1990) *Cir Res* **66**: 596-607
118. Ito T, Toki Y, Hieda N, Okumura K, Hashimoto H, Ogawa K, Satake T (1989) *Jpn Cir J* **53**:1115-1121
119. Hahn RA, MacDonald BR, Simpson PJ, Potts BD, Parli CJ (1990) *J Pharmacol Exp Ther* **253**:58-66
120. Egan JW, Griswold DE, Hillegass LM, Newton JF, Eckardt RD, Slivjak MJ, Smith EF (1989) *Prostaglandins* **37**:597-613
121. Dale HH, Laidlaw PP (1911.) *J Physiol* **41**:318-344
122. Back M, Norel X, Walch L, Gascard J, de Montpreville V, Dahlen S, Brink C (2000) *Eur J Pharmacol* **401**:389-395
123. Allen SP, Chester AH, Piper PJ, Sampson AP, Akl ESK, Yacoub MH (1992) *Br J Clin Pharmacol* **34**:409-414
124. Lindgren JA, Hokfelt T, Dahlen SE, Patrono C, Samuelsson B (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:6212-6216
125. Rao AM, Hatcher JF, Kindy MS, Dempsey RJ (1999) *Arachidonic Neurochem Res* **24**(10):1225-32
126. Zeng LH, Zhang WP, Wang RD, Wang PL, Wei EQ (2001) *Yao Xue Xue Bao* **36**(2):148-50-Abst.
127. Zhang WP, Wei EQ, Mei RH, Zhu CY, Zhao MH (2002) *Acta Pharmacol Sin* **23**(10):871-7
128. Cicceri P, Rabuffetti M, Monopoli A, Nicosia S (2001) *Br J Pharmacol* **133**(8):1323-9
129. Rosnowska M, Cendrowski W, Sobczyk W (1997) *Pol Merkuriusz Lek* **2**:254-255
130. Winking M, Deinsberger W, Joedicke A, Boeker DK (1998) *Cerebrovasc Dis* **8**:318-326
131. Uz T, Dimitrijevic N, Tueting P, Manev H (2002) *Restor Neurol Neurosci* **20**(1-2):15-20
132. Mayatepek E (2000) *Eur J Pediatr* **159**(11):811-813.
133. Hulting AL, Lindgren JA, Hokfelt T, Eneroth P, Werner S, Patrono C, Samuelsson B (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:3834-3838
134. Gerozissis K, Saadi M, Dray F (1987) *Brain Res* **416**:54-58
135. Saadi M, Gerozissis K, Rougeot C, Minary P, Dray F (1990) *Life Sci* **46**:1857-1865
136. Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Lofberg H, Sjolander A (2003) *Gastroenterology* **124**(1):57-70
137. Wikstrom K, Ohd JF, Sjolander A (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **302**(2):330-335
138. Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjolander A (2003) *Exp Cell Res* **289**(2):342-51
139. Nakano R, Oka M, Nakamura T, Fukuda M, Kawabata S, Terashi K, Tsukamoto K, Noguchi Y, Soda H, Kohno S (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1):307-12
140. Kennedy TJ, Chan CY, Ding XZ, Adrian TE (2003) *Expert Rev Anticancer Ther* **3**(4):525-36
141. Steele VE, Holmes CA, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC, Kelloff GJ (1999) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(5):467-83

Czy błonowe tratwy lipidowe biorą udział w aktywacji płytek krwi?

Do membrane lipid rafts take part in blood platelet activation?

BEATA OLAS

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura i funkcje błony płytek krwi
- III. Budowa błonowych tratw lipidowych
- IV. Aktywacja płytek krwi przez kolagen z udziałem GPVI; rola błonowych tratw lipidowych
- V. Rola błonowych tratw lipidowych w aktywacji płytek krwi z udziałem receptora FcγRIIIa
- VI. Przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów sprzężonych z białkami G w błonowych tratwach lipidowych
- VII. Przekazywanie sygnałów z udziałem przemiany fosfatydyloinozytolu w błonowych tratwach płytek krwi
- VIII. Zmiany stężenia cholesterolu w błonie płytek krwi w stanach patologicznych
- IX. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and function of platelet membrane
- III. Structure of membrane lipid rafts
- IV. Implication of GPVI in blood platelet activation induced by collagen; the role of membrane lipid rafts
- V. The role of membrane lipid rafts in FcγRIIIa-mediated blood platelet activation
- VI. G-protein coupled receptor transduction signaling in membrane lipid rafts
- VII. Phosphoinositide (PtdIns) transduction signaling pathway in platelet membrane rafts
- VIII. Variation of platelet membrane cholesterol concentration on pathophysiology
- IX. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ADP — adenylozodifosforan; ATP — adenylozotrifosforan; BCR — receptory antygenowe limfocytów B (ang. *B-cell antigen receptor*); BH — ang. *breakpoint-chester-region homology domain*; BTK — kinaza tyrozynowa Bruton (ang. *Bruton tyrosine kinase*); CD — antygeny różnicowania leukocytów (ang. *cluster of differentiation*); DAG — diacyloglicerol; Domeny PH — domeny homologiczne do sekwencji aminokwasowych w białku plekstrynie (ang. *pleckstrin homology*); GP — glikoproteina; Ins(1,4,5)P₃ — inozytolo-trisfosforan; ITAM — (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); LAT — łącznik aktywacji limfocytów T (ang. *linker for activation of T cells*); łańcuch γ FcRIIIa — łańcuch γ receptora Fc o wysokim powinowactwie do IgE (ang. *chain of the high-affinity receptor of IgE*); MβCD — metylo-β-cyklodekstryryna; PAF — czynnik aktywujący płytki (ang. *platelet activating factor*); PAR — (ang. *proteolytically activated receptor*); PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanoloamina; PI-3K — kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PKC — kinaza białkowa C; PLC — fosfolipaza C; PLCβ₂ — fosfolipaza C typu β₂; PLCγ₂ — fosfolipaza C typu γ₂; PS — fosfatydyloseryna; PtdIns — fosfatydyloinozytol; PtdIns(3)P — fosfatydyloinozytolo(3)fosforan; Pt-dIns(3,4)P₂ — fosfatydyloinozytolo(3,4)bisfosforan;

Pt-dIns(3,4,5)P₃ — fosfatydyloinozytolo(3,4,5)trisfosforan; PtdIns(4)P — fosfatydyloinozytolo(4)fosforan; PtdIns(4,5)P₂ — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; PtdIns(5)P — fosfatydyloinozytolo(5)fosforan; PtdOH — kwas fosfatydowy; SH2 — domena homologiczna do domeny 2 kinaz rodziny src (ang. *Src homology 2 domain*); SLP-76 — białko leukocytów zawierające domenę homologiczną do domeny SH2 kinaz rodziny src (ang. *src homology 2 domain-containing leukocyte protein*); SM — sfingomielina; SPARC — (ang. *secreted protein acidic and rich in cysteine*); src — mięsak (ang. *sarcoma*); TCR — receptory antygenowe limfocytów T (ang. *T-cell antigen receptor*); TRAP — ang. *thrombin receptor activating peptide*; TXA₂ — tromboksan A₂; VASP — ang. *vasodilator stimulated phosphoprotein*

I. Wstęp

Wzmocniona aktywacja płytek krwi jest przyczyną wielu różnych stanów chorobowych jak np. miażdżyca i choroby układu krążenia. Płytki krwi są najmniejszymi, bezjądrzastymi elementami morfotycznymi (średnica 2-4 μm). Powstają one z cytoplazmy megakariocytów w szpiku kostnym i częściowo w płucach. Proliferację i różnicowanie komórek prekursorowych szeregu płytkotwórczego oraz dojrzewanie megakariocytów aż do wytworzenia płytek

krwi regulują różne cytokiny (interleukina 3 i 11, a przede wszystkim trombopoetyna). Czas życia nie uczestniczących w procesie hemostazy płytek krwi w krążeniu wynosi od 8 do 12 dni, po czym ulegają fagocytozie (głównie w śledzionie). Płytką krwi otoczona jest błoną cytoplazmatyczną, w której zlokalizowane są liczne receptory, sprzężone z enzymatycznymi systemami przekazywania informacji. Ma kształt dysku i charakterystyczny układ ziarnistości.

Aktywacja płytek krwi polegająca m. in. na adhezji, zmianie kształtu komórki, sekrecji i agregacji odgrywa istotną rolę w przebiegu prawidłowej hemostazy. Liczne i różnorodne pod względem budowy czynniki pełniące rolę agonistów inicjują aktywację płytek krwi przez związanie się ze specyficznym receptorem obecnym na powierzchni płytek. Wiele receptorów płytkowych to receptory sprzężone z białkami G. Ważnymi agonami wchodzącymi w interakcję z takimi receptorami są: trombina, tromboksan A_2 (TXA $_2$), ADP, adrenalina, płytkowy czynnik aktywujący (PAF) i wazopresyna. Niektóre z nich posiadają nawet kilka różnych pod względem budowy receptorów na płytce krwi. Trombina ma np. trzy różne receptory: dwa receptory typu PAR i glikoproteinę GPIb (GPIb) w kompleksie (GPIb/IX/V), natomiast ADP rozpoznawany jest przez płytkę za pomocą trzech różnych receptorów: P2Y $_1$, P2Y $_{AC}$ i P2X $_1$. Receptory P2Y $_1$ są odpowiedzialne za wywołanie sygnału aktywacji, receptory P2Y $_{AC}$ są odpowiedzialne za utrwalenie agregacji i potęgowanie sekrecji, natomiast receptory P2X $_1$ (jonotropowe) uczestniczą w napływie jonów wapnia do płytki krwi. Dokładną budowę oraz ich udział w przekazywaniu sygnałów w płytkach krwi został omówiony przez O l a s i W a c h o w i c z [1, 2]. Nasilenie aktywacji płytek krwi zależy od rodzaju i stężenia działającego agonu. W czasie aktywacji płytek krwi zachodzą dwie podstawowe przemiany biochemiczne: (1) hydroliza fosfatydyloinozytolu prowadząca do powstania dwóch wtórnych przekaźników informacji: diacyloglicerolu (DAG) i inozytolotrisfosforanu (Ins(1,4,5)P $_3$) oraz (2) przemiana arachidonianu i synteza eikozanoidów z wytworzeniem tromboksanu A_2 . Silne agony, jak trombina czy kolagen stymulują hydrolizę fosfatydyloinozytolu poprzez oddziaływanie z receptorami sprzężonymi z białkami G $_q$, natomiast słabe mają tylko nieznaczny wpływ albo wcale nie indukują hydrolizy fosfatydyloinozytolu. Po przyłączeniu aktywatora do specyficznego receptora obecnego na powierzchni płytek krwi dochodzi też do różnych zmian wewnątrz komórki, m. in. obserwuje się reorganizację cytoszkieletu, tworzenie filopodiów, ekspozycję receptora dla fibryno-

geny (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$) oraz sekrecję związków zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych. Fibrynogen łączy integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ sąsiadujących ze sobą płytek, powstają ich agregaty, co daje początek tworzeniu pierwotnego czopu hemostatycznego. Dynamiczne przemiany w pobudzonej płytce i uruchomienie molekularnych szlaków przekazywania sygnału obejmują nie tylko wewnątrz płytki krwi, ale również i błonę komórkową, w której dochodzi do zmian płynności matrycy lipidowej, zmian na powierzchni błony wraz z uaktywnieniem licznych receptorów oraz do odsłonięcia fosfolipidów biorących udział w procesie krzepnięcia krwi [3-7]. W funkcjonowaniu płytek krwi ważną rolę wydają się pełnić błonowe tratwy lipidowe (ang. *membrane lipid rafts*) — wysoko zorganizowane mikrodomeny błonowe zawierające glicerolipidy i sfingolipidy oraz cholesterol.

II. Struktura i funkcje błony płytek krwi

Półpłynna błona płytkowa, podobnie jak błona innych komórek, stanowi mozaikę swobodnie lateralnie dyfundujących i rotujących białek i lipidów. Składniki błony podlegają stałemu przemieszczeniu, białka zderzają się ze sobą przypadkowo, a lipidy w dwuwarstwie podlegają przemieszczaniu typu *flip-flop*. Zarówno białka, jak i lipidy odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu płytki krwi, zapewniając kontakt z otoczeniem oraz umożliwiając przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki. Wiele lipidów może funkcjonować jako cząstki sygnałowe, np. diacyloglicerol powstający w błonie komórkowej może aktywować białkową kinazę C (PKC). Lipidy są nie tylko istotnymi składnikami błony płytkowej, ale także odpowiadają za biologiczną aktywność płytki krwi. Zapewniają płynność błony płytkowej, aktywność koagulacyjną płytki oraz są źródłem aktywnych eikozanoidów. Stosunek lipidów do białek w całych ludzkich płytkach krwi wynosi 0,28 (w/w), natomiast w błonie jest znacznie wyższy - 0,58 (w/w). Fosfolipidy stanowią ok. 78% wszystkich lipidów płytkowych. W błonie ludzkich płytek krwi występują fosfolipidy nie tylko zawierające glicerol jak: fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloseryna (PS) oraz fosfatydyloinozytol (PtdIns), ale także sfingozynę jak: sfingomielina (SM). Procentową zawartość lipidów w błonie płytkowej przedstawiono w Tabeli 1. Obojętne lipidy stanowią średnio 28% całkowitej zawartości lipidów błony płytkowej; ich głównym przedstawicielem jest cholesterol. Cholesterol jest nie tylko ważnym składnikiem błony płytkowej; jego obecność stwierdzono także w cytoszkielecie płytko-

Tabela. 1.

Dystrybucja fosfolipidów i glikolipidów płytkowych ([8], zmodyfikowano)

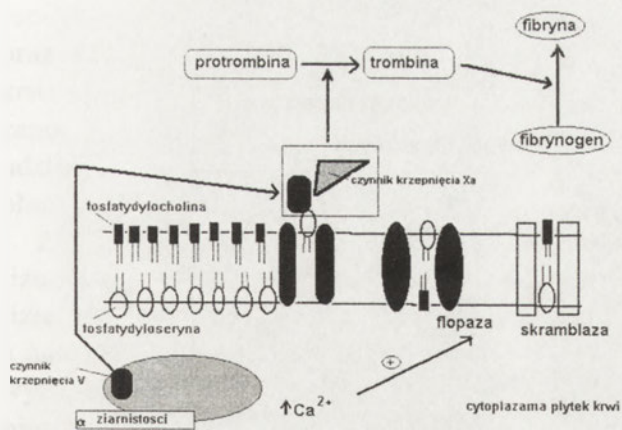
Płytkowe fosfolipidy	Procentowy skład fosfolipidów w monowarstwie		Fracje całkowitej zawartości fosfolipidów (%)	Płytkowe glikolipidy	nmol/10 ⁹ płytek krwi
	zewnątrznej błony (%)	wewnętrznej błony (%)			
Fosfatydylocholina (PC)	60	40	38	Ceramidy	3,48
Fosfatydyloetanolamina (PE)	20	80	27	Glukozaoceramid	0,022
Sfingomielina (SM)	90	10	17	Laktozoceramid	1,39
Fosfatydyloseryna (PS)	0	100	10	Triheksoceramid	0,56
Fosfatydyloinozytol (PtdIns)	0	100	5	Globozyd	0,42
				Gangliozyd II	>0,03

wym. Jednak tylko megakariocyty, ale nie płytki krwi, są zdolne do jego syntezy [8].

Ważną grupę lipidów błony płytek stanowią glikolipidy sfingozynowe zwane glikosfingolipidami albo cerebrozydami. Część polarną stanowią cząsteczki cukrów połączone z ceramidem wiązaniem O-glikozydowym. Wśród glikosfingolipidów wyróżnia się: obojętne - zawierające cząsteczki cukrów - oraz kwaśne - odznaczające się obecnością kwasu N-acetyloneuraminowego (sjalowego) lub kwasu siarkowego. Kwaśne glikosfingolipidy z kwasem sjalowym nazywane są gangliozydami, natomiast z kwasem siarkowym sulfoglikosfingolipidami. Ilości poszczególnych glikolipidów płytkowych stanowiących mniej niż 4% całkowitej zawartości lipidów zaprezentowano w Tabeli 1. Glikolipidy spełniają ważne role w dojrzewaniu płytek krwi oraz w prawidłowym funkcjonowaniu krwinek płytkowych [8]. Synteza glikosfingolipidów odbywa się poprzez kolejne dodawanie do ceramidu reszt glikozyłowych, czerpanych z aktywnych nukleotydujących pochodnych cukrowych.

Płytki krwi, w odróżnieniu od leukocytów i erytrocytów, charakteryzują się intensywnym metabolizmem lipidów, gdyż są zdolne do syntezy kwasów tłuszczowych i fosfolipidów *de novo*. Zwraca uwagę asymetryczne ułożenie lipidów w błonie płytkowej, co ma istotne znaczenie dla koagulacyjnej aktywności płytek krwi. Fosfatydylocholina i sfingomielina są obecne na powierzchni błony płytkowej, natomiast kwaśne fosfolipidy (m. in. PE, PS i PtdIns) są zlokalizowane w części wewnętrznej błony (Tab. 1). Takie rozmieszczenie występuje również w erytrocytach i innych komórkach [8], ale tylko błona komórkowa płytek krwi jest częścią powierzchni, na której

zachodzą poszczególne etapy kaskady krzepnięcia krwi uwieńczone wytwarzaniem trombiny. Warunkiem kolejnych faz aktywacji licznych proteaz serynowych biorących udział w krzepnięciu krwi jest tworzenie na błonie płytkowej tzw. powierzchni prokoagulacyjnej z dużym udziałem wewnątrz błonowych aminofosfolipidów — PS i PE [9, 10]. Zaistnienie takiej prokoagulacyjnej powierzchni rozpoznawanej np. przez kompleks protrombinazy, jest z jednej strony warunkiem krzepnięcia krwi, a z drugiej zaś — nie byłoby możliwe bez aktywacji płytek krwi i postępującej symetryzacji rozmieszczenia fosfolipidów dwuwarstwy lipidowej błony płytkowej. Podczas aktywacji płytek krwi m. in. trombiną czy kolagenem następuje bardzo szybka redystrybucja niektórych fosfolipidów, zwłaszcza przemieszczenie PS, która pojawiając się w monowarstwie zewnętrznej błony nadaje jej własności prokoagulacyjne. Mechanizmy tych przemian nie są w pełni wyjaśnione. Istotne znaczenie przypisuje się mikrocząstkom (ang. *microparticles*) — małym fragmentom o średnicy < 0,5 μm pochodzącym z cytoplazmy płytek krwi podczas ich aktywacji. Mikrocząstki są otoczone błoną pęcherzykami, a fosfolipidy mikrocząstek mogą pochodzić z błony płytkowej i błon organelli płytkowych. Na powierzchni mikrocząstek określanych też mikrocząstkami wykazano zagęszczenie prokoagulacyjnych fosfolipidów oraz receptorów analogicznych do receptorów błony płytek. Uwalniany z ziarnistości płytkowych czynnik V jest wiązany na powierzchni aktywowanych płytek krwi i może stanowić receptor dla czynnika X (Ryc. 1) [11-22]. Za reorganizację fosfolipidów w błonie płytkowej odpowiedzialne są trzy enzymy: (1) translokaza aminofosfolipidowa, (2) flopaza i (3) skramb-



Ryc. 1. Aktywacji płytek krwi towarzyszy zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺, co umożliwia aktywację flopazy — enzymu powodującego m. in. transport fosfatydyloseryny do monowarstwy zewnętrznej błony płytkowej. W tych warunkach translokaza aminofosfolipidów jest także stymulowana przez nadmiar substratu w monowarstwie zewnętrznej. Za redystrybucję fosfolipidów błony płytkowej odpowiedzialna jest ponadto skramblaza, której aktywność zależy od stężenia ATP i od zawartości mostków dwusiarczkowych białek błonowych płytki. Przemieszczenie fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy błony warunkuje jej udział w przekształcaniu protrombiny w trombinę, ponieważ fosfatydyloseryna jest podstawowym składnikiem kompleksu protrombinazy (czynnik Va i Xa). Około 25% czynnika V znajdującego się w krwiobiegu pochodzi z płytek krwi, gdzie znajduje się on w ziarnistościach w połączeniu z białkiem multimeryną.

laza występująca w ilości 10³-10⁴ kopii na płytkę [23, 24].

III. Budowa błonowych tratw lipidowych

Błona płytkowa składa się z monomerów lub agregatów białkowych zawieszonych w dwuwarstwie lipidowej, co powoduje, że ma trzy właściwości: asymetryczność, dynamiczność i płynność. Błona ta podlega ciągłym zmianom. Zmiany wydają się bardziej specyficzne i ułożone w określonych miejscach niż przewidywał mozaikowy model błony. W błonie płytek krwi obecne są też liczne receptory błonowe umożliwiające dotarcie informacji niesionej przez bardzo różne substancje (aktywatory i inhibitory aktywacji płytek) do wnętrza płytki krwi. Wśród tych receptorów można wyróżnić: receptory stale występujące na powierzchni płytek krwi (zarówno w stanie pobudzonym, jak i podstawowym komórki) i receptory pojawiające się w następstwie aktywacji płytek krwi.

Pod koniec lat osiemdziesiątych stwierdzono, że w płytkowej błonie komórkowej mogą istnieć tratwy lipidowe, które prawdopodobnie uczestniczą w reorganizacji receptorów błony płytkowej oraz mogą stanowić podstawę dla procesów przekazywania sygnału i aktywacji płytek [25, 26]. Błonowe tratwy

mogą spełniać rolę tzw. platform sygnałowych [27], głównie dzięki istnieniu współdziałania pomiędzy receptorami obecnymi na powierzchni komórki, a białkami wewnątrzkomórkowymi [28]. Tratwy lipidowe są to mikrodomeny błon nierozpuszczalne w detergentach lub tworzące fragmenty błon. Są małymi strukturami czy domenami o średnicy 20-50 nm (dla porównania, grubość całej błony komórkowej wynosi zazwyczaj średnio 7,5 nm). Mogą istnieć różnego typu tratwy, np. w błonie komórkowej oraz w błonach różnych struktur komórkowych, m. in. ziarnistości, aparatu Golgiego czy fagosomów [29, 30]. Występowanie tratw stwierdzono m. in. w błonie neutrofilów [31], komórek nerwowych [32], komórek nabłonka [33] czy limfocytów [34]. W tratwach są obecne nie tylko lipidy, ale również różnego rodzaju białka: kinazy białkowe, fosfatazy białkowe, heterotrimeryczne białka G, "małe" białka G oraz inne, jeszcze nie zidentyfikowane [35-37]. Tratwy nie tylko mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów, ale mogą też brać udział w proteolizie wewnątrzkomórkowych lub błonowych białek [32].

W błonie ludzkich płytek krwi wysoki poziom sfingomieliny sprzyja powstawaniu struktur błonowych tratw. W tratwach błon płytkowych wykryto lipidy odgrywające rolę wtórnych przekaźników sygnałów oraz białka pełniące wielorakie funkcje (Tabela 2). Identyfikacja białek w tratwach błon płytkowych była możliwa m. in. dzięki zastosowaniu elektroforezy dwukierunkowej, za pomocą której udało się zidentyfikować w tych strukturach od 16 do 82 różnych białek płytkowych [36]. Za markera tratw lipidowych błon uważa się gangliozyd G_{M1} rozpoznawany przez toksynę cholery [38].

Od dawna było wiadomo, że lipidy obecne w błonie płytek uczestniczą w aktywacji tych komórek. Wykazanie obecności tratw lipidowych powstających podczas aktywacji płytek krwi wskazuje, że te struktury są ważne dla istotnych funkcji płytek. Przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w płytkach krwi aktywowanych trombiną, zaobserwowano wysoką fluorescencję w lipidowych tratwach błon zaangażowanych w tworzenie agregatów płytkowych. Może to sugerować istotną rolę tratw w aktywacji płytek krwi. G o u s s e t i wsp. [39] wykazali, że w czasie aktywacji płytek krwi niską temperaturą (poniżej 18°C) dochodzi do tworzenia agregatów płytkowych i w miejscach kontaktu płytek krwi obecne są tratwy błonowe (Ryc. 2), ale obecność tratw w agregatach płytkowych zależy od stężenia cholesterolu w błonach. Szczególnie wysoki poziom cholesterolu był obserwowany w filopodiach. Stwierdzono także, że powstawanie fosfatydyloino-

Tabela 2.

Lipidowe wtórne przekaźniki oraz białka obecne w błonowych tratwach płytek krwi

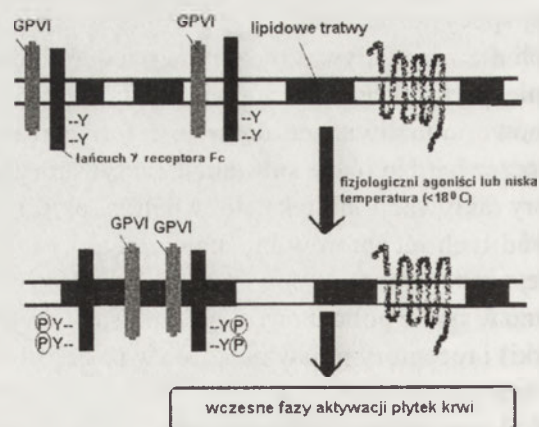
Białka obecne w tratwach błonowych	Lipidowe wtórne przekaźniki obecne w tratwach błonowych
<p>Białka sygnałowe: GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) GPIb GPVI FcγRIIa LAT p85α PLCγ_2 SLP-76 pp60^{src} kinaza Lyn kinaza Fyn CD36 podjednostka α_i i α_q białek G</p>	<p>PtdIns(4,5)P₂ PtdIns(3,4)P₂ PtdIns(3,4,5)P₃ PtdOH</p>
<p>Inne białka: białko CD9 transpoter glukozy GLUT-3 flotylina 1 i 2 stomatyna albumina β-tromboglobulina zasadowe białko płytek płytkowy czynnik 4 łańcuch α-fibrynogenu osteonektyna trombospondyna czynnik krzepnięcia V białko S multimeryna tymozyna β_4 SPARC</p>	

zytolo(3,4,5)trisfosforanu (PtdIns(3,4,5)P₃) ma miejsce w tratwach lipidowych błon. W tworzeniu błonowych tratw w płytkach uczestniczą glikoproteinowe receptory, m. in. GPVI (jeden z receptorów kolagenu), jak i kompleks GPVI-Fc γ RIIa. Fosforylacja receptora Fc γ RIIa jest kontrolowana przez ligand, który warunkuje formowanie błonowych tratw [40].

IV. Aktywacja płytek krwi przez kolagen z udziałem GPVI; rola błonowych tratw lipidowych

W błonie płytek krwi występuje kilka białek pełniących rolę receptora dla kolagenu. Najlepiej poznany pod względem budowy i funkcji są dwa receptory: integryna $\alpha_2\beta_1$ i glikoproteina VI (GPVI). Glikoproteina GPVI pełni funkcje receptora kolagenu niezbędnego do prawidłowej aktywacji płytek krwi. W błonie tworzy kompleks z łańcuchem Fc γ , co stanowi podstawę dla przekazywania informacji [41-44]. Cechą charakterystyczną aktywacji płytek krwi kolagenem przebiegającej z udziałem GPVI jest udział wielu białkowych kinaz tyrozynowych fosfo-

rylujących reszty tyrozynowe białkowych substratów w sposób niezależny od cykazy adenylanowej i białkowej kinazy C. Mechanizm przekazywania sygnału do płytek z udziałem GPVI jest bardzo zbliżony do mechanizmu wykorzystującego receptory antygenowe limfocytów (ang. *B- and T-cell antigen*



Ryc. 2. Powstawanie tratw lipidowych w błonie płytek krwi stymulowanych fizjologicznymi agonistami (trombina, kolagen) lub niską temperaturą (<18°C). Podczas aktywacji płytek krwi kolagenem ilość GPVI w błonowych tratwach lipidowych znacznie wzrasta. Obserwuje się ponadto fosforylację reszt tyrozynowych w łańcuchu receptora Fc. Dalsze objaśnienia w tekście.

receptor; BCR, TCR) [45]. Dokładna budowa GPVI oraz jej rola w przekazywaniu informacji w płytkach krwi została opisana przez K r a l i s z [45]. Jak wykazano, w czasie aktywacji płytek krwi kolagenem z udziałem receptora GPVI, ważną rolę spełniają błonowe tratwy lipidowe [46-48].

Płytki krwi są komórkami bardzo opornymi na lizę. Dopiero obciążone glicerolem łatwo ulegają lizie, co pozwala wyizolować ich błony komórkowe, a następnie użycie różnych detergentów umożliwia wyizolowanie błonowych tratw lipidowych. Po raz pierwszy B o e s z e - B a t t a g l i a i wsp. [46] zaobserwowali przemieszczanie się cholesterolu w błonie płytkowej w czasie aktywacji płytek krwi kolagenem, natomiast W a t s o n i wsp. [47] opisali także, że dochodzi wówczas do biochemicznych zmian w błonie płytkowej. L o c k e i wsp. [48] wykazali natomiast, że GPVI nie jest obecna w tratwach wyizolowanych z niepobudzonych płytek krwi, natomiast pojawia się w tratwach otrzymanych z płytek aktywowanych. Doświadczenia te wykonano z Tritonem-X-100 w niskim stężeniu. Używając Brij 58 jako detergentu do izolowania tratw błon, W o n e r o w i wsp. [49] stwierdzili znaczną ilość GPVI w błonowych tratwach wyizolowanych z płytek krwi w stanie spoczynkowym, natomiast nie obserwowali zmian w czasie aktywacji płytek krwi. Wyniki te raczej wskazują na powolną interakcję GPVI z tratwami błon. Za stabilizację interakcji GPVI z tratwami odpowiedzialny jest łańcuch γ receptora Fc [48], ale molekularne podstawy tego procesu nie są dostatecznie poznane. Ufosforylowany łańcuch γ receptora Fc jest obecny w tratwach błon, chociaż proces fosforylacji nie jest konieczny dla interakcji GPVI z mikrodomenami. Błonowe domeny łańcucha γ receptora Fc mogą spełniać istotną rolę w oligomeryzacji receptora GPVI, a reszty argininowe w błonowej domenie GPVI mogą formować mostki z błonowymi domenami łańcucha γ receptora Fc (dokładnie z resztami Asp). Nie wiadomo jeszcze, czy łańcuch Fc spełnia rolę tarczy dla GPVI w mikrodomenach czy spełnia rolę cząstki przekaźnikowej. Można przypuszczać, że fosforylacja łańcucha Fc jest ważnym procesem w budowaniu tratw błon, gdzie inne białka takie jak np. łącznik aktywacji limfocytów T (LAT; ang. *linker for activation of T cells*) koordynują ten proces [38]. Fosforylacja łańcucha γ receptora Fc przy udziale kinazy Lyn może zachodzić specyficznie w błonowych tratwach lipidowych, ponieważ stwierdzono większe stężenie Lyn w tych mikrodomenach [50].

V. Rola błonowych tratw lipidowych w aktywacji płytek krwi z udziałem receptora Fc γ RIIa

Przyłączenie kolagenu do receptora płytkowego GPVI powoduje m. in. fosforylację tyrozyn w łańcuchu γ receptora Fc, który tworzy stabilny kompleks z GPVI. W kompleksie tym GPVI spełnia rolę receptora dla kolagenu, natomiast łańcuch γ receptora Fc jest przekaźnikiem sygnału do wnętrza płytki krwi [51, 52]. B o d i n i wsp. [38] badając rolę błonowych tratw lipidowych w organizacji i integracji sygnałów zależnych od receptora Fc γ RIIa zaobserwowali, że kinaza Lyn oraz białko LAT są fosforylowane głównie na resztach tyrozynowych, a w czasie aktywacji płytek krwi dochodzi też do wytwarzania PtdIns(3,4,5)P₃, zależnego i potęgowanego aktywacją przez uwolniony ADP, który przyłączając się następnie do receptora P₂Y₁₂ współdziała z fosfolipazą PLC γ ₂ [53]. W ludzkich płytkach krwi aktywowanych przy udziale receptora Fc γ RIIa, podobnie jak przy udziale GPVI, zachodzi fosforylacja tyrozyny w cząsteczce fosfolipazy PLC γ ₂. Fosforylacja nie jest konieczna do aktywacji tego enzymu, natomiast wczesna synteza produktów działania PI-3K — PtdIns(3,4,5)P₃ jest niezbędnym etapem jego aktywacji [53]. PtdIns(3,4,5)P₃ może przede wszystkim wchodzić w interakcję z domeną PH i/lub domeną SH2 fosfolipazy PLC γ ₂ i uczestniczyć w przemieszczeniu i odpowiedniej lokalizacji tej fosfolipazy w komórce [53]. W ludzkich płytkach krwi powstawanie kwasu fosfatydowego (PtdOH) przez fosforylację DAG jest dobrym wskaźnikiem aktywacji enzymu PLC. Stwierdzono, że w płytkach krwi aktywowanych przez receptor Fc γ RIIa, w błonowych tratwach jest obecny PtdOH, a jego wytwarzanie hamują inhibitory PI-3K lub antagony receptora P₂Y₁₂ dla ADP. Tratwy błon powstałe przy udziale receptora Fc γ RIIa mogą być destabilizowane przez obniżenie ilości cholesterolu. Obniżenie może być wywołane metylo- β -cyklodekstryną (M β CD), np. M β CD w dawce 5 mM po 5 minutach działania obniżała ilość cholesterolu o ok. 45% w całych płytkach krwi. Kiedy ilość cholesterolu spadała o ok. 40%, obserwowano słabą sekrecję, natomiast nie obserwowano zaburzeń w zmianie kształtu płytki i agregacji w odpowiedzi na działanie trombiny w stężeniu powyżej 0,5 j/ml [38]. Takie kontrolowane obniżenie poziomu cholesterolu ma wpływ na dystrybucję błonowych tratw płytkowych oraz interakcję receptora Fc γ RIIa z tratwami bez istotnej fosforylacji tyrozyny w białkach, ale jednak produkcja PtdIns(3,4,5)P₃ i aktywacja PLC γ ₂ jest silnie hamowana w całych płytkach. Hamowanie to jest odwracal-

ne, jeżeli poziom cholesterolu powróci do normy. Wyniki te wskazują na ważną rolę lipidowego wtórnego przekaźnika - PtdIns(3,4,5)P₃ w prawidłowym funkcjonowaniu PLCγ₂ oraz kluczowych białek w przekazywaniu sygnału poprzez błonowe tratwy lipidowe [38].

Fosforylacja reszt tyrozynowych wywołana po przyłączeniu ligandu do receptora FcγRIIa była tylko słabo wrażliwa na obniżenie poziomu cholesterolu, natomiast w aktywacji płytek krwi kolagenem, fosforylacja reszt tyrozynowych była wysoce wrażliwa, co może sugerować, że istnieją dwie różne funkcje błonowych tratw w aktywacji płytek krwi z udziałem receptora FcγRIIa i GPVI [38].

VI. Przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów sprzężonych z białkami G w błonowych tratwach lipidowych

Trombina — silny aktywator płytek krwi - aktywuje płytki krwi za pomocą receptorów typu PAR, które należą do receptorów serpentynowych sprzężonych z wysokocząsteczkowymi białkami G. Na ludzkich płytkach krwi stwierdzono obecność receptorów PAR-1 i PAR-4. Receptor PAR-1 jest wrażliwy na działanie niskich dawek trombiny, natomiast PAR-4 tylko na wysokie jej dawki [54-57]. Stymulacja płytek krwi trombiną indukuje powstawanie tratw, co jest skorelowane z szybkim łączeniem się podjednostki α heterotrimerycznych białek G_q czy G_i z tratwami i produkcją lipidowych wtórnych przekaźników w tratwach. Przy obniżeniu poziomu cholesterolu przez MβCD dochodzi do sekrecji i agregacji płytek krwi stymulowanych trombiną w dawce poniżej 0,3 j/ml [38] jakkolwiek przy wysokich dawkach trombiny obserwowano, że obniżenie poziomu cholesterolu o ok. 40-50% nie ma wpływu na tworzenie agregatów płytkowych. Wyniki te są zgodne z założeniem, że błonowe tratwy są niezbędne w mechanizmie aktywacji płytek z udziałem receptora o wysokim powinowactwie do trombiny (PAR-1) [38].

VII. Przekazywanie sygnałów z udziałem przemiany fosfatydyloinozytolu w błonowych tratwach płytek krwi

Fosfatydyloinozytol jest fosfolipidem stanowiącym zaledwie ok. 5% całkowitej zawartości fosfolipidów błon komórkowych, ale jest on wysoce aktywną metabolicznie cząsteczką, która odgrywa ważną rolę w mechanizmach regulacji komórkowej. Szczególną rolę PtdIns spełnia w płytkach krwi [58]. W płytkach krwi PtdIns jest zarazem szybko syntety-

zowany, jak i rozkładany zarówno w błonie komórkowej, jak i w błonach różnych struktur komórkowych. Może on wchodzić w interakcję z różnymi białkami, np. z domenami podobnymi do plekstryny, domenami FYVE czy Phox (PX). W komórkach jądrzastych, podobnie jak w płytkach krwi, domeny błonowe bogate w cholesterol czy sfingolipidy są obecne w miejscach, gdzie zachodzi intensywny metabolizm PtdIns oraz dochodzi do produkcji DAG i Ins(1,4,5)P₃. W tratwach błon fosfatydyloinozytol występuje w niewielkiej ilości, ale dostatecznie dużej aby spełniać rolę cząstki sygnałowej w tych strukturach [58, 59]. Sugeruje się również, że białka włączone w dynamiczną organizację aktywy, m. in. białka należące do VASP, są niezbędne do wiązania PtdIns w błonowych tratwach lipidowych. Nie tylko PtdIns(4,5)P₂ spełnia ważną rolę w tratwach płytek. Istotną rolę spełnia także bardziej ufosforylowana forma - PtdIns(3,4,5)P₃, powstający w tratwach aktywowanych płytek krwi. Odgrywa on też ważną funkcję w stabilizowaniu PLCγ₂ czy innych enzymów zawierających domenę PH, takich jak kinaza tyrozynowa Bruton (ang. *Bruton tyrosine kinase*) czy kinaza Tek [60]. Obecność PtdIns(3,4,5)P₃ w błonowych tratwach lipidowych może wyjaśniać główny mechanizm aktywacji hematopetycznych komórek i rolę tego wtórnego przekaźnika w limfocytach.

VIII. Zmiany stężenia cholesterolu w błonie płytek krwi w stanach patologicznych

Zawartość cholesterolu w błonie płytkowej i aktywność biologiczna płytek krwi są ze sobą ściśle skorelowane. Synteza cholesterolu *de novo* zachodzi w megakariocytach, a nie w płytkach krwi. Płytki krwi nie mają zdolności wychwytywania i transportowania cholesterolu drogą endocytozy i nie gromadzą go. Istnieje mechanizm odnowy cholesterolu przez jego wymianę, co nie wywołuje istotnych zmian w poziomie cholesterolu w płytkach krwi [8]. Badania nad wpływem ilości cholesterolu w błonie na reaktywność płytek krwi budzą wiele kontrowersji. Wysoką korelację zaobserwowano pomiędzy wzrostem stężenia cholesterolu czy wzrostem stosunku cholesterol/fosfolipidy w błonie, a wzrostem reaktywności płytek w warunkach *in vitro*. Na przykład płytki krwi pacjentów z hipercholesterolemią typu IIa miały wyższe stężenie cholesterolu w błonie płytkowej [61] i wyższą reaktywność z kolagenem czy ADP [59]. Płytki krwi w obecności liposomów bogatych w cholesterol wykazywały podobne właściwości biologiczne; płytki były wysoce reaktywne, a proces ten był hamowany przez prosta-

glandynę E₁ [59]. In s e l i wsp. [62] zaobserwowali, że jeżeli stosunek cholesterol/fosfolipidy w błonie był niższy niż 0,51 stwierdzono obniżoną reaktywność płytek na epinefrynę czy ADP. Wyniki te mogą wskazywać, że poszczególne lipidy mogą spełniać istotną rolę we wczesnej fazie aktywacji płytek krwi. Sugeruje się także, że zmiany w stężeniu cholesterolu przypuszczalnie mogą wstępnie modyfikować organizację tratw błonowych, ale także mogą mieć wpływ na płynność błony płytkowej. Takie modyfikacje mogą być także odpowiedzialne za wzrost częstości występowania zakrzepów u pacjentów z hipercholesterolemią. Możliwe jest ponadto, że leki obniżające poziom cholesterolu głównie hamują funkcje płytek krwi i nie wyklucza się, że ich działanie związane jest z powstawaniem błonowych tratw [38].

IX. Podsumowanie

Błonowe tratwy lipidowe są obecnymi w błonie płytkowej wysoce dynamicznymi strukturami, uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału w płytkach. Podobnie jak w przypadku aktywacji komórek T [63], błonowe tratwy lipidowe obecne w płytkach krwi są zależne od receptorów zawierających motyw ITAM. Dokładna rola tych struktur w płytkach krwi wymaga jeszcze dalszych badań. Rozwój metod izolowania tratw w fizjologicznej temperaturze z użyciem detergentu jakim jest Brij 98 może być bardzo pomocny w badaniu natywnej struktury tratw oraz w identyfikacji białek i poznaniu ich roli w tych mikrodomenach. Obecnie wiadomo, że kompleks GPIIb-IX-V (palmitylowana podjednostka GPIIX i GPIIb) jest obecny w błonowych tratwach płytkowych, ale tylko w kilku kopiach na płytkach w stanie niepobudzonym (ok. 8% GPIIb-IX-V znajduje się w błonowych tratwach płytek) [64, 65]. Stymulacja płytek krwi powoduje jednak, że liczba kopii kompleksu GPIIb-IX-V wzrasta wielokrotnie (3 - 6 krotnie) i w obecności czynnika von Willebranda liczba GPIIb-IX-V w błonowych tratwach wzrasta do ok. 26% [66]. Wykazano, że w tratwach glikoproteina GPIIb jest połączona z receptorem FCγRIIa, ale zastosowanie przeciwciał przeciwko FCγRIIa znosi taką asocjację. Jeżeli natomiast obniżony zostanie poziom cholesterolu w błonach, obserwuje się zmniejszanie się wiązania czynnika von Willebranda z kompleksem GPIIb-IX-V. Obniżenie poziomu cholesterolu w błonie komórkowej również chroni przed wiązaniem czynnika IX z błonowymi tratwami płytkowymi [65]. Błonowe tratwy płytkowe odgrywają istotną rolę w funkcji hemostatycznej płytek. Recep-

torem osoczonego czynnika XI jest także kompleks GPIIb/IX/V na płytce, a szczególnie GPIIb obecny w tratwach błon [38]. Chociaż aktywacja kinazy Syk czy fosforylacja tyrozyny w PLCγ₂ z udziałem integryny α_{IIb}β₃ nie zależy od tratw, może się to okazać ważne w badaniu roli tych mikrodomen w późnej fazie aktywacji płytek, np. przy tworzeniu już agregatów płytkowych. Nie można też wykluczyć, że niektóre białka obecne w błonowych tratwach płytkowych mogą brać udział w aktywacji fosfolipazy Cγ₂, ponieważ proces taki obserwowany jest np. w komórkach śródbłonna [67]. Interakcja elementów cytoszkieletu (głównie aktyny) z lipidowymi tratwami błon opisana w limfocytach oraz erytrocytach [68-71], może także istnieć w płytkach krwi.

Pomimo ogromnego postępu badań w budowie i roli błonowych tratw płytkowych nadal istnieje wiele zagadnień jeszcze nie wyjaśnionych. Funkcja błonowych tratw w przekazywaniu sygnałów w płytkach krwi jest także bardzo słabo poznana i stanowi olbrzymie pole dalszych badań. Wyjaśnienie mechanizmów powstawania błonowych tratw lipidowych w płytkach krwi wydaje się bardzo ważne dla poznania aktywacji płytek krwi oraz dla zrozumienia wielu zjawisk patologicznych związanych z nadmierną aktywnością tych komórek, co pozwoli na wprowadzenie właściwej terapii.

Podziękowania:

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Barbarze Wachowicz za cenne uwagi dotyczące tej pracy.

Praca finansowana z badań statutowych UŁ 506/810.

*Artykuł otrzymano 29 marca 2004
Zaakceptowano do druku 20 maja 2004*

Piśmiennictwo:

1. O l a s B, W a c h o w i c z B (1998) *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 5: 471-487
2. O l a s B, W a c h o w i c z B (1999) *Acta Haematol Polon* 30: 361-369
3. A b r a m s C h S (2001) In "Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice" (RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George eds.) Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA, 541-559
4. B l o c k m a n s D, D e e k m y n H, V e r m y l e n J (1995) *Blood Rev* 9: 143-156
5. K r o l l M H, S c h a f e r A J (1995) *Immunopharmacol* 29: 31-65
6. L e v y - T o l e d a n o S (1999) *Haemostasis* 29: 4-15
7. R y n i n g e n A, H o l m s e n H (1999) In "Platelet Physiology and Pharmacology" (Gundu H. and Rao R. eds.) Kluwer Academic Publishers, Norwell; 1-22
8. S c h i c k P. K (2001) [in] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. (ed.) RW. Colman, J. Hirsh, VJ. Marder.

- AW. Clowes, JN. George, 4th Edition, Lippincott Williams and Willins, Philadelphia, USA, 29: 521-532
9. Bucki R, Janmey P A, Vegners R, Giraud F, Sulpice J C (2001) *Biochem* 40: 15752-15761
 10. Lentz E R (2003) *Prog Lipid Res* 43: 423-438
 11. Thiagarajan P, Tait J F (1991) *J Biol Chem* 266: 24302-24307
 12. Sandberg H, Andersson L O, Höglund S (1982) *Biochem J* 203: 303-311.
 13. Schroit A J, Zwaal R F A (1991) *BBA* 1071: 313-329
 14. Zwaal R F, Schroit A J (1997) *Blood* 4: 1121-1132
 15. Sims P, Faioni E M, Wiedmer T, Shattil S J (1988) *J Biol Chem* 263: 18205-18212
 16. Sims P J, Wiedmer T, Esmon C T, Weiss H J, Shattil S J (1989) *J Biol Chem* 264: 17049-17057
 17. Gilbert G E, Sims P J, Wiedmer T, Furie B, Furie B C, Shattil S J (1991) *J Biol Chem* 266: 17261-17268.
 18. Pasquet J M, Dachary—Prigent J, Nurden A T (1997) *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 57: 451-453
 19. Pasquet J M, Toti F, Nurden A T, Dachary—Prigent J (1996) *Thromb Res* 82: 509-522
 20. Dachary—Prigent J, Pasquet J M, Fressinaud E, Toti F, Freyssinet J M, Nurden A T (1997) *Br J Haematol* 99: 959-967
 21. Horstman L L, Ahn Y S (1999) *Crit Rev Oncol Hematol* 30: 111-142
 22. Olas B, Lundell K, Holmsen H, Fukami M H (2002) *FEBS Lett* 525: 29-32
 23. Zhou Q, Sims P J, Wiedmer T (1998) *Biochem* 37: 2356-2360
 24. Bevers E M, Comfurius P, Dekkers D W C, Zwaal R F A (1999) *BBA* 1439: 317-330
 25. Simons K, van Meer G (1988) *Biochem* 27: 6197-6202
 26. van Meer G, Simons K (1988) *J Cell Biochem* 36: 51-58
 27. Edidin M (2003) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 257-283
 28. Lai E C (2003) *J Cell Biol* 162: 365-370
 29. Hoylaerts M F (2003) *J Thromb Haemost* 1: 1140-1141
 30. Shogomori H, Brown D A (2003) *Biol Chem* 384: 1259-1263
 31. Shao D, Segai A W, Dekker L V (2003) *FEBS Lett* 550: 101-106
 32. Ledesma M D, Da Silva J S, Schevchenko A, Wilm M, Dotti C G (2003) *Brain Res* 897: 107-116
 33. Fiedler K, Kobayashi T V, Kurzchalia K, Simons K (1993) *Biochemistry* 32: 6365-6373
 34. Fra A M, Williamson E, Simons K, Parton R G (1994) *J Biol Chem* 269: 30745-30748
 35. Foster J L, de Hoog C L, Mann M (2003) *PNAS* 100: 5813-5818
 36. Maguire P B, Fitzgerald D J (2003) *J Thromb Haemost* 1: 1593-1601
 37. Elortza F, Nuhse T S, Foster L J, Stensballe A, Peck S C, Jensen O N (2003) *Mol Cell Proteomics* (w druku)
 38. Bodin S, Tronchere H, Payrastre B (2003) *BBA* 1610: 247-257
 39. Gousset K, Wolkers W F, Tsvetkova N M, Oliver A E, Field C L, Walke N J, Crowe J H, Tablin F (2002) *J Cell Physiol* 190: 117-128
 40. Ezumi Y, Kodama K, Uchiyama T, Takayama H (2002) *Blood* 99: 3250-3255
 41. Schulte V, Rabie T, Prostredna M, Aktas B, Gruner S, Nieswandt B (2003) *Blood* 101: 3938-3952
 42. Locke D, Liu Ch, Peng X, Chen H, Kahn M L (2003) *J Biol Chem* 278: 15441-15448
 43. Mangin P, Nonne C, Eckly A, Ohlmann P, Freund M, Nieswandt B, Cazenave J P, Gachet C, Lanza F (2003) *FEBS Lett* 542: 53-59
 44. Nieswandt B, Watson S P (2003) *Blood* 102: 449-461
 45. Kralisz U (2003) *Postępy Biochemii* 1: 26-38
 46. Boesze—Battaglia K, Clayton S T, Schimmel R J (1996) *Biochemistry* 35: 6664-6673
 47. Watson S P, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis G, Marshall S, Snell D, Stafford M, Tulasne D, Wilde J, Wonerow P, Frampton J (2001) *Thromb Haemost* 86: 276-288
 48. Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn M L (2002) *J Biol Chem* 277: 18801-18809
 49. Wonerow P, Obergfell A, Wilde J I, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, Leo A, Schraven B, Horejsi V, Shattil S J, Watson S P (2002) *Biochem J* 364: 755-765
 50. Zhang W, Tribble R P, Samelson L E (1998) *Immunity* 9: 239-246
 51. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law C L, Watson S P (1996) *J Biol Chem* 271: 18095-18099
 52. Gibbins J M, Briddon S, Shutes A, van V M, van—de W J, Saito T, Watson S P (1998) *J Biol Chem* 273: 34437-34443
 53. Gratacap M P, Herault J P, Viala C, Ragab A, Savi P, Herbert J M, Chap H, Plantavid M, Payrastre B (2000) *Blood* 96: 3439-3444
 54. Andersen H, Greenberg D L, Fujikawa K, Xu W, Chung D W, Davie E W (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11189-11193
 55. Furman M I, Liu L, Benoit S E, Becker R C, Barnard M R, Michelson A D (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3082-3087
 56. Schmidt V A, Nierman W C, Feldblyum T V, Maglott D R, Bahou W F (1997) *Br J Haematol* 97: 523-529
 57. Siess W (1997) In "Handbook of Experimental Pharmacology, Platelets and Their Factors" (F Van Bruchhausen, U Walter eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 126: 101-116
 58. Olas B (2003) *Postępy Biochemii* 3: 185-193
 59. Schick B P, Holmsen H (1987) Platelet Responses and Metabolism, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2: 255-277
 60. Payrastre B, Missy K, Giuriato G, Bodin S, Plantavid M P, Gratacap M P (2001) *Cell Signal* 13: 377-387
 61. Shattil S J, Bennett J S, Colman R W, Cooper R A (1977) *J Lab Clin Med* 89: 341-353
 62. Insel P A, Nirenberg P, Turnbull J, Shattil S J (1978) *Biochem* 17: 269-274
 63. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B (1998) *Immunity* 8: 723-732
 64. Shrimpton C N, Borthakur G, Larrucea S, Cruz M A, Dong J F, Lopez J A (2002) *J Exp Med* 196: 1057-1066
 65. McGregor J L, Poston R N (2003) *J Thromb Haemost* 1: 1142-1143
 66. Baglia F A, Shrimpton C N, Lopez J A, Walsh P N (2003) *J Biol Chem* 278: 21744-21750
 67. Kiely J M, Hu Y, Garcia—Cardena G, Gimbrone M A (2003) *J Immunol* 171: 3216-3224
 68. Salzar U, Prohaska R (2001) *Blood* 97: 1141-1143
 69. Salzar U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R (2002) *Blood* 99: 2569-2577
 70. Heijnen H F G, van Lier M, Waaijenborg S, Ohno-Iwashita Y, Waheed A A, Inomata M, Gorter G, Mobius W, Akkerman W N, Slot J W (2003) *J Thromb Haemost* 1: 1161-1173
 71. Mairhofer M, Steiner M, Mosgoeller W, Prohaska R, Salzer U (2002) *Blood* 100: 897-904

Transport białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym: rola białka Ran

Nucleocytoplasmic transport of proteins: the role of Ran protein

JOANNA E. MIKULSKA

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Komplex poru jądrowego
 - II-1. Struktura NPC w komórkach kręgowców
 - II-2. Nukleoporyny kręgowców
- III. Sygnały transportu jądrowego
- IV. Wpływ fosforylacji na transport jądrowy
- V. Receptory transportu jądrowego
 - V-1. Rodzina karioferyn
 - V-2. Inne receptory
- VI. Białko Ran
 - V-1. Struktura białka Ran
 - V-2. Cykl RanGTP/GDP
 - V-3. Rola białka Ran w transporcie jądrowym
- VII. Mechanizm translokacji przez NPC
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: CRT — kalretikulina; GR — receptor glikokortykosteroidowy; hnRNP — heterogenne rybonukleoproteiny jądrowe; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez mitogen; NES — sygnał jądrowego eksportu; NLS — sygnał lokalizacji jądrowej; NPC — kompleks poru jądrowego; Nup — nukleoporyna; PKI — inhibitor białkowej kinazy A zależnej od cAMP; RanGDP — białko Ran związane z difosforanem guanozyny; RanGTP — białko Ran związane z trifosforanem guanozyny; U snRNP — małe rybonukleoproteiny jądrowe bogate w uracyl

I. Wstęp

Transport jądrowy białek w komórkach eukariotycznych, tzn. selektywny jedno lub dwukierunkowy transport między cytoplazmą a jądrem komórkowym, jest integralną częścią wielu procesów, takich jak ekspresja genu, przekazywanie sygnału, cykl komórkowy, proliferacja i różnicowanie komórek.

Dr hab., Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Zakład Immunochemii, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, tel. 337 11 72 wew. 379
e-mail: mikulska@immuno.iitd.pan.wroc.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Nuclear pore complex
 - II-1. Structure of the vertebrate NPC
 - II-2. Vertebrate nucleoporins
- III. Nuclear transport signals
- IV. Influence of the phosphorylation on the nuclear transport
- V. Nuclear transport receptors
 - V-1. Karyopherin family
 - V-2. Other receptors
- VI. Ran protein
 - V-1. Structure of Ran protein
 - V-2. RanGTP/GDP cycle
 - V-3. Role of protein in the nuclear transport
- VII. Mechanism of the translocation through the NPC
- VIII. Concluding remarks

Dokładne poznanie mechanizmu selektywnego transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym i jego regulacji jest podstawą, aby zrozumieć i ewentualnie móc korygować patologiczne funkcje komórek, jak również wpływać na regulację ekspresji genów.

Większość makrocząsteczek przenoszonych z cytoplazmy do jądra stanowią białka (białka uczestniczące w transkrypcji, replikacji, białka niezbędne w procesie splicingu, różne enzymy i białka regulatorowe), podczas gdy transport z jądra dotyczy przede wszystkim RNA (mRNA, tRNA, rRNA, snRNA) [1]. Ponadto, wiele białek przemieszcza się między cytoplazmą i jądrem tam i z powrotem [2, 3]. Selektywny transport białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym dotyczy cząsteczek o masie powyżej 40 kDa. Mniejsze cząsteczki a także jony mogą dyfundować między cytoplazmą a jądrem komórkowym zgodnie z gradientem stężeń [4]. Głównymi składnikami selektywnego transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym są (I) receptory transportu; (II) nukleoporyny (białka porów jądrowych); (III) białko Ran i białka wiążące białko

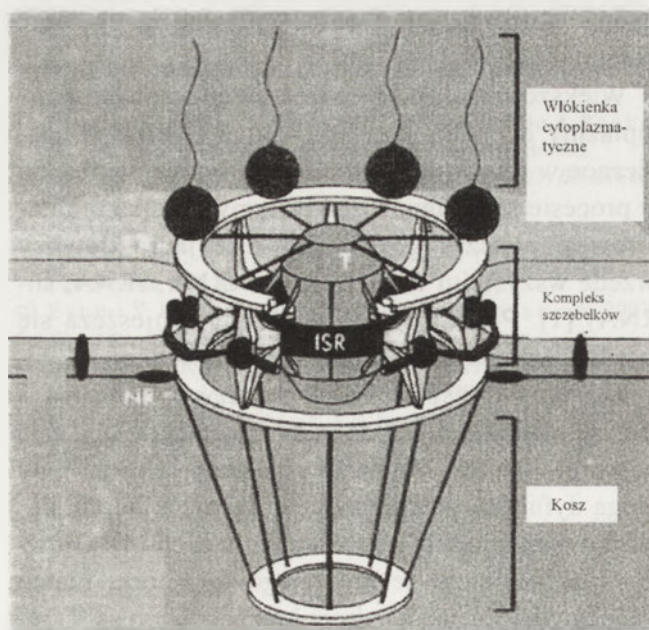
Ran. W selektywnym transporcie białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym można wyróżnić trzy główne fazy: (I) rozpoznanie i wiązanie białek z receptorami transportu; (II) połączenie utworzonego kompleksu transportu z porą jądrową i jego translokacja przez centralny kanał poru jądrowego; (III) dysocjacja kompleksu transportu, której efektem jest uwolnienie transportowanej makrocząsteczki z kompleksu transportu [5].

Niniejszy artykuł stanowi próbę podsumowania obecnego stanu wiedzy na temat selektywnego transportu białek z cytoplazmy do jądra komórkowego (import) i z jądra do cytoplazmy (eksport) z uwzględnieniem roli białka Ran w tym procesie.

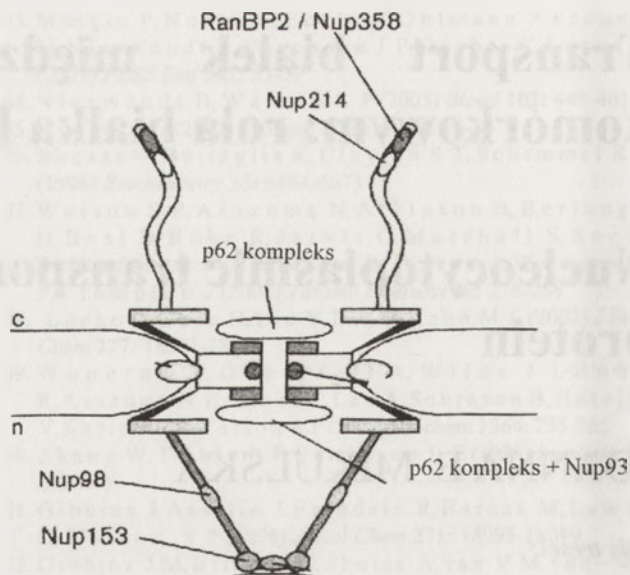
II. Kompleks poru jądrowego (NPC)

II-1. Struktura NPC w komórkach kręgowców

Obecne w otocze jądrowej pory są miejscem translokacji białek, stanowią także podłoże strukturalne kontroli tego procesu [6]. Por jądrowy w komórkach kręgowców jest dużą skomplikowaną strukturą o masie 125 MDa, zwaną kompleksem poru jądrowego (NPC). Nukleoporyny — białka kompleksu poru jądrowego — formują trzy pierścienie: cytoplazmatyczny, środkowy i jądrowy (Ryc. 1). Pierścień cytoplazmatyczny i jądrowy połączone są ze sobą strukturami przypominającymi szczebelki tworząc tzw. kompleks szczebelkowy, którego częścią jest pierścień środkowy; otacza on kanał centralny poru jądrowego. Kanał centralny może zawierać „zatyckę” w kształcie klepsydry (zwaną też transporte-



Ryc. 1. Model poru jądrowego w komórkach kręgowców, według [7]. CR — pierścień cytoplazmatyczny; ISR — pierścień środkowy, NR — pierścień jądrowy; T — zatycka



Ryc. 2. Model poru jądrowego w komórkach kręgowców: lokalizacja nukleoporyn, według [11]. c — cytoplazma; n — jądro; p62 — kompleks: Nup62-Nup-58-Nup54-Nup45

rem), którego dokładna budowa i funkcja nie są poznane. Z pierścienia cytoplazmatycznego i jądrowego wystaje 8 włókienek białkowych. Od strony światła jądra zbiegają się one tworząc strukturę koła [7-9].

II-2. Nukleoporyny kręgowców

Około 20 nukleoporyn kręgowców zostało sklonowanych i zlokalizowanych w obrębie poru jądrowego [10], Ryc. 2 przedstawia lokalizację niektórych nukleoporyn kręgowców [11]. Lokalizacja nukleoporyn i ich konformacja zmieniają się podczas transportu jądrowego. Współczesne badania wykazały przemieszczanie się nukleoporyn: Nup214, Nup98, Nup153 [12-14]. Charakterystyczną cechą nukleoporyn jest obecność w ich strukturze powtarzających się motywów zawierających fenyloalaninę i glicynę, takich jak: FXFG, GLFG lub FG (gdzie F — fenyloalanina, G — glicyna, L — leucyna, X — dowolny aminokwas), przedzielonych sekwencjami o różnej i zmiennej długości, bogatymi w reszty hydrofilowe. Te motywy, nazwane ogólnie motywami FG, są miejscami wiążącymi receptory transportu [15-18]. W wielu nukleoporynach stwierdzono domeny superhelisy, motywy zamka leucynowego i palca cynkowego, które odpowiedzialne są za interakcję białko-białko. Szczególnie bogate w motywy palca cynkowego są: Nup 153 i Nup 358 [19-21]. Ponadto wiele nukleoporyn jest modyfikowanych przez przyłączenie N-acetyloglukozaminy do hydroksylowych grup reszt serynowych [19, 22]. Stwierdzono, że białka kompleksu p62 (Nup62-Nup58-Nup54-Nup45) mogą być fosforylowane *in vitro* przez

białkową kinazę A i kinazę syntazy glikogenu [22, 23]. Funkcjonalne znaczenie tych modyfikacji nie jest wyjaśnione [22, 23]. Nukleoporyny zaangażowane są w translokację kompleksu transportu (receptor transportu + białko transportowane) przez kanał centralny poru jądrowego. W ostatnich latach uzyskano informacje wskazujące na to, że Nup 153 zlokalizowana w pierścieniu kosza może uczestniczyć w połączeniu kompleksu eksportu z porą jądrową [24] oraz, podobnie jak nukleoporyna Nup98 [25] również obecna w koszu, może brać udział w końcowej fazie transportu białek z cytoplazmy do jądra komórkowego, tzn. w uwolnieniu z kompleksu transportu importowanych białek [26]. Nup 358, główna nukleoporyna włókienek cytoplazmatycznych, oraz Nup 214 współuczestniczą w uwolnieniu z kompleksu eksportu przynoszonych z jądra komórkowego makrocząsteczek [9, 27]. Nup 358 ze względu na zdolność do oddziaływania z białkiem Ran zwana jest białkiem RanBP2. Pomimo tego, że nukleoporyna Nup358 jest sama białkiem wiążącym Ran, zawiera miejsce wiążące inne białka współdziałające z GTPazą Ran, a mianowicie białka RanBP1 i białka RanGAP [27]. Ponadto stwierdzono, że Nup 358 wykazuje aktywność ligazy SUMO3 [28] odpowiedzialnej za modyfikację białek sentryną (białko SUMO-1, podobne do ubikwityny) oraz, że proteaza SUMO (SEN2) oddziałuje z motywami FG nukleoporyny Nup153 [29]. Obserwacje te sugerują, że białka transportowane lub receptory transportu mogą być modyfikowane białkiem SUMO-1 przez Nup358/RanBP2. Ta modyfikacja może być istotna w mechanizmie translokacji kompleksów transportu przez kanał centralny poru

jądrowego i tym samym wpływać na regulację selektywnego transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym. A zatem nukleoporyny są nie tylko odpowiedzialne za translokację kompleksu transportu, ale mogą bezpośrednio uczestniczyć w innych fazach selektywnego transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym oraz w jego regulacji.

III. Sygnały transportu jądrowego

Białka selektywnie transportowane przez kompleks poru jądrowego zawierają w swojej strukturze sekwencję sygnałową, która określa kierunek transportu (Tabela 1). Białka transportowane z cytoplazmy do jądra komórkowego mają sekwencję sygnałową o nazwie sygnał lokalizacji jądrowej — NLS (ang. *nuclear localization signal*). Zidentyfikowano dwa typy klasycznych sygnałów NLS, które charakteryzuje wysoka zawartość aminokwasów o ładunku dodatnim, szczególnie lizyny. Typ I jest krótką (nie więcej niż 8-10 aminokwasów) sekwencją, typ II składa się z dwóch fragmentów bogatych w reszty zasadowe, rozdzielonych regionem zbudowanym z 10 aminokwasów. Typ I klasycznej sekwencji NLS zidentyfikowano po raz pierwszy w antygenie T wirusa SV40, [30], a typ II w nukleoplazminie [31]. Obecnie wiadomo, że większość białek zawiera klasyczne sygnały lokalizacji jądrowej [32]. Sygnałem kierującym małe rybonukleoproteiny jądrowe (U snRNP) do jądra jest reszta trimetyloguanozyny [m₃G (TMG), struktura zwana kapem] na 5' końcu U snRNA oraz sygnał związany z białkami Sm [33]. Sygnał lokalizacji jądrowej białek rybosomowych

Tabela 1.

Sygnały transportu jądrowego

Sygnał	Sekwencja	Białko
klasyczny NLS, typ I	PKKKRKV	SV40
klasyczny NLS, typ II	VKR _x ₁₀ KKKKLD	nukleoplazmina
NLS	m3G, białka Sm	U snRNP
NLS	KIRTSPTFRPKTLRLLRR-QPKYRRKSAPRRNK	białka rybosomowe
M9 NLS/NES	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSG-PYGGGGQYFAKPRNQGGY	hnRNP A1, A2, F
KNS NLS/NES	YDRRGRPGDRYDGMVGFSADET-WDSAIDTWSPSEWDMAY	hnRNP K
NES	LXXXLXXLXL	PKI, IκBα, MAPK

K — lizyna; G — glicyna; L — leucyna; R — arginina; X — dowolny aminokwas

stanowi 32-aminokwasowa sekwencja zawierająca 10 reszt argininy [34]. Sygnały transportu jądrowego, o aktywności importu i eksportu, zidentyfikowano w białkach kompleksów hnRNP. Jest to 39-aminokwasowa sekwencja zwana M9, bogata w glicynę, obecna w białkach A1, A2, F kompleksów hnRNP i sekwencja KNS, w białku hnRNP K [35-37].

Białka transportowane z jądra do cytoplazmy mają sekwencję sygnałową o nazwie sygnał jądrowego eksportu — NES (ang. *nuclear export signal*). NES po raz pierwszy opisano w inhibitorze kinazy białkowej zależnej od cAMP [38]. Była to 10-aminokwasowa sekwencja zawierająca 4 reszty leucyny. Większość poznanych sygnałów jądrowego eksportu białek to krótkie sekwencje (8-11 reszt) bogate w leucynę [36, 39, 40].

IV. Wpływ fosforylacji na transport jądrowy

Aktywność sygnałów jądrowego importu i eksportu może być modulowana przez fosforylację lub defosforylację samych białek selektywnie transportowanych przez kompleks poru jądrowego, jak i cząsteczek, z którymi białka transportowane oddziałują [41, 42]. Na przykład: białka NF- κ B są połączone w cytoplazmie z inhibitorowymi cząsteczkami I κ B, które maskują sygnał lokalizacji jądrowej tej rodziny czynników transkrypcyjnych, uniemożliwiając im interakcję z maszyną importu do jądra komórkowego. Fosforylacja inhibitorowych podjednostek I κ B przez wielopodjednostkową kinazę I κ B, zainicjowana np. przez stymulację komórek cytokinami, bakteryjnym LPS, prowadzi do ubikwitynacji, a następnie degradacji przez proteasom cząsteczek I κ B, a w rezultacie do oddysocjowania od NF- κ B. Uaktywnione w ten sposób formy NF- κ B są transportowane do jądra komórkowego, gdzie aktywują różne geny, np. kodujące cytokiny, białka ostrej fazy, czynniki wzrostu, cząsteczki adhezji komórkowej, receptory cytokin oraz transkrypcję genów łańcucha lekkiego immunoglobulin [43-45].

Czynniki transkrypcyjne rodziny NFAT w cytoplazmie komórek niepobudzonych są ufosforylowane. Ufosforylowane są reszty seryny blisko sygnału lokalizacji jądrowej; zapobiega to importowi czynników NFAT do jądra. Wzrost stężenia jonów wapnia w komórce prowadzi do defosforylacji czynników NFAT przez kalcyneurynę, fosfatazę serynowo-treoninową zależną od kalmoduliny i wapnia. Defosforylacja odsłania zamaskowany przez fosforylację NLS, co prowadzi do szybkiego importu czynników NFAT do jądra, gdzie odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów kodujących cytokiny: głównie

IL-2, ale także IL-3, 4, GM-CSF, TNF α , IFN- γ . Natomiast fosforylacja czynników NFAT w jądrze, przez białkową kinazę A lub kinazę syntazy glikogenu (GSK-3), inicjuje ich transport do cytoplazmy [46-48].

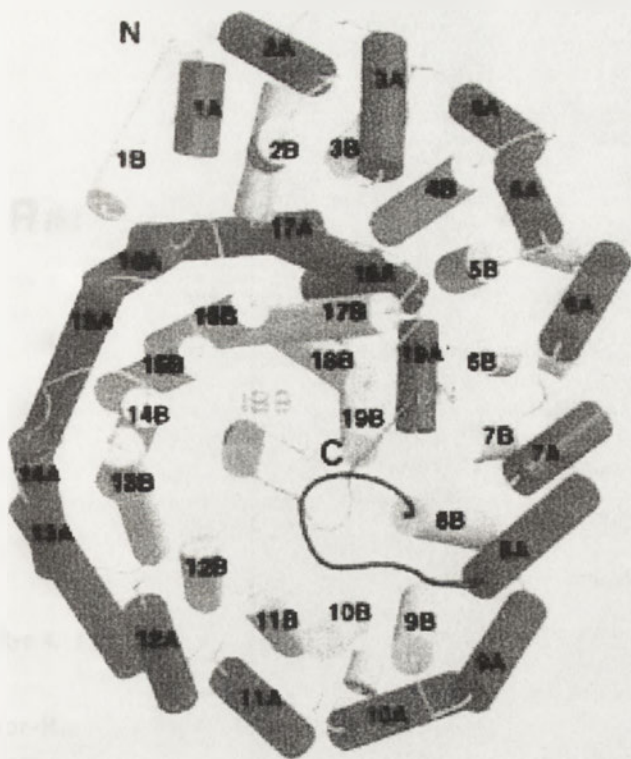
Modulacja aktywności sekwencji sygnałowych (NLS, NES) przez fosforylację lub defosforylację jest formą regulacji transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym.

V. Receptory transportu jądrowego białek

V-I. Rodzina karioferyn

Sygnały transportu jądrowego białek są rozpoznawane przez receptory transportu bezpośrednio lub pośrednio, z udziałem cząsteczek adaptorowych, z którymi receptory tworzą heterodimery. Większość receptorów transportu jądrowego należy do rodziny białek zwanych karioferynami. Funkcjonalnie receptory rodziny karioferyn podzielone są na dwie podgrupy: importyny — uczestniczące w transporcie białek z cytoplazmy do jądra komórkowego i eksportyny — biorące udział w eksporcie białek z jądra komórkowego do cytoplazmy. Karioferyny charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową (90-150 kDa), kwaśnym punktem izoelektrycznym (4,0-5,0), zdolnością do oddziaływań z motywami FG nukleoporyn, białkami zawierającymi sygnały transportu jądrowego, białkami adaptorowymi, białkiem RanGTP oraz zdolnością do recyklicacji [49, 50]. Na Ryc. 3 przedstawiono strukturę receptorów rodziny karioferyn (na przykładzie importyny- β). Białka te zbudowane są z powtarzających się tandemowo 15-19 jednostek zwanych motywami HEAT. Każdy motyw zawiera 35-45 reszt aminokwasowych i składa się z dwóch rejonów α -helikalnych oznaczonych jako helisy A i B, połączonych krótką pętlą. Cała cząsteczka białka jest zwinięta tworząc strukturę superhelisy tak, że helisy A są zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni białka, a helisy B na wewnętrznej powierzchni. Miejsca wiążące sekwencje FG nukleoporyn stwierdzono na powierzchni helisy A motywów HEAT (powierzchnia zewnętrzna białka). Natomiast na powierzchni wewnętrznej karioferyn, w kierunku N-końca, są zlokalizowane miejsca wiążące RanGTP, a w kierunku C-końca miejsca wiążące transportowane białka i białka adaptorowe [49, 51].

Tabela 2A, B przedstawia przykłady ludzkich receptorów selektywnego transportu białek między cytoplazmą a jądrem. Importyna β jest głównym receptorem importu. Przez bezpośrednią interakcję z im-



Ryc. 3. Struktura importyny- β , na podstawie [49, 51]. A i B — α -helisy motywu HEAT, przedstawione w formie walców; IBB — domena importyny α odpowiedzialna za wiązanie z importyną β

portyną β jest importowana do jądra cyklina $\beta 1$, białko zaangażowane w kontrolę fazy M cyklu komórkowego [52]. W imporcie białek zawierających klasyczne sygnały lokalizacji jądrowej bierze udział heterodimer: importyna β/α (Kap $\beta 1$ /Kap α). W oddziaływaniu importyny α i β uczestniczy C-końcowy fragment cząsteczki importyny β i N-końcowy rejon importyny α zwany domeną wiążącą importynę β (IBB). Importyna α reaguje poprzez swój rejon zwany ARM bezpośrednio z sekwencją NLS transportowanych białek, podczas gdy Kap $\beta 1$ wiąże się z motywami FG nukleoporyn, co prowadzi do umiejscowienia kompleksu białko-receptor w porze jądrowym [49, 53]. Snurportyna 1 jest adaptorowym białkiem dla importyny β do importu małych rybonukleoprotein jądrowych, odgrywających kluczową rolę w procesie dojrzewania mRNA. Reszta trimetyloguanozyny (m_3G) na 5' końcu U snRNA, jest rozpoznawana przez snurportynę [54]. Heterodimer importyna β /importyna 7 jest receptorem importu dla histonów H1 [55]. Importyny 5 i 7 bezpośrednio wiążą i importują białka rybosomowe [34]. Transportyna 1 (Kap $\beta 2$) rozpoznaje 39-aminokwasową sekwencję bogatą w glicynę określaną jako M9 białek A1, A2, F kompleksów hnRNP uczestniczących w reakcjach dojrzewania mRNA [56]. Transportyna SR importuje białka SR; są to białka zaangażowane głównie w splicingu prekursorowego mRNA. Niektóre białka SR odgrywają istotną rolę w alternatywnym splicingu

gu (w modulowaniu wyboru miejsca splicingowego) [57].

Eksportyna 1 (Crm1) jest receptorem eksportu z jądra komórkowego białek zawierających klasyczne sygnały NES bogate w leucynę. Crm1 eksportuje również snurportynę, białko bez klasycznej sekwencji NES [58, 59], natomiast eksportyna 2 (CAS1) uczestniczy w transporcie importyny α , której sygnał jądrowego eksportu jest nieznan [60].

V-2. Inne receptory

Zidentyfikowano również receptory transportu jądrowego białek nie należące do rodziny karioferyn (Tabela 2B). Wykazano, że kalretikulina (CRT) jest receptorem eksportu dla inhibitora białkowej kinazy A i dla glikokortykosteroidowego receptora jądrowego. Receptor jądrowy CRT rozpoznaje bogatą w leucynę sekwencję sygnałową (NES) inhibitora kinazy białkowej A. Domena receptora glikokortykosteroidowego (GR) wiążąca DNA, funkcjonuje również jako sygnał eksportu dla GR [61].

Białko NTF2, konserwatywny homodimer podjednostek o masie 14 kDa, obecny w cytosolu, jest receptorem importu białka Ran — formy związanej z difosforanem guanozyny [62, 63].

VI. Białko Ran

VI-1. Struktura białka Ran

Istotną rolę w regulacji oddziaływań między receptorami transportu a białkami transportowanymi odgrywa białko Ran [27, 64].

Białko Ran o masie cząsteczkowej 25 kDa, należy do rodziny małych białek G, wiążących GTP. Jest białkiem monomerycznym, zbudowanym z domeny zwanej G, składającej się z sześciu β -pasm otoczonych pięcioma α -helisami połączonymi pętlami (Ryc. 4). Cechą charakterystyczną struktury domeny G białka Ran, w odróżnieniu od innych małych białek G, jest długi C- koniec domeny G, zawierający motyw DEDDDL (gdzie D — kwas asparaginowy, E — kwas glutaminowy, L — leucyna), który zmienia swoją konformację po interakcji z białkami wiążącymi Ran. Sekwencja DEDDDL jest niezbędna w oddziaływaniach białka Ran z białkami wiążącymi białko Ran i z receptorami transportu [65, 66].

VI-2. Cykl RanGTP/GDP

Białko Ran występuje w dwóch formach konformacyjnych w zależności od tego, z jakim nukleoty-

Tabela 2

Ludzkie receptory transportu jądrowego białek

A. Rodzina karioferyn

Nazwa receptora	Białka
Import	
importyna- β (Kap β 1, p97)	cyklina B1
importyna β/α (Kap β 1-Kap α ; Imp β -Imp α)	białka z klasycznymi NLS
importyna β /snurportyna 1 (Kap β 1-SPN 1)	snRNPs U1, U2, U4, U5
importyna β /importyna 7 (Imp β /Imp7)	histony H1
transportyna 1 (Kap β 2; Imp β 2)	hnRNP A1, A2
importyna 5 (Kap β 3; RanBP5)	białka rybosomowe
importyna 7 (RanBP7)	białka rybosomowe
transportyna SR1 (TRN-SR1)	białka SR
Eksport	
eksportyna 1 (Crm1; Expo1)	białka z sekwencją NES-bogatą w leucynę, snurportyna
eksportyna 2 (CAS)	importyna α (Kap α)

W nawiasach podane są alternatywne nazwy receptorów

B. Inne receptory

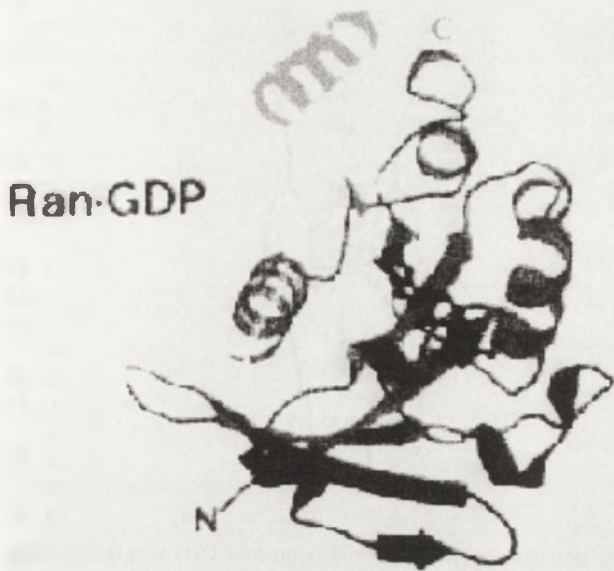
Nazwa receptora	Białka
kalretikulina	eksport PKI, GR
białko NTF2	import RanGDP

dem guaninowym: GTP (trifosforan guanozyny) czy GDP (difosforan guanozyny) jest związane. Zamiana formy RanGDP na RanGTP zachodzi w jądrze z udziałem czynnika wymiany nukleotydu Ran-GEF (RCCI) i białka RanBP3 zwiększającego katalityczną aktywność RanGEF (Ryc. 5). Powstała forma RanGTP opuszcza jądro. W cytoplazmie, aktywność GTPazowa białka Ran jest wyzwolona po interakcji RanGTP z białkiem RanGAP (stymulującym hydroлизę GTP do GDP przez Ran) i z białkami współpracującymi z RanGAP, takimi jak: RanBP1/BP2. Następnie powstała forma białka Ran związana z difosforanem guanozyny (białko RanGDP) jest transportowana do jądra z udziałem receptora transportu — NTF2. Konformacja RanGTP jest przywrócona ponownie w jądrze przez oddysocjowanie GDP, po czym następuje związanie nowej cząsteczki GTP do białka Ran i cykl powtarza się [63, 67].

VI-3. Rola białka Ran w transporcie jądrowym

Fakt, że białka RanGAP i RanBP1/RanBP2, mające wpływ na aktywność GTPazową białka Ran, obecne są w cytoplazmie, a czynnik wymiany nukleotydu RanGEF i białko RanBP3 w jądrze, sprawia, że forma RanGTP przeważa w jądrze, a RanGDP w cytoplazmie [27, 64, 68, 69]. To asymetryczne rozmieszczenie RanGTP jest podstawą jego roli w regulacji oddziaływań receptorów transportu z białkami transportowanymi. Gradient RanGTP kontroluje kierunkowość transportu jądrowego [70].

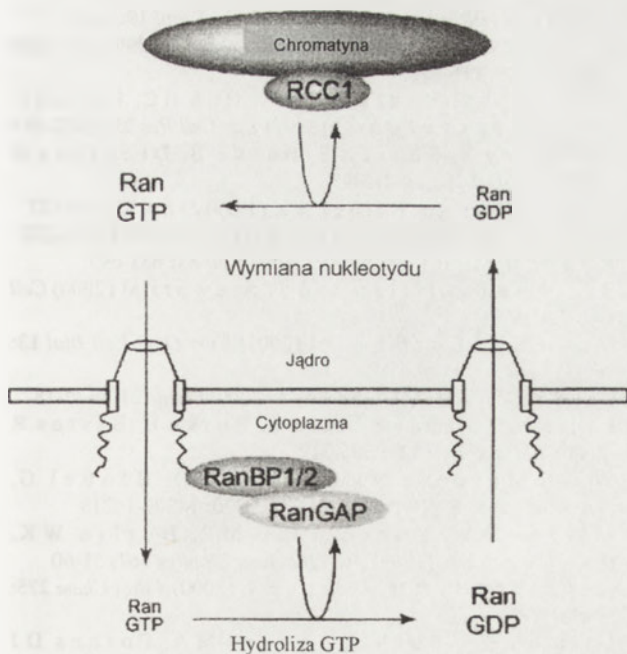
Receptory importu oddziałują z białkami transportowanymi tylko w nieobecności RanGTP, to jest w cytoplazmie (Ryc. 6). Po wejściu kompleksu importu do jądra RanGTP wiąże się do receptora importu i indukuje uwolnienie białka z kompleksu transportującego. Prawdopodobnie kompleks recep-



Ryc. 4. Model struktury przestrzennej białka Ran związanego z difosforanem guanozyny, według [66].

tor-RanGTP przemieszcza się do cytoplazmy, gdzie rozpada się w wyniku hydrolizy GTP do GDP przez białko Ran, z udziałem białek RanGAP, RanBP1/RanBP2. Uwolniony receptor powraca do cytoplazmy.

Natomiast receptor eksportu może formować kompleks z białkiem transportowanym tylko w obecności RanGTP. Bezpośrednie wiązanie RanGTP z receptorem stabilizuje połączenie receptora z białkiem transportowanym. Powstały w jądrze trójskładnikowy kompleks: RanGTP-receptor eksportu-białko



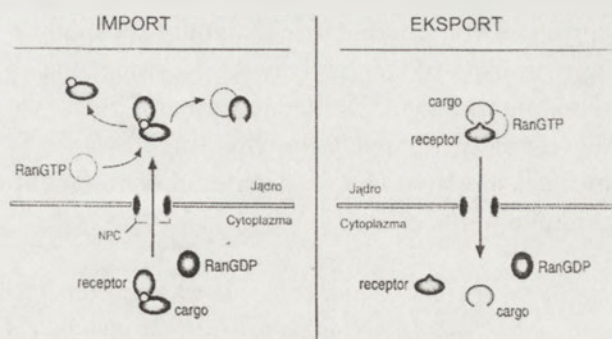
Ryc. 5. Cykl RanGTP/GDP, według [67]. Białka regulujące rozmieszczenie RanGTP/RanGDP w komórce: RanGAP - stymuluje aktywność GTPazową białka Ran w kooperacji z białkami RanBP1/BP2; RanGEF (RCC1) — katalizuje uwolnienie GTP związanego z białkiem Ran i wiązanie GTP do Ran.

transportowane przemieszcza się przez por jądrowy do cytoplazmy (Ryc. 6). W cytoplazmie kompleks ten zostaje rozbit w wyniku interakcji RanGTP z białkiem RanGAP i białkami RanBP1/RanBP2 [27, 67, 71].

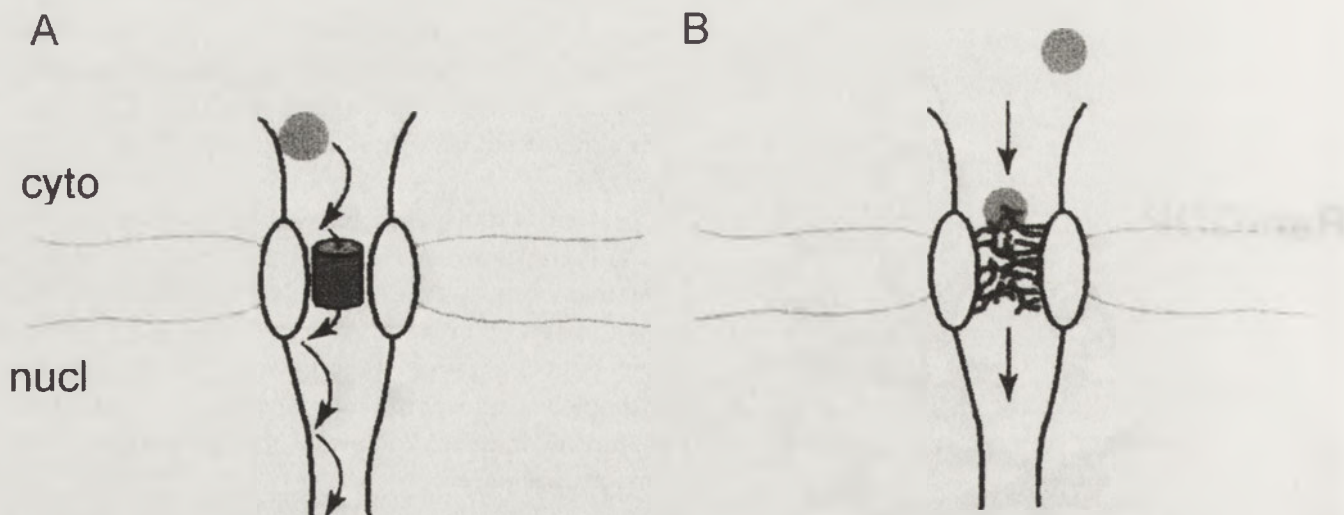
Zatem w transporcie białek z cytoplazmy do jądra komórkowego RanGTP jest niezbędny w końcowej fazie importu — do uwolnienia białek transportowanych od receptorów transportu. Natomiast w eksporcie białek z jądra komórkowego do formowania kompleksu transportu i w końcowej fazie eksportu — do uwolnienia z kompleksu przenoszonych z jądra makrocząsteczek.

VII. Mechanizm translokacji przez NPC

Mechanizm oddziaływań między receptorem transportu a nukleoporynami podczas przemieszczania się kompleksu transportu przez por jądrowy jest słabo poznany. Na podstawie obserwacji stopniowego wzrostu powinowactwa importyny α do nukleoporyn: kolejno od Nup358 (włókienka cytoplazmatyczne), poprzez p62 (centralny kanał), do Nup 153 (pierścień kosza), opracowano model translokacji zwany „gradientem powinowactwa” [72]. Według tego modelu przemieszczanie się kompleksu transportu przez por jądrowy zachodzi dzięki gradientowi powinowactwa receptora transportu do różnych nukleoporyn kompleksu poru jądrowego (Ryc. 7A). Ribbeck i Görlich [73] na podstawie kinetycznej analizy transportu jądrowego opracowali model tzw. „selektywnej fazy” (Ryc. 7B). Model ten sugeruje, że nukleoporyny centralnego kanału jądrowego oddziałują wzajemnie poprzez swoje hydrofobowe motywy FG, formując giętką siatkę (tzw. fazę hydrofobową). Receptory transportu mogą przejściowo reagować z motywami FG fazy hydrofobowej dzięki swoim miejscom wiążącym sekwencje FG nukleoporyn i w ten sposób rozrywać siatkę i przemieszczać się wraz z transportowanym białkiem przez kompleks



Ryc. 6. Rola białka Ran w transporcie jądrowym, według [71]: cargo - białko transportowane, import — transport białek z cytoplazmy do jądra komórkowego, eksport — transport białek z jądra do cytoplazmy.



Ryc. 7. Modele translokacji kompleksu transportu przez pory jądrowe: A — model gradientu powinowactwa; B — model selektywnej fazy, według [74]. cyto — cytoplazma; nucl — nukleoplazma

poru jądrowego. Makrocząsteczka, która nie jest związana z receptorem, jest zbyt hydrofilowa aby przenikać hydrofobową siatkę centralnego kanału.

VIII. Uwagi końcowe

W ciągu ostatnich lat uczyniono istotny postęp w poznaniu specyficznych receptorów jądrowego transportu białek. Sklonowano i zlokalizowano w obrębie poru około 20 nukleoporin kręgowców. Uzyskano informacje o aktywnym uczestnictwie niektórych z nich w transporcie jądrowym. Na uwagę zasługuje poznanie roli białka Ran w transporcie białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym.

Obecnie badania rozwijają się głównie w kierunku poznania molekularnego mechanizmu translokacji białek przez kompleks poru jądrowego i regulacji transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym. Analiza strukturalna nukleoporin i receptorów transportu rozpoczęta badaniami krystalograficznymi, oraz zastosowanie techniki FRET (ang: *fluorescence resonance energy transfer*) do badań *in vivo* oddziaływań receptorów transportu z nukleoporinami są pomocne w dalszych badaniach zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu i sposobu regulacji transportu białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym. Dokładne poznanie tych procesów umożliwi, między innymi, ingerowanie w kontrolę ekspresji genów, w proliferację oraz różnicowanie komórek.

Artykuł otrzymano 1 września 2003
Zaakceptowano do druku 19 kwietnia 2004

Piśmiennictwo:

1. Izaurrealde E, Mattaj J (1995) *Cell* **81**: 153-159
2. Schmidt-Zachmann MS, Dargemont C, Kuhn IC, Nigg EA (1993) *Cell* **74**: 493-504
3. Kalland KH, Szilvay AM, Brokstad KA, Saetrevik W, Haukenes G (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7436-7444
4. Lyman SK, Guan T, Bednenko J, Wodrich H, Gerace L (2002) *J Cell Biol* **159**: 55-67
5. Cole CN, Hammell CM (1998) *Curr Biol* **8**: 368-372
6. Allen TD, Cronshaw S, Bagley E, Kiseleva E, Goldberg MW (2000) *J Cell Sci* **113**: 1651-1659
7. Akey CW, Rademacher M (1993) *J Cell Biol* **122**: 1-19
8. Nevo R, Markiewicz P, Kapon R, Elbaum M, Reich Z (2000) *Single Mol* **2**: 109-114
9. Fahrenkrog B, Aebi U (2002) *Results Probl Cell Differ* **35**: 25-48
10. Pante N, Webi U (1995) *J Cell Sci Suppl* **19**: 1-11
11. Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**: 391-401
12. Boer JM, vanDeursen JMA, Hub HC, Franssen JAM, Grosveld GC (1997) *Exp Cell Res* **232**: 182-185
13. Nakielny S, Shaikh S, Burke B, Dreyfuss G (1999) *EMBO J* **18**: 1982-1995
14. Zolotukhin AS, Felber BK (1999) *J Virol* **73**: 120-127
15. Radu A, Moore MS, Blobel G (1995) *Cell* **81**: 215-222
16. Rexach M, Blobel G (1995) *Cell* **83**: 683-692
17. Basylliss R, Littlewood T, Stewart M (2000) *Cell* **102**: 99-108
18. Vasu SK, Forbes DJ (2001) *Curr Opin Cell Biol* **13**: 363-375
19. Lee JY, Yoo BC, Lucas WJ (2000) *Planta* **210**: 177-187
20. Pante N, Thomas F, Aebi U, Burke B, Bastos R (2000) *J Struct Biol* **129**: 306-312
21. Wu J, Matunis NJ, Kraemer D, Blobel G, Contavas E (1995) *J Biol Chem* **270**: 14209-14213
22. Miller MW, Caracciolo MR, Berlin WK, Hanover JA (1999) *Arch Biochem Biophys* **367**: 51-60
23. Kehlenbach RH, Gerace L (2000) *J Biol Chem* **275**: 17848-17856
24. Ullman KS, Shah S, Powers MA, Forbes DJ (1999) *Mol Biol Cell* **10**: 649-664
25. Fontoura BMA, Blobel G, Yaseen NR (2000) *J Biol Chem* **275**: 31289-31296
26. Shah S, Tugendreich S, Forbes D (1998) *J Cell Biol* **141**: 31-49
27. Bernad R, van der Velde H, Fornerod M, Pickersgill H (2004) *Mol Cell Biol* **24**: 2373-2384

28. Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F (2002) *Cell* 108: 109-120
29. Zhang H, Saitoh H, Matunis MJ (2002) *Mol Cell Biol* 22: 6498-6508
30. Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984) *Nature* 311: 33-38
31. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) *Cell* 64: 615-623
32. Conti E, Izaurralde E. (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13: 310-319
33. Adam SA (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11: 402-406
34. Jäkel S, Görlich D (1998) *EMBO J* 17: 4491-4502
35. Pollard VW, Michael WM, Nakielny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G (1996) *Cell* 86: 985-994
36. Nigg EA (1997) *Nature* 386: 779-787
37. Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997) *EMBO J* 16: 3587-3598
38. Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995) *Cell* 82: 463-473
39. Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF (2001) *J Biol Chem* 276: 39404-39410
40. Macara IG (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:1-25
41. Turpin P, Ossareh-Nazari B, Dargemont C (1999) *FEBS Lett* 452: 82-86
42. Hunter T, Karin M (1992) *Cell* 70: 375-387
43. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) *Annu Rev Immunol* 18: 621-663
44. Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schmid JA (2002) *J Biol Chem* 277: 10842-10851
45. Lee SH, Hannink M (2002) *J Biol Chem* 277: 23358-23366
46. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) *Science* 275: 1930-1933
47. Zhu J, Mckeon F (1999) *Nature* 398: 256-260
48. Cyert MS (2001) *J Biol Chem* 276: 20805-20808
49. Gamblin SJ, Smerdon SJ (1999) *Structure* 7: 199-204
50. Chook YM, Blobel G (2001) *Curr Opin Struct Biol* 11: 703-715
51. Cingolani G, Petosa C, Weis K, Müller CW (1999) *Nature* 399: 221-229
52. Takizawa CG, Weis K, Morgan DO (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7938-7943
53. Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW (1998) *Cell* 92: 327-336
54. Huber J, Dickmanns A, Lührmann R (2002) *J Cell Biol* 156: 467-479
55. J kel S, Albig W, Kutay U, Bischoff FR, Schwamborn K, Doenecke D, Görlich D (1999) *EMBO J* 18: 2411-2423
56. Bonifaci N, Moroianu J, Radu A, Blobel G (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5055-5060
57. Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G (1999) *J Cell Biol* 145: 1145-1152
58. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997) *Cell* 90:1051-1060
59. Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Lührmann R, Görlich D (1999) *J Cell Biol* 145: 255-264
60. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D (1997) *Cell* 90: 1061-1071
61. Holaska JM, Black BE, Love DC, Hanover JA, Leszyk J (2001) *J Cell Biol* 152: 127-140
62. Quimby BB, Leung SW, Bayliss R, Harreman MT, Thirumala G, Stewart M, Corbett AH (2001) *J Biol Chem* 276: 38820-38829
63. Smith A, Brownawell A, Macara IG (1998) *Curr Biol* 8: 1403-1406
64. Azuma Y, Dasso M (2000) *Curr Opin Cell Biol* 12: 302-307
65. Moore MS (1998) *J Biol Chem* 273: 22857-22860
66. Vetter IR, Nowak C, Nishimoto T, Kuhlmann J, Wittinghofer A (1999) *Nature* 398: 39-46
67. Kuersten S, Ohno M, Mattaj IW (2001) *Trends Cell Biol* 11: 497-503
68. Renault L, Kuhlmann J, Henkel A, Wittinghofer A (2001) *Cell* 105: 245-255
69. Nemergut ME, Lindsay ME, Brownawell AM, Macara IG (2002) *J Biol Chem* 277: 17385-17388
70. Clarke PR, Zhang C (2001) *Trends Cell Biol* 11: 366-371
71. Nakielny S, Dreyfuss G (1999) *Cell* 99: 677-690
72. Ben-Efraim I, Gerace L (2001) *J Cell Biol* 152: 411-417
73. Ribbeck K, Görlich D (2001) *EMBO J* 20: 1320-1330
74. Paschal BM (2002) *Trends Biochem Sci* 27: 593-596

Preseniliny i ich funkcja w patogenezie choroby Alzheimera

The presenilins and Alzheimer disease

TADEUSZ PIETRAS¹, PIOTR WIERZBIŃSKI², PAWEŁ GÓRSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Organizacja genów kodujących preseniliny
- III. Budowa presenilin
- IV. Lokalizacja narządowa presenilin
- V. Rola presenilin w tworzeniu kompleksu gamma-sekretazy
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: A β — białko amyloidu beta (ang. *amyloid β peptide*); β -APP — białko prekursorowe amyloidu beta (ang. *β -amyloid precursor protein*); AID- C końcowy fragment białka β -APP (ang. *β -APP intracellular domain*); ALID1 — fragment wewnątrzkomórkowy pierwszego białka podobnego do białka prekursorowego amyloidu beta (ang. *amyloid precursor-like protein intracellular domain 1*); ALID2 — fragment wewnątrzkomórkowy drugiego białka podobnego do białka prekursorowego amyloidu beta (ang. *amyloid precursor-like protein intracellular domain 2*); APH-1 — białko APH-1 (ang. *anterior-pharynx defective- 1*); APLP1 — białko podobne do białka prekursorowego amyloidu beta (ang. *amyloid precursor-like protein 1*); APLP2 — białko podobne do białka prekursorowego amyloidu beta (ang. *amyloid precursor-like protein 2*); B4-CTF — wewnątrzkomórkowy fragment białka ErbB4 (ang. *C-terminal fragment of ErbB4*); BP1 — białko BP1 (ang. *APP-binding protein-1*); CTF — peptyd C-końcowy preseniliny (ang. *N-terminal fragment*); ErbB4 — białko produkt protoonkogenu homologicznego wobec wirusowego onkogenu ptasiej erythroblastozy (ang. *avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*); FAD — rodzinna postać choroby Alzheimera (ang. *familial Alzheimer disease*); JNK — kinaza N-końca białka produktu protoonkogenu *c-jun* (ang. *c-jun amino-terminal kinase*); LRP — białka związane z receptorem LDL (ang. *LDL receptor-related proteins*); GSK-3 — kinaza syntazy glikogenu 3 beta (ang. *glycogen synthase kinase 3*); NICD — wewnątrzkomórkowa domena białka Notch (ang. *Notch intracellular domain*); NTF — peptyd N-końcowy preseniliny (ang. *N-terminal fragment*); PAT1 — białko PAT1 (ang. *protein that interacts with APP tail*); PEN-2 — białko PEN-2 (ang. *preseni-*

Contents:

- I. Introduction
- II. The genes encoding presenilins
- III. Structure of presenilins
- IV. Tissue localisation of presenilins
- V. Presenilins function in the gamma-secretase construction
- VI. Conclusions

lin enhancer 2); PS-1 — presenilina pierwsza (ang. *presenilin 1*); PS-2 — presenilina druga (ang. *presenilin 2*); PSH- białka o dużej homologii z presenilinami (ang. *presenilin homologues proteins*); ShcA — białko ShcA (ang. *SH2-domain-containing transforming protein 1*), TIP60 — białko TIP60 o aktywności acetylotransferazy histonów (ang. *TAT-interactive protein, 60 kDa*); Wnt- białko Wnt (ang. *wingless*)

I. Wstęp

Otępienia stanowią ważny problem współczesnej medycyny. Jedną z częstszych przyczyn otępienia przedstarczego i starczego jest choroba Alzheimera. Badania nad tą chorobą prowadzone w licznych laboratoriach na świecie koncentrują się na białkach zaangażowanych w patogenezę zmian neuropatologicznych. Zmiany te odpowiedzialne są za rozwój choroby Alzheimera i wtórnie za zanik mózgu z następczym upośledzeniem funkcji poznawczych. Wśród białek związanych z patogenezą choroby szczególne zainteresowanie budzą preseniliny, ponieważ mutacje w genach kodujących te białka są jedną z przyczyn dziedzicznie uwarunkowanej postaci choroby Alzheimera o wczesnym początku (FAD, ang. *familial Alzheimer disease*). Preseniliny wchodzi w skład kompleksu enzymatycznego γ -sekretazy o ważnym znaczeniu w powstawaniu złogów amyloidu beta (A β , ang. *amyloid β peptide*). Powstawanie tych złogów uważane jest za kluczowy proces w rozwoju choroby Alzheimera.

¹Dr n. med., ²student Uniwersytetu Medycznego. ³Prof. dr hab. n. med., Pracownia Gerontologii, Klinika Pneumonologii i Alergologii Instytutu Medycyny Wewnętrznej uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Kopcińskiego 22, 91-153 Łódź, tel/fax (42)6782129
e-mail: tad200@poczta.onet.pl

II. Organizacja genów kodujących preseniliny

Preseniliny (PS) należą do ważnych białek zaangażowanych w procesy degradacji proteolitycznej białka prekursorowego amyloidu i w proces odkładania złożeń A β [1]. Istnieją dwie formy PS: presenilina pierwsza PS-1 i presenilina druga PS-2 [1]. Gen kodujący białko PS-1 zlokalizowany jest w chromosomie 14 (14q24.3) [1]. Gen kodujący PS-2 zlokalizowano na chromosomie 1 (1q42.2) poprzez porównywanie homologii sekwencji z genem kodującym PS-1 [2,3]. Zarówno gen kodujący PS-1, jak i PS-2 złożony jest z 10 eksonów składanych alternatywnie w zależności od tkanki i narządu [4-7]. Ekspresja różnych izoform białek PS (na skutek alternatywnego składowania) prowadzi do zróżnicowanej regulacji procesu degradacji proteolitycznej białka prekursorowego amyloidu beta (β -APP, ang. *β -amyloid precursor protein*) [4,7]. Przykładowo, nieprawidłowa transkrypcja PS-2 z pominięciem egzonu 5 wywołuje zwiększone wytwarzanie A β [8,9]. Z kolei powstanie izoformy bez fragmentu kodowanego przez ekson 3 i 4 lub 8 nie wpływa na zwiększenie wytwarzania A β [8,9].

Dane pochodzące z Banku Genów sugerują, że białka zbudowane podobnie jak preseniliny są stare ewolucyjnie i stosunkowo konserwatywne [10-15]. Świadczy to pośrednio o ważnej roli fizjologicznej tych białek w komórce. Geny homologiczne w stosunku do genów kodujących PS znaleziono u wszystkich badanych dotychczas organizmów eukariotycznych w tym u roślin wyższych, mięczaków, owadów, ryb, ptaków i ssaków [10-15]. Wykryto również białka powszechnie występujące u organizmów eukariotycznych tzw. białka PSH (ang. *presenilin homologues*) o dużej homologii sekwencji z białkami PS [16,17]. Białka PHS pełnią prawdopodobnie funkcję błonowych peptydaz odcinających peptydy sygnałne od preprobiałek. Homologia budowy pomiędzy białkami PHS a PS dotyczy zwłaszcza wewnątrzłonowych i przyłonowych sekwencji aminokwasów bogatych w reszty kwasu asparaginianowego [16,17]. Sekwencje te prawdopodobnie odpowiedzialne są za aktywność biologiczną omawianych białek, w tym za tworzenie proteolitycznego kompleksu nazywanego γ -sekretazą [16,17]. Białka PHS znaleziono u wszystkich badanych organizmów eukariotycznych w tym grzybów i roślin, oraz w grupie organizmów prokariotycznych, *Archea* [16,17]. W genomie ludzkim znaleziono pięć genów kodujących białka PHS [16,17]. Sugeruje się, że PS, jak i białka PHS reprezentują jedną nadrodzinę po-

wszechnie występujących białek prawdopodobnie o aktywności proteolitycznej [16,17].

III. Budowa presenilin

Ludzkie PS1 i PS2 zbudowane są odpowiednio z 467 i 448 aminokwasów [18]. Homologia pomiędzy tymi białkami wynosi ok. 67 % [19]. Masa cząsteczkowa PS wynosi około 50 kDa [18,19]. Preseniliny są białkami błonowymi a ich końce N i C zlokalizowane są w obrębie cytoplazmy [18]. Liczba domen wewnątrzłonowych waha się od 6 do 10 (w zależności od izoformy) [18-20]. Model budowy PS1 z 8 domenami przezłonowymi omawia piśmiennictwo [20,21]. Mutacje związane z chorobą Alzheimera grupują się w obrębie domen wewnątrzłonowych, które są konserwatywne ewolucyjnie [20], w obrębie N-końca cząsteczki białka oraz w długiej wewnątrzcytoplazmatycznej pętli [20]. Pętla ta zlokalizowana jest pomiędzy 6 i 7 domeną wewnątrzłonową [20].

Białko PS ulega modyfikacji posttranslacyjnej [21]. W obrębie wspomnianej powyżej długiej pętli znajduje się domena o aktywności endoproteolitycznej, która przecina łańcuch białkowy blisko miejsca autokatalitycznego dzieląc na dwa polipeptydy [21]. Z białka prekursorowego powstaje peptyd N-końcowy NTF (ang. *N-terminal fragment*) o masie 35 kDa i peptyd C-końcowy o masie 18-20 kDa CTF (ang. *C-terminal fragment*) [21]. Odcięte fragmenty pozostają połączone ze sobą w stosunku stechiometrycznym 1:1, oba są też niezbędne do aktywności biologicznej PS [21]. Przecięcie następuje pomiędzy Thr291 a Met292 w łańcuchu PS-1 i pomiędzy Ala297 i Met298 w łańcuchu PS-2 [22]. Regulacja modyfikacji posttranslacyjnej białek PS nie jest dokładnie poznana. Wiadomo, że oprócz endoproteaz również inne proteazy odgrywają ważną rolę w procesie przecinania łańcucha aminokwasowego obu form PS. Proteazy te zaangażowane są w apoptozę i należą do grupy kaspazy 3 [21,23]. W procesie transportu łańcuchów białkowych PS z retikulum endoplazmatycznego do miejsca występowania w komórce istotną funkcję pełnią takie białka, jak nikastryna, białko APH-1 (ang. *anterior pharynx defective*) i białko PEN-2 (ang. *presenilin enhancer 2*) [21,23]. Białka te równocześnie regulują proces proteolizy łańcucha PS [21,23].

Przecinanie na dwa polipeptydy wykryto u wszystkich badanych PS pochodzących z różnych organizmów [21,25]. Uważa się, że proces ten jest stary ewolucyjnie i odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności biologicznej omawianych białek [24,25]. Niektóre mutacje związane z chorobą

Alzheimera np. delecja egzonu 9 w genie kodującym PS-1 hamuje endoproteolizę czyli przecięcie białka preseniliny na NTF i CTF. Większość mutacji związanych z chorobą Alzheimera nie ma jednak związku z modyfikacją posttranslacyjną presenilin i powstawaniem NTF i CTF [24,25]. Problem ten nie jest jednak rozstrzygnięty jednoznacznie, bowiem ukazują się zarówno prace sugerujące związek pomiędzy zahamowaniem endoproteolizy PS a zmniejszeniem wytwarzania złogów białkowych w mózgowiu [26], jak i prace wskazujące na brak takiego związku [27]. Zagadnienie to dokładnie omówił w pracy przeglądowej Thinakaran [28].

IV. Lokalizacja narządowa presenilin

Ludzkie preseniliny PS-1 i PS-2 wykazują zróżnicowaną ekspresję w różnych tkankach. PS-1 występuje w ośrodkowym układzie nerwowym i we wszystkich tkankach obwodowych [29]. PS-2 wykazuje stosunkowo niską ekspresję w mózgowiu z wyjątkiem *corpus callosum* [29]. Nasiloną ekspresję PS-2 stwierdza się w niektórych narządach w tym: w trzustce, sercu i mięśniach szkieletowych [29,30]. Liczba znalezionych mutacji związanych z otępieniem w obrębie genu kodującego PS-1 jest znacznie większa w porównaniu z liczbą mutacji w genie dla PS-2 [30]. Mniejsza odkryta liczba mutacji w genie kodującym PS-2 tłumaczy się stosunkowo niską ekspresją PS-2 w mózgowiu w porównaniu z ekspresją PS-1 [30].

V. Rola presenilin w tworzeniu kompleksu gamma-sekretazy

Podstawowym znaczeniem biologicznym PS jest udział w tworzeniu kompleksu enzymatycznego γ -sekretazy [20,28]. γ -Sekretaza jest wielopodjednostkowym kompleksem enzymatycznym o charakterze błonowej peptydazy aspartylowej (E.C. 3.4.23.X) [31]. Budzi ona szczególne zainteresowanie, gdyż jest jednym z kilku kompleksów enzymatycznych biorących udział w proteolitycznym cięciu białka prekursorowego amyloidu beta (β -APP) i w patogenezie choroby Alzheimera [28].

Cięcie β -APP odbywa się dwiema drogami: szlakiem nieamyloidogennym i szlakiem amyloidogennym [32-34]. Na szlaku nieamyloidogennym łańcuch β -APP przecinany jest najpierw przez enzym α -sekretazę tworząc rozpuszczalny peptyd powstały od strony N-końca β -AP, peptyd β -APP α (ang. *β -amyloid precursor protein secreted/soluble alpha*) i drugi zakotwiczony w błonie, C83 [32-36]. Peptyd

zakotwiczony w błonie jest następnie rozcinany przez γ -sekretazę do dwóch peptydów nieamyloidogennych [32-34]. Na szlaku amyloidogennym β -APP rozcinany jest najpierw przez β -sekretazę tworząc, od strony N-końca, peptyd β -APPs (ang. *β -amyloid precursor protein secreted/soluble beta*) i drugi peptyd zakotwiczony w błonie, C100 [32-36]. Z peptydu tego γ -sekretaza odcina peptyd A β zbudowany z 40 lub 42 aminokwasów [32-36]. A β jest białkiem odpowiedzialnym za tworzenie typowych dla choroby Alzheimera zmian neuropatologicznych czyli blaszek starczych [32-36].

Fizjologiczna rola białka β -APP i produktów jego proteolitycznej degradacji nie jest znana. Uważa się, że ważne znaczenie ma C końcowy fragment białka β -APP nazwany białkiem AID (ang. *β -APP intracellular domain*) uwalniany podczas ostatniego etapu proteolizy katalizowanego przez kompleks γ -sekretazy [38,39]. AID łączy się z jądrowym białkiem Fe65 i/lub acetylotransferazą histonów czyli białkiem TIP60 (ang. *TAT-interactive protein*, 60 kDa) [38-42]. Kompleks Fe65 z białkiem AID reguluje ekspresję wielu genów poprzez czynnik transkrypcyjny CP2/LSF/LBP [38-42]. Acetylotransferaza histonów hamuje biologiczną aktywność białek substratów kinaz tyrozynowych poprzez wiązanie reszt fosfotyrozynowych i poprzez ich acetylację [38-42]. Zauważono homologię pomiędzy białkiem Fe65 a integrazami retrowirusów [38]. Udowodniono, że geny pozostające pod kontrolą czynników transkrypcyjnych zależnych od AID biorą również udział w wewnątrzkomórkowych mechanizmach przekazywania sygnałów zależnych od fosfatydyloinyzitolu i wapnia [42,43]. Komórki pozbawione β -APP lub narażone na obecność syntetycznych inhibitorów sekretaz charakteryzują się zaburzonym metabolizmem wapnia wewnątrzkomórkowego [42]. AID ułatwia podatność komórki nerwowej na apoptozę, przez co może być czynnikiem ryzyka zaniku komórek nerwowych typowego dla choroby Alzheimera [38-42]. β -APP i AID odgrywają również ważną rolę w transporcie aksonalnym zależnym od białka kinezyny [43-45]. AIP oddziałuje również z innymi białkami takimi, jak BPI (ang. *APP-binding protein-1*), ShcA (ang. *SH2-domain-containing transforming protein 1*), PAT1 (ang. *protein that interacts with APP tail*) i białko JNK (ang. *c-jun amino-terminal kinase*) [43-45].

Być może, AID odgrywa ważniejszą rolę w patogenezie otępienia i zaburzeń funkcji poznawczych, niż powstawanie złogów złożonych z A β [40]. Dotychczas tym złogom przypisywano kluczowe znaczenie w patogenezie choroby [40], choć niektórzy

sądzi od dawna, że tworzenie blaszek amyloidowych może być epifenomenem o wspólnym podłożu patogenetycznym z zanikiem neuronów i z upośledzeniem transmisji cholinergiczej w mózgowiu. Białkom zaangażowanym w patogenezę choroby Alzheimera poświęcono osobny artykuł na łamach Postępów Biochemii [46].

Substratami dla kompleksu enzymatycznego γ -sekreazy są również dwa białka, tj. APLP1 (ang. *amyloid precursor-like protein 1*) i APLP2 (ang. *amyloid precursor-like protein 2*) [47-49]. Białka te mają bardzo podobną strukturę do β -APP, nie zawierają one jednak w środku łańcucha domeny odpowiadającej białku A β [47,50]. Należą do tej samej nadrodziny konserwatywnych ewolucyjnie białek co β -APP [47,50]. Pod wpływem kompleksu γ -sekreazy białka APLP rozpadają się z uwolnieniem do cytoplazmy C-końcowych fragmentów nazwanych odpowiednio ALID1 (ang. *amyloid precursor-like protein intracellular domain 1*) i ALID2 (ang. *amyloid precursor-like protein intracellular domain 1*) [47,51]. Białka ALID wykazują podobne właściwości do białka AID łącząc się z białkiem Fe65 [47,51]. Prawdopodobnie, białka ALID regulują transkrypcję genów w podobny sposób jak białko AID [51]. Rodzi się pytanie, czy białka APLP odgrywają jakąś rolę w patogenezie choroby Alzheimera, mimo że nie posiadają w swojej strukturze fragmentu homologicznego w stosunku do A β [52]?

Trzecią grupą substratów kompleksu γ -sekreazy jest błonowe białko Notch [53-58], oraz prekursor jego fizjologicznych ligandów (białka oznaczone symbolami Delta, Serrate, i Jagged) [53-57]. Białko Notch, zanim staje się substratem dla kompleksu γ -sekreazy cięte jest przynajmniej przez dwa zewnątrz błonowe enzymy proteolityczne, w tym enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworów [53-58]. Sekreaza odszczepia od białka Notch peptyd NICD, który stanowi wewnątrzkomórkową domenę białka Notch (ang. *Notch intracellular domain*) [53-58]. NICD stanowi fragment analogiczny z AID i ALID [53-58]. NICD reguluje transkrypcję wielu genów działających często przeciwstawnie na komórkę w stosunku do genów aktywowanych przez AID i ALIP [53-58]. NICD łączy się w jądrze komórkowym z czynnikiem transkrypcyjnym RBP-Jk regulując ekspresję wielu genów, w tym genów odpowiedzialnych za angiogenezę w ośrodkowym układzie nerwowym i wrażliwość na czynniki proapoptogenne [59,60]. Antagonizm czynnościowy pomiędzy AID a NICD przejawia się w tym, że AID wiąże białko Numb i białka do niego podobne [61]. Białka te są inhibitorami drogi przekazywania sygnału

wewnątrzkomórkowego, w której białka Notch i NICD biorą udział [61]. Interesującym jest fakt, że kompleks γ -sekreazy bierze udział w funkcjonowaniu i regulacji częściowo przeciwstawnych sobie mechanizmów fizjologicznych w komórce nerwowej [61].

Innym substratem dla kompleksu enzymatycznego γ -sekreazy jest błonowy receptor ErbB4 (ang. *avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*) należący do typu I błonowych receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych [62]. γ -Sekreaza odszczepia od białka ErbB4 domenę wewnątrzkomórkową B4-CTF (ang. *C-terminal fragment of ErbB4*) o masie 80 kDa [62]. B4-CTF wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi w jądrze komórkowym [62]. Zdolność do odszczepiania B4-CTF uważa się za jedną z form biologicznej aktywności białka ErbB4 [62]. Aktywność ta jest niezależna od aktywności kinazowej białka ErbB4 [62].

Kolejnym substratem kompleksu γ -sekreazy jest powierzchniowe białko E-kadheryna odgrywające ważną rolę w tworzeniu połączeń międzykomórkowych [63]. γ -Sekreaza odcina wewnątrzkomórkową domenę białka E-kadheryny [63], która łączy się z alfa i beta-keniną [63]. Kompleks γ -sekreazy poprzez odcięcie wewnątrzkomórkowej domeny E-kadheryny zwiększa wewnątrzkomórkową pulę katenin niezwiązanych z innymi białkami, przez co reguluje transdukcję sygnału na drodze zależnej od białek Wnt (ang. *wingless*) [63]. Białka Wnt izolowane z różnych organizmów charakteryzują się dużym stopniem homologii, są konserwatywne ewolucyjnie i zawierają 23/24 reszty cysteinowe [63]. Białka te aktywują różne receptory błonowe, między innymi seroninowo-treoninowe kinazy białkowe, w tym GSK-3 — kinazę syntazy glikogenu 3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*), oraz różne czynniki transkrypcyjne. Szlak transdukcji sygnału regulowany przez Wnt odgrywa ważną rolę w różnicowaniu się ośrodkowego układu nerwowego zarówno u owadów, jak i u ssaków [63].

Kolejnym wykrytym substratem dla kompleksu γ -sekreazy jest powierzchniowe białko CD44 [64]. Białko to reguluje migrację limfocytów i makrofagów, jest również receptorem dla reszt kwasu hialuronowego [64]. γ -Sekreaza odzlepia od CD44 wewnątrzkomórkową domenę, podobnie jak w przypadku wcześniej omówionych substratów [64]. Substratami dla kompleksu γ -sekreazy są również błonowe białka związane z receptorem LDL czyli białka LRP (ang. *LDL receptor-related protein*) [65].

Kolejnym substratem enzymu jest nektyna-1- α , białko z nadrodziny immunoglobulin [66]. Nekty-

na-1- α bierze udział w tworzeniu synaps i połączeń międzykomórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym [66]. Podobnie jak w przypadku innych substratów, kompleks γ -sekreazy odcina wewnątrzkomórkową domenę białka nektyny, o masie 26 kDa [66]. Uwolniony peptyd wpływa na funkcje połączeń międzykomórkowych [66].

Sekwencja aminokwasów, którą przecina γ -sekreaza, jest podobna we wszystkich omówionych białkach [65,66]. Wykaz poznanych substratów γ -sekreazy przedstawia Tabela 1.

Rodzi się pytanie, jak jest zbudowany kompleks γ -sekreazy i jaką rolę w jego budowie i funkcji pełnią preseniliny. Podstawowym składnikiem kompleksu γ -sekreazy jest PS-1 albo PS-2 [66]. Kompleks pozbawiony białka PS traci aktywność katalityczną i ulega szybko degradacji proteolitycznej przez proteasomy [67]. W skład kompleksu γ -sekreazy, oprócz białka PS, wchodzi nikastryna, białko APH-1 i białko PEN-2 [68-77].

Białko PEN-2 zbudowane jest ze 101 aminokwasów, zawiera dwie domeny błonowe, a długa pętla pomiędzy tymi domenami umiejscawia się w świetle retikulum endoplazmatycznego lub aparatu Golgiego [73]. N-koniec białka PEN-2 oddziałuje z białkami PS odpowiadając za ich stabilizację i za endoproteolityczne cięcie PS na peptydy NTF i CTF [73]. Obecność białka PEN-2 jest niezbędna, aby zaszła endoproteoliza łańcucha PS [77]. Gen kodujący białko PEN-2 zlokalizowany jest na chromosomie 19 [73].

Białko APH-1 zbudowane jest z siedmiu domen wewnątrz błonowych i podobnie jak białka PEN-2 i nikastryna, bierze udział w dojrzewaniu obu PS, a jego główna funkcja polega na stabilizacji kompleksu PS/PEN-2 [70,71,74, 77]. Zwiększona ekspresja białka APH-1 ułatwia proteolizę PS zależną od PEN-2 [75]. Sugeruje to, że APH-1 stabilizuje kompleks PEN-2/PS [75]. Gen kodujący białko APH-1 zlokalizowany jest na chromosomie 15 [72]. Zmien-

Tabela 1

Fizjologiczne substraty kompleksu γ -sekreazy i ich funkcje

Białko-substrat sekreazy	Ważniejsze funkcje białka	Literatura
β -APP	prawdopodobnie regulacja transkrypcji genów i regulacja apoptozy	32-45
APLP1 i APLP2	prawdopodobnie regulacja transkrypcji genów i regulacja apoptozy	47-52
białko Notch	transdukcja sygnału wewnątrzkomórkowego, regulacja apoptozy, receptor dla kilku peptydów	53-61
peptydy delta, serrate, jagged	fizjologiczne ligandy białka Notch	53-57
białko ErbB4	receptor dla czynnika wzrostu naskórka o aktywności kinazy tyrozynowej	62
E-kadheryna	białko powierzchniowe regulujące transdukcję sygnału drogą Wnt	63
Nektyna-1 - α	tworzenie synaps i połączeń międzykomórkowych neuronów	66
białko CD44	białko powierzchniowe złączy międzykomórkowych	64
białka LPR	stabilizacja receptora lipoprotein LDL w błonie biologicznej	65

ność nukleotydów w obrębie tego genu wiąże się także z ryzykiem FAD, podobnie jak zmienność nukleotydów i mutacje w genach kodujących białka PS-1, PS-2 i β -APP [72].

Białka PEN-2 i APH-1 są zarówno aktywnymi składnikami kompleksu enzymatycznego γ -sekreazy, jak i regulują ekspresję i transport białek PS-1 i PS-2 [21,23,70]. Ostatnio podkreśla się, że PEN-2 i APH-1 pełnią funkcję białek opiekuńczych (chaperonów) dla PS-1, PS-2 i dla nikastryny [77].

Nikastryna, kolejny składnik kompleksu jest transbłonową glikoproteiną łączącą się z białkami PS [69]. Gen kodujący nikastrynę znajduje się w chromosomie 1q21.1, a mutacje w tym genie związane są z FAD [69]. Zwiększona ekspresja nikastryny nasila aktywność sekretazową enzymu i zwiększa wytwarzanie $A\beta$ [76]. Wzrost aktywności enzymatycznej nie jest związany ze zwiększoną ekspresją PS [76]. Nikastrynę można uważać za allosteryczny aktywator γ -sekreazy [76].

Wszystkie białka: nikastryna, preseniliny (PS-1 albo PS-2), PEN-2 i APH-1 są niezbędne, aby wielopodjednostkowy kompleks białkowy wykazywał aktywność sekretazową (Tabela 2) [68]. W skład kompleksu γ -sekreazy mogą także wchodzić inne białka i pełnić funkcje regulacyjne. Białka te nie są jednak niezbędne dla aktywności katalitycznej sekretazy [68]. Udowodniono to rekonstruując kompleks sekretazy w komórkach drożdży *Sacharomyces cerevisiae* [68]. Wykazano, że centrum aktywne enzymu tworzą wewnątrzblonowa domena 6, znajdująca się w obrębie peptydu NTF i wewnątrzblonowa domena 7 w CTF [69].

Tabela 2

Białka wchodzące w skład kompleksu γ -sekreazy niezbędne do jego aktywności enzymatycznej

Białko	Funkcja	Literatura
preseniliny	Domena 7 i domena 8 tworzą centrum aktywne enzymu	66,67,69
nikastryna	stabilizuje strukturę czwartorzędową, aktywuje allosterycznie aktywność sekretazową, kofaktor cięcia proteolitycznego PS do NTF i CTF	69, 76,77
białko APH-1	stabilizuje strukturę czwartorzędową, ułatwia interakcję PEN-2 z PS	21,23,68,72, 75-77
białko PEN-2	stabilizuje strukturę czwartorzędową, kofaktor cięcia proteolitycznego PS do NTF i CTF	21,23,68,73, 75-77

V. Podsumowanie

W chwili obecnej wiadomo, że preseniliny wchodzi w skład kompleksu enzymatycznego γ -sekreazy. Białko to posiada kluczowe znaczenie w patogenezie choroby Alzheimera. Mutacje w genach kodujących składniki γ -sekreazy są jedną z przyczyn wczesnych zachorowań na otępienie przedstarcze i starcze. Preseniliny, jako podjednostki enzymu, regulują na drodze proteolizy wiele szlaków transdukcji sygnału w obrębie komórki. Wiedza na temat presenilin rozwija się dynamicznie, a każdy dzień przynosi nowe doniesienia i publikacje.

Artykuł otrzymano 22 maja 2003

Zaakceptowano do druku 22 kwietnia 2004

Piśmiennictwo:

- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K (1995) *Nature* **375**: 754-760
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995) *Nature* **376**: 775-778
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995) *Science* **269**: 970-973
- Evin G, Smith MJ, Tziotis A, McLean C, Canterford L, Sharples RA, Cappai R, Weidemann A, Beyreuther K, Cotton RG, Masters CL, Culvenor JG (2002) *Neuroreport* **13**: 719-723
- Manabe T, Katayama T, Sato N, Kudo T, Matsuzaki S, Imaizumi K, Tohyama M (2002) *Neurosci Lett* **328**: 198-200
- Bresciani LG, Walsh DT, Gentleman SM, Jen LS (2002) *Moll Cell Neurosci* **21**: 239-249
- Kwok JB, Halliday GM, Brooks WS, Dolios G, Laudon H, Murayama O, Hallupp M, Badenhop RF, Vickers J, Wang R, Naslund J,

- Takashima A, Gandy SE, Schofield PR (2003) *J Biol Chem* **278**: 6748-6754
8. Prihar G, Fuldner RA, Perez-Tur J, Lincoln S, Duff K, Crook R, Hardy J, Philips CA, Venter C, Talbot C, Clark RF, Goate A, Li J, Potter H, Karran E, Roberts GW, Hutton M, Adams MD (1996) *Neuroreport* **7**: 1680-1684
 9. Grunberg J, Walter J, Eckman C, Capell A, Schindzielorz A, Younkin S, Mehta N, Hardy J, Haass C (1998) *Neuroreport* **9**: 3293-3299
 10. Levitan D, Greenwald I (1995) *Nature* **377**: 351-354
 11. Hong CS, Koo EH (1997) *Neuroreport* **8**: 665-668
 12. Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) *Neuroreport* **8**: 1025-1029
 13. Tsujimura A, Yasojima K, Hashimoto-Gotoh T (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 392-396
 14. Calenda A, Mestre-Frances N, Czech C, Pradier L, Petter A, Perret M, Bons N, Bellis M (1998) *Neurobiol Dis* **5**: 323-333
 15. Martinez-Mir A, Canestro C, Gonzalez-Duarte R, Albalat R (2001) *Gene*: **179**: 157-164
 16. Ponting CP, Hutton M, Nyborg A, Baker M, Jansen K, Golde TE (2002) *Hum Mol Genet* **11**: 1037-1044
 17. Grigorenko AP, Moliaka YK, Korovaitseva GI, Rogaev EI (2002) *Biochemistry (Mosc)* **67**: 826-835
 18. Hutton M, Hardy J (1997) *Hum Mol Genet* **6**: 1639-1646
 19. Fraser PE, Yang DS, Yu G, Levesque L, Nishimura M, Arawaka S, Serpell LC, Rogaeva E, St George-Hyslop P (2000) *Biochim Biophys Acta* **1502**: 1-15
 20. Tandon A, Fraser P (2002) *Genome Biology* **3**: 3014.1-3114.9
 21. Thinakaran G, Regard JB, Bouton CM, Harris CL, Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS (1998) *Neurobiol Dis* **4**: 438-453
 22. Jacobsen H, Reinhardt D, Brockhaus M, Bur D, Kocyba C, Kurt H, Grim MG, Baumeister R, Loetscher H (1999) *J Biol Chem* **274**: 35233-35239
 23. Capell A, Grunberg J, Pesold B, Diehlmann A, Citron M, Nixon R, Beyreuther K, Selkoe DJ, Haass C (1998) *J Biol Chem* **273**: 3205-3211
 24. Kim TW, Pettingell WH, Jung YK, Kovacs DM, Tanzi RE (1997) *Science* **277**: 373-376
 25. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1996) *Neuron* **17**: 181-190
 26. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberley WT, Selkoe DJ (1999) *Nature* **398**: 513-517
 27. Steiner H, Romig H, Pesold B, Philipp U, Baader M, Citron M, Loetscher H, Jacobsen H, Haass C (1999) *Biochemistry* **38**: 14600-14605
 28. Thinakaran G (1999) *J Clin Invest* **104**: 1321-1327
 29. Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P (1997) *Genomics* **40**: 415-424
 30. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M, Mar L, Brice A, Agid Y, Percy ME, Clerget-Darpoux F, Piacentini S, Marcon G, Nacmias B, Amaducci L, Frebourg T, Lannfelt L, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1996) *Hum Mol Genet* **5**: 985-988
 31. Hersh LB (2003) *Curr Pharm Des* **9**: 449-454
 32. Selkoe DJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 18295-18298
 33. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996) *Nat Med* **2**: 864-870
 34. Selkoe DJ (1999) *Nature* **399**: 23-31
 35. Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Pettenati C, Cottini E, Rozzini L, Monastero R, Lenzi GL, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A (2001) *Arch Neurol* **58**: 442-446
 36. Chen Q, Kimura H, Schubert D (2002) *J Cell Biol* **158**: 79-89
 37. Cummings JL (2003) *Semin Clin Neuropsychiatry* **8**: 31-36
 38. Fiore F, Zambrano N, Minopoli G, Donini V, Duilio A, Russo T (1995) *J Biol Chem* **270**: 30853-30856
 39. Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L (2000) *J Alzheimers Dis* **2**: 289-301
 40. Cao X, Sudhof TC (2001) *Science* **293**: 115-120
 41. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) *Cell* **110**: 55-67
 42. Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Muller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4697-4702
 43. Taru H, Iijima K, Hase M, Kirino Y, Yagi Y, Suzuki T (2002) *J Biol Chem* **277**: 20070-20078
 44. Cao X, Sudhof TC (2001) *Science* **293**: 115-120
 45. Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) *Nature* **414**: 643-648
 46. Piekietko A (1999) *Post Bioch* **45**: 116-122
 47. Scheinfeld MH, Ghersi E, Laky K, Fowlkes BJ, D'Adamio L (2002) *J Biol Chem* **277**: 44195-44201
 48. Lenkkeri U, Kestila M, Lamerdin J, McCready P, Adamson A, Olsen A, Tryggvason K (1998) *Hum Genet* **102**: 192-196
 49. von der Kammer H, Loffler C, Hanes J, Klaudiny J, Scheit KH, Hansmann I (1994) *Genomics* **20**: 308-11
 50. Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL (2000) *Neurochem Int* **36**: 175-84
 51. LaFerla FM (2002) *Nat Rev Neurosci* **3**: 862-872
 52. Bayer TA, Paliga K, Weggen S, Wiestler OD, Beyreuther K, Multhaup G (1997) *Acta Neuropathol (Berl)* **94**: 519-524
 53. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) *Nature* **398**: 518-522
 54. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Scheonjans L, De Strooper B (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 461-462
 55. Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Bernstein A, Yankner BA (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 463-465
 56. Indsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, Weinmaster G (1996) *Mol Cell Neurosci* **8**: 14-27
 57. Ikeuchi T, Sisodia SS (2002) *Neuromolecular Med* **1**: 43-54
 58. Ikeuchi T, Sisodia SS (2003) *J Biol Chem* **278**: 7751-7754
 59. Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) *J Cell Physiol* **194**: 237-255
 61. Roncarati R, Sestan N, Scheinfeld MH, Berechid BE, Lopez PA, Meucci O, McGlade JC, Rakic P, D'Adamio L (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7102-7107
 62. Lee HJ, Jung KM, Huang YZ, Bennett LB, Lee JS, Mei L, Kim TW (2002) *J Biol Chem* **277**: 6318-6323
 63. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z,

- Wisniewski T, Robakis NK (2003) *EMBO J* **21**: 1948-1956
64. Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, Edbauer D, Walter J, Steiner H, Haass C (2002) *J Biol Chem* **277**: 44754-44759
65. May P, Reddy YK, Herz J. (2002) *J Biol Chem* **277**: 18736-18743
66. Kim DY, MacKenzie I, Kovacs DM (2002) *J Biol Chem* **277**: 49976-49981
67. Fraser PE, Levesque G, Yu G, Mills LR, Thirlwell J, Frantseva M, Gandy SE, Seeger M, Carlen PL, St George-Hyslop P (1998) *Neurobiol Aging* **19**: S19-S21
68. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) *Nat Cell Biol* **5**: 486-488
69. Dermaut B, Theuns J, Sleegers K, Hasegawa H, Vanden Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, St George-Hyslop P, Cruts M, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2002) *Am J Hum Genet* **70**: 1568-1574
70. Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H (2003) *J Biol Chem* **278**: 7850-7854
71. Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, Li W, Ruan X, Luthra A, Mount HT, Tandon A, Fraser PE, St George-Hyslop P (2003) *J Biol Chem* **278**: 7374-7380
72. Lee SF, Shah S, Li H, Yu C, Han W, Yu G (2002) *J Biol Chem* **277**: 45013-45019
73. Crystal AS, Morais VA, Pierson TC, Pijak DS, Carlin D, Lee VM, Doms RW (2003) *J Biol Chem* **278**, 20117-20123
74. LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) *J Biol Chem* **278**, 37213-37222
75. Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H (2003) *J Biol Chem* **278**, 7850-7854
76. Murphy MP, Das P, Nyborg AC, Rochette MJ, Dodson MW, Loosbrock NM, Souder TM, McLendon C, Merit SL, Piper SC, Jansen KR, Golde TE (2003) *FASEB J* **17**, 1138-1140
77. Baulac S, LaVoie MJ, Kimberly WT, Strahle J, Wolfe MS, Selkoe DJ, Xia W (2003). *Neurobiol Dis* **14**, 194-204

Biosynteza proteoglikanów keratanosiarczanowych, chondroitynosiarczanowych i dermatanosiarczanowych

Biosynthesis of keratan sulfate, chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans

ANDRZEJ GŁOWACKI¹, EWA M. KOŹMA², KRYSZYNA OLCZYK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza proteoglikanów
 - II-1. Synteza białek rdzeniowych i tworzenie ich struktury trzeciorzędowej
 - II-2. Substraty do glikozylacji białek rdzeniowych proteoglikanów
 - II-3. Synteza oligosacharydów wiązanych N-glikozydowo
 - II-4. Synteza oligosacharydów wiązanych O-glikozydowo
 - II-5. Synteza siarczanowanych glikoaminoglikanów
 - II-5.1. Tworzenie siarczanów keratanu
 - II-5.2. Synteza glikoaminoglikanów chondroitynosiarczanowych i dermatanosiarczanowych
 - II-5.2.1. Synteza tetrasacharydu łączącego
 - II-5.2.2. Synteza łańcuchów glikoaminoglikanowych

Wykaz stosowanych skrótów: CS — siarczany chondroityny; CMP — cytydynomonofosforan; CSPG — proteoglikany chondroitynosiarczanowe; DS — siarczany dermatanu; DSPG — proteoglikany dermatanosiarczanowe; ER — siateczka śródplazmatyczna; ERGIC — struktury przejściowe pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego (ang. *Endoplasmic Reticulum — Golgi Intermediate Compartment*); Fuc — fucoza; GAG — glikoaminoglikany; Gal — galaktoza; GalNAc — N-acetylogalaktozoamina; GalNAc4-S — N-acetylogalaktozoamina siarczanowana przy węglu C-4; GalNAc6-S — N-acetylogalaktozoamina siarczanowana przy węglu C-6; GalNAc4,6-diS — N-acetylogalaktozoamina siarczanowana przy węglu C-4 i C-6; Gal-T — galaktozylotransferaza; GDP — guanozynodifosforan; Glc — glukoza; GlcA — kwas glukuronowy, glukuronian; GlcNAc — N-acetyloglukozoamina; GlcNAc-T — N-acetyloglukozoaminylotransferaza; Gn6ST — N-acetyloglukozoaminylo-6 sulfotransferaza; IdoA — kwas L-iduronowy, iduronian; KS — siarczany keratanu; KSPG — proteoglikany keratanosiarczanowe; Man — mannoza; Neu-

Contents:

- I. Introduction
- II. Biosynthesis of proteoglycans
 - II-1. Core protein synthesis and formation of their tertiary structure
 - II-2. Substrates for glycosylation of the proteoglycan core proteins
 - II-3. Synthesis of N-linked oligosaccharides
 - II-4. Synthesis of O-linked oligosaccharides
 - II-5. Synthesis of sulfated glycosaminoglycans
 - II-5.1. Formation of keratan sulfates
 - II-5.2. Synthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate glycosaminoglycans
 - II-5.2.1. Synthesis of the linkage tetrasaccharide
 - II-5.2.2. Synthesis of glycosaminoglycan chains

NAC — kwas N-acetylneuraminowy; PAPS — 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczan; PG — proteoglikany; UDP — urydynodifosforan; Xyl — ksyloza

I. Wstęp

Proteoglikany keratanosiarczanowe (KSPG), chondroitynosiarczanowe (CSPG) oraz dermatanosiarczanowe (DSPG) reprezentują szeroko rozpowszechnioną w organizmach zwierzęcych rodzinę glikoprotein, cechujących się obecnością — kowalencyjnie związanych z częścią białkową — łańcuchów glikoaminoglikanów (GAG) [1]. Te ostatnie są liniowymi heteropolisacharydami, zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych podjednostek o składzie charakterystycznym dla poszczególnych typów GAG [2]. Podjednostki, tworzące łańcuchy siarczanów keratanu (KS), zawierają reszty N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) i galaktozy (Gal). Natomiast disacharydowe podjednostki, budujące łańcuchy siarczanów chondroityny (CS) oraz siarczanów dermatanu (DS), składają się z reszt N-acetylogalak-

^{1,2}Dr, ³prof. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: chem_klin@slam.katowice.pl

tozoaminy (GalNAc) oraz kwasu glukuronowego (GlcA) i/lub iduronowego (IdoA) [3]. Przynajmniej część reszt cukrowych w obrębie łańcuchów wymienionych wyżej GAG jest siarczanowana. Obecność wspomnianych grup oraz — w przypadku CS i DS — grup karboksylowych nadaje GAG charakter polianionów o dużej gęstości ujemnego ładunku elektrycznego [2]. Prócz łańcuchów GAG, proteoglikany (PG) keratano-, chondroityno- i dermatanosiarczanowe zawierają także oligosacharydy, przyłączone wiązaniem N- i/lub O-glikozydowym do części białkowej, tzw. białka rdzeniowego [4]. Białka rdzeniowe PG wykazują często złożoną, wielodomenową strukturę. Strukturalne podobieństwa części białkowej PG stały się podstawą do wyróżnienia kilku rodzin tych makrocząsteczek [1, 5]. Rodzinami, w skład których wchodzi proteoglikany omawiane w niniejszej pracy, są:

1. hialektany (lektykany) — zawierające CSPG i CS/KSPG macierzy pozakomórkowej, agregujące z kwasem hialuronowym [6, 7],
2. bogate w leucynę, drobnocząsteczkowe proteoglikany macierzy — DSPG i większość KSPG [8, 9],
3. testikany — będące pozakomórkowymi proteoglikanami chondroityno-heparanosiarczanowymi [10],
4. syndekany — zawierające przezbłonowe proteoglikany z łańcuchami chondroityno-heparanosiarczanowymi lub heparanosiarczanowymi [11],
5. proteoglikany serglycylowe — wewnątrzkomórkowe PG chondroitynosiarczanowe lub heparynowo-chondroitynosiarczanowe [12].

Poza przedstawioną klasyfikacją — ze względu na unikalną strukturę części białkowej — pozostają jednak niektóre z omawianych w niniejszej pracy PG, np.: trombomodulina [13], betaglikan [14], CD44 [15] czy — klaustryne [16].

Proteoglikany oddziałują z cytokinami, cząsteczkami adhezyjnymi komórek oraz składnikami macierzy pozakomórkowej, uczestnicząc tym samym — jako czynniki regulacyjne — w procesach proliferacji i różnicowania komórek, ich migracji i adhezji oraz tworzeniu struktury macierzy pozakomórkowej [7, 11]. Za wiele wymienionych wyżej funkcji PG odpowiadają wyłącznie ich składniki glikozoaminoglikanowe [1]. Znaczna zmienność struktury łańcuchów GAG, leżąca u podstaw ich zróżnicowanego powinowactwa do różnych ligandów, jest prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn ścisłej regulacji ekspresji poszczególnych typów PG w przebiegu

różnych procesów fizjologicznych i patologicznych [1].

II. Biosynteza proteoglikanów

Biosynteza proteoglikanów odbywa się prawdopodobnie we wszystkich typach komórek zwierzęcych, zawierających jądra komórkowe [17]. Jest to proces złożony z następujących etapów:

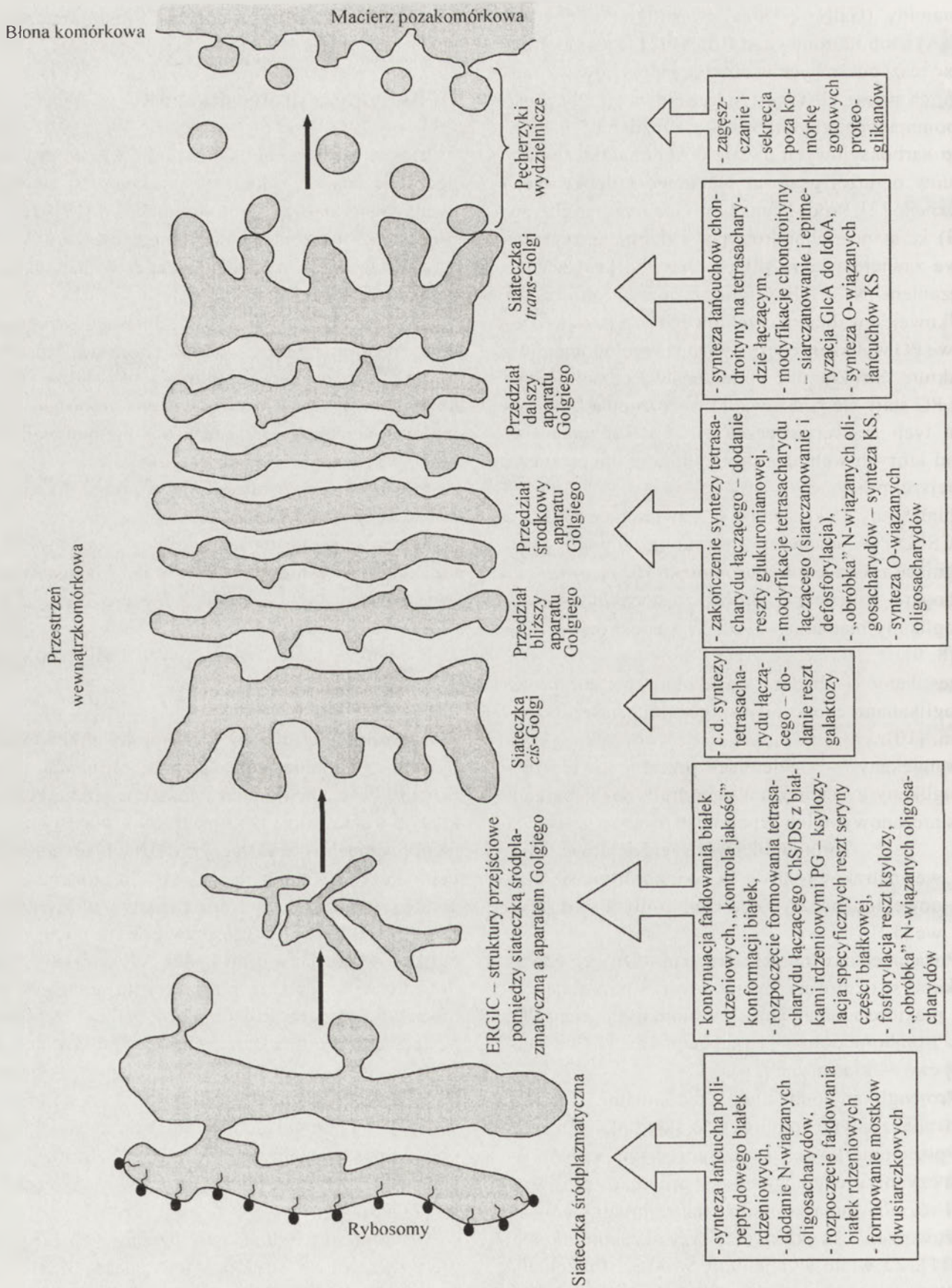
- translacji informacji genetycznej w łańcuch polipeptydowy,
- ko- i posttranslacyjnych modyfikacji syntetyzowanego polipeptydu — białka rdzeniowego, obejmujących m.in. jego N-glikozylację, a także O-glikozylację — w tym syntezę tetrasacharydu łączącego łańcuchy GAG ze wspomnianym białkiem oraz — syntezę glikozoaminoglikanów,
- transportu nowo utworzonego proteoglikanu do miejsca jego przeznaczenia.

Schemat wewnątrzkomórkowej lokalizacji poszczególnych etapów biosyntezy PG przedstawiony jest na Ryc.1.

II-1. Synteza białek rdzeniowych i tworzenie ich struktury trzeciorzędowej

Synteza białek rdzeniowych proteoglikanów odbywa się podobnie, jak w przypadku innych glikoprotein. Proces ten rozpoczyna się w jądrze komórkowym transkrypcją DNA na mRNA, a następnie — na polisomach — translacją mRNA na łańcuch polipeptydowy. Ustalono już sekwencje nukleotydowe genów i odpowiadającą im strukturę pierwszorzędową białek rdzeniowych prawie wszystkich proteoglikanów poznanych do końca XX wieku [5, 18]. Ponadto wykazano, że z transkryptu jednego genu może brać początek kilka izoform białka rdzeniowego jednego PG, powstających zarówno wskutek alternatywnego, posttranskrypcyjnego składowania RNA, jak i enzymatycznej „obróbki” części białkowej [5, 19]. Przykładem takiego zróżnicowania w obrębie poszczególnych PG są cztery izoformy wersikanu [20], a także — wiele form CD44 czy fosfakanu [21-23].

We wszystkich białkach rdzeniowych, których pierwszorzędowa struktura jest znana, występuje N-końcowa, hydrofobowa sekwencja sygnałowa [4]. Jest ona niezbędna do kotranslacyjnego przemieszczania się syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego PG poprzez translokon [24], zlokalizowany w błonie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (ER), do wnętrza tej struktury komórkowej [25]. W ER, wytworzone już białka rdzeniowe PG pozostają w



Ryc. 1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja etapów biosyntezy proteoglikanów keratanosiarczanowych, chondroitinosiarczanowych i dermatanosiarczanowych. CS — siarczany chondroityny, DS — siarczany dermatanu, GlcA — kwas glukuronowy, IdoA — kwas iduronowy, KS — siarczany keratanu, PG — proteoglikany. Opracowano wg [29, 42].

kontakcie z błoną siateczki. Jednakże rodzaj tych oddziaływań jest uzależniony od przyszłej lokalizacji PG. Białka rdzeniowe proteoglikanów macierzy pozakomórkowej są luźno związane z błoną ER, podczas gdy części białkowe PG powierzchniowokomórkowych trwale wiążą się z błoną siateczki, za pomocą swych specyficznych domen przezbłonowych [4].

W siateczce śródplazmatycznej rozpoczyna się kształtowanie trzeciorzędowej struktury wszystkich nowo utworzonych białek — w tym białek rdzeniowych PG, poprzez fałdowanie ich łańcuchów polipeptydowych, które to zmiany konformacyjne, osiągnięte przy udziale białek opiekuńczych, stabilizowane są wytworzeniem wiązań dwusiarczkowych [26, 27]. Równocześnie z opisywanymi procesami, w ER odbywa się swoista „kontrola jakości” powstałych białek. Cząsteczki o nieprawidłowej konformacji są rozpoznawane przez białka sensorowe, należące do grupy białek opiekuńczych, a następnie kierowane do proteasomów w celu degradacji [24, 26].

We wspomnianym wyżej procesie tworzenia odpowiedniej struktury przestrzennej białek (w tym białek rdzeniowych PG) istotną rolę odgrywa także ich N-glikozylacja, rozpoczynająca się w siateczce śródplazmatycznej [28].

II-2. Substraty do glikozylacji białek rdzeniowych proteoglikanów

W procesie N-glikozylacji oraz O-glikozylacji białek rdzeniowych PG, w tym także w syntezie łańcuchów glikozoaminoglikanowych wspomnianych glikoprotein uczestniczą nukleotydowe pochodne monosacharydów, pochodzących głównie z przemian glukozy [25]. Pochodne te obejmują: UDP-N-acetyloglukozoaminę (UDP-GlcNAc), UDP-N-acetylogalaktozoaminę (UDP-GalNAc), UDP-glukozę (UDP-Glc), UDP-galaktozę (UDP-Gal), UDP-ksylozę (UDP-Xyl), UDP-kwas glukuronowy (UDP-GlcA) oraz GDP-fukozę (GDP-Fuc), GDP-mannozę (GDP-Man) i CMP-kwas N-acetylonauraminowy (CMP-NeuNAc) [29-31]. Ponadto, do syntezy niektórych N-wiązanych glikanów oraz wszystkich łańcuchów GAG, tworzących PG, jest także wykorzystywany aktywny siarczan — 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiaraczan (PAPS). Związek ten powstaje z nieorganicznego siarczanu (i w minimalnym stopniu z aminokwasów siarkowych) oraz z ATP, przy udziale enzymu o podwójnej aktywności — ATP sulfurylasy i adenzyno-5'-fosfosiarczanokinazy [32].

Synteza PAPS, a także większości aktywnych pochodnych monosacharydów odbywa się w cytosolu [29, 30]. Dostarczanie tych substratów do ER i aparatu Golgiego, gdzie zachodzą procesy glikozylacji białek, odbywa się przy udziale swoistych białek przezbłonowych [30, 33]. Transportery te funkcjonują jako tzw. antyportery, przenoszące do wnętrza ER i aparatu Golgiego nukleotydowe pochodne cukrów i PAPS, przy równoczesnym transporcie do cytosolu nukleotydów monofosforanowych [30, 34].

II-3. Synteza oligosacharydów wiązanych N-glikozydowo

Pierwszym etapem biosyntezy wiązanych N-glikozydowo oligosacharydowych składników proteoglikanów jest utworzenie oligosacharydu prekursorowego. Proces ten rozpoczyna się od przeniesienia na dolicholowy akceptor, zlokalizowany na zewnętrznej (zwróconej w stronę cytosolu) stronie błony ER, kolejno, dwu reszt N-acetyloglukozoaminy i pięciu reszt mannozy [35]. Tak powstały związek jest transportowany do wewnętrznej warstwy błony ER, gdzie dołącza się do niego siedem dalszych reszt cukrowych, obejmujących cztery reszty mannozy i trzy reszty glukozy [36]. Utworzony w powyższy sposób, prekursorowy oligosacharyd jest następnie przenoszony z fosfodolicholu na resztę asparaginy w sekwencji -Asn-X-Thr/Ser- (gdzie X — dowolna reszta aminokwasowa, z wyjątkiem reszty proliny i kwasu asparaginowego), znajdującej się na syntetyzowanym łańcuchu polipeptydowym białka rdzeniowego PG [37, 38]. Po zakończeniu syntezy N-glikozylowane białka rdzeniowe opuszczają ER i — w tzw. strukturach przejściowych między siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego (pęcherzykach ERGIC) — są transportowane do aparatu Golgiego. Jeszcze w trakcie tej wędrówki, z wiązanych N-glikozydowo oligosacharydów usuwane są cztery końcowe reszty cukrowe [4]. Tak rozpoczęta „obrobka” wspomnianych oligosacharydów odbywa się dalej w aparacie Golgiego. W cysternach jego przedziału bliższego, oligosacharydy wiązane N-glikozydowo do białka rdzeniowego mogą być poddane dwóm różnym, enzymatycznym procesom. W trakcie pierwszego z nich, dwie reszty Man ulegają fosforylacji, co stanowi sygnał do transportu białka rdzeniowego do lizosomów [39]. W przebiegu drugiego procesu, od wiązanego N-glikozydowo oligosacharydu odszczepiane są trzy reszty Man, co prawdopodobnie umożliwia transport glikoproteiny do dalszych przedziałów aparatu Golgiego [39]. W przedziałach tych, w trakcie lub po zakończeniu syn-

tezy GAG i oligosacharydów przyłączonych O-glikozydowo, odbywa się ostateczne formowanie oligosacharydów wiązanych N-glikozydowo do białek rdzeniowych PG. Proces ten przebiega z udziałem ok. 150 enzymów, obejmujących m. in.: N-acetyloglukozaminylotransferazy (GlcNAc-T) I, II, III, IV i V oraz mannozydazy, fukozylotransferazy, galaktozylotransferazy (Gal-T) i sialylotransferazy [39]. Utworzone przy ich udziale oligosacharydy, zawierające często reszty siarczanowanej GlcNAc i Man, fosforylowane reszty cukrowe oraz acetylowane reszty NeuNAc [39], reprezentują jeden z trzech następujących typów strukturalnych [40]:

1. oligosacharydy o wysokiej zawartości mannozy,
2. oligosacharydy typu kompleksowego,
3. oligosacharydy typu hybrydowego.

Z wiązanych N-glikozydowo oligosacharydów typu kompleksowego w toku dalszej, enzymatycznej „obróbki”, mogą powstać poli-N-acetylolaktozoaminy i/lub siarczany keratanu typu I (KS I, rogówkowe) [39, 41].

II-4. Synteza oligosacharydów wiązanych O-glikozydowo

Proces biosyntezy oligosacharydów wiązanych O-glikozydowo — zależnie od typu tych glikanów — albo zaczyna się w cysternach części środkowej aparatu Golgiego i kończy w cysternach części dalszej, albo też całkowicie przebiega w części dalszej [35, 42]. Pierwszym etapem tworzenia tych związków jest przeniesienie reszty N-acetyloglukozaminy z jej UDP pochodnej na resztę treoniny lub — najczęściej — resztę seryny białka rdzeniowego [43]. Dotychczas nie wykazano istnienia uniwersalnej sekwencji łańcucha polipeptydowego w otoczeniu wymienionych wyżej reszt aminokwasowych, rozpoznawanej przez α GalNAc-transferazę polipeptydową, inicjującą syntezę oligosacharydów wiązanych O-glikozydowo [44]. Tworzenie wspomnianych glikanów może kończyć się na etapie przeniesienia jednej reszty GalNAc [43]. Najczęściej jednak do reszty tej przyłączane są naprzemiennie reszty Gal i GlcNAc. Tworzone w ten sposób oligosacharydy wiązane O-glikozydowo różnią się sposobem rozgałęzienia rdzenia cukrowego, co stało się podstawą do wyodrębnienia ośmiu typów tych związków [43, 44]. Większość oligosacharydów wiązanych O-glikozydowo zawiera od kilku do kilkunastu reszt cukrowych. Sygnałem do zakończenia wydłużania tych glikanów jest przyłączenie reszty kwasu N-acetyloneuraminowego [44]. Jednakże oligosacharydy wiązane O-glikozydowo o rdzeniu cukrowym typu 2

i 4 mogą być bardziej wydłużane w wyniku naprzemiennego przyłączania reszt Gal i GlcNAc, co prowadzi do tworzenia rozgałęzionych i liniowych poli-N-acetylolaktozoamin [43, 45]. Spośród nich, liniowe poli-N-acetylolaktozoaminy, powstające jako przedłużenie oligosacharydów typu 2, mogą ulec przekształceniu w siarczany keratanu typu II (KS II, szkieletowe). Proces ten odbywa się poprzez siarczanowanie niektórych reszt GlcNAc i Gal w łańcuchach wspomnianych glikanowych prekursorów [41, 46].

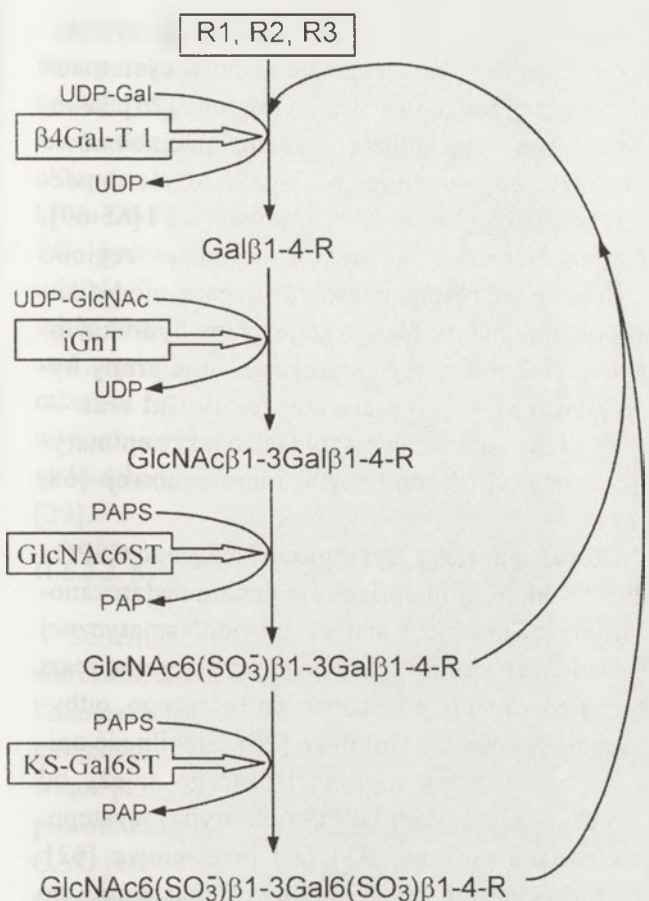
Oligosacharydy wiązane O-glikozydowo, reprezentujące różne typy rdzenia cukrowego, mogą występować na białku rdzeniowym jednego typu PG. Przykładem takiego PG jest, należący do rodziny hialektanów, agrekan, szczególnie rozpowszechniony w chrząstce. Jego białko rdzeniowe zawiera wiązane O-glikozydowo oligosacharydy typu 1 oraz typu 2, przy czym większość z tych ostatnich jest związana z łańcuchami siarczanu keratanu [4, 42].

II-5. Synteza siarczanowanych glikozoaminoglikanów

II-5.1. Tworzenie siarczanów keratanu

Biosynteza siarczanów keratanu odbywa się dwuetapowo — najpierw tworzony jest region łączący białko rdzeniowe z łańcuchem GAG, potem zaś zachodzi wydłużanie tego łańcucha i jego modyfikacja [47]. O ile dwa ostatnie etapy tworzenia KS, których przebieg przedstawiono schematycznie na Ryc. 2, są wspólne dla wszystkich typów tych GAG, to przebieg syntezy regionu łączącego znacznie je różni. Wspomniane różnice są podstawą podziału KS na trzy typy: KS I (rogówkowy), KS II (szkieletowy) i KS III (mózgowy) [3, 48]. Regiony łączące KS I są utworzone przez wiązane N-glikozydowo oligosacharydy typu kompleksowego [39, 41]. Sygnałem do wykorzystania tych oligosacharydów do syntezy KS jest prawdopodobnie obecność reszt aminokwasów aromatycznych (szczególnie fenyloalaniny) w sąsiedztwie asparaginy, podstawionej wymienionymi wyżej glikanami wiazanymi N-glikozydowo [49]. Siarczany keratanu typu I występują w cząsteczkach małych KSPG, bogatych w reszty leucyny [18], a także w agrekanach [6], CD 44, SV 2, abakanie czy klaustryne [41, 47].

Region łączący w siarczanach keratanu typu II stanowią wiązane O-glikozydowo oligosacharydy typu 2 [43, 44]. Obecność łańcuchów KS tak wiązanych do białka rdzeniowego wykazano wyłącznie w agrekanie [6, 41]. W obrębie białka rdzeniowego



R1 - N-glikozydowo wiązany oligosacharyd typu kompleksowego łączący łańcuch siarczanu keratanu z białkiem rdzeniowym

R2 - O-glikozydowo wiązany oligosacharyd typu 2 łączący łańcuch siarczanu keratanu z białkiem rdzeniowym

R3 - O-glikozydowo wiązana reszta mannozy łącząca łańcuch siarczanu keratanu z białkiem rdzeniowym

Ryc. 2. Schemat biosyntezy siarczanów keratanu. $\beta 4\text{Gal-T 1}$ — $\beta 1,4$ -galaktozylotransferaza, Gal — galaktoza, GlcNAc — N-acetyloglukozamina, GlcNAc6ST — N-acetyloglukozaminylo-6-sulfotransferaza, iGnT — $\beta 1,3$ -N-acetyloglukozaminylotransferaza, KS-Gal6ST — galaktozylo-6-sulfotransferaza keratanosiarczanowa, PAPS — 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarcezan, PAP — 3'-fosfoadenozyno-5'-fosforan, UDP — urydynodifosforan. Opracowano wg [41, 47].

tego PG większość łańcuchów KS II jest przyłączona do akceptorowych reszt seryny i treoniny, zlokalizowanych w N-końcowym odcinku tzw. domeny CS. Ponadto, w regionie części białkowej agrekanu, wiążącym kwas hialuronowy, także występują pojedyncze łańcuchy KS II, obok wymienionych wyżej KS I [6, 50].

Łańcuchy siarczanów keratanu typu III łączą się z resztami seryny białka rdzeniowego za pośrednictwem reszty mannozy wiązanej 2,O-glikozydowo [41]. Mannozyłacja białek ssaków nie jest procesem w pełni wyjaśnionym — nie scharakteryzowano dotychczas uczestniczących w nim enzymów. Natomiast opisano już transferazę inicjującą syntezę łańcucha KS III, poprzez przeniesienie na akceptor mannozowy pierwszej reszty GlcNAc [47]. Łańcu-

chy KS III znaleziono w hybrydowej formie chondroitynosiarczanowego PG tkanki nerwowej — fosfakanu [41, 47].

Wydłużanie łańcuchów siarczanów keratanu wszystkich typów odbywa się przez naprzemienne przyłączanie reszt Gal i GlcNAc, prowadzące do powstania cząsteczki prekursorowej — poli-N-acetylolaktozoaminy [41]. Tworzenie tej ostatniej cząsteczki jest katalizowane, odpowiednio, przez galaktozylotransferazę 4 i 1 [51] oraz $\beta 1,3$ -N-acetyloglukozaminylotransferazę [52]. Ostatni z wymienionych enzymów, w odróżnieniu od dwóch pierwszych, nie jest jeszcze ostatecznie zidentyfikowany. Jednakże, istnieją przesłanki wskazujące, iż w elongacji łańcucha prekursora KS może uczestniczyć glukozaminylotransferaza, biorąca udział w syntezie poli-N-acetylolaktozoamin, zwanych „antygenem i” [43, 44].

Przekształcanie prekursorowych poli-N-acetylolaktozoamin w łańcuchy siarczanów keratanu polega na siarczanowaniu przy C-6 reszt galaktozy i N-acetyloglukozaminy. Opisany proces ma charakter tkankowospecyficzny, prowadząc do powstania łańcuchów KS o swoistym rozmieszczeniu siarczanowanych reszt cukrowych [47]. Stwierdzono, iż łańcuchy KS pochodzące z różnych tkanek wykazują mniejszą zawartość reszt siarczanowanej Gal niż siarczanowanej GlcNAc [47]. Wspomniana modyfikacja reszt heksozoaminy jest katalizowana przez N-acetyloglukozaminylo-6-sulfotransferazę (Gn6ST). Enzym ten, którego kilka tkankowych izoform już poznano [53], jest zdolny do siarczanowania jedynie reszty heksozoaminy, znajdującej się na nieredukującym końcu łańcucha poli-N-acetylolaktozoaminy [53]. W związku z powyższym przyjmuje się, iż opisywana modyfikacja reszt GlcNAc odbywa się w trakcie elongacji łańcucha glikanowego [47]. Natomiast najprawdopodobniej już po polimeryzacji KS, zachodzi siarczanowanie reszt Gal, katalizowane przez specyficzną galaktozylo-6-sulfotransferazę [54]. Aktywność tego enzymu, a także transferaz, uczestniczących w wydłużaniu łańcuchów poli-N-acetylolaktozoamin i siarczanów keratanu, jest w znacznym stopniu uzależniona od aktywności Gn6ST, przynajmniej w przypadku komórek rogówki — keratocytów. W rogówce osób cierpiących na tzw. plamkową dystrofię, której patogeneza jest związana z brakiem lub znaczną redukcją aktywności Gn6ST, spotyka się KS o krótkich łańcuchach, zawierających mało reszt siarczanowanej Gal [47].

Prócz opisanej wyżej modyfikacji, w łańcuchach siarczanów keratanu typu II oraz — w mniejszym stopniu — w łańcuchach siarczanów keratanu typu I

niektórych PG stwierdza się obecność reszt fukozy, przyłączonych O-glikozydowo do C-3 reszt siarczanowanej GlcNAc [47]. Przebieg tej modyfikacji oraz zakończenia syntezy łańcuchów KS pozostają nie w pełni zbadane. W przypadku ostatniego z wymienionych procesów wydaje się, iż przyłączenie kwasu N-acetylneuraminowego przy C-3 lub C-6 terminalnej reszty GlcNAc kończy syntezę KS II oraz niektórych KS I [41, 47]. Natomiast inne KS I zawierają na końcu łańcucha glikanowego reszty β GalNAc lub α Gal [55]. Terminalne reszty cukrowe łańcuchów siarczanów keratanu typu III pozostają nieznane [41, 47].

II-5.2. Synteza glikoaminoglikanów chondroitynosiarczanowych i dermatanosiaraczanowych

II-5.2.1. Synteza tetrasacharydu łączącego

Powstanie tetrasacharydowego regionu o strukturze Xyl-Gal-Gal-GlcA, łączącego resztę seryny (lub rzadziej treoniny) białka rdzeniowego z łańcuchem glikoaminoglikanowym, rozpoczyna syntezę siarczanów chondroityny i siarczanów dermatanu, a także pominiętych w niniejszym opracowaniu — siarczanów heparanu i heparyn [29]. Proces tworzenia wspomnianego regionu jest inicjowany przez katalizowane enzymatycznie przeniesienie reszty ksylozy na akceptorową resztę seryny, występującą w charakterystycznej sekwencji łańcucha polipeptydowego [56]. Minimalną sekwencją, rozpoznawaną przez ksylozylotransferazę, jest — zlokalizowany w obszarze łańcucha polipeptydowego o konformacji β płaszczyzny — peptyd zawierający resztę Gli-Ser-Gli, otoczone przez reszty aminokwasów kwaśnych [57, 58]. Jednakże, najlepszym akceptorem reszty ksylozy jest reszta seryny, umiejscowiona w sekwencji Gln-Glu-Glu-Glu-Gli-Ser-Gli-Gli-Gli-Gln, występującej w bikuninie, proteoglikanie chondroitynosiarczanowym, wchodzącym w skład inter- α inhibitora trypsyny [59, 60]. Reakcja ksylozylacji reszty seryny białek rdzeniowych zaczyna się w ER i jest kontynuowana w cysternach bliższego przedziału aparatu Golgiego [61, 62]. Uczestnicząca w tym procesie ksylozylotransferaza — dzięki słabemu związaniu z błonami wymienionych wyżej organelli — odgrywa także dodatkową rolę w syntezie regionu łączącego. Enzym ten ułatwia bowiem przenoszenie pierwszej reszty galaktozy na nieredukujący koniec syntetyzowanego regionu łączącego, wiążąc zarówno modyfikowane białko rdzeniowe, jak i przezbłonową β 1,4-galaktozylotransferazę I, katalizującą reakcję galaktozylacji [63, 64]. Przyłączenie drugiej reszty galaktozy oraz

terminalnej reszty kwasu glukuronowego do syntetyzowanego regionu łączącego zachodzi w cysternach środkowego przedziału aparatu Golgiego [25]. W reakcjach tych uczestniczą swoiste przezbłonowe transferazy, odpowiednio, β 1,3-galaktozylotransferaza II oraz β 1,3-glukuronozylotransferaza I [65-69].

Często jeszcze w trakcie syntezy regionu łączącego jego reszty cukrowe ulegają modyfikacjom, obejmującym: fosforylację grupy hydroksylowej przy C-2 reszty Xyl, siarczanowanie grupy hydroksylowej przy C-6 pierwszej reszty Gal oraz — przy C-4 lub C-6 drugiej reszty Gal, a także epimeryzację reszty GlcA do reszty iduronianowej [68, 70-72].

Fosforylacja reszty Xyl regionu łączącego CSPG i DSPG (a także proteoglikanów heparanosiaraczanowych) może nastąpić w siateczce śródplazmatycznej [72]. Jednakże reakcji tej sprzyja przyłączenie reszt Gal do tworzonego tetrasacharydu łączącego, odbywające się w aparacie Golgiego [25]. Stabilność opisywanej modyfikacji regionu łączącego zależy od typu PG. W niektórych DSPG (dekoryna) występowanie ufosforylowanej Xyl jest przejściowe [62]. Defosforylacja tej reszty cukrowej następuje po przyłączeniu do syntetyzowanego regionu łączącego reszty glukuronianowej [73]. Natomiast obecność trwale fosforylowanej reszty wspomnianej pentozy stwierdza się w regionach łączących agrekanów, syntetyzowanych i wydzielanych przez chondrocyty [74]. W związku z występowaniem opisanych wyżej różnic w stabilności stanu ufosforylowania Xyl w różnych PG, wydaje się, iż wspomniana modyfikacja może determinować syntezę lub modyfikację proteoglikanów, wpływając na ich transport w obrębie aparatu Golgiego [25]. Ponadto wykazano, że fosforylacja reszty ksylozy przyspiesza przyłączanie reszty glukuronianowej w trakcie syntezy regionu łączącego [29, 72, 73].

Kolejna z wymienionych wyżej modyfikacji regionu łączącego obejmuje siarczanowanie jego reszt Gal. Ponieważ reakcja ta dotyczy wyłącznie tetrasacharydu łączącego proteoglikanów chondroitynosiarczanowych i dermatanosiaraczanowych, wydaje się, że stanowi ona sygnał do syntezy siarczanów chondroityny i siarczanów dermatanu na białkowych nośnikach [75]. Powyższa hipoteza znajduje potwierdzenie w wynikach badań, wskazujących, iż 4-O-siarczanowane reszty Gal regionu łączącego stymulują przyłączanie do niego reszty GalNAc, hamując jednocześnie aktywność GlcNAc-transferazy, enzymu odpowiadającego za inicjację syntezy łańcuchów siarczanów heparanu i heparyn [56, 68, 76].

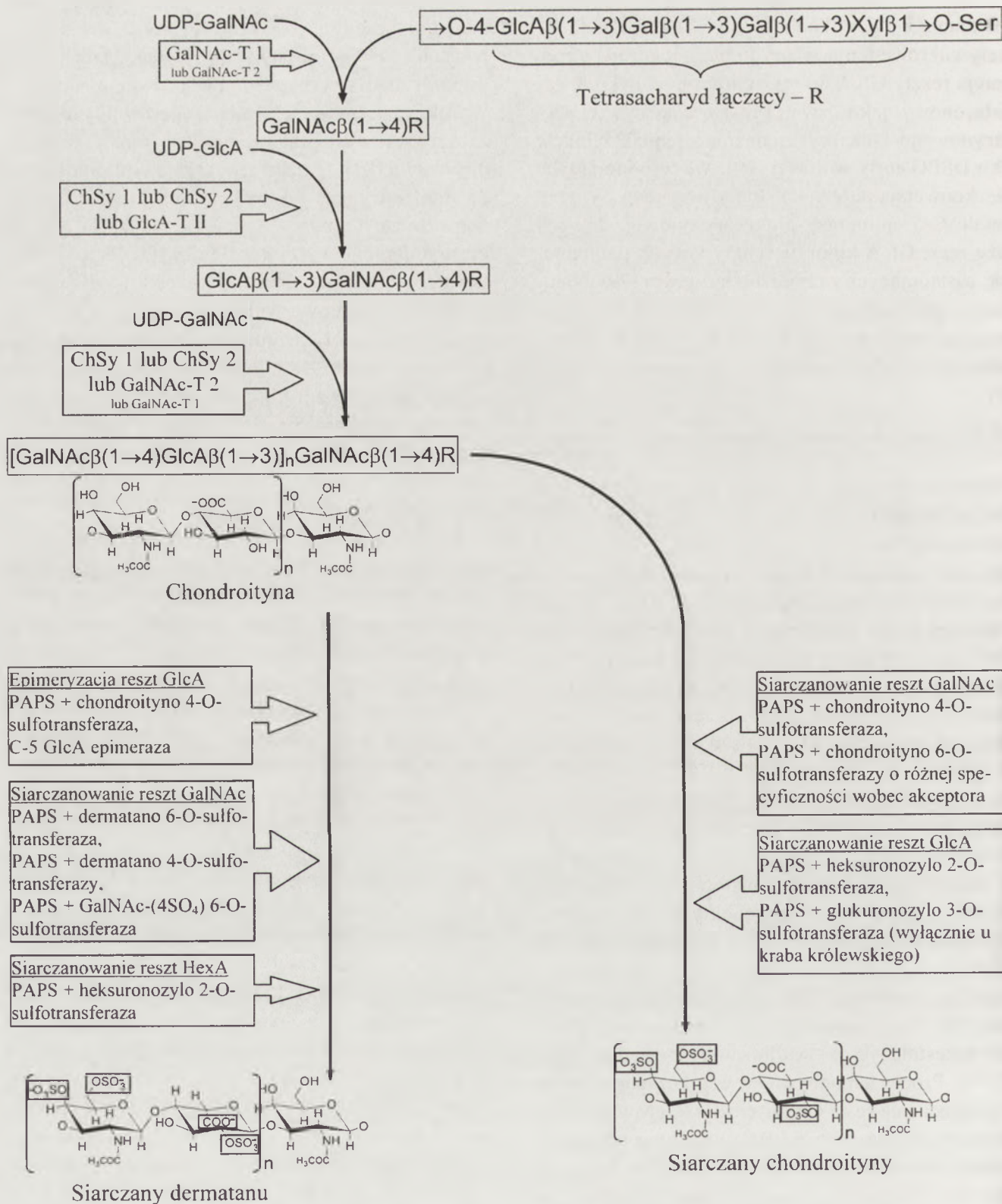
Ostatnia z modyfikacji, jakim mogą być poddane reszty cukrowe tetrasacharydu łączącego, to epimeryzacja reszty GlcA do reszty iduronianowej. Kwas L-iduronowy, jako czwartą resztę cukrową tetrasacharydowego łącznika, znaleziono jednak tylko w kilku DSPG aorty wołowej [29]. We wspomnianych PG, konwersja GlcA do IdoA, zachodząca przy udziale C-5 epimerazy glukuronozylowej, dotyczy także reszt GlcA kilku disacharydowych podjednostek, sąsiadujących z regionem łączącym [29]. Natomiast w przypadku większości DSPG epimeryzacja wspomnianych reszt cukrowych odbywa się dopiero w disacharydach odleglejszych od regionu łączącego [29].

II-5.2.2. Synteza łańcuchów glikoaminoglikanowych

Schemat biosyntezy siarczanów chondroityny i siarczanów dermatanu przedstawiono na Ryc.3. Glikoaminoglikany te są tworzone jako nierozgałęzione łańcuchy heteropolisacharydowe, stanowiące przedłużenie regionów łączących [25]. Proces powstawania na powyższym akceptorze łańcucha GAG jest inicjowany i zarazem regulowany przeniesieniem pierwszej reszty GalNAc na nieredukujący koniec regionu łączącego [62]. Jeśli reszta ta jest dołączana wiązaniem α 1-4, dalsze wydłużanie łańcucha glikanowego jest wstrzymane [57]. Jeżeli jednak pierwsza reszta GalNAc jest przyłączana do regionu wiążącego wiązaniem β 1-4, łańcuch GAG jest syntetyzowany [56, 57]. Pierwszą z opisanych wyżej reakcji katalizuje α -GlcNAc-transferaza I, drugą zaś β -GalNAc-transferaza I, której aktywność wykazują przynajmniej dwa białka, znalezione w organizmach zwierzęcych [77]. Te dwa ostatnie enzymy różnią się ekspresją tkankową oraz specyficznością substratową [78]. Tym niemniej, obie transferazy mogą także uczestniczyć w wydłużaniu łańcucha GAG [77-79]. Proces ten odbywa się poprzez naprzemienne przyłączanie reszt GalNAc i GlcA, prowadząc do powstania prekursora CS i DS — chondroityny. Biosynteza chondroityny zachodzi — w zależności od typu tworzonego PG — w cysternach środkowego i/lub dalszego przedziału aparatu Golgiego [25]. W opisywanym procesie przyłączanie reszt heksozamin do syntetyzowanego łańcucha glikanowego odbywa się przy udziale jednego z opisywanych wyżej enzymów o aktywności β -GalNAc-transferazy albo też syntazy chondroitynowej 1 lub 2 [78, 80, 81]. Jedną z dwóch wymienionych syntaz lub też β 1,3-glukuronozylotransferaza II katalizują przeniesienie reszt glukuronianowych na powstający łańcuch GAG [80, 82]. Mimo, iż potwierdzony jest

udział wymienionych wyżej transferaz w elongacji łańcucha chondroityny, to jednak mechanizm współdziałania tych enzymów pozostaje niejasny. Wyniki wcześniejszych badań sugerowały, że każda z reszt cukrowych przenoszona jest przez swoisty dla niej enzym [82]. Jednakże, odkrycie syntaz zdolnych do transferu reszt cukrowych obu typów zdaje się podważać tę hipotezę. Wydaje się jednak, iż wszystkie wymienione wyżej transferazy tylko wtedy efektywnie wydłużają łańcuch glikoaminoglikanowy, gdy białko rdzeniowe syntetyzowanego PG jest unieruchomione na błonie aparatu Golgiego, w sąsiedztwie enzymów [25, 83]. Powyższa sugestia wyływa z obserwacji, że ani oligosacharydy, ani też wolne łańcuchy chondroityny, dodane do bezkomórkowych systemów mikrosomalnych, nie są dobrymi akceptorami reszt cukrowych, służących do syntezy glikoaminoglikanów [25].

Jeszcze w trakcie elongacji, łańcuch chondroityny syntetyzowanego CSPG lub DSPG podlega modyfikacjom, obejmującym siarczanowanie reszt GalNAc i reszt kwasów heksuronowych oraz — w przypadku glikanów dermatanosiarczanowych — epimeryzację reszt glukuronianowych do iduronianowych [28, 84]. Pierwsza z wymienionych modyfikacji dotyczy większości reszt heksozamin, zarówno w łańcuchach CS jak i DS. Tym niemniej, między wymienionymi typami GAG istnieją różnice w sposobie siarczanowania tych reszt. Reszty GalNAc w łańcuchach CS są najczęściej siarczanowane przy C-4 (GalNAc-4-S) lub C-6 (GalNAc-6-S), rzadziej w obu tych pozycjach równocześnie (GalNAc-4,6-diS) [85]. Reszty GalNAc-4-S dominują w łańcuchach DS, podczas gdy reszty GalNAc-6-S czy też GalNAc-4,6-diS są w tych glikanach dość rzadkie [25, 29]. Ponadto, DS cechują się dużą zawartością reszt iduronianowych, siarczanowanych przy C-2 [86]. Natomiast siarczanowanie tylko w małym stopniu dotyczy reszt glukuronianowych łańcuchów CS — reszty kwasu glukuronowego siarczanowane przy C-2 bądź C-3 są spotykane bardzo rzadko [25]. Siarczanowanie reszt cukrowych łańcuchów CS i DS przebiega w sposób swoisty tkankowo. Opisywane GAG, pochodzące z różnych tkanek, cechują się bowiem odmiennym stopniem i sposobem siarczanowania podjednostek disacharydowych oraz innym ich rozmieszczeniem w łańcuchu glikanowym [87]. Jedną z głównych przyczyn opisywanego zjawiska jest prawdopodobnie tkankowe zróżnicowanie w odniesieniu do ekspresji i regulacji aktywności sulfo-transferaz, katalizujących reakcje siarczanowania [25, 88]. Scharakteryzowano już kilka takich białek enzymatycznych [84]. Badania ich aktywności wy-



Ryc. 3. Schemat biosyntezy siarczanów chondroityny i siarczanów dermatanu. ChSy 1 - syntaza chondroitynowa 1, ChSy 2 - syntaza chondroitynowa 2, GalNAc - N-acetylogalaktozoamina, GalNAc-T 1 - chondroitynowa β1,4-N-acetylogalaktozoaminylotransferaza 1, GalNAc-T 2 - chondroitynowa β1,4-N-acetylogalaktozoaminylotransferaza 2, GlcA - kwas glukuronowy, GlcA-T II - β1,3-glukuronozylotransferaza II, HexA - kwas heksuronowy (glukuronowy lub iduronowy), PAPS - 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarcezan, UDP - urydynodifosforan. Opracowano wg [29, 56, 78, 80, 84].

kazały, iż odrębne enzymy odpowiadają za siarczanowanie przy C-4 reszt GalNAc w łańcuchach chondroityny, przekształcanej w CS bądź w DS [25, 89]. Ponadto, stwierdzono także występowanie znacznych różnic w specyficzności substratowej chondroityno-6-sulfotransferaz. W grupie tych enzymów

znaleziono białka katalizujące siarczanowanie zarówno reszt GalNAc w łańcuchach chondroityny, jak i reszt Gal w łańcuchach poli-N-acetylolaktozoamin oraz — cechujące się bardzo wysoką specyficznością — transferazy, uczestniczące w przenoszeniu grup siarczanowych na terminalne reszty Gal-

NAC-4-S [90-92]. Sulfotransferazy różnią się także rozmieszczeniem w cysternach aparatu Golgiego. Zarówno w cysternach jego przedziału środkowego jak i dalszego zlokalizowane są chondroityno-6-sulfotransferazy [93]. Natomiast enzymy, uczestniczące w siarczanowaniu reszt N-acetylogalaktozaminy przy C-4 oraz reszt kwasu iduronowego przy C-2, występują wyłącznie w cysternach dalszego przedziału aparatu Golgiego [25, 83]. Jednakże, niezależnie od swej lokalizacji, opisywane transferazy tylko wtedy efektywnie uczestniczą w siarczanowaniu łańcuchów chondroityny syntetyzowanego PG, gdy jego białko rdzeniowe jest zakotwiczone w błonie aparatu Golgiego, w sąsiedztwie enzymów. Taki wniosek wynika bowiem z obserwacji, iż oligosacharydy oraz wolne łańcuchy chondroityny, dodane do bezkomórkowych układów mikrosomalnych, są siarczanowane tylko w małym stopniu [25, 88].

Siarczanowanie przy C-4 reszt GalNAc, w trakcie przekształcania prekursora chondroitynowego w siarczany dermatanu, jest ściśle związane z epimeryzacją sąsiadujących w obrębie łańcucha glikanowego z resztami heksozoaminy — reszt glukuronianowych do reszt iduronianowych [25]. Ścisłe czasowe powiązanie obu wymienionych modyfikacji jest niezbędne, gdyż epimeryzacja reszt glukuronianowych, katalizowana przez chondroitynową C-5 epimerazę glukuronozylową, jest odwracalna, jeśli sąsiednie reszty GalNAc nie zostaną szybko siarczanowane [25, 94]. Opisane wyżej reakcje, zachodzące w obrębie jednego disacharydu łańcucha chondroityny, przyspieszają modyfikację kolejnych podjednostek disacharydowych [25]. Powstają w ten sposób regiony zmodyfikowanych podjednostek, różniące się długością i rozmieszczeniem w łańcuchach glikanowych [86]. Wspomniane zjawisko jest kolejną przyczyną heterogenności strukturalnej siarczanów dermatanu [86, 94]. Epimeryzacja reszt glukuronianowych w łańcuchach glikanowych syntetyzowanych DSPG odbywa się w cysternach dalszego przedziału aparatu Golgiego [25]. Jednakże „trafienie” syntetyzowanych PG do miejsc wykazujących lub też niewykazujących aktywności epimerazy, w obrębie wspomnianego wyżej przedziału, jest zdeterminowane strukturą proteoglikanowych białek rdzeniowych. Obecność w ich polipeptydowych łańcuchach heptapeptydu Pro-X-Y-Thr-Glu-Leu-Ser (gdzie X = Glu, Gln lub Ser, natomiast Y = Gly, Ala lub Pro) jest prawdopodobnie sygnałem do kierowania syntetyzowanych PG do regionów, pozbawionych aktywności wspomnianego wyżej enzymu [95]. Potwierdzeniem powyższej sugestii jest wykazanie występowania takiego peptydu w białkach rdzeniowych CSPG —

agrekaniu, wersikanu, syndekanu i proteoglikanowej formy czynnika stymulującego wzrost kolonii makrofagów [95].

Mechanizm zakończenia biosyntezy łańcuchów CS i DS w proteoglikanach nie jest w pełni wyjaśniony. Wydaje się, iż sygnałem do terminacji syntezy łańcucha glikanowego jest siarczanowanie końcowej reszty GalNAc przy C-4 lub też — równocześnie — przy C-4 i C-6 [96]. Jednakże, regulacja omawianego procesu nie jest prawdopodobnie zbyt precyzyjna, co w konsekwencji prowadzi do występowania różnic w długości łańcuchów glikozoaminoglikanowych, pochodzących z tego samego PG, syntetyzowanego przez ten sam rodzaj komórek [25, 97].

Proteoglikany keratanosiarczanowe oraz chondroitynosiarczanowe i dermatanosiarczanowe — po zakończeniu ich biosyntezy — przebywają w tzw. siateczce *trans* aparatu Golgiego, gdzie tworzą się granule wydzielnicze. We wspomnianych strukturach, cząsteczki PG podlegają sortowaniu i zagęszczaniu, po czym opuszczają wnętrze komórki i transportowane są do miejsc, w których spełniają swoje funkcje [83, 98].

Artykuł otrzymano 18 grudnia 2003

Zaakceptowano do druku 8 kwietnia 2004

Piśmiennictwo:

- Koźma EM, Głowacki A, Olczyk K, Jaźwiec M (1997) *Post Biochem* 43: 158-172
- Jackson RL, Bush SJ, Cardin AD (1991) *Physiol Rev* 71: 481-525
- Głowacki A, Koźma E, Olczyk K, Kucharz EJ (1995) *Post Biochem* 41: 139-148
- Hascall VC, Heinegard DK, Wight TN (1991) W: Hay ED (red) *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Press, New York-London, str. 149-175
- Lozzo RV, Danielson KG (1999) *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 62: 19-53
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB (2002) *Cell Res* 12: 19-32
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) *Physiol Rev* 80: 1267-1290
- Lozzo RV (1999) *J Biol Chem* 274: 18843-18846
- Bobinski R, Olczyk K, Krzyżowska-Bobinska E (1998) *Post Biochem* 44: 64-71
- Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Sato H (2003) *Cancer Res* 63: 3364-3369
- Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M (1999) *Annu Rev Biochem* 68: 729-777
- Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT (1998) *Biochim Biophys Acta* 1425: 617-627
- Edano T, Kumai N, Mizoguchi T, Ohkuchi M (1998) *Int J Biochem Cell Biol* 30: 77-88
- Ponce-Castaneda MV, Esparza-Lopez J, Vilchis-Landeros MM, Mendoza VR, Lopez-Casillas F (1998) *Biochim Biophys Acta* 1384: 189-196
- Johnson P, Maiti A, Brown KL, Li R (2000) *Biochem Pharmacol* 59: 455-465

16. Togel M, Wiche G, Propst F (1998) *FEBS Lett* **423**: 254-258
17. Makatsoni E, Karamanos NK, Papadogiannakis N, Hjerpe A, Anastassiou ED, Tseggenidist (2001) *Biomed Chromatogr* **15**: 413-417
18. Ameye L, Young MF (2002) *Glycobiology* **12**: 107R-116R
19. Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S (2000) *Arch Biochem Biophys* **374**: 24-34
20. Schmalfeldt M, Dours-Zimmermann M, Winterhalter KH, Zimmermann DR (1998) *J Biol Chem* **273**: 15758-15764
21. Greenfield B, Wang W-C, Marquard H, Piepkorn M, Wolffe EA, Aruffo A, Bennet KL (1999) *J Biol Chem* **274**: 2511-2517
22. Miyata S, Shingal, Taguchi K, Nakashima T, Kiyohara T, Oohira A (2002) *Brain Res* **949**: 112-121
23. Shintani T, Maeda N, Nishiwaki T, Noda M (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 419-425
24. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 246-255
25. Silbert JE, Sugumarang (2002) *IUBMB Life* **54**: 177-186
26. Ellgaard L, Helenius A (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 181-191
27. Gao Y, Mehta K (2001) *J Biochem* **129**: 179-83
28. Parodi AJ (2000) *Biochem J* **348**: 1-13
29. Prydz K, Dalen KT (2000) *J Cell Sci* **113**: 193-205
30. Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C (1998) *Annu Rev Biochem* **67**: 49-69
31. Yarema KJ, Bertozzi CR (2001) *Genome Biol* **2**: reviews0004.1-0004.10.
32. Superti-Furga A (1994) *Am J Hum Genet* **55**: 1137-1145
33. Kinoshita T, Inoue N (2000) *Curr Opin Chem Biol* **4**: 632-638
34. Guillen E, Abeijon C, Hirschberg CB (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7888-7892
35. Jaeken J, Matthijs G (2001) *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 129-151
36. Burda P, Aebi M (1999) *Biochim Biophys Acta* **1426**: 239-257
37. Verbert A, Cacan R (1999) *Biochim Biophys Acta* **1473**: 137-146
38. Kornfeld R, Kornfeld S (1985) *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664
39. Frosch C (1997)
40. Zakl (1995) *Post Biol Kom* **22**: 317-341
41. Funderburgh JL (2000) *Glycobiology* **10**: 951-958
42. Vertel BM (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 458-464
43. Ujita M, Fukuta M (2001) *Trends Glycosci Glycotechnol* **13**: 177-191
44. Brockhausen I (1999) *Biochim Biophys Acta* **1473**: 67-95
45. Leppanen A, Zhu Y, Maaheimo H, Helin J, Lehtonen E, Renkonen O (1998) *J Biol Chem* **273**: 17399-17405
46. Habuchi O, Suzuki Y, Fukuta M (1997) *Glycobiology* **7**: 405-412
47. Funderburgh JL (2002) *IUBMB Life* **54**: 187-194
48. Greiling H (1994) *EXS* **70**: 101-122
49. Dunlevy JR, Neame PJ, Vergnes J-P, Hassell JR (1998) *J Biol Chem* **273**: 9615-9621
50. Watanabe H, Yamada Y, Kimata K (1998) *J Biochem* **124**: 687-693
51. Amado M, Almeida R, Schwientek T, Clausen H (1999) *Biochim Biophys Acta* **1473**: 35-53
52. Sasaki K, Kurata-Miura K, Ujita M, Angata K, Nakagawa S, Sekine S, Nishi T, Fukuta M (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14294-14299
53. Lee JK, Bhakta S, Rosen SD, Hemmerich S (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 543-549.
54. Fukuta M, Inazawa J, Torii T, Tsuzuki K, Shimada E, Habuchi O (1997) *J Biol Chem* **272**: 32321-32328
55. Tai GH, Nieduszynski IA, Fullwood NJ, Huckerby TN (1997) *J Biol Chem* **272**: 28227-28231
56. Sugahara K, Kitagawa H (2000) *Curr Opin Struct Biol* **10**: 518-527
57. Esco JD, Zhang L (1996) *Curr Opin Struct Biol* **6**: 663-670
58. Zhang L, David G, Esco JD (1995) *J Biol Chem* **270**: 27127-27135
59. Habuchi H, Habuchi O, Kimata K (1998) *Trends Glycosci Glycotechnol* **10**: 65-80
60. Weilke C, Brinkmann T, Kleesiek K (1997) *Clin Chem* **43**: 45-51
61. Kresse H, Seidler DG, Muller M, Breuer E, Hausser H, Roughley PJ, Schonherre E (2001) *J Biol Chem* **276**: 13411-13416
62. Fransson L-A, Belting M, Jonsson M, Mani K, Moses J, Oldberg A (2000) *Matrix Biol* **19**: 367-376
63. Higuchi T, Tamura S, Tanaka K, Takagaki K, Saito Y, Endo M (2001) *Biochem Cell Biol* **79**: 159-164
64. Almeida R, Levery SB, Mandel U, Kresse H, Schwientek T, Bennett EP, Clausen H (1999) *J Biol Chem* **274**: 26165-26171
65. Bai X, Zhou D, Brown JR, Crawford BE, Hennet T, Esco JD (2001) *J Biol Chem* **276**: 48189-48195
66. Kim B-T, Tsuchida K, Lincecum J, Kitagawa K, Bernfield M, Sugahara K (2003) *J Biol Chem* **278**: 9116-9124
67. Pedersen LC, Tsuchida K, Kitagawa K, Sugahara K, Darden TA, Negishi M (2000) *J Biol Chem* **275**: 34580-34585
68. Ueno M, Yamada S, Zako M, Bernfield M, Sugahara K (2001) *J Biol Chem* **276**: 29134-29140
69. Kitagawa H, Taoka M, Tone Y, Sugahara K (2001) *Biochem J* **358**: 539-546
70. Yamada S, Okada Y, Ueno M, Iwata S, Deepa SS, Nishimura S, Fujita M, Vandiel, Hirabayashi Y, Sugahara K (2002) *J Biol Chem* **277**: 31877-31886
71. Yamada S, Oyama M, Yuki Y, Kato K, Sugahara K (1995) *Eur J Biochem* **233**: 687-693
72. Moses J, Oldberg A, Fransson L-A (1999) *Eur J Biochem* **260**: 879-884
73. Fransson L-A, Belting M, Edgren G, Jonsson M, Mani K, Schmidtchen A, Wiik P (1998) *Trends Glycosci Glycotechnol* **10**: 81-94
74. Oegema TR Jr, Kraft EL, Jourdian GW, VanValen TR (1984) *J Biol Chem* **259**: 1720-1726
75. Sugahara K, Kitagawa H (2002) *IUBMB Life* **54**: 163-175
76. Sakaguchi H, Watanabe M, Ueoka C, Sugiyama E, Taketomi T, Yamada S, Sugahara K (2001) *J Biochem* **129**: 107-118
77. Uyama T, Kitagawa H, Tanaka J, Tamura J, Ogawa T, Sugahara K (2003) *J Biol Chem* **278**: 3072-3078
78. Sato T, Gotoh M, Kiyohara K, Akashima T, Iwasaki H, Kameyama A, Mochizuki H, Yada T, Inaban N, Togayachi A, Kudo T, Asada M, Watanabe H, Imamura T, Kimata K, Narimatsu H (2003) *J Biol Chem* **278**: 3063-3071
79. Uyama T, Kitagawa H, Tamura J, Sugahara K (2002) *J Biol Chem* **277**: 8841-8846
80. Yada T, Gotoh M, Sato T, Shionyu M, Go M, Kaseyama H, Iwasaki H, Kikuchi N, Kwon Y-D, Togayachi A, Kudo T, Watanabe H, Narimatsu H, Kimata K (2003) *J Biol Chem* **278**: 30235-30247
81. Kitagawa H, Uyama T, Sugahara K (2001) *J Biol Chem* **276**: 38721-38726
82. Sugumarang G, Katsman M, Sunthakar P, Drake RR (1997) *J Biol Chem* **272**: 14399-14403
83. Silbert JE, Sugumarang G (1995) *Biochim Biophys Acta* **1241**: 371-384
84. Habuchi O (2000) *Biochim Biophys Acta* **1474**: 115-127
85. Cheng F, Yoshida K, Heinegard D, Fransson LA (1992) *Glycobiology* **2**: 553-561
86. Trowbridge JM, Gallo RL (2002) *Glycobiology* **12**: 117R-125R

87. Cheng F, Heinegard D, Malmstrom A, Schmidtchen A, Yoshida K, Fransson LA (1994) *Glycobiology* 4: 685-696
88. Silbert JE, Sugumaran G, Cogburn JN (1993) *Biochem J* 296: 119-126
89. Evers MR, Xia G, Kang HG, Schachner M, Baenziger JU (2001) *J Biol Chem* 276: 36344-36353
90. Fukuta M, Uchimura K, Nakashima K, Katom, Kimata K, Shinomura T, Habuchi O (1995) *J Biol Chem* 270: 18575-18580
91. Sugumaran G, Katsman M, Drake RR (1995) *J Biol Chem* 270: 22483-22487
92. Ohtake S, Ito Y, Fukuta M, Habuchi O (2001) *J Biol Chem* 276: 43894-43900
93. Sugumaran G, Silbert JE (1991) *J Biol Chem* 266: 9565-9569
94. Valla S, Li J, Ertesvagh H, Barbeyron T, Lindahl U (2001) *Biochimie* 83: 819-830
95. Seidler DG, Breuer E, Grande-Allen KJ, Hascall VC, Kresse H (2002) *J Biol Chem* 277: 42409-42416
96. West LA, Roughley P, Nelson FR, Plaas AH (1999) *Biochem J* 342: 223-229
97. Midura RJ, Calabro A, Yanagishita M, Hascall VC (1995) *J Biol Chem* 270: 8009-8015
98. Arvan P, Castle D (1998) *Biochem J* 332: 593-610

Flawonoidy — charakterystyka i znaczenie w terapii

Flavonoids — characteristics and significance for therapy

DOMINIKA MALIŃSKA¹, ANNA KIERSZTAN²

Spis treści:

- I. Wstęp
 - I-1. Budowa i klasyfikacja flawonoidów
 - I-2. Zawartość flawonoidów w diecie i ich przyswajanie
- II. Przeciwnowotworowe właściwości flawonoidów
 - II-1. Zapobieganie mutagenezie
 - II-2. Hamowanie proliferacji i indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych
 - II-3. Flawonoidy w terapii nowotworów z opornością wielolekową
- III. Przeciwcukrzycowe właściwości flawonoidów
 - III-1. Wpływ (-)-epikatechiny na syntezę i wydzielanie insuliny
 - III-2. Hamowanie syntezy glukozy w hepatocytach przez EGCG
 - III-3. Spowalnianie wchłaniania glukozy w jelicie
 - III-4. Zapobieganie utracie wzroku w warunkach cukrzycy
- IV. Wpływ flawonoidów na system naczyniowy
 - IV-1. Flawonoidy w profilaktyce i leczeniu miażdżycy
 - IV-2. Flawonoidy w leczeniu innych dolegliwości naczyniowych
- V. Przeciwzapalne i przeciwalergiczne działanie flawonoidów
- VI. Flawonoidy w terapii AIDS
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
 - I-1. Structure and classification of flavonoids
 - I-2. Dietary intake of flavonoids and their absorption
- II. Cancer preventive properties of flavonoids
 - II-1. Antimutagenic activity of flavonoids
 - II-2. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cancer cells
 - II-3. Flavonoids in therapy of cancers with multidrug resistance
- III. Antidiabetic properties of flavonoids
 - III-1. Modulation of the synthesis and excretion of insulin by (-)-epicatechin
 - III-2. EGCG as an inhibitor of hepatic glucose production
 - III-3. Inhibition of glucose absorption in the gut
 - III-4. Diabetic cataracts prevention
- IV. Flavonoids and vascular disorders
 - IV-1. Antiarteriosclerotic activities of flavonoids
 - IV-2. Flavonoids in the therapy of others vascular disorders
- V. Antiinflammatory and antiallergic properties of flavonoids
- VI. Flavonoids in AIDS therapy
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 (ang. *activator protein 1*) — czynnik transkrypcyjny AP-1; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; CCR - receptor dla chemokin; CDK (ang. *cyclin dependent kinases*) — kinazy zależne od cyklin; C/EBP β (ang. *CCAAT enhancer binding protein β*) — czynnik transkrypcyjny; COX-1 — cyklooksygenaza 1; COX-2 — cyklooksygenaza 2; Cyt P-450 — cytochrom P-450; EGCG (ang. *epigallocatechin-3-gallate*) — 3-galusan epigalokatechiny; EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) — receptor naskórkowego czynnika wzrostu; ERK (ang. *extracellular signal regulated kinase*) — kinaza MAP aktywowana przez czynniki wzrostowe; FGF-BP (ang. *fibroblast growth factor binding protein*) — białko wiążące się z fibroblastowym czynnikiem wzrostu; GST — S-transferaza glutationowa; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) — kinazy aktywowane mitogenem, HMG-CoA-3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzym A; IC₅₀ — współczyn-

nik inhibicji, stężenie związku, przy którym obserwuje się 50% inhibicji; IG - integraza wirusa HIV; IgE — immunoglobuliny klasy E; I κ B — inhibitor czynnika transkrypcyjnego κ B; IKK (ang. *I κ B kinase complex*) — kompleks kinazowy fosforylujący białko I κ B; IL-1 — interleukina 1; IL-2 — interleukina 2; iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*) — syntaza tlenu azotu typu 2; IRS-1 (ang. *insulin receptor substrate-1*) — substrat receptora insulinowego; JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinase*) — kinaza białka c-Jun; LDL (ang. *low density lipoprotein*) — lipoproteiny o niskiej gęstości; 5-LOX - 5-lipoksygenaza; MDR (ang. *multi-drug resistance*) - oporność wielolekowa; NAT — N-acetylotransferaza; NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) — czynnik transkrypcyjny κ B; NKEK — linia komórkowa ludzkich keranocytów; NO — tlenek azotu; PEPCK — karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa; PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; PKA — kinaza białkowa A; PKC — kinaza białkowa C; PT - proteina wirusa HIV; RT - odwrotna transkryptaza; SGLT-1 — symporter glukozy i sodu; TFdG (ang. *theaflavin digallate*) — digalusan TF, jednego z produktów kondensacji katechin, powstający w dużych ilościach podczas procesów związanych z produkcją czarnej herbaty; UGT — transferaza *p*-nitrofenolo-UDP-glukuronowa; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostowy nabłonka naczyń

¹Studentka IV roku biologii UW, ²dr, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 55 43 204; e-mail: akiersztan@biol.uw.edu.pl

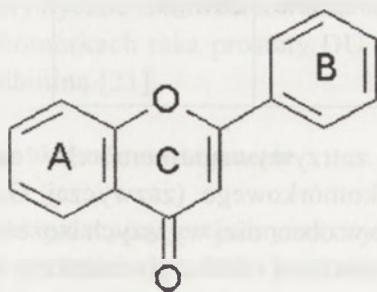
I. Wstęp

Flawonoidy są metabolitami wtórnymi powszechnie występującymi w roślinach. Zidentyfikowano ponad 4000 związków należących do tej grupy. Pełnią one różnorodne funkcje, m. in. chronią roślinę przed promieniowaniem UV czy atakiem patogenów, są inhibitorami transportu auksyn, a także inicjują powstawanie brodawek korzeniowych u roślin motylkowych. Często z ich obecnością związane jest żółte, czerwone czy niebieskie zabarwienie kwiatów lub liści [1].

Flawonoidy są często aktywnymi składnikami roślin leczniczych, stosowanymi od dawna w medycynie ludowej w leczeniu między innymi stanów zapalnych, chorób układu krążenia czy cukrzycy. Liczne badania nad flawonoidami udowodniły ich właściwości immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające oraz hipoglikemiczne [2].

I-1. Budowa i klasyfikacja flawonoidów

Flawonoidy należą do polifenoli. Podstawowym elementem strukturalnym ich budowy jest jednostka diarylopropanowa ($C_6-C_3-C_6$) (Ryc. 1). Poszczególne klasy flawonoidów zostały wyróżnione głównie na podstawie różnic w budowie jednostki C_3 . Przedstawiciele danej klasy różnią się natomiast między sobą rodzajem i umiejscowieniem podstawników w pierścieniach aromatycznych (Tabela 1).



Ryc.1. Wzór ogólny flawonoidów. Dwa pierścienie aromatyczne (A i B) połączone są trójwęglowym fragmentem, który u większości flawonoidów tworzy wraz z atomem tlenu trzeci pierścień (C).

I-2. Zawartość flawonoidów w diecie i ich przyswajanie

Głównym źródłem flawonoidów w diecie są warzywa, owoce, a także czekolada, herbata i czerwone wino (Tabela 1) [3]. Związki te występują w pożywieniu zarówno w formie wolnej, jak i w postaci glikozydów. Obie te formy są wchłaniane w jelicie,

choć często z różną szybkością np. wchłanianie niektórych glikozydów kwercetyny jest szybsze niż wolnej formy tego flawonoidu [4]. Na powierzchni i wewnątrz komórek jelita cienkiego, a następnie w wątrobie, flawonoidy mogą ulegać licznym modyfikacjom tj.: metylacji, glukuronidacji, hydroksylacji, sulfatacji, glikozylacji, a także mogą być hydrolizowane przez glikozydazy [4,5]; część tych modyfikacji odbywa się przy udziale bakterii jelitowych [6]. Dlatego formy znajdujące się we krwi mogą znacznie różnić się od tych zawartych w pożywieniu. Np. po perfuzji jelita szczurów roztworem zawierającym katechiny, w krwiobiegu zidentyfikowano takie związki jak glukuronidy katechiny i 3'-*O*-metylokatechiny [5]. Z kolei glikozydy kwercetyny były hydrolizowane podczas transportu z jelita do krwi, gdyż nie wykryto tych form w krwiobiegu. Znalazła się tam natomiast kwercetyna w formie wolnej oraz glukuronidy kwercetyny [4]. Modyfikacje flawonoidów mogą wpływać na ich aktywność, a także na szybkość ich eliminacji z krwiobiegu [7].

Spożycie flawonoidów różni się znacznie w poszczególnych populacjach wskutek różnic dotyczących nawyków żywieniowych. Ze względu na niedostateczne dane dotyczące zawartości flawonoidów w poszczególnych produktach spożywczych, trudno jest dokładnie określić dzienne spożycie tych związków. Dlatego w literaturze można znaleźć wartości od ok. 20 do nawet 650 mg dziennie w przeliczeniu na zawartość aglikonów - czyli nieglikozylowanych form flawonoidów [8, 9].

Stężenie flawonoidów w osoczu zależy od jakości i ilości spożywanego pożywienia. Po posiłku zawierającym średnią ilość flawonoidów jest zazwyczaj dość niskie, rzadko przekracza $1 \mu\text{M}$ [3]. Znacznie wyższe stężenia mogą być jednak osiągane po spożyciu posiłku bogatego w te związki, a regularne ich spożywanie może prowadzić do uzyskania wyższych stężeń tych związków we krwi, dzięki ich akumulacji m.in. w monocytach [3].

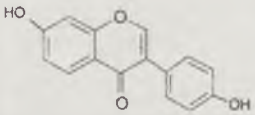
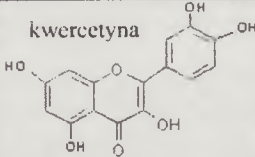
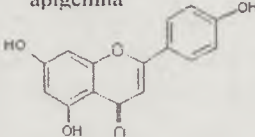
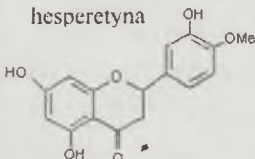
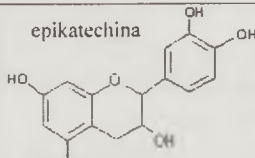
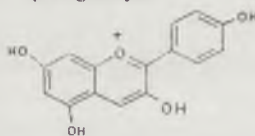
II. Przeciwnowotworowe właściwości flawonoidów

Przyczyną powstawania nowotworów są mutacje w DNA prowadzące do intensywnej proliferacji komórek i wywołujące ich oporność na bodźce apoptotyczne. Klon tak zmutowanych komórek dzieli się w sposób niekontrolowany, prowadząc do licznych zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu [10].

Badania epidemiologiczne sugerują odwrotną korelację między zawartością flawonoidów w diecie a ryzykiem wystąpienia niektórych nowotworów.

Tabela 1.

Przedstawiciele głównych klas flawonoidów oraz ich występowanie

Klasa Flawonoidów	Wzór przedstawiciela	Związki	Występowanie	Zawartość
Izoflawonoidy	daidzeina 	genisteina daidzeina	soja	1 mg/g ziarna
Flawonole	kwercetyna 	kwercetyna	cebula herbata jabłka	0,3 mg/g ś.m. 10-25 mg/l 0,03 mg/g ś.m.
Flawony	apigenina 	apigenina luteolina	seler czerwona papryka	} brak danych
Flawanony	hesperetyna 	hesperetyna naryngenina	pomarańcze, grejfruty	} 125-250 mg/l soku
Flawanole	epikatechina 	katechiny: (głównie (-)- epikatechina i (+)-katechina)	kiwi czerwone wino zielona herbata czekolada	4,5 mg/kg 270 mg/l 1 mg/ml 0,8 mg/g
Antocyjanidy	pelargonidyna 	pelargonidyna cyjanidyna	wiśnie truskawki winogrona czerwone wino	4,5 mg/kg 0,15 mg/kg brak danych 26 mg/l

Przykładowo, obserwowano obniżenie ryzyka wystąpienia raka piersi u kobiet, których dieta była bogata w izoflawony [11], natomiast spożywanie zielonej herbaty, charakteryzującej się wysoką zawartością katechin, wydaje się zapobiegać powstawaniu nowotworów płuc [12]. Potwierdzają to badania na modelach zwierzęcych, w których obserwowano hamujący wpływ flawonoidów zarówno na powstawanie nowotworów, jak i na rozrost już powstałych guzów, a także na częstość występowania przerzutów (Tabela 2). Dlatego wiąże się duże nadzieje z zastosowaniem flawonoidów w profilaktyce i terapii nowotworów.

Szczegółowych informacji dotyczących mechanizmów działania flawonoidów dostarczają badania na liniach komórkowych, w których obserwowano m.in. hamowanie proliferacji komórek nowotworo-

wych wskutek zatrzymywania komórek w różnych fazach cyklu komórkowego (zazwyczaj G₁/S lub G₂/M), a często w obecności wyższych stężeń flawonoidów lub po dłuższej inkubacji - indukcję apoptozy. W poszczególnych doświadczeniach wykazano wpływ badanych związków na aktywność białek pro-apoptotycznych (p21, p53) i anty-apoptotycznych (Bcl-2), białek regulujących przebieg cyklu komórkowego (CDK, cykliny), enzymów związanych z metabolizmem mutagenów i innych [17, 18]. Natomiast zapobieganie przerzutom może wynikać z obniżania przez flawonoidy aktywności niektórych metaloproteinaz [19].

Obserwowano też indukcję różnicowania się komórek nowotworowych pod wpływem flawonoidów np. ludzkich komórek białaczkowych HL-60 do granulocytów (apigenina, luteolina) i monocytów

Tabela 2.

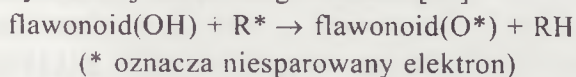
Przeciwnowotworowe właściwości flawonoidów wykazane na modelach zwierzęcych

Rodzaj nowotworu	Związek / ekstrakt i sposób podawania	Wyniki	Piśmienictwo
rak jelita grubego - u szczurów traktowanych azoksymetanem - przerzuty indukowane bombezyną	apigenina - podawana w zastrzykach od 16 do 45 tygodnia po rozpoczęciu karcinogenezy	- obniżenie częstości wystąpienia przerzutów - inhibicja stymulowanej bombezyną fosforylacji MAPK	[13]
mysi model raka płuc Lewisa	genisteina	- spowolnienie unaczyniania guza	[14]
czerniak - model myszy	EGCG kwercetyna apigenina - podawane w zastrzykach dootrzewnowo	- spowolnienie rozwoju nowotworu - kwercetyna i apigenina: zmniejszenie częstotliwości występowania przerzutów do płuc	[15]
rak skóry - indukowany u myszy za pomocą UV	silymarina	- obniżenie częstości powstawania nowotworów	[16]

(kwercetyna, floretyna) [20]. Zmiany morfologiczne charakterystyczne dla różnicowania wystąpiły również w komórkach raka prostaty DU 145 traktowanych silibininą [21].

II-1 Zapobieganie mutagenezie

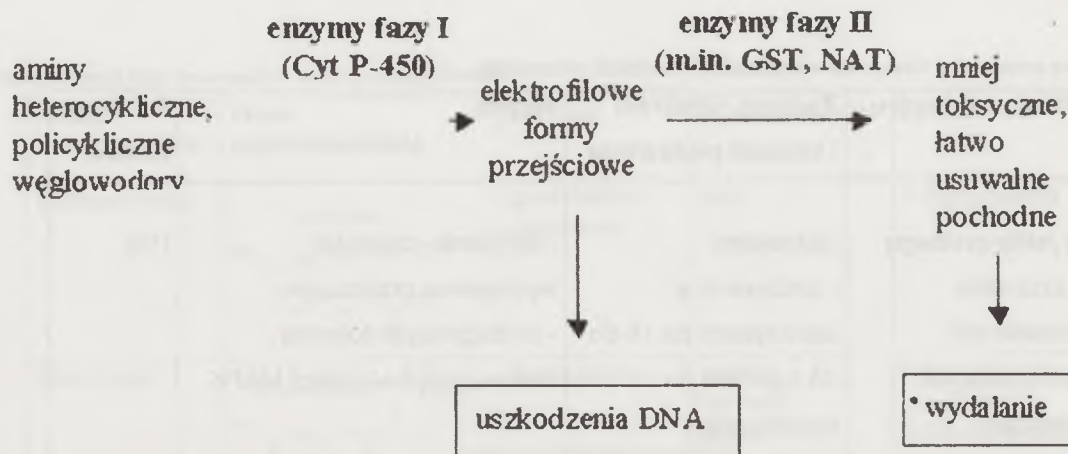
Stres oksydacyjny jest jednym z czynników sprzyjających uszkodzeniom DNA i w konsekwencji mutacjom. Dlatego duże znaczenie w zapobieganiu procesom nowotworzenia mają bez wątpienia przeciwutleniające właściwości flawonoidów. Ich grupy hydroksylowe mogą reagować z wolnymi rodnikami, prowadząc do powstania bardziej stabilnego, a tym samym mniej szkodliwego rodnika [22]:



Oprócz neutralizowania wolnych rodników, flawonoidy mogą zapobiegać również ich wytwarzaniu hamując aktywność enzymów i procesów sprzyjających powstawaniu wolnych rodników. Kwercetyna i baikalina są inhibitorami oksydazy ksantyno-

wej (IC₅₀ odpowiednio 7,23 i 9,44 μM), enzymu zaangażowanego w katabolizm puryn [23], którego wzmożoną aktywność obserwuje się m. in. w zapaleniach wątroby i niektórych nowotworach mózgu [9]. Jednym z produktów katalizowanej przez ten enzym reakcji jest wysoce reaktywny anionorodnik ponadtlenkowy. Kolejną korzystną cechą flawonoidów jest ich działanie przeciwzapalne, opisane szerzej w rozdziale V. Reakcji zapalnej towarzyszy bowiem nasilenie stresu oksydacyjnego - wytwarzane wtedy reaktywne formy tlenu biorą udział w niszczeniu patogenów. Jednak gdy odpowiedź zapalna przedłuży się, może dojść również do uszkodzenia tkanek gospodarza [22], co sprzyja nowotworzeniu.

Ponadto wykazano, że flawonoidy mogą również działać ochronnie na inne przeciwutleniacze, takie jak witamina C czy E. W przypadku witaminy C obserwowano pod wpływem flawonoidów m. in. jej stabilizację, spowolnienie zużycia oraz redukcję dehydroaskorbinianu do askorbinianu [9]. Jedną z przyczyn ochronnego działania flawonoidów na witaminę C może być chelatowanie jonów metali np.



Ryc.2. Metabolizm niektórych mutagenów w wątrobie.

miedzi, które uczestniczą w utlenianiu kwasu askorbinowego [9, 24].

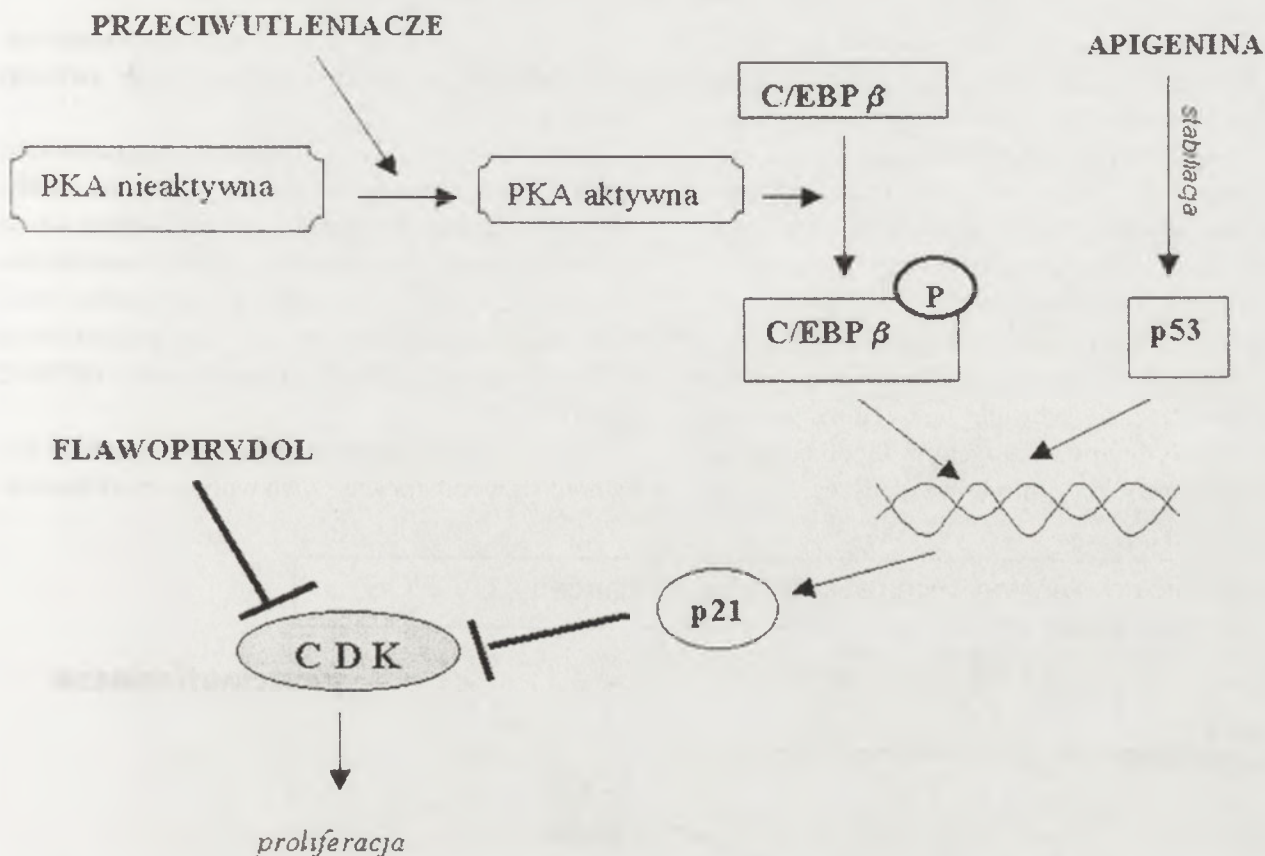
Okazało się, że niektóre flawonoidy są zdolne do modulowania aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm ksenobiotyków. Jest to ważne ze względu na to, że mutagenność niektórych substancji zmienia się pod wpływem działania tych enzymów. Pierwszy etap metabolizmu wątrobowego ksenobiotyków polega zazwyczaj na hydroksylacji związku i katalizowany jest przez enzymy fazy I, należące do grupy cytochromu P-450 (patrz artykuły w Postęпах Biochemii: K. Kobylińska (1994) 40, 248; R. Jaskuła-Sztul (2000) 46, 50). Drugi etap to sprzężanie związku z kwasem glukuronowym lub przyłączenie innych polarnych grup w miejsce wprowadzonych grup hydroksylowych przy udziale enzymów fazy II, co zwiększa rozpuszczalność związku w wodzie i ułatwia jego wydalanie [25]. Związki takie jak policykliczne węglowodory czy aminy heterocykliczne, wskutek modyfikacji przeprowadzanych przy udziale cytochromów P-450 nabywają właściwości mutagennych (Ryc.2), dlatego gdy aktywność cytochromów P-450 znacznie przewyższa aktywność enzymów fazy II, pojawia się niebezpieczeństwo powstania uszkodzeń DNA prowadzących do nowotworzenia [26]. Korzystna dla zapobiegania nowotworzeniu może więc być obserwowana dla niektórych flawonoidów stymulacja aktywności enzymów fazy II. Wzbogacenie diety szczurów we flawon, flawanon czy tangretynę podwyższyło aktywność m. in. S-transferazy glutationowej (GST) i transferazy p-nitrofenolo-UDP-glukuronowej (UGT) [27]. Wzrost aktywności UGT obserwowano również w komórkach nowotworowych jelita grubego Caco-2 traktowanych chryzyną [28]. Różne są natomiast doniesienia dotyczące wpływu flawonoidów na aktywność cytochromów P450 — obecne dane wskazują na to, że mogą one zarówno aktywować,

jak i hamować enzymy fazy I metabolizmu ksenobiotyków [29, 30].

II-2 Hamowanie proliferacji i indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za antyproliferacyjne działanie flawonoidów jest blokowanie replikacji DNA na skutek hamowania aktywności enzymów zaangażowanych w ten proces, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S. Przykładowo, acetyloglukopiranozydowe pochodne kwercetyny i kempferolu są inhibitorami polimerazy II DNA [31], luteolina hamuje aktywność topoizomerazy I ($IC_{50} = 5 \mu M$) [32], a topoizomeraza II jest hamowana przez baikaleinę, kwercetynę, mirycetynę, EGCG i ECG [33].

Flawonoidy mogą również wpływać na aktywność białek zaangażowanych w regulację przebiegu cyklu komórkowego: cyklin oraz kinaz zależnych od cyklin (CDK). Bezpośrednim, kompetycyjnym inhibitorem większości CDK jest flawopirydol (Ryc.3). Odpowiednie ułożenie pierścieni w tym związku umożliwia blokowanie miejsca wiążącego ATP w CDK [34]. Większość flawonoidów natomiast przyczynia się do inaktywacji CDK pośrednio, poprzez stymulację transkrypcji białka p21 — inhibitora CDK-2 i CDK-4 (Ryc.3). Stymulacja transkrypcji białka p21 może odbywać się przynajmniej na dwóch drogach: zależnej od p53 i niezależnej od p53. Ponieważ p53 jest aktywatorem transkrypcji genu białka p21, zwiększenie zawartości białka p53 w komórce pociąga za sobą podwyższenie ilości białka p21 [10]. Mc V e a n i wsp. [35] wykazali, że zwiększanie stężenia p53 pod wpływem apigeniny wiąże się ze znacznym wydłużeniem okresu półtrwania tego białka. Wydaje się więc, że niektóre flawonoidy mogą chronić p53 przed degradacją i w ten sposób



Ryc.3. Wpływ flawonoidów na aktywność kinaz zależnych od cyklin.

hamować rozwój nowotworu. Obserwowano jednak również indukowanie przez flawonoidy syntezy p21, któremu nie towarzyszył wzrost aktywności p53 [36]. Oprócz p53 czynnikiem mającym zdolność uruchomienia syntezy p21 jest również czynnik transkrypcyjny C/EBP β. Aktywowany jest on wskutek fosforylacji przez kinazę białkową A (PKA). Aktywacji PKA sprzyja natomiast środowisko redukujące, możliwe więc, że flawonoidy dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym przyczyniają się do zwiększenia syntezy p21 [37].

Niektóre flawonoidy mogą obniżać aktywność czynników transkrypcyjnych NF-κB i AP-1, odgrywających dużą rolę w nowotworzeniu - pod kontrolą tych kompleksów białkowych znajduje się bowiem wiele genów uczestniczących w regulacji proliferacji i apoptozy (Ryc.4, 5), a zaburzenia w ich szlakach sygnałowych mogą prowadzić do nowotworzenia [38]. Zaobserwowano, że hamowaniu wzrostu niektórych linii komórek nowotworowych wywołanemu przez flawonoidy towarzyszyło obniżenie aktywności AP-1 lub NF-κB. Przykładowo, pod wpływem flawonoidów izolowanych z herbaty (m. in. EGCG, TFdD) obniżeniu uległa aktywność AP-1, a także wzrost stransfekowanych onkogenem H-ras komórek nabłonka mysiego JB-6, charakteryzujących się nadaktywnością AP-1 [39]. Z kolei aktywność NF-κB, jak również intensywność proliferacji, były

zredukowane w ludzkich epidermalnych komórkach rakowych A431 poddanych działaniu EGCG [40]. Wydaje się, że hamujący wpływ flawonoidów na w/w czynniki transkrypcyjne może być skutkiem ich właściwości przeciwutleniających, gdyż reaktywne formy tlenu mogą aktywować zarówno NF-κB jak i AP-1. Nie jest to jednak jedyny mechanizm. Badania nad wpływem polifenoli z zielonej herbaty na aktywność IKK - kinazy katalizującej fosforylację I-κB (inhibitora NF-κB), prowadzącej do aktywacji NF-κB wykazały, że EGCG może nie tylko zapobiegać aktywacji IKK (co mogłoby być skutkiem usuwania wolnych rodników), ale również hamować już aktywne IKK (Ryc.4). Właściwości tej nie miały inne przeciwutleniacze [41]. Również hamowaniu aktywności NF-κB przez TFdG towarzyszyło obniżenie aktywności IKK [42]. W przypadku AP-1, hamowanie jego aktywności przez EGCG wynikało przynajmniej po części z obniżenia stopnia fosforylacji c-Jun oraz niektórych kinaz zaangażowanych w kaskadę sygnałową aktywującą AP-1 (Ryc.5) [39]. Mogło być to skutkiem usuwania wolnych rodników przez flawonoidy, jednak tu także udowodniono, że nie jest to jedyny mechanizm. Flawonoidy często są inhibitorami kinaz białkowych — hamują ich aktywność blokując miejsce wiążące ATP [43]. Nie jest więc wykluczone, że obniżanie aktywności AP-1

wynika z hamującego działania flawonoidów na kinazy kaskady aktywacji AP-1.

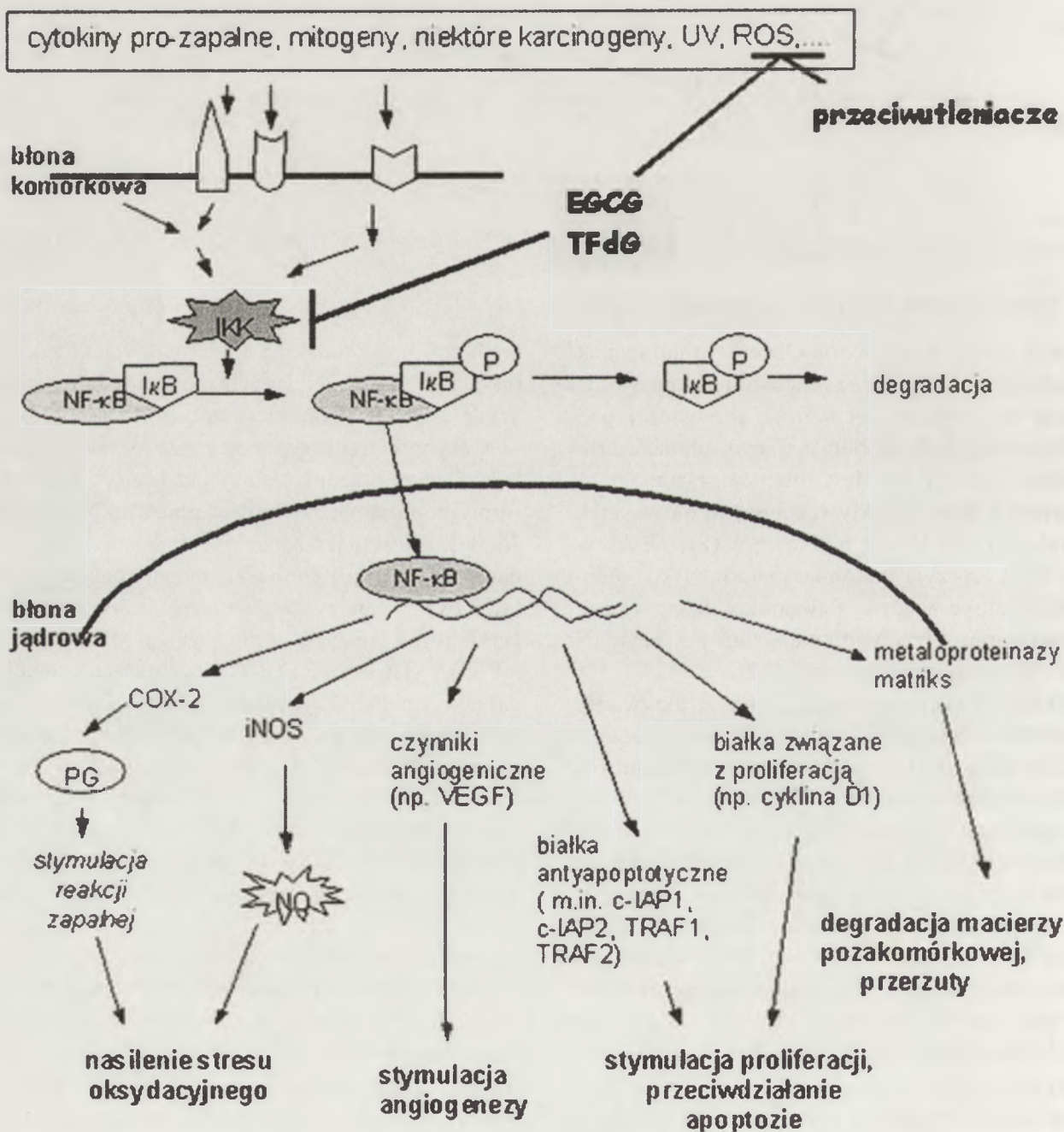
Oprócz kontrolowania cyklu komórkowego i apoptozy AP-1 i NF- κ B zaangażowane są w procesy angiogeniczne [44], dlatego obniżanie ich aktywności przynosi dodatkowe korzyści w postaci spowalnienia ukrwienia guza, a tym samym jego rozrostu.

W tkankach nowotworowych obserwuje się często podwyższoną aktywność dekarboksylazy ornitynowej - jednego z enzymów związanych z syntezą poliamin, które zaangażowane są w regulację proliferacji [45]. Sylimarina i apigenina zapobiegały indukcji dekarboksylazy ornitynowej u myszy, których

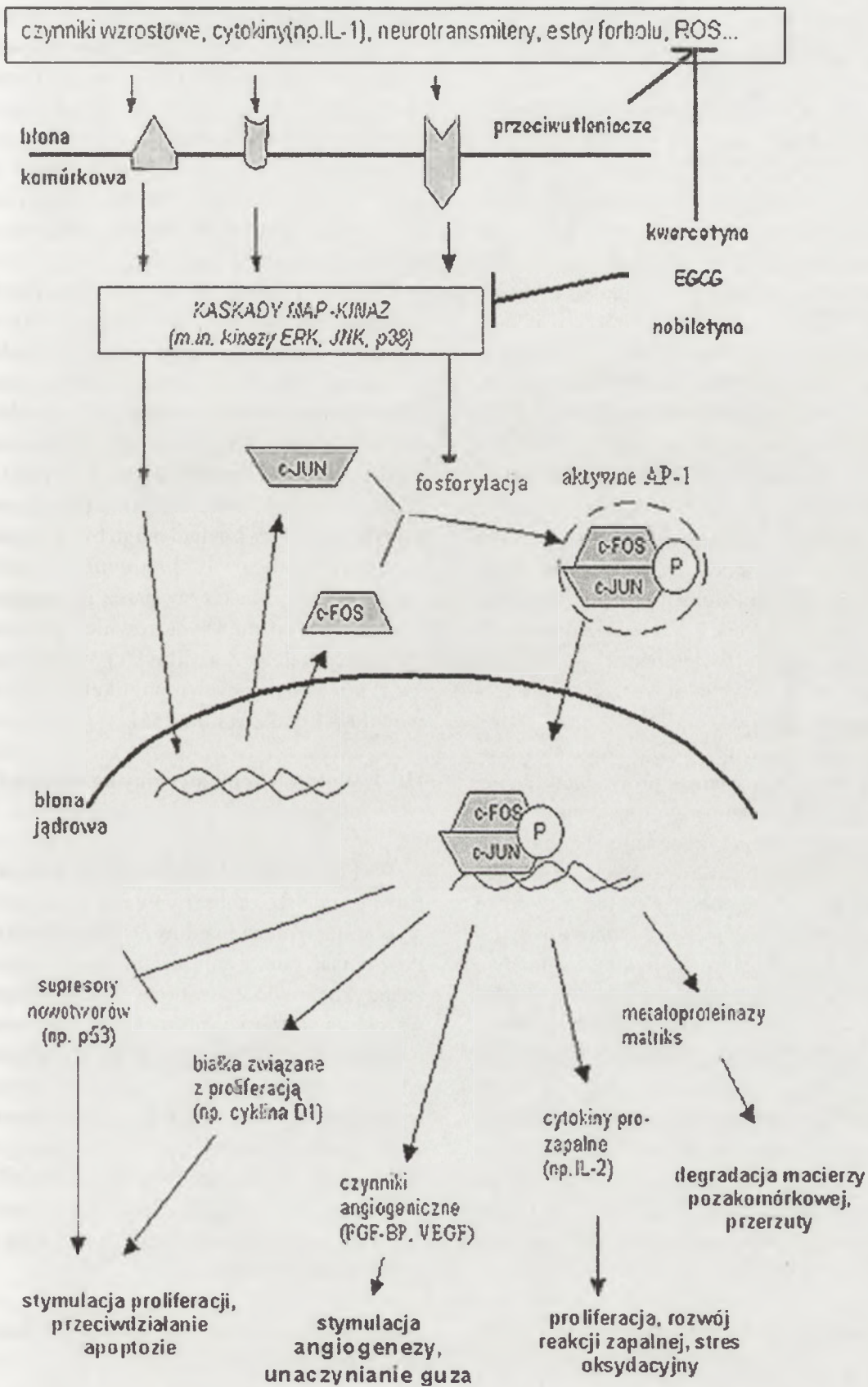
skóra traktowana była TPA. Jednocześnie obserwowano hamowanie nowotworzenia u tych zwierząt [46, 47].

Wiele flawonoidów m. in. flawony mają zdolność hamowania aktywności aromatazy - enzymu katalizującego syntezę estrogenów z androgenów — co jest korzystnym zjawiskiem w terapii nowotworów hormonozależnych tj. jak rak sutka czy jajnika. Inhibitorami aromatazy są m. in. 7-hydroksyflawon ($IC_{50}=0,5 \mu M$), 7,4'-dihydroksyflawon ($IC_{50}=2 \mu M$) [48].

Cytostatyczne i cytotoksyczne właściwości flawonoidów wynikają więc z ich wpływu na różnorod-



Ryc.4. Przeciwnowotworowe działanie flawonoidów związane z hamowaniem aktywności NF- κ B. NF- κ B aktywowany jest wskutek fosforylacji i degradacji związanego z nim białka inhibitorowego I κ B. Uwolniony czynnik transkrypcyjny przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie uruchamia transkrypcję genów związanych m. in. z regulacją proliferacji i apoptozy.



Ryc.5. Przeciwnoworworowe działanie flawonoidów związane z hamowaniem aktywności AP-1. AP-1 jest heterodimerem składającym się z białek c-Jun i c-Fos, aktywowanym przez czynniki wzrostowe, niektóre cytokiny, mitogeny, a także przez reaktywne formy tlenu. Czynniki te uruchamiają kaskadę kinaz MAP prowadzącą do ekspresji c-Jun i c-Fos, które po utworzeniu dimeru i odpowiednim ufosforylowaniu tworzą aktywny AP-1.

ne enzymy i czynniki transkrypcyjne, związane bezpośrednio lub pośrednio z regulacją proliferacji i

apoptozy. Godnym podkreślenia jest fakt, że niejednokrotnie obserwowano silniejsze działanie flawo-

noidów na komórki nowotworowe niż na odpowiadające im komórki nienowotworowe [40, 49].

II-3. Flawonoidy w terapii nowotworów z opornością wielolekową

Pochodne flawonoidów mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów, które wykształciły oporność wielolekową (MDR) dzięki wysokiej ekspresji glikoproteiny P (P-gp). Jest to białko błonowe zależne od ATP, które w normalnych warunkach służy do usuwania z komórki szkodliwych substancji, natomiast w komórkach nowotworowych powoduje usuwanie z nich leków. Znanych jest już wiele pochodnych flawonoidów będących inhibitorami P-gp. Mają one zdolność przywracania wrażliwości na cytostatyki komórkom nowotworowym, które wykształciły MDR, np. traktowanie ludzkiej linii komórek białaczki K562 pochodnymi flawonoidów uwrażliwiło je na działanie dokсорubicyny [50]. Niektóre z pochodnych flawonoidów wykazują silniejsze działanie na P-gp niż werapamil — związek obecnie stosowany w leczeniu nowotworów z opornością wielolekową [51].

Flawonoidy nie są jeszcze powszechnie stosowane w terapii nowotworów, jednak prowadzone są już badania mające na celu wprowadzenie tych związków do stosowania klinicznego. Najbardziej obiecującym wydaje się być flawopirydol. Jego cytotatyczne właściwości wynikają głównie z tego, że jest inhibitorem większości CDK. Dodatkowo flawopirydol działa hamująco na szlaki sygnałowe związane z czynnikami wzrostowymi: hamuje fosforylację EGFR czy ERK-1 — kinazy odpowiedzialnej m. in. za aktywację czynnika transkrypcyjnego AP-1, oraz wykazuje działanie antyangiogeniczne [52]. Cytostatyczne i cytotoksyczne działanie obserwowane było w obecności nanomolowych stężeń flawopirydolu, czyli stężeniach łatwych do osiągnięcia w krwiobiegu. Związek ten znajduje się już w II fazie badań klinicznych. Ponadto prowadzone są badania fazy I dla EGCG i kwercetyny [53].

III. Przeciwcukrzycowe właściwości flawonoidów

Cukrzyca charakteryzuje się upośledzeniem produkcji i wydzielania insuliny i/lub niewrażliwością komórek docelowych na ten hormon. Regulacja poziomu glukozy we krwi jest wtedy zaburzona, a stężenie tego cukru we krwi jest wysokie. Z kolei w komórkach tkanek peryferycznych występują niedobory glukozy, spowodowane upośledzeniem jej pobie-

rania. Wzrasta więc zużycie lipidów jako substancji energetycznych, czemu towarzyszy wytwarzanie dużych ilości acetylo-CoA. Intensywny metabolizm acetylo-CoA prowadzi między innymi do zakwaszenia osocza, a zbyt wysoki poziom glukozy we krwi jest przyczyną hiperosmolarności osocza. Zmiany te prowadzą do wtórnych zaburzeń towarzyszących cukrzycy: miażdżycy, ślepoty czy śpiączki spowodowanej zakwaszeniem krwi [54].

Głównym celem terapii cukrzycy jest obniżenie stężenia glukozy we krwi. Znanych jest wiele substancji działających hipoglikemicznie, jednak wciąż poszukuje się nowych związków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu tej choroby. Analiza aktywności poszczególnych składników roślin leczniczych pozwala znajdować nowe związki o hipoglikemicznym lub innym działaniu pożądanym w terapii cukrzycy. Przykładem mogą być badania nad ekstraktem z *Pterocarpus marsupium* — rośliny stosowanej w terapii cukrzycy przez indyjską medycynę naturalną, a od niedawna również przez medycynę konwencjonalną. Z rośliny tej wyizolowano kilka związków działających hipoglikemicznie, w tym flawonoid (-)-epikatechinę [55].

III-1. Wpływ (-)-epikatechiny na syntezę i wydzielanie insuliny

W badaniach na izolowanych komórkach, jak również *in vivo*, zaobserwowano, że (-)-epikatechyna stymuluje syntezę insuliny w komórkach β trzustki. Po 4 dniach podawania szczurom (-)-epikatechiny w zastrzykach dootrzewnowych zauważono 30% wzrost zawartości insuliny w wyizolowanych później wysepkach Langerhansa [56]. Badania *in vitro* na komórkach trzustki szczura wykazały, że wywołanemu przez (-)-epikatechinę wzrostowi syntezy i wydzielania insuliny towarzyszy podwyższenie w komórkach β trzustki poziomu cAMP, stymulującego sekrecję insuliny. Zaobserwowano też intensywniejsze niż w kontroli przekształcanie proinsuliny w insulinę [57].

III-2. Hamowanie syntezy glukozy w hepatocytach przez EGCG

Działanie hipoglikemiczne wykazuje również EGCG (galusan epigalokatechiny) — związek strukturalnie podobny do (-)-epikatechiny. Wykazano jednak, że u podstaw tego działania leży mechanizm inny niż stymulacja komórek β trzustki do syntezy insuliny. Pięciogodzinna inkubacja szczurzych komórek wątrobowych linii H4IIE z EGCG spowodo-

wała obniżenie produkcji glukozy, któremu towarzyszył spadek aktywności PEPCK i glukozo-6-fosfatazy (kluczowych enzymów glukoneogenezy), spowodowany obniżeniem poziomu transkrypcji genów kodujących te białka. Działanie to było widoczne już w obecności około 10 μ M stężenia EGCG [58]. Obserwowano również wzrost aktywności niektórych kinaz związanych ze szlakiem sygnałowym uruchamianym przez insulinę, np. kinazy fosfatydyloinozitolowej (PI3K) czy białka p70. Mechanizm działania EGCG na syntezę glukozy w wątrobie musi jednak zostać dokładniej poznany, aby móc ocenić przydatność tego związku dla terapii cukrzycy.

III-3. Spowalnianie wchłaniania glukozy w jelicie

Wykazano, że niektóre flawonoidy spowalniają wchłanianie cukrów w jelicie, co jest kolejnym zjawiskiem korzystnym w terapii cukrzycy, gdyż wolniejsze wchłanianie glukozy do krwi zmniejsza rozmiary charakterystycznej dla cukrzyków poposiłkowej hiperglikemii.

Okazało się, że luteolina, 7-*O*-glukozyd luteoliny, amentoflawon i daidzeina mogą spowalniać wchłanianie glukozy poprzez hamowanie aktywności α -amylazy i α -glukozydazy - enzymów zaangażowanych w hydrolizę węglowodanów w przewodzie pokarmowym. Luteolina o stężeniu 1,5 mM zmniejszała aktywność α -glukozydazy o 36%. Jest więc silniejszym inhibitorem α -glukozydazy niż obecnie stosowana w terapii akarboza [59]. Ponadto luteolina hamowała też aktywność α -amylazy, choć w mniejszym stopniu niż akarboza [59]. Dlatego związek ten rokuje nadzieje na włączenie go do terapii wspomagającej leczenie cukrzycy.

Niższy poposiłkowy poziom glukozy we krwi obserwowano również u szczurów z cukrzycą, którym podawano glukozę (2 g/kg masy ciała) razem z kwercetyną (3-65 mg/kg masy ciała), w porównaniu z poziomem glukozy obecnym we krwi po podaniu wyłącznie glukozy [60]. Inne badania ujawniły, że glikozydy kwercetyny zmniejszają aktywność SGLT-1, występującego w enterocytach transportera glukozy zależnego od jonów sodu [61]. Dzięki zmniejszeniu aktywności jelitowych transporterów glukozy wchłanianie glukozy jest wolniejsze, co zapobiega gwałtownemu wzrostowi stężenia glukozy we krwi po posiłku.

III-4. Zapobieganie utracie wzroku w warunkach cukrzycy

W terapii cukrzycy ważne jest również zapobieganie powikłaniom spowodowanym rozwojem tej choroby. Okazało się, że kwercetyna może opóźnić utratę wzroku towarzyszącą cukrzycy. W badaniach na gryzoniach *Octodon degus* z cukrzycą, V a r m a i wsp. [62] wykazali, że wzbogacenie ich diety w kwercetynę opóźniło utratę wzroku. Odpowiedzialne za to okazało się obniżenie przez kwercetynę aktywności reduktazy aldolowej, choć nie bez znaczenia były prawdopodobnie również wcześniej omówione mechanizmy (np. spowalnianie wchłaniania glukozy w jelicie). Ze względu na to, że bezpośrednią przyczyną ślepoty cukrzycowej jest odkładanie się w gałce ocznej sorbitolu — związku syntetyzowanego z glukozy właśnie przez reduktazę aldolową — hamowanie aktywności tego enzymu przez kwercetynę wydaje się być główną przyczyną obserwowanego opóźnienia utraty wzroku.

IV. Wpływ flawonoidów na system naczyniowy

IV-1. Flawonoidy w profilaktyce i leczeniu miażdżycy

Przyczyną miażdżycy jest odkładanie się złogów cholesterolu w ścianach naczyń krwionośnych, prowadzące do zmniejszania lub całkowitego blokowania światła naczynia. Utrudnienie przepływu krwi pociąga za sobą zaburzenia w funkcjonowaniu wielu tkanek spowodowane ich niedotlenieniem. Powstawaniu zmian miażdżycowych sprzyja występowanie we krwi wysokich stężeń lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), zwłaszcza ich form utlenionych [63]. LDL odkładają się w ścianach naczyń krwionośnych. Są tam fagocytowane przez makrofagi, które następnie stają się tzw. komórkami piankowatymi, dając początek blaszce miażdżycowej. Cytokiny wydzielane przez makrofagi stymulują komórki mięśniowe ściany naczynia do proliferacji, migracji i intensywnej produkcji macierzy pozakomórkowej, co powoduje powstanie okrywy włóknistej i dalszy rozrost blaszki. Poza tym w uszkodzonym przez zmiany miażdżycowe fragmencie naczynia łatwo dochodzi do powstawania zakrzepów. Stres oksydacyjny dodatkowo zwiększa ryzyko powstania zmian miażdżycowych, gdyż utlenione LDL są intensywniej fagocytowane przez monocyty niż formy nieutlenione.

Niska zapadalność na choroby układu krążenia (w tym miażdżycę) w krajach południowoeuropejskich,

mimo dość wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych w tamtejszej diecie, nosi nazwę „francuskiego paradoksu”. Analiza tego zjawiska skierowała uwagę na flawonoidy jako związki mogące znaleźć zastosowanie w terapii i profilaktyce miażdżycy. Badania epidemiologiczne wykazały odwrotną korelację między zapadalnością na choroby układu krążenia a spożyciem czerwonego wina [64] oraz herbaty [65]. Za składniki czerwonego wina i herbaty odpowiedzialne za przeciwmiażdżycowe działanie tych produktów uważa się m.in. występujące w nich flawonoidy: głównie kwercetynę (czerwone wino) i katechiny (obecne zarówno w czerwonym winie jak i w herbacie) [66]. Postuluje się różne mechanizmy przeciwmiażdżycowego działania flawonoidów, które przedstawiono w Tabeli 3.

IV-2. Flawonoidy w leczeniu innych dolegliwości naczyniowych

Niektóre dolegliwości związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem naczyń krwionośnych, takie jak żylaki czy kruchość naczyń włosowatych, mogą być skutkiem przewlekłych stanów zapalnych. Podczas reakcji zapalnej wytwarzane są w dużych

ilościach reaktywne formy tlenu, co prowadzi do uszkodzeń ścian naczyń. Wykazano, że niektóre flawonoidy mogą chronić kolagen przed degradacją spowodowaną stresem oksydacyjnym [73]. W leczeniu niektórych dolegliwości naczyniowych, m.in. przewlekłej niewydolności żył, stosowany jest preparat o nazwie Daflon 500, w którego skład wchodzi diosmina (90%) i hesperetyna (10%). Przeciwwzapalne właściwości tych flawonoidów [74] (patrz rozdział V) oraz ich zdolność do zmiatania wolnych rodników przyczyniają się do poprawy stanu naczyń krwionośnych.

V. Przeciwwzapalne i przeciwalergiczne działanie flawonoidów

Właściwości przeciwnowotworowe flawonoidów oraz ich terapeutyczne działanie w schorzeniach naczyń krwionośnych częściowo wynikają z ich właściwości przeciwzapalnych. Przeciwwzapalne działanie flawonoidów wiąże się z obserwowanym w wielu doświadczeniach hamującym wpływem tych związków na szlaki cyklooksygenazy (COX) i lipooksygenazy (LOX) [75]. Enzymy te są odpowiedzialne za syntezę prostaglandyn i leukotrienów — związków sygnałowych stymulujących rozwój od-

Tabela 3.

Mechanizmy odpowiedzialne za przeciwmiażdżycowe właściwości flawonoidów

Zjawiska sprzyjające powstawaniu blaszki miażdżycowej	Flawonoid	Działanie	Piśmiennictwo
odkładanie się LDL w ścianach naczyń krwionośnych	hesperetyna	obniżanie poziomu cholesterolu we krwi – prawdopodobnie wskutek hamowania reduktazy HMG-CoA	[67]
powstawanie komórek piankowatych	luteolina, epikatechyna, kwercetyna	przeciwdziałanie utlenianiu LDL	[68]
	kwercetyna, metabolity (+)katechiny	obniżanie zdolności monocytów do adhezji do nabłonka naczyń i przenikania przez ściany naczyń	[69]
powstawanie okrywy włóknistej	kwercetyna	hamowanie proliferacji i migracji mięśni gładkich naczyń	[70]
	baikaleina	hamowanie proliferacji mięśni gładkich naczyń	[71]
powstawanie skrzepów	mirycetyna, kwercetyna	hamowanie agregacji trombocytów	[72]

powiedzi zapalnej (Ryc.6). Obniżanie aktywności cyklooksygenazy wynika prawdopodobnie ze zmniejszenia intensywności syntezy tego enzymu wskutek hamowania przez flawonoidy aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, pod którego kontrolą znajduje się gen cyklooksygenazy-2. W przeciwieństwie do COX-1, enzymu o konstytutywnej ekspresji, COX-2 syntetyzowana jest jedynie podczas reakcji zapalnej, jednak w znacznie większych ilościach niż COX-1. Nadekspresja COX-2 towarzyszy niektórym patologiom obserwowanym podczas przewlekłych stanów zapalnych, także powstawaniu niektórych nowotworów.

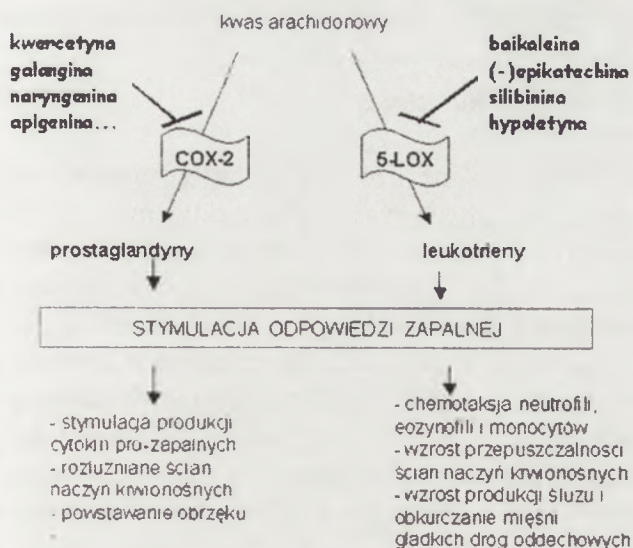
Badania nad ekstraktami roślin leczniczych stosowanych w alergiach, głównie w astmie, wykazały przeciwalergiczne właściwości niektórych flawonoidów [76]. Częściowo są one wynikiem ich ogólnych właściwości przeciwzapalnych (Ryc.6). Dla niektórych flawonoidów wykazano, że poza ogólnym działaniem przeciwzapalnym mogą wpływać również na niektóre procesy charakterystyczne dla alergii. Kwercetyna i luteolina, poza obniżaniem syntezy prostaglandyn i leukotrienów, hamująco wpływały również na uwalnianie histaminy z mastocytów, stymulowanych przeciwciałami klasy IgE. Hamowaniu uwalniania wyżej wymienionych mediatorów zapalenia towarzyszyło zmniejszenie napływu wapnia do komórek oraz obniżenie aktywności kinaz takich jak PKC, ERK i JNK. Przeciwalergiczne działanie flawonoidów może więc być skutkiem hamowania szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za uwalnianie mediatorów zapalenia [77].

Innym flawonoidem o działaniu przeciwalergicznym jest baikaleina. Wyizolowano ją z korzeni *Scutellaria baicalensis*, używanych w Japonii w leczeniu astmy. Na uwalnianie mediatorów zapalenia z

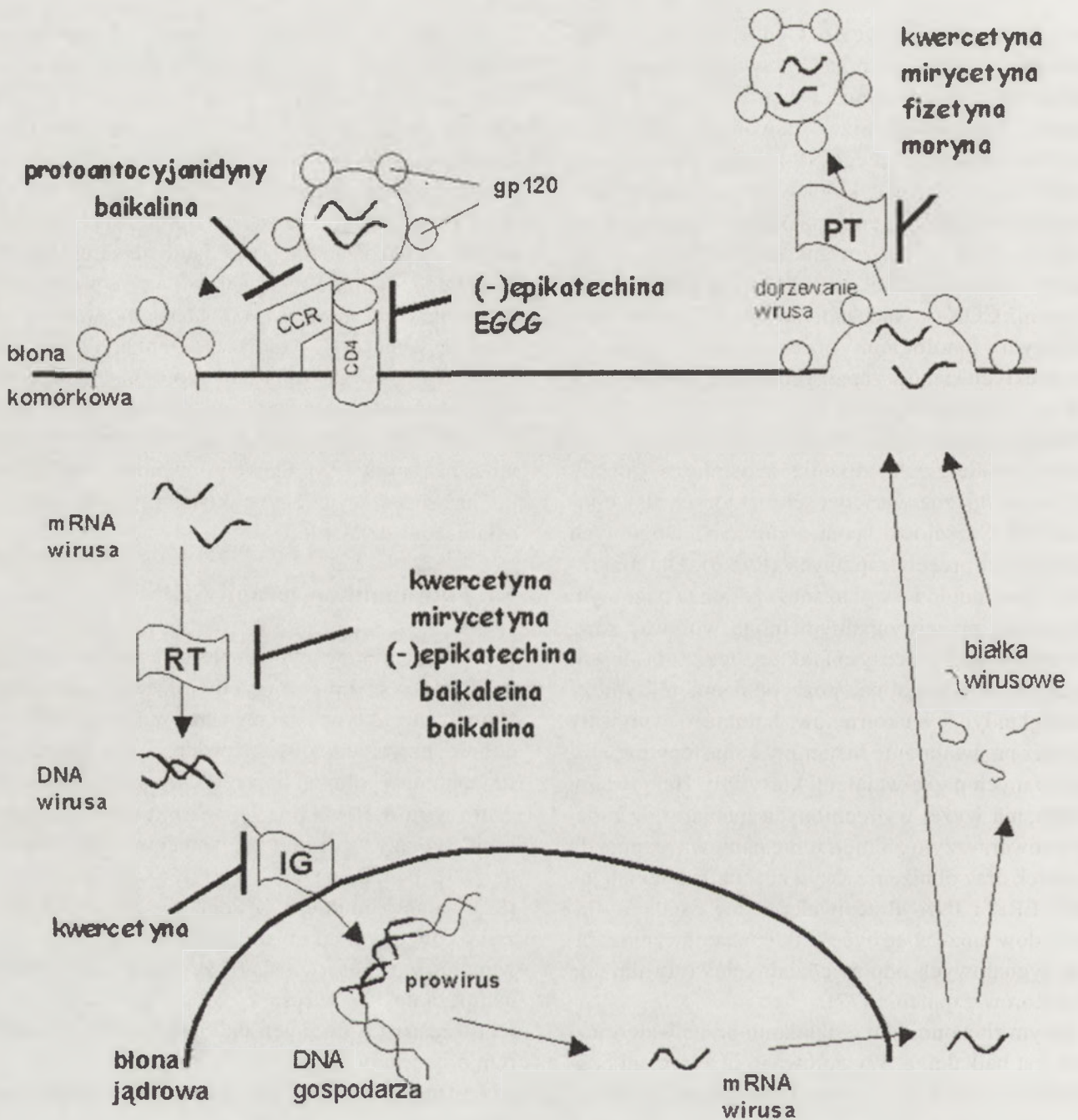
mastocytów baikaleina wpływała podobnie jak kwercetyna i luteolina, jednak jej wpływ był nieco słabszy niż pozostałych dwóch flawonoidów [77]. Okazało się jednak, że baikaleina również hamuje sekrecję eotaksyny — chemokiny wydzielanej m.in. przez fibroblasty, powodującej chemotaksję eozynofili w kierunku ogniska reakcji alergicznej i zaostrzenie odpowiedzi zapalnej. Działanie baikaleiny wynika prawdopodobnie z jej wpływu na ekspresję genu dla eotaksyny [76]. Z *Clerodendrum petasites* — rośliny używanej w Tajlandii w leczeniu objawów astmy — wyizolowano inny flawonoid: hispidulinę, dla której wykazano działanie rozluźniające na mięśnie gładkie tchawicy stymulowane do skurczu za pomocą histaminy [78]. Flawonoidy mogą więc nie tylko hamować wydzielanie histaminy, ale również osłabiać jej działanie.

VI. Flawonoidy w terapii AIDS

Związkami mogącymi znaleźć zastosowanie w terapii AIDS są inhibitory odwrotnej transkryptazy. Hamowanie aktywności tego enzymu jest prawdopodobnie przyczyną obserwowanego dla niektórych flawonoidów spowalniającego wpływu na namnażanie wirusa HIV (Ryc.7). Inhibitorami odwrotnej transkryptazy są m.in. (-)epikatechina [79], baikalina [80], baikaleina [81], kwercetyna i mirycetyna [82]. Stała inhibicji K_i dla niektórych z tych związków nie przekracza $1 \mu\text{M}$. Dla niektórych flawonoidów zaobserwowano, że dodatkowo hamują namnażanie się wirusa blokując proces wnikania jego cząsteczki do wnętrza komórki. Ważną rolę w tym procesie odgrywiają interakcje między białkami wchodzącymi w skład otoczki wirusa a cząsteczkami powierzchniowymi atakowanych komórek, głównie limfocytów T CD4^+ . Związanie cząsteczki CD4 z białkiem kapsydowym gp120 jest jednym z etapów adsorpcji wirusa na powierzchni atakowanej komórki. Proces ten ulega zaburzeniu w obecności (-)epikatechiny lub EGCG, gdyż związki te mogą wiązać się nieodwracalnie z gp120 [79]. Flawonoidem, dla którego również zaobserwowano zdolność do hamowania wnikania wirusa HIV do komórki, jest baikalina. Nie wpływa ona jednak na wiązanie CD4 z gp120. Podejrzewa się natomiast, że zaburza interakcje między białkami kapsydu a receptorami dla chemokin (CCR), które również są wykorzystywane przez wirusa podczas internalizacji [83]. Natomiast proantocyjanidy izolowane z nasion winogron obniżają poziom ekspresji receptorów dla chemokin na powierzchni komórek i w ten sposób mogą przyczyniać



Ryc.6. Przeciwalpalne właściwości flawonoidów.



Ryc. 7. Wpływ flawonoidów na cykl rozwojowy wirusa HIV. PT — proteinaza wirusa HIV; RT — odwrotna transkryptaza; IG — integraza wirusa HIV.

się do obniżenia skuteczności wirusa w infekowaniu komórek [84].

Oprócz hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy (RT), kwercetyna może spowalniać namnażanie wirusa, hamując działanie wirusowego białka Vpr, odpowiedzialnego za zmiany w cyklu komórkowym gospodarza, prowadzące do zwiększenia wydajności namnażania wirusa [85]. Jest również inhibitorem integrazy (IG) — enzymu odpowiedzialnego za włączanie DNA wirusowego do chromosomów gospodarza — oraz proteinazy (PT) biorącej udział w procesie dojrzewania wirusa [9].

VII. Uwagi końcowe

Flawonoidy stosowane były w leczeniu od dawna, gdyż często właśnie one są aktywnymi składnikami ziół działających przeciwzapalnie, hipoglikemicznie czy przeciwwirusowo. Przeciwtleniające właściwości flawonoidów są w dużej mierze odpowiedzialne za ich dobroczynne działanie dla organizmu człowieka. Stres oksydacyjny leży bowiem u podłoża wielu zmian patologicznych. Wolne rodniki mogą uszkadzać DNA, prowadząc do powstawania mutacji, oksydacyjne modyfikacje białek enzymatycznych wpływają na ich aktywność, a utlenianie lipidów błonowych zmienia właściwości błon komór-

kowych. Organizm dysponuje mechanizmami likwidującymi nadmiar wolnych rodników, jednak czasami produkcja wolnych rodników przewyższa zdolności organizmu do ich neutralizowania. Dlatego przeciwutleniacze zawarte w pożywieniu przyczyniają się do ograniczania uszkodzeń spowodowanych stresem oksydacyjnym, a w konsekwencji zapobiegają związanym z nimi schorzeniom.

Obecnie wzrasta zainteresowanie flawonoidami jako związkami mogącymi znaleźć zastosowanie w medycynie konwencjonalnej. Jednak przed ich wprowadzeniem do stosowania klinicznego muszą zostać przeprowadzone dokładniejsze badania dotyczące mechanizmów działania oraz ewentualnych skutków ubocznych ich stosowania, gdyż niektóre badania wykazały, że flawonoidy mogą działać również jako utleniacze, bądź przyczyniać się do powstawania reaktywnych form tlenu [86]. To czy dany flawonoid zadziała jako utleniacz, czy jako przeciwutleniacz, wydaje się zależeć od środowiska, między innymi od pH i potencjału redoks [87]. Ponadto niektóre flawonoidy, zwłaszcza flawonole, mogą wykazywać właściwości mutagenne [88]. Trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić, w jakim stopniu będą indukować mutacje *in vivo* w organizmie człowieka.

Podziękowania

Autorki składają serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Jadwidze Bryle za liczne uwagi, pomocne w przygotowaniu niniejszej pracy.

Praca częściowo finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji – grant nr 3P05A 04925

Artykuł otrzymano 20 listopada 2003
Zaakceptowano do druku 27 maja 2004

Piśmiennictwo:

1. Winkel-Shirley B (2001) *Plant Physiol* **127**: 1399-1404
2. Mukhtar H, Ahmad N (2000) *Am J Clin Nutr* **71**: 1698-1704
3. Scalbert A, Williamson G (2000) *J Nutr* **130**: 2073-2085
4. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) *J Nutr* **130**: 2765-2771
5. Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Remesy C (2001) *J Nutr* **131**: 1753-1757
6. Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K, Adlercreutz H (1998) *J Nutr* **128**: 1710-1715
7. Ueno I, Nakano N, Hirano I (1983) *Jpn J Exp Med* **53**: 41-50
8. Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB (2002) *J Am Diet Assoc* **102**: 1414-1420
9. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) *Pharmacol Rev* **52**: 673-751
10. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999) *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Polska, s. 590-593
11. Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S (2003) *J Natl Cancer Inst* **95**: 906-913
12. Zhong L, Goldberg MS, Gao YT, Hanley JA, Parent ME, Jin F (2001) *Epidemiology* **12**: 695-700
13. Tatsuta A, Iishi H, Baba M, Yano H, Murata K, Mukai M, Akedo H (2000) *Clin Exp Metastasis* **18**: 657-662
14. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M (2000) *Int J Cancer* **87**: 595-600
15. Wietrzyk J, Boratynski J, Gryniewicz G, Ryczynski A, Radzikowski C, Opolski A (2001) *Anticancer Res* **21**: 3893-3896
16. Katiyar SK (2002) *Int J Oncol* **21**: 1213-1222
17. Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM (1999) *Cancer Res* **59**: 4634-4641
18. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ (2001) *Int J Oncol* **19**: 837-844
19. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H (2001) *Nutr Cancer* **39**: 139-47
20. Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T (1998) *62*: 2199-2204
21. Tyagi A, Agarwal C, Agarwal R (2002) *Cell Cycle* **1**: 137-142
22. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001) *Am J Clin Nutr* **74**: 418-425
23. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC (1993) *Anticancer Res* **13**: 2165-70.
24. Brown J. E, Khodr H, Hider R. C, Rice-Evans C. A (1998) *Biochem J* **330**: 1173-1178
25. Hatagima A (2002) *Cad Saude Publica* **18**: 357-377
26. Hashimoto Y, Miura S, Degawa M (1990) *Princess Takamatsu Symp* **21**: 129-36
27. Siess MH, Mas JP, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M (1996) *J Toxicol Environ Health* **49**: 481-496
28. Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T (2001) *Pharm Res* **18**: 374-379
29. Buening MK, Chang RL, Huang MT, Fortner JG, Wood AW, Conney AH (1981) *Cancer Res* **41**: 67-72
30. Hodek P, Trefil P, Stiborova M (2002) *Chem Biol Interact* **139**: 1-21
31. Mizushima Y, Ishidoh T, Kamisuki S, Nakazawa S, Takemura M, Sugawara F, Yoshida H, Sakaguchi K (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 480-487
32. Chowdhury AR, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK (2002) *Biochem J* **366**: 653-661
33. Austin CA, Patel S, Ono K, Nakane H, Fisher LM (1992) *Biochem J* **282**: 883-889
34. De Azevedo WF Jr, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim SH (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2735-2740
35. McVean M, Xiao H, Isobe K, Pelling JC (2000) *Carcinogenesis* **21**: 633-639
36. Bai F, Matsui T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Ding Y, Sakai T (1998) *FEBS Lett* **437**: 61-64
37. Colic M, Pavelic K (2000) *J Mol Med* **78**: 333-336
38. Dong Z, Park AM (2003) *J Biochem Mol Biol* **36**: 66-77
39. Chung JY, Huang C, Meng X, Dong Z, Yang CS (1999) *Cancer Res* **59**: 4610-4617
40. Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H (2000) *Arch Biochem Biophys* **376**: 338-46.
41. Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW (2001) *Mol Pharmacol* **60**: 528-533
42. Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK (2000) *Biochem Pharmacol* **59**: 357-367
43. Manthey JA (2000) *Microcirculation* **7**: S29-34

44. Dębiński W, Slagle-Webb B, Achen MG, Stacker SA, Tulchinsky E, Gillespie GY, Gibo DM (2001) *Mol Med* 7: 598-608
45. Canizares F, Salinas J, de las Heras M, Diaz J, Tovar I, Martinez P, Penafiel R (1999) *Clin Cancer Res* 5:2035-41.
46. Agarwal R, Katiyar SK, Lundgren DW, Mukhtar H (1994) *Carcinogenesis* 15: 1099-1103
47. Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF (1990) *Cancer Res* 50: 499-502
48. Ibrahim AR, Abul-Hajj YJ (1990) 37: 257-260
49. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 287: 914-20.
50. Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte AM, Boumendjel A, Boutonnat J (2003) 46: 2125-2131
51. Ferte J, Kuhnel JM, Chapuis G, Rolland Y, Lewin G, Schwaller MA (1999) 42: 478-489
52. Sedlacek HH (2001) *Crit Rev Oncol Hematol* 38: 139-170
53. Wang HK (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9: 2103-19.
54. Ganong WF (1994) *Fizjologia - podstawy fizjologii lekarskiej* wydawnictwo PZWL, Warszawa, Polska, s. 411-425
55. Jachak SM (2002) *CRIPS* 3: 9-13
56. Hii CS, Howell SL (1984) *Diabetes* 33: 291-296
57. Ahmad F, Khan MM, Rastogi AK, Chaubey M, Kidwai JR (1991) *Indian J Exp Biol* 29: 516-520
58. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK (2002) *J Biol Chem* 277: 34933-34940
59. Kim JS, Kwon CS, Son KH (2000) *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2458-2461
60. Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M (2002) *J Biol Chem* 277: 15252-15260
61. Ader P, Block M, Pietzsch S, Wolfram S (2001) *Cancer Lett* 162: 175-180
62. Varma SD, Mizuno A, Kinoshita JH (1977) *Science* 195: 205-206
63. Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarck R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P (2003) *Circulation* 107: 1640-1646
64. Wollin SD, Jones PJ (2001) *J Nutr* 131: 1401-1404
65. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC (1999) *Arch Intern Med* 159: 2170-2174
66. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD (1999) *Circulation* 100: 100-1055
67. Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS (2003) *Clin Chim Acta* 327: 129-137
68. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001) *J Nutr Sci Vitaminol* 47: 357-362.
69. Koga T, Meydani M (2001) *Am J Clin Nutr* 73: 941-948
70. Alcocer F, Whitley D, Salazar-Gonzalez JF, Jordan WD, Sellers MT, Eckhoff DE, Suzuki K, Macrae C, Bland KI (2002) *Surgery* 131: 198-204
71. Huang HC, Wang HR, Hsieh LM (1994) *Eur J Pharmacol* 251: 91-93
72. Robak J, Korbut R, Shridi F, Swies J, Rzakowska-Bodalska H (1988) *Pol J Pharmacol Pharm* 40: 337-340
73. Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, Borel JP (1983) *Biochem Pharmacol* 32: 53-58
74. Jean T, Bodinier MC (1994) *Angiology* 45: 554-559
75. You KM, Jong HG, Kim HP (1999) *Arch Pharm Res* 22: 18-24
76. Nakajima T, Imanishi M, Yamamoto K, Cyong JC, Hiraï K (2001) *Planta Med* 67: 132-135
77. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H (2000) *Clin Exp Allergy* 30: 501-508
78. Hazekamp A, Verpoorte R, Panthong A (2001) *J Ethnopharmacol* 78: 45-49
79. De Clercq E (2000) *Med Res Rev* 20: 323-349
80. Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T (1998) *Antiviral Res* 37: 131-140
81. Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 160: 982-987
82. Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barre-Sinoussi F (1990) *Eur J Biochem* 190: 469-476
83. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 276: 534-538
84. Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, Nair HN, Chawda R, Shanahan T, Schwartz SA (2002) *Biol Res* 35: 421-431
85. Shimura M, Zhou Y, Asada Y, Yoshikawa T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 261: 308-316
86. Sahu SC, Gray GC (1997) *Food Chem Toxicol* 35: 443-447
87. Horvathova K, Vachalkowa A, Novotny L (2001) *Neoplasma* 48: 435-441
88. Jurado J, Alejandro-Duran E, Alonso-Moraga A, Pueyo C (1991) *Mutagenesis* 6: 289-295

Szanowni Państwo,

Pragniemy zawiadomić, że XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej odbędzie się w Lublinie w dniach:

19-22.05.2005.

Aby uzyskać bliższe informacje prosimy o kontakt:

www.immuno.prot.pl

lub z Piotrem Pożarowskim - sekretarzem Zjazdu

Zakład Immunologii Klinicznej

ul. Jaczewskiego 8

20-950 Lublin

tel. (+81)742 50 26

fax (+81) 746 70 10

e-mail: ppozarowski@o2.pl

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

dotyczący składek członkowskich i prenumeraty "Postępów Biochemii"
w roku 2004

Składka członkowska w 2004 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 2004 , mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorem "Postępów Biochemii". Koszt w 2004 roku - 80.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2004 120.- zł.

UWAGA: ZMIANA NUMERÓW KONT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

**Składki członkowskie i prenumerata Kwartalnika
"Postępy Biochemii"**

**BPH PBK S.A. Oddział w Warszawie, ul. Krucza 24-26
95 1060 0076 0000 4110 5000 0371**

**Prenumerata Kwartalnika "Acta Biochimica Polonica"
BPH PBK S.A. Oddział w Warszawie, ul. Krucza 24-26
35 1060 0076 0000 4110 5000 0384**