

p. 939

# POSTĘPY BIOCHEMII

13.01.2012

POLSKIE

TOWARZYSTWO

BIOCHEMICZNE

WARSZAWA 2011

TOM 57

NUMER 4

**Prof. Józef Heller**

**Neuropeptydy owadów**

**Retinoidy w rozwoju serca**

**Likopen**



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

<http://rcin.org.pl>

**Rozmiar: Nano. Możliwości: Mega.**



Poznaj zupełnie nowe wymiary real-time PCR:  
[www.lightcycler-nano.com](http://www.lightcycler-nano.com)

**LightCycler®**

Produkt przeznaczony tylko do badań naukowych.  
Nie stosować w procedurach diagnostycznych.

LIGHTCYCLER jest znakiem handlowym Roche.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.  
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B  
01-531 Warszawa  
[www.roche.pl](http://www.roche.pl)



© 2011 Roche Diagnostics  
Wszystkie prawa zastrzeżone.

<http://rcin.org.pl>



## W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Czynniki transkrypcyjne z rodziny LSF/Grainyhead**

Tomasz Wilanowski,  
Agnieszka Kikulska,  
Michał Młacki

**Białka inherentnie nieuporządkowane**

Agnieszka Dziedzic-Letka,  
Andrzej Ożyhar

**Kanały chlorkowe CIC roślin**

Agata Bogusz

**Białka NRT1 i ich rola w dystrybucji azotanów w roślinach**

Anna Warzybok,  
Magdalena Migocka

**Zdjęcie na okładce:**

*Zophobas atratus* Feb. Autorami zdjęcia są Paweł Marciniak i Michał Gniot z Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zdjęcie wykorzystano za zgodą autorów.

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki XLVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie Anna Bilska-Wilkosz, Piotr Laidler	333
Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XIX Kadencji Maria Jolanta Rędownicz, Andrzej Dżugaj	338
Rozstrzygnięcie konkursu Doktoraty 2010 Elżbieta Purta	342
VIII Konferencja im. Jakuba Karola Parnasa w Krakowie Maria Jolanta Rędownicz, Andrzej Dżugaj	345
52. Międzynarodowa Konferencja Biologii Lipidów Agnieszka Dobrzyń, Ewa Świeżewska, Tadeusz Chojnacki	347
Wiadomości krajowe pod red. Teresy Wesołowskiej	348

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Józef Heller – współtwórca polskiej biochemii w latach 1942-1973 Zofia Zarębska	354
Charakterystyka molekularna i fizjologiczna neuropeptydów owadzych z rodziny pirokinin Paweł Marciniak, Joanna Pacholska-Bogalska, Monika Szymczak, Grzegorz Rosiński	365
Likopen – występowanie, właściwości oraz potencjalne zastosowanie Agnieszka Belter, Małgorzata Giel-Pietraszuk, Stefan Oziewicz, Piotr Chomczyński, Jan Barciszewski	372
Retinoidy – ich metabolity, działanie i rola w rozwoju serca Emilia Stachurska, Anna Ratajska	381
Bifidobakterie i stymulujące ich wzrost fruktany typu inuliny Marzena Jędrzejczak-Krzepkowska, Stanisław Bielecki	392
$\beta$ -fruktofuranazydaza – właściwości, struktura i zastosowanie Marzena Jędrzejczak-Krzepkowska, Halina Kalinowska, Stanisław Bielecki	401
Rola połączeń typu Gap w komórkach tkanki kostnej Edyta Wróbel, Joanna Leszczyńska, Jacek Przybylski	411
W poszukiwaniu miejsc wiązania regulatorów transkrypcji – technika immunoprecypitacji chromatyiny (ChIP) Małgorzata Kus-Liśkiewicz, Wiesława Widłak	418
Promotor rdzeniowy a kontrola transkrypcji genów u <i>Eucaryota</i> Anna Niewiadomska-Cimicka, Marian Kochman	425
Małe, monomeryczne białka G roślin Stanisław Kowalczyk, Anna Hetmann, Mariusz Czarnota	442

## REVIEWS

Józef Heller – One of organizers of Polish biochemistry in 1942–1973	354
Molecular and physiological characterization of the pyrokinin insect neuropeptide family	365
Lycopene – occurrence, properties and applications	372
Retinoids – their metabolites, action, and role in heart development	381
Bifidobacteria and inulin-type fructans which stimulate their growth	392
$\beta$ -fructofuranosidase – properties, structure and applications	401
Role of Gap junctions in bone tissue	411
Finding targets of transcriptional regulators – chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)	418
Eucaryotic regulation of transcription – a role of core promoter	425
Small, monomeric G proteins in plants	442

## Szanowni Czytelnicy, Autorzy i Redaktorzy Postępów Biochemii

Niech Nowy 2012 Rok będzie szczęśliwy  
w osobiste doznania,  
spełni zamierzenia i dążenia zawodowe  
oraz przyniesie wiele satysfakcji  
z własnych dokonań.

Życzenia wszelkiej pomyślności i sukcesów  
w nadchodzącym roku  
wraz z podziękowaniami za zainteresowanie  
naszym czasopiśmie,  
wyraży poparcia naszej działalności  
i dotychczasową współpracę

przesyła

Sławomir Pikula  
Redaktor Naczelny



### PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

**OLYMPUS**

Your Vision, Our Future

**MERCK**

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

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesołowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl

Redaktorzy: Joanna Bandorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniwiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembala, Krzysztof Zabłocki, Alicja Żylicz

Skład i łamanie: Małgorzata Basaj; e-mail: biochem@nencki.gov.pl

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel/fax: (22) 5892499, e-mail: biuro@ptbioch.edu.pl, http://www.ptbioch.edu.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

„Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline, IndexCopernicus i Agrolibrex. Nakład 1000 egz.

# II OGÓLNOPOLSKI KONGRES BIOCHEMII I BIOLOGII KOMÓRKI XLVI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO KRAKÓW, 5-9 WRZEŚNIA 2011 ROKU

W dniach 5-9 września 2011 roku odbył się w Krakowie II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, będący jednocześnie XLVI Zjazdem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady w całości odbywały się w Audytorium Maximum UJ przy ul. Krupniczej 33 (Fot. 1). W Kongresie wzięło udział blisko 700 uczestników z kraju i z zagranicy (Austria, Białoruś, Czechy, Francja, Hiszpania, Holandia, Japonia, Niemcy, Rosja, Szwecja, Tajlandia, USA, Wielka Brytania, Włochy). Organizatorami krajowymi były Polskie Towarzystwo Biochemiczne i Polskie Towarzystwo Biologii Komórki, lokalnie Uniwersytet Jagielloński i Uniwersytet Rolniczy. Znaczną część uczestników stanowili młodzi naukowcy, studenci i doktoranci. Kongres zaszczylicili również honorowi członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.



Fot. 1. Audytorium Maximum UJ.

W Kongresie podzielonym na 28 sesji tematycznych wygłoszono w sumie 4 wykłady plenarne, 108 referatów sesyjnych (session lectures), 98 ustnych komunikatów oraz zaprezentowano 347 posterów. Oficjalnym językiem Kongresu był język angielski, co miało na celu nadanie mu między-

narodowego charakteru. Umożliwiło to skierowanie zaproszenia do, potencjalnie zainteresowanych udziałem, uczestników z całego świata oraz udział dużej liczby specjalistów z Europy, USA i Japonii, a także szerokie upowszechnienie osiągnięć polskich uczonych.

Honorowy Patronat nad Kongresem objęli Rektorzy obu organizujących go uczelni oraz przedstawiciele władz regionu i miasta: Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, profesor Karol Musioł oraz Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, profesor Janusz Żmija, a także Marszałek Województwa Małopolskiego, Pan Marek Sowa, Wojewoda Małopolski, Pan Stanisław Kracik i Prezydent Miasta Krakowa, profesor Jacek Majchrowski. W skład Komitetu Honorowego weszli: Prezes Polskiej Akademii Umiejętności, profesor Andrzej Bia-

łas, Prezes Polskiej Akademii Nauk, Profesor Michał Kleiber, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, profesor Andrzej Dżugaj oraz Prezes Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, profesor Alicja Józkowicz.

Głównymi Sponsorami Kongresu były firmy Merck, Millipore oraz Sigma-Aldrich (Platinum Sponsor). Wśród sponsorów znalazły się również firmy: Roche (Gold Sponsor), Abo (Silver Sponsor) oraz BD-Becton Dickinson Polska, Perkin Elmer, Precoptic Co.-Nikon (Bronze Sponsor).

Ponadto Kongres wsparli: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Fundacja na Rzecz Rozwoju Glikobiologii GLYCO XII oraz Euroimplant Emapol, TriMen Chemicals, Life Technologies i IKA POL.

Organizatorami tegorocznego Zjazdu był Krakowskie Oddziały: Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którego Przewodniczącą jest dr hab. Ewa Luchter-Wasylewska oraz Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, którego Przewodniczącym jest prof. dr hab. Marcin Majka. Pracownikami Komitetu Organizacyjnego przewodniczył prof. dr hab. Piotr Laidler z Katedry Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJ CM). Członkami Komitetu byli pracownicy UJ CM (Ewa Luchter-Wasylewska, Marcin Majka, Joanna Dulińska-Litewka, Jacek Kijowski), Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (Alicja Józkowicz, Józef Dulak, Andrzej Kozik), Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ (Anna Lityńska), Wydziału Chemii UJ (Grażyna Stochel), Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego (Krystyna Koziec, Anna Hrabia) oraz Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej (Jerzy Silberring).

Komitet Naukowy, któremu przewodniczył z ramienia Polskiego Towarzystwa Biochemii prof. dr hab. Piotr Laidler, z ramienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki prof. dr hab. Alicja Józkowicz oraz reprezentujący oba Towarzystwa prof. dr hab. Józef Dulak, zgromadził organizatorów poszczególnych sesji zjazdowych, wśród których znaleźli się: Joanna Bereta (Kraków), Leonora Bużańska (Warszawa), Joanna Cichy (Kraków), Anna Ciemerych-Litwinienko (Warszawa), Jerzy Dobrucki (Kraków), Adam Dubin (Kraków), Grzegorz Du-



Fot. 2. Uroczystość otwarcia Kongresu. Kolejno od lewej siedzą, rząd górny: prof. Jerzy Duszyński, dr Maja Grabacka, dr Barbara Stachurska; rząd środkowy: prof. prof. Mieczysław Choraży, Włodzimierz Korohoda, Jerzy Kawiak, Zygmunt Machoy; rząd dolny: Prezes PTBK prof. Alicja Józkowicz, Dziekan Wydziału Chemii UJ prof. Grażyna Stochel, Prorektor UJ ds. CM prof. Wojciech Nowak, Rektor Uniwersytetu Rolniczego prof. Janusz Żmija, Rektor UJ prof. Karol Musioł, Przewodniczący Rady Miasta Krakowa Pan Bogusław Kośmider, prof. Józef Dulak.

bin (Kraków), Józef Dulak (Kraków), Jerzy Duszyński (Warszawa), Jakub Gołąb (Warszawa), Artur Jarmołowski (Poznań), Barbara Jarząb (Gliwice), Leszek Kaczmarek (Warszawa), Elżbieta Kołaczowska (Kraków), Krystyna Koziec (Kraków), Jerzy Kruk (Kraków), Piotr Laidler (Kraków), Paweł Lipiński (Jastrzębiec), Anna Lityńska (Kraków), Ewa Luchter-Wasyłewska (Kraków), Marcin Majka (Kraków), Marta Miączyńska (Warszawa), Joanna Moraczewska (Bydgoszcz), Krzysztof Nowak (Poznań), Artur Osyczka (Kraków), Adam Szewczyk (Warszawa), Jerzy Silberring (Kraków), Grażyna Stochel (Kraków), Lech Wojtczak (Warszawa) i Maria Wróbel (Kraków).

Uroczystość inauguracji poprzedzona została posiedzeniami Zarządów Głównych Towarzystw: Biochemicznego i Biologii Komórki. Zebraniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przewodniczył jego Prezes profesor Andrzej Dżugaj. W czasie spotkania omówiono szczegóły działań związanych z rozpoczynającym się Kongresem oraz powołano m.in. członków Komisji, która podczas Zjazdu miała dokonać oceny prac zgłoszonych do nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego. W czasie posiedzenia przedstawiono także przebieg prac związa-

nych z przygotowaniem do przyszłorocznego Zjazdu, który odbędzie się w Poznaniu.

Inauguracja Kongresu (Fot. 2) odbyła się 5 września 2011r. w Audytorium Maximum UJ. Uroczystość, która rozpoczęła się wysłuchaniem przez zaproszonych gości i uczestników odegrane-

go w Auli Hejnału krakowskiego (Fot. 3), prowadził w imieniu Komitetów Organizacyjnego i



Fot. 3. Hejnał krakowski na otwarcie Kongresu.

Naukowego Profesor Piotr Laidler. Uczestników powitali w imieniu środowiska akademickiego Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, profesor Karol Musioł oraz Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Rolniczego, profesor Janusz Żmija. W imieniu władz miasta życzenia owocnych obrad przekazał Przewodniczący Rady Miasta, Pan Bogusław Kośmider.

Oficjalnego otwarcia Kongresu dokonał Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Profesor Andrzej Dżugaj (Fot. 4). Następnie zgodnie



Fot. 4. Oficjalne otwarcie Kongresu przez Prezesa PTBioch profesora Andrzeja Dżugaj.

z przyjętą tradycją Prezesa obu Towarzystw: profesor Alicja Józkowicz z ramienia Polskiego Towarzystwa

Biologii Komórki i profesor Andrzej Dżugaj z ramienia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego rozpoczęli ceremonię wręczania nagród wzbogacając ją stosownymi laudacjami. Głos zabrali również przedstawiciele sponsorów.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. Jakuba Karola Parnasa i Firmy Molecular Research Center, Inc, Ohio, Cincinnati, USA za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii lub biologii molekularnej wykonaną całkowicie w pracowni na terenie Polski otrzymali: Jacek Bil, Magdalena Winiarska, Dominika Nowis, Kamil Bojarczuk, Anna Dąbrowska-Iwanicka, Grzegorz Basak, Kazimierz Sulek, Marek Jakóbsiak i Jakub Gołąb, z Zakładu Immunologii Centrum Biostruktury Uniwersytetu Medycznego w Warszawie za pracę pt.: „Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity” opublikowaną w „Blood”, 2010, 115, 3745-3755. Wykład im. Jakuba Karola Parnasa pt.: „Anticancer monoclonal antibodies” wygłosił w imieniu nagrodzonych prof. dr hab. Jakub Gołąb.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki im. Wacława Mayzla i Firmy Roche za najlepszy artykuł opublikowany w kwartalniku „Postępy Biologii Komórki” w 2010 roku otrzymali: Ewelina Synowiec, Anna Merecz, Renata Krupa i Katarzyna Woźniak z Katedry Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego za pracę pt.: „Polimorfizm genów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w raku piersi”, Postępy Biologii Komórki, 2010, 37, 433-448.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. Witolda Dąbrowskiego i Firmy Merck za najlepszą pracę doktorską z biochemii otrzymała Elżbieta Purta za dysertację pt.: „Identyfikacja i charakterystyka nowych enzymów modyfikujących RNA”. Promotorem pracy był prof. dr hab. Janusz Bujnicki z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w „Postęпах Biochemii” w roku 2010 otrzymali: Magdalena Lebiedzińska, Jan Suski, Jerzy Duszyński i Mariusz R. Więtkowski z Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie za pracę pt.: „Rola białka p66Shc w fizjologii i patologii”, *Postępy Biochemii*, 2010, 56, 165-173.

Nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Sigma-Aldrich Polska za najlepszą pracę doświadczaną lub teoretyczną z zakresu Chemii i Biochemii Kwasów Nukleinowych otrzymał emerytowany profesor Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego Ignacy Zenon Siemion za wkład i rozwój badań nad chemią i biochemią kwasów nukleinowych.

Podczas ceremonii otwarcia miało również miejsce uroczyste wręczenie dyplomów Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. Otrzymali je: prof. dr hab. Lech Wojtczak z Zakładu Biochemii



Fot. 5. Prezes PTBK prof. Alicja Józkowicz wręcza dyplom Honorowemu Członkowi Towarzystwa prof. Włodzimierzowi Korohodzie (UJ). W głębi prof. Piotr Laidler.

z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, prof. dr hab. Leszek Kuźnicki z Zakładu Biologii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN i prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda z Zakładu Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (Fot. 5). Uroczystą laudację wygłosiła Prof. dr hab. Alicja Józkowicz, Prezes Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.



Fot. 6. Chwila rozmowy w trakcie koktajlu powitalnego.

Gospodarzem przyszłorocznego, XLVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego będzie Poznań, dokąd gorąco i serdecznie zaprosiła wszystkich zebranych prof. dr hab. Maria Rybczyńska, Przewodnicząca Oddziału Poznańskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Po uroczystości otwarcia Kongresu uczestnicy zostali zaproszeni na „Koktajl Powitalny”, który odbył się we wnętrzach i na dziedzińcu Auditorium Maximum (Fot. 6).

Obrady Kongresu rozpoczęły się w dniu 6 września o godz. 8.30 wykładami otwierającymi poszczególne sesje i przebiegającymi według ustalonego programu równolegle w 4 salach w panelach przed- i popołudniowym przez trzy kolejne dni, a w dniu zakończenia kongresu jedynie w sesji przedpołudniowej. Poszczególne sesje naukowe poświęcone były następującym tematom:

- Inflammation and cancer: intracellular signaling and beyond (Joanna Bereta);
- Proteases in pathophysiology (Adam Dubin);
- Small RNAs: biogenesis and function (Artur Jarmołowski);
- Molecular and cellular bioenergetics (Artur Osyczka);
- Gasotransmitters and signal transduction (Józef Dulak);
- Kinases and phosphatases (Ewa Luchter-Wasylewska);
- Biochemistry of reproduction (Krystyna Koziec);
- Mitochondria (Adam Szewczyk, Lech Wojtczak, Jerzy Duszyński);
- Molecular mechanism in cancer (Piotr Laidler);
- Immune response: from cell trafficking to enzymatic regulation (Joanna Cichy);

- Molecular and cellular neurobiology (Leszek Kaczmarek);
  - Stem cells in tissue engineering (Leonora Bużańska);
  - Signaling pathways regulating transcription (Marta Miączyńska);
  - Applications of X-ray crystallography in life science (Grzegorz Dubin);
  - Glycan impact on molecule structure and function (Anna Lityńska);
  - Stem cells in science and medicine (Anna Ciemierych-Litwinienko);
  - Gene therapy and cellular reprogramming (Józef Dulak);
  - Omics and systems biology (Jerzy Silberring);
  - Mechanism of cell motility (Joanna Moraczewska);
  - Cancer transcriptomics: from model studies to predictive factors (Barbara Jarzab);
  - Imaging molecular interactions in living cells (Jerzy Dobrucki);
  - Sulfur-containing compounds – regulatory, antitumor and antioxidative potential (Maria Wróbel);
  - EMT-biology and clinical implications (Marcin Majka);
  - Tumor cells and the formation of metastases (Jakub Gołąb);
  - Inorganic nanomaterials for biology and medicine (Grażyna Stochel);
  - Iron metabolism (Paweł Lipiński);
  - Advances in plant biochemistry (Jerzy Kruk);
  - Varia.
- Tematyka wykładów plenarnych wygłaszanych przez zaproszonych wybitnych specjalistów w kolejne dni Kongresu, w godzinach południowych pomiędzy panelami przed- i popołudniowymi, a w ostatnim dniu Kongresu na jego rozpoczęcie, dotyczyła najnowszych osiągnięć z zakresu nauk biologicznych:
- Carbon monoxide: evolution, chemical reactivity and biological function (Roberto Motterlini (Fot. 7), FEBS National Lecturer, Inserm 955, Faculty of Medicine, University Paris-Est, Francja);
  - Perivascular inflammation as a risk factor of cardiometabolic disease (Tomasz Guzik, UJ CM, Kraków, Polska);
  - A novel type of adult human pluripotent stem cells (mouse cells) that reside in mesenchymal tissues (Mari Dezawa, Department of



Fot. 7. Wręczenie przez prof. Adama Szewczyka dyplomu FEBS Lecturer of the Year prof. Robertowi Motterliniemu.

Stem Cell Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japonia);

- An H-shaped electron transfer system of cytochrome bc<sub>1</sub> (Artur Osyczka, UJ, Kraków, Polska).

W Kongresie wzięło udział ponad 80 naukowców z zagranicy. Ciekawe podejście tematyczne i wysoki poziom merytoryczny prezentowanych badań sprawiły, że wszystkim wykładom i sesjom plakatowym towarzyszyło duże, a niekiedy wręcz bardzo duże zainteresowanie (Fot. 8).



Fot. 8. Dyskusje przy plakatach.

Trudno w tym miejscu nie pokusić się o refleksję, że polskie środowisko naukowe biologów i biochemików zajmuje coraz bardziej znaczącą pozycję w Europie i na świecie, a tego typu konferencje, pod warunkiem, że będą odbywały się w języku angielskim, są doskonałą płaszczyzną do rozwoju i promocji polskiej biologii i biochemii oraz stwarzają coraz korzystniejsze warunki do kontaktów międzynarodowych, co szczególnie dla młodych naukowców ma istotne dla ich rozwoju znaczenie.

Młodzi naukowcy mieli również, podczas uroczystego spotkania Władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z nowo przyjętymi jego członkami, szczególną okazję

do rozmowy i dyskusji z prof. dr hab. Tomaszem Guzikiem, laureatem Nagrody Fundacji Na Rzecz Nauki Polskiej 2010, nazywanej potocznie „polskim Noblem”, za wykazanie istotnego znaczenia układu odporności w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Fundacja Na Rzecz Nauki Polskiej przyznaje corocznie indywidualne nagrody uczynom za szczególne osiągnięcia i odkrycia naukowe, które stanowią istotny wkład w życie duchowe i postępowanie cywilizacyjny naszego kraju oraz zapewniają Polsce miejsce w nauce światowej.

Dużym zainteresowaniem cieszyły się również wykłady i warsztaty zorganizowane przez firmy:

- Touch the future of PCR (Bio-Rad Polska);
- Easy, accurate and reliable UV/Vis photometric analysis with the new Eppendorf BioSpectrometer® (Eppendorf Poland);
- Introducing Next Generation Sequencing to Laboratories: a Practical Approach (Genomed);
- Western blotting – products and applications (Merck. Oddział Merck Millipore);
- Combination of labeled and label-free assay technologies for the analysis of receptor biology (PerkinElmer Polska);
- Targeted Genome Editing in Mammalian Cells Using Engineered Zinc Finger Nucleases (Sigma-Aldrich);
- Maxwell 16 - an automated nucleic acid and protein extraction apparatus as a new quality standard in a genetic laboratory (Symbios).

Kongresowi towarzyszyła przez cały czas jego trwania, licznie odwiedzana przez uczestników, wystawa 37 firm oferujących odczynniki, sprzęt medyczny i naukowy, aparaturę kontrolno-pomiarową i laboratoryjną, książki i podręczniki (Fot. 10).

Wśród wystawców znalazł się też Instytut Biologii Doświadczalnej im.

Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, będący największym nie-universyteckim centrum badań biologicznych w Polsce, współpracujący z renomowanymi placówkami zagranicznymi oraz Polskie Towarzystwo Biochemiczne prezentujące swoją ofertę wydawniczą.

W czasie trwania Kongresu Komisja w składzie: prof. prof.: Maria Rybczyńska, Ludmiła Żylińska, Teresa Wesołowska, Józef Dulak, Lech Romanowicz i Andrzej Kozik (Przewodniczący) powołana w dniu 5 września 2011 r. przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wybrała laureatów Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików przyznawaną za szczególnie dobre i interesujące przedstawienie wartościowych prac biochemicznych na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W konkursie mogli uczestniczyć autorzy doniesień ustnych lub plakatowych, którzy do czasu zamknięcia Kongresu nie ukończyli 35 lat. Nagrodę główną otrzymał Michał Młacki z Pracowni Przekazywania Sygnału Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie za pracę pt.: „Grainyhead-like 1 (GRHL1) transcription factor in development of skin cancers”. Przyznano również trzy wyróżnienia, które otrzymali: Grzegorz Gołubiński z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii w Gdańsku za pracę pt.: „Formation of stacking aggregates between methylxanthines and aromatic mutagens reduces their biological activity”, Marta Przewoźniak z Instytutu Zoologii Uniwersytetu

Warszawskiego za pracę pt.: „Differentiation of myoblasts and embryonic stem cells can be stimulated by IGF-1 and IL-2” oraz Anna Florczak z Międzyuczelnianego Centrum Nano-BioMedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu za pracę pt.: „Hybrid spider silk proteins as drug nanocarriers for targeted cancer therapy”. Na-



Fot. 10. Wystawa firm prezentujących nowoczesną aparaturę, drobny sprzęt, odczynniki i publikacje.



## NOWE WŁADZE POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

6 września 2011 r., podczas II Kongresu Polskiej Biochemii i Biologii Komórki w Krakowie, odbyło się Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na którym wybrano nowe władze Towarzystwa, na XX Kadencję (lata 2011–2014). Prezesem został prof. dr hab. Andrzej Dżugaj (Wrocław), Wiceprezesem prof. dr hab. Adam Szewczyk (Warszawa). Wybrano też Zarząd Główny, który na posiedzeniu w Warszawie, w dniu 19 września 2011 r., wyłonił Prezydium, w skład którego, poza Prezesem i Wiceprezesem, weszli: dr hab. prof. nadzw. Paweł Pomorski (Warszawa) – Sekretarz, dr hab. prof. nadzw. Joanna Bandorowicz-Pikuła (Warszawa) – Skarbnik, dr hab. Elżbieta Rębas (Łódź) – Członek, prof. dr hab. Piotr Laidler (Kraków) – Członek, prof. dr hab. Artur Jarmołowski (Poznań) – Członek. Pozostali członkowie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na lata 2011–2014 to: prof. dr hab. Jolanta Barańska (Warszawa), dr Teresa Wesołowska (Szczecin), prof. dr hab. Ewa Birkner (Zabrze), prof. dr hab. Ludmiła Żylińska (Łódź), dr hab. Joanna Moraczewska (Bydgoszcz), dr hab. Barbara Dołęgowska (Szczecin), prof. dr hab. Edward Bańkowski (Białystok), prof. dr hab. Jan Barciszewski (Poznań) i prof. dr hab. Krzysztof Sobolewski (Białystok).

grody podczas ceremonii zamknięcia Kongresu wręczył Prof. dr hab. Andrzej Kozik.

Podczas Kongresu zostały również przyznane Nagrody Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki i Firmy Roche za najlepsze prezentacje konferencyjne. Nagrodę za najlepszą prezentację ustną wygłoszoną podczas II Ogólnopolskiego Kongresu Biochemii i Biologii Komórki otrzymał: Maciej Cieśla z Wydziału Biochemii, Biologii i Biotechnologii UJ za pracę pt.: „Heme oxygenase-1 as a possible therapeutic target in treatments of rhabdomyosarcoma”. Nagrodę PTBK za najlepszy poster prezentowany podczas II Ogólnopolskiego Kongresu Biochemii i Biologii Komórki ponownie otrzymał Michał Młacki z Pracowni Przekazywania Sygnału Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie za pracę pt. „Grainyhead-like 1 (GRHL1) transcription factor in development of skin cancers”. Wyróżnienie PTBK za poster prezentowany podczas II Ogólnopolskiego Kongresu Biochemii i Biologii Komórki otrzymała Katarzyna Szpak z Wydziału Biochemii, Biologii i Biotechnologii za pracę pt.: „Effect of fenofibrate on the properties of endothelial continuum in proximity of prostate cancer cells” oraz Katarzyna Sikorska z Zakładu Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego

w Gdańsku za pracę pt.: „Expression of hepcidin and heme oxygenase-1 in chronic hepatitis”. Nagrody Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki podczas ceremonii zamknięcia Kongresu wręczyli: prof. dr hab. Alicja Józko-wicz oraz Przedstawiciel Firmy Roche.

Materiały z Kongresu opublikowane zostały, dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w suplementie do *Acta Biochimica Polonica* (vol. 58, Suplement 2/2011), który uczestnicy Kongresu otrzymali, po raz pierwszy w historii dotychczasowych konferencji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w wersji elektronicznej, a nie drukowanej.

Organizatorzy starali się dostarczyć uczestnikom Konferencji także innych, poza przewidzianym programem naukowym Konferencji, przeżyć; w tym możliwość wybrania się na liczne wycieczki: zwiedzanie Krakowa, Nowej Huty, Muzeum Auschwitz-Birkenau oraz jednej z najstarszych kopalni soli w Wieliczce. Imprezą dodatkową było również spotkanie towarzyskie w Klubie „Żaczek”, miejscu, które jak wszystko w Krakowie ma swoją historię i legendę. W Żaczkę karierę rozpoczynali m.in. tacy artyści, jak: Ewa Demarczyk, Andrzej Sikorowski, Elżbieta Adamiak czy Jacek Kaczmarski.

Na zakończenie pragniemy bardzo serdecznie podziękować członkom Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Pani prof. dr hab. Jolancie Rędownicz i Pani dr hab. prof. nadzw. Joannie Bandorowicz-Pikule oraz Pani Małgorzacie Basaj i Panu dr hab. prof. nadzw. Pawłowi Pomorskiemu z Redakcji *Acta Biochimica Polonica*, a także Pani Ewie Szczepanik z biura PTBioch za wszelką pomoc i wspierającą współpracę w trakcie przygotowywania i prowadzenia Kongresu. Pragniemy także podziękować organizatorom Sesji Naukowych i członkom Komisji ds.

Nagród za trud włożony w organizację Kongresu i jego sprawny przebieg. Dziękujemy również firmie „Targi w Krakowie”, organizatorowi konferencji i kongresów, w której szczególnie w osobach Pani Ewy Woch i Pani Katarzyny Perlik znaleźliśmy doskonałych, zawsze gotowych do działania współpracowników. Chcielibyśmy również podziękować Pani dr Joannie Dulińskiej-Litewce za wysiłek włożony w przygotowanie Wystawy Firm, która w znaczący sposób przyczyniła się do nadania Kongresowi rangi ważnego i budzącego powszechne zainteresowanie wydarzenia naukowego. Dziękujemy także za znakomitą współpracę wszystkim koleżankom i kolegom z Komitetu Organizacyjnego i Komitetu Naukowego, z którymi mieliśmy możliwość pracować nad organizacją i przebiegiem Kongresu.

Atmosfera krakowskiego spotkania sprzyjała nawiązywaniu naukowych i towarzyskich kontaktów, prowadzeniu licznych dyskusji i wymianie idei twórczych, za co wszystkim uczestnikom II Kongresu Polskiej Biochemii i Biologii Komórki pięknie dziękujemy, pozostając z nadzieją, iż wywiezione z Krakowa wrażenia będą mile wspomniane.

**mgr Anna Bilska-Wilkosz**  
**prof. Piotr Laidler**

# Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XIX Kadencji (IX-2008-IX-2011)

## SPRAWY ORGANIZACYJNE

### WŁADZE POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Zarząd Główny, wybrany w dniu 9 września 2008 r. na Walnym Zebraniu Członków podczas Kongresu Biochemii i Biologii Komórki w Olsztynie, ukonstytuował się 23 września 2008 r. w następujący sposób: Prezes – Andrzej Dżugaj (Wrocław), Wiceprezes – Jolanta Barańska (Warszawa), Sekretarz – Maria Jolanta Rędownicz (Warszawa), Skarbnik – Anna Dygas (Warszawa); członkowie Prezydium – Edward Bańkowski (Białystok), Jan Barciszewski (Poznań) i Teresa Wesołowska (Szczecin); pozostali członkowie Zarządu – Wanda Bar-Dubowska (Poznań), Joanna Bendorowicz-Pikuła (Warszawa), Józef Dulak (Kraków), Teresa Jakubowska (Lublin), Hanna Jańska (Wrocław), Wiesława Jarmuszkiewicz (Poznań), Piotr Laidler (Kraków), Adam Szewczyk (Warszawa) i Ludmiła Żylińska (Łódź). W związku z rezygnacją we wrześniu 2009 r. Anny Dygas z funkcji Skarbnika i członkostwa w PTBioch Zarząd wybrał ze swego grona Joannę Bendorowicz-Pikułę, która rozpoczęła pełnienie tej funkcji z dniem 1 stycznia 2010 r.

Podczas kadencji odbyło się 9 posiedzeń Zarządu (w tym trzy wyjazdowe podczas dorocznych Zjazdów Towarzystwa w Łodzi, Wiśle i Krakowie) oraz 11 posiedzeń Prezydium Zarządu. Większość spotkań Zarządu odbywała się w formie rozszerzonej, tzn. z udziałem przedstawicieli Oddziałów i członków Głównej Komisji Rewizyjnej. Podczas Zjazdu w Łodzi zwołano również Nadzwyczajne Walne Zebranie Członków w celu dokonania zmiany Statutu.

### BIURO ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTBioch

Siedziba biura Zarządu Głównego mieści się w Instytucie Biolo-

gii Doświadczalnej im. Marcellego Nenckiego PAN. W lecie 2009 r. przeprowadzono remont biura (na koszt Instytutu Nenckiego) i dokonano zakupu niezbędnego sprzętu i umeblowania. Obecnie biuro wraz z redakcją *Acta Biochimica Polonica* zajmuje powierzchnię około 40 m<sup>2</sup>. W celu usprawnienia działalności biura Zarządu Głównego podjęto decyzję o zatrudnieniu jednej osoby na cały etat. Zakończono zaś współpracę z osobami związanymi z Towarzystwem, które niestety nie potrafiły posługiwać się komputerem. Od września 2009 r. biuro prowadzi p. Ewa Szczepanik. Biuro jest teraz czynne codziennie, zapewniony jest także bezpośredni kontakt z członkami poprzez obecność p. Szczepanik na dorocznych Zjazdach PTBioch.

### STRONA INTERNETOWA

Od listopada 2008 r. administratorem strony internetowej PTBioch (oraz obu wydawnictw) został dr hab. Paweł Pomorski (Warszawa). Strona ([www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl)) jest na bieżąco aktualizowana, powstały nowe zakładki m.in. Praca.

### KALENDARZ TOWARZYSTWA

Dr Anna Dygas pełniąca do grudnia 2009 roku funkcję skarbnika Towarzystwa wystąpiła z inicjatywą wydrukowania Kalendarza PTBioch, zawierającego informację o Towarzystwie i organizowanych przez Towarzystwo i FEBS zjazdach i konferencjach naukowych. Inicjatywę tę zrealizowano w 2010 roku, dzięki wsparciu finansowemu firm, drukując 200 sztuk kalendarza książkowego i 250 ściennego na rok 2011. Kalendarze, będące formą promocji Towarzystwa zostały rozdane członkom władz Towarzystwa, przedstawicielom Oddziałów i działaczom, kierownictwu instytucji i przedstawicielom firm systematycznie wspierających Towarzystwo. Były również dodatkiem do nagród Towarzystwa.

### ZMIANA STATUTU

Podczas minionej kadencji ponowiono próby zmiany zapisu w §37 Statutu Towarzystwa, praktycznie uniemożliwiającego dokonywanie jakichkolwiek zmian w Statucie. Pierwsza próba, podjęta podczas Zjazdu w Łodzi (zorganizowano wówczas Nadzwyczajne Walne Zebranie Członków) zakończyła się połowicznym sukcesem, gdyż udało się uzyskać ponad 50% głosów (włączając w to pełnomocnictwa), jednakże organ nadzoru, czyli Prezydent Miasta Stołecznego Warszawy nie uznał głosowania poprzez pełnomocników. W lipcu 2010 r. zmieniła się sytuacja prawna i pełnomocnictwa są obecnie uznawane przez Urząd Miasta.

Postanowiono więc powtórzyć akcję zbierania pełnomocnictw i zwołać Nadzwyczajne Walne Zebranie wówczas, gdy uda zdobyć się pełnomocnictwa od co najmniej 50% członków. Akcja zbierania dokumentów trwa, wciąż jednak brakuje wystarczającej liczby głosów. Tą drogą raz jeszcze prosimy o współpracę w tej sprawie. Plik z pełnomocnictwem oraz list Prezesa są dostępne na stronie internetowej Towarzystwa.

### POWOŁANIE NOWYCH SEKcji TEMATYCZNYCH

Powołano dwie nowe sekcje, Starzenia i Śmierci Komórki pod kierownictwem prof. Ewy Sikory z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcellego Nenckiego PAN w Warszawie oraz Molekularnych Mechanizmów Ruchliwości pod kierownictwem prof. Przemysława Wojtaszka z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wskrzyszono także sekcję dydaktyczną, kierownictwo powierzono prof. Julianowi Świerczyńskiemu z Uniwersytetu Gdańskiego.

### SPRAWY CZŁONKOWSKIE

Kontynuowano aktualizację listy członków PTBioch, dokonując, zgodnie ze Statutem, skreślenia osób z listy członków, które zalegały z opła-

caniem składek więcej niż dwa lata. Organizowano także podczas Zjazdów spotkania członków Zarządu z nowoprzyjętymi członkami Towarzystwa, podczas których omawiano korzyści płynące z przynależności do PTBioch. W 2010 r. przeprowadzono także akcję POWROTY, umożliwiającą powrót do Towarzystwa osobom skreślonym z powodu niepłacenia składek; skorzystało z niej 11 osób, które uiszczyły równowartość składki za lata 2008–2010.

Podczas kadencji skreślono 504 członków, w tym emerytów, którzy nie potwierdzili chęci przynależenia do Towarzystwa. Podczas trzyletniej kadencji przyjęto do Towarzystwa 288 nowych członków. Obecnie (stan na 6 września 2011 r.) Towarzystwo liczy 1069 członków, w tym 676 osób powinno opłacać pełną składkę, 297 jest uprawnionych do składki ulgowej dla studentów i doktorantów (275) oraz współmałżonków opłacających pełną składkę (22), a także 80 emerytów i 16 członków honorowych. Zarząd Główny podjął również uchwałę o możliwości dofinansowania udziału w dorocznych Zjazdach Towarzystwa członków-emerytów.

#### CZŁONKOSTWO HONOROWE

Z rekomendacji ustępującego Zarządu Głównego podczas Walnego Zebrania Członków w Krakowie przyznano członkostwa honorowe osobom szczególnie zasłużonym dla rozwoju polskiej biochemii. Są to: dr Piotr Chomczyński (USA, fundator Nagrody Parnasa), prof. Ryszard Gryglewski (Kraków, wybitny biochemik i farmakolog), prof. Serhiy Komisarenko (Ukraina, Prezes Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego), dr John Mowbray (Wielka Brytania, ustępujący skarbnik FEBS), prof. Maciej J. Nałęcz (Warszawa-UNESCO, były przewodniczący Komisji Stypendiów w FEBS), dr Teresa Wesołowska (Szczecin, wieloletni redaktor „Listów do członków” oraz prof. Zdzisław Żak (Kraków, wieloletni przewodniczący Oddziału PTBioch w Krakowie).

#### SPRAWY FINANSOWE

Na dochody Towarzystwa składały się: (i) składki członkowskie;

(ii) dotacje Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; (iii) wpływy z prenumeraty czasopism Towarzystwa; (iv) opłaty za publikację prac i artykułów przeglądowych w czasopismach Towarzystwa (tzw. *page charge*) oraz (v) dobrowolne dotacje instytucji wspierających i firm sponsorujących.

(i) począwszy od 2009 r. składka członkowska w pełnej wysokości wynosiła 100 zł rocznie, a składka ulgowa (od studentów i doktorantów oraz współmałżonków opłacających pełną składkę) 50 zł. Członkowie honorowi oraz emeryci są zwolnieni z opłacania składki. Niepokoi wysokość wpływów ze składek, które utrzymywały się na poziomie około 65% spodziewanych wpływów;

(ii) dotacje Ministerstwa przeznaczone były wyłącznie na dofinansowanie wydawnictw Towarzystwa „Postępów Biochemii”, „Acta Biochimica Polonica” i „Leksykonu” (jedynie w 2008 r. i częściowo w 2009 r.) oraz dorocznych Zjazdów Towarzystwa, Kongresu EBEC, zorganizowanego w 2010 r. przez sekcję Bioenergetyki oraz VIII Konferencji Parnasa (w 2011 r.);

(iii) prenumerata „Postępów Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica” (w zróżnicowanej wysokości) opłacana jest głównie przez biblioteki i innych prenumeratorów instytucjonalnych, natomiast członkowie Towarzystwa, którzy na bieżąco opłacają składkę członkowską, otrzymują „Postępy Biochemii” bezpłatnie. Wpływy z tego źródła pokrywają jedynie niewielką część kosztów wydawniczych;

(iv) opłaty za druk artykułów w obu czasopismach, wprowadzone w poprzedniej kadencji, poprawiły stan finansów Towarzystwa. Wysokość opłat ustalają redakcje czasopism;

(v) sponsorowanie przez instytucje wspierające oraz firmy komercyjne lub ich prezesów polegało przede wszystkim na fundowaniu nagród pieniężnych oraz wspieraniu finansowym Sesji Jubileuszowej, zjazdów i konferencji organizowanych przez Towarzystwo oraz druk i wysyłkę „Listów do Członków”.

## DZIAŁALNOŚĆ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA FORUM KRAJOWYM

### SESJA JUBILEUSZOWA

W ramach obchodów 50-lecia powstania PTBioch zorganizowano Sesję Jubileuszową 50-lecia PTBioch, która odbyła się 3 kwietnia 2009 r. w Sali Lustrzanej Pałacu Staszica w Warszawie. Uczestniczyło w niej około 200 osób, w tym wielu znakomitych gości, wśród nich córka jednego z założycieli PTBioch, prof. Kazimierza Zakrzewskiego, Pani Minister Julia Pitera. Poza wykładem prof. Lecha Wojtczaka poświęconym historii Towarzystwa, wykłady wygłosili prof. Maciej Żylicz i prof. Grzegorz Węgrzyn. Szczegółowe sprawozdanie z Sesji zamieszczono w „Postęпах Biochemii” (numer 55/2), „Acta Biochimica Polonica” (numer 56/2) oraz na stronie internetowej Towarzystwa ([www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl)). Zorganizowanie spotkania było możliwe dzięki wsparciu finansowemu Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN oraz wielu firm. Polskie Towarzystwo Biochemiczne dofinansowało również wydanie Złotej Księgi 50-lecia.

### ZJAZDY PTBioch

W minionej kadencji odbyły się trzy ogólnopolskie Zjazdy Towarzystwa: 44. Zjazd w Łodzi (16–19 września 2009 r.), zorganizowany przez prof. Ludmiłę Żylińską i dr hab. Elżbietę Rębas, Oddział Łódzki; 45. Zjazd w Wiśle (20–23 września 2010 r.), zorganizowany przez prof. Ewę Birkner i prof. Krystynę Olczyk, Oddział Katowicki oraz 46. Zjazd w Krakowie wspólnie z XI Ogólnopolską Konferencją Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki jako II Kongres Polskiej Biochemii i Biologii Komórki (5–9 września 2011), główni organizatorzy Kongresu to prof. Piotr Laidler (PTBioch, Oddział Krakowski) i prof. Alicja Józkowicz (Prezes PTBK). Kolejny 47. Zjazd odbędzie się w Poznaniu. Szczegółowe sprawozdania ze Zjazdów ukazały się w „Postęпах Biochemii”, a streszczenia tradycyjnie już druko-

wane są w postaci suplementów do „Acta Biochimica Polonica”.

#### KONFERENCJE PARNASA

Podczas minionej kadencji odbyły się dwie konferencje Parnasa, VII w Jałcie i VIII w Warszawie. VII Polsko-Ukraińska Konferencja, zorganizowana przez Ukraińskie Towarzystwo Biochemiczne odbyła się w dniach 3-7 października 2009 r. w Jałcie. Polskie Towarzystwo Biochemiczne zorganizowało zbiorowy wyjazd autokarem; koszty wynajęcia autokaru dla członków PTBioch pokryto z tzw. funduszu wschodniego uzyskanego podczas Kongresu FEBS w Warszawie. VIII Konferencja, pierwsza, z inicjatywy prof. A. Dżugaja, trójstronna Polsko-Ukraińsko-Izraelska Konferencja Parnasa, pod patronatem Ministra Spraw Zagranicznych Pana Radosława Sikorskiego i Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego Pani Barbary Kudryckiej, odbyła się w dniach 27-31 sierpnia 2011 r. na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Szczegółowe sprawozdanie z Konferencji znajduje się w tym numerze „Postępów Biochemii”. Kolejna, IX już Konferencja odbędzie się w 2013 r. najprawdopodobniej w Jeruzolimie.

#### FEDERACJA POLSKICH TOWARZYSTW NAUKOWYCH

W grudniu ubiegłego roku Towarzystwo wystąpiło z inicjatywą powołania Federacji Polskich Towarzystw Naukowych. W tym celu skontaktowano się z prezesami wszystkich naukowych towarzystw przyrodniczych i w styczniu 2011 r. odbyło się spotkanie założycielskie. Rolę koordynatora tego przedsięwzięcia powierzono, za zgodą wszystkich uczestników spotkania, członkowi PTBioch prof. Jerzemu Duszyńskiemu. Obecnie trwają prace organizacyjne. W październiku odbędzie się zebranie, na którym ustalony zostanie program i zasady działania Federacji.

#### VARIA

Polskie Towarzystwo Biochemiczne we współpracy z innymi towarzystwami naukowymi podejmowały szereg inicjatyw. Na przykład przygotowano petycję w spr-

wie zwolnienia z procedury przetargowej zakupów dokonywanych z funduszy uzyskanych w ramach grantów badawczych oraz zmian w prawodawstwie dotyczącym badań z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Ponadto, korzystając z prawa nadanego w Ustawie o Narodowym Centrum Nauki (NCN) Towarzystwo zgłosiło kandydaturę prof. Leszka Kaczmarka do Rady NCN.

#### DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

Towarzystwo wydaje dwa kwartalniki: „Postępy Biochemii” i „Acta Biochimica Polonica”. Ponadto, również kwartalnie wydawane są pod redakcją dr Teresy Wesołowskiej „Listy do Członków”, rozprawdane bezpłatnie wśród wszystkich członków Towarzystwa, informujące o bieżących sprawach i wydarzeniach. Warto podkreślić, że dr Wesołowska zdobywa fundusze pokrywające koszty wydania i wysyłki „Listów...”.

#### „POSTĘPY BIOCHEMII”

Redaktorem naczelnym „Postępów Biochemii” jest prof. Sławomir Pikuła (Warszawa), któremu podczas minionej kadencji przedłużono umowę na kolejnych 5 lat. Pismo cieszy się dużym zainteresowaniem jako aktualne źródło informacji o współczesnych trendach w biochemii i biologii molekularnej. Ponadto, w dziale Wydarzenia/Opinie/Komentarze umieszczane są informacje o wydarzeniach w polskim środowisku biochemicznym. Dzięki staraniom Redakcji kwartalnik został umieszczony na ministerialnej liście czasopism. Została zmodernizowana wysyłka „Postępów Biochemii”, jest ono wysyłane w przezroczystej kopercie za pomocą tańszej formy wysyłkowej.

#### „ACTA BIOCHIMICA POLONICA”

Wydawane są wspólnie przez Towarzystwo i Komitet Biochemii i Biofizyki PAN, jednakże to Polskie Towarzystwo Biochemiczne ponosi główny ciężar organizacyjny, logistyczny i finansowy. Kwartalnik publikuje oryginalne prace doświadczalne i przeglądowe wyłącznie w

języku angielskim. Poza artykułami polskich autorów w „Acta” ukazują się również prace autorów zagranicznych (około 30% prac). Pismo publikuje około 100 prac rocznie. W skład Rady Redakcyjnej „Acta” wchodzi uznanie autorytety naukowe z Polski i z zagranicy. *Impact factor* pisma wahał się w ciągu ostatnich 3 lat w granicach 1,2-1,4. Czasopismo wydawane jest zarówno w wersji drukowanej, jak i elektronicznej; ta ostatnia jest dostępna bezpłatnie i bez żadnych ograniczeń. Redaktorem Naczelnym „Acta” po śmierci prof. Liliany Konarskiej (w sierpniu 2008 r.) został prof. Grzegorz Węgrzyn (Gdańsk), który objął tę funkcję w styczniu 2009 r.

#### „LEKSYKON”

„Leksykon” zawierający wykaz terminów z zakresu biochemii i biologii molekularnej był wydawany w formie internetowej. Na początku 2009 r. Zarząd Główny podjął jednak decyzję o zaprzestaniu prac nad tym wydawnictwem. Budziło ono bowiem wiele słów krytyki, ponadto „Leksykon” pojawił się nielegalnie na stronach internetowych nie związanych z Towarzystwem. Zwrócono dotację celową do Ministerstwa przyznaną na 2009 r., a w miejsce „Leksykonu” postanowiono przygotować polsko-angielski i angielsko-polski słownik biochemiczny.

#### „SŁOWNIK BIOCHEMICZNY”

Zarząd Główny uznał, że istnieje pilna potrzeba opracowania współczesnego Słownika Biochemicznego Angielsko-Polskiego i Polsko-Angielskiego. Pracy nad Słownikiem podjął się prof. Edward Bańkowski, który w ciągu niecałych dwóch lat wykonał gigantyczną pracę opracowując Słownik zawierający ponad 10.000 haseł. Wydawnictwo to uzyskało pozytywne recenzje i jest obecnie drukowane przez firmę Elsevier, Urban & Partner we Wrocławiu.

#### NAGRODY TOWARZYSTWA

Dokonano aktualizacji większości regulaminów nagród PTBioch. Nagrodzie za najlepszą pracę doktorską, finansowanej przez firmę Merck, nadano patrona profesora

Witolda Drabikowskiego. Zamiast Nagrody im. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepsze doniesienie zjazdowe przedstawione przez studentów uczestniczących w dorocznych Zjazdach Towarzystwa utworzono Stypendium im. Janiny Opieńskiej-Blauth pokrywające koszty ich uczestnictwa w tych wydarzeniach naukowych.

W ciągu XIX kadencji przyznano następujące coroczne nagrody:

(1) im. Jakuba K. Parnasa za najlepszą publikację pracy wykonanej w polskim laboratorium. Nagrodę sponsoruje dr Piotr Chomczyński z firmy Molecular Research Center, Inc. w Cincinnati, stan Ohio, USA;

(2) im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „Postęпах Biochemii”, nagrodę finansuje Zarząd Główny;

(3) im. Włodzimierza Mozolowskiego za najlepsze doniesienie zjazdowe przedstawione przez młodego naukowca podczas dorocznego Zjazdu PTBioch; nagrodę finansują organizatorzy Zjazdu;

(4) stypendia im. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepsze doniesienie pokrywające koszty ich uczestnictwa w tych wydarzeniach naukowych; stypendia są fundowane przez Zarząd Główny;

(5) za najlepszą pracę w zakresie kwasów nukleinowych; nagrodę sponsoruje firma SIGMA-ALDRICH Polska;

(6) im. Witolda Drabikowskiego za najlepszą rozprawę doktorską w zakresie biochemii; nagrodę sponсорuje firma Merck.

Ponadto, w 2009 r. przyznano nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii.

Laureaci nagród i stypendium są wymienieni na stronie internetowej Towarzystwa w zakładkach odpowiadających poszczególnym nagrodom.

## DZIAŁALNOŚĆ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO NA FORUM ZAGRANICZNYM

### FEDERACJA EUROPEJSKICH TOWARZYSTW BIOCHEMICZNYCH (FEBS)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne od początku powstania Federacji jest jej aktywnym członkiem. Co roku odprowadzana jest do FEBS składka, wysokość której jest pochodną liczby członków Towarzystwa. Członkowie PTBioch mogą ubiegać się o różne stypendia badawcze oferowane przez FEBS oraz o dofinansowanie udziału w Forum Młodych podczas Kongresów FEBS oraz w warsztatach naukowych. Prof. Andrzej Dżugaj uczestniczył z głosem stanowiącym na corocznych spotkaniach Rady FEBS podczas Kongresów FEBS w Pradze (2009), Goeteborgu (2010) i Turynie (2011). Członkowie Towarzystwa wchodzili w skład centralnych władz FEBS. Prof. Adam Szewczyk pełnił urząd doradcy ds. kongresów FEBS (Congress Counselor), a prof. Maciej J. Nałęcz do 2010 r. był przewodniczącym komisji ds. stypendiów (pełnił tę funkcję przez trzy kadencje z rzędu). Godne podkreślenia jest, że podczas posiedzenia FEBS Council w Turynie prof. Szewczyk został jednomyślnie wybrany na trzecią kadencję. W komisji ds. wydawnictw od 2006 r. pracuje prof. Mariusz Jaskólski (Poznań), natomiast prof. J. Barańska została wybrana w 2009 r. do grupy ds. Europy Środkowo-Wschodniej (WOGCEE; do 2009 r. członkiem tej grupy był prof. Andrzej Dżugaj). Ponadto, prof. Jerzy Duszyński został w 2011 r. włączony w skład komisji *Science and Society*. Niestety, pomimo zgłaszania kandydatów do innych komisji nie udało się tam wprowadzić polskich biochemików. Wart podkreślenia jest fakt, że podczas minionej kadencji dwukrotnie gościliśmy Sekretarza Generalnego FEBS, prof. Israela Pechta (uczestniczył w Sesji Jubileuszowej oraz w VIII Konferencji Parnasa). Na Konferencję Parnasa przyjechał również prof. Mathias Sprinzl, przewodniczący grupy WOGCEE.

### WSPÓŁPRACA Z INNYMI TOWARZYSTWAMI BIOCHEMICZNYMI

Kontynuowano datującą się od początku lat 90. współpracę z Ukraińskim Towarzystwem Biochemicznym, która

przejawiała się głównie w organizacji Konferencji Parnasa (w 2009 i 2011 r.). Ponadto, prof. Jolanta Barańska i prof. Andrzej Dżugaj uzyskali członkostwo honorowe tego Towarzystwa.

Kontynuowano współpracę z biochemikami z Białorusi, zwłaszcza z Grodna. Organizatorzy dorocznych Zjazdów oraz VIII Konferencji Parnasa finansowali uczestnictwo w tych wydarzeniach naukowych kilku badaczom z Białorusi. Także dwa egzemplarze każdego numeru „Postępow Biochemii” są bezpłatnie przekazywane na Białoruś. W grudniu 2008 r. prof. Andrzej Dżugaj i prof. Edward Bańkowski uczestniczyli w konferencji zorganizowanej w Grodnie zatytułowanej „Substancje biochemicznie aktywne”, która odbyła się z okazji 240-lecia urodzin i 170-lecia śmierci Jędrzeja Śniadeckiego. Konferencja ta była też okazją do rozmów na temat sytuacji białoruskich biochemików. Temu zagadnieniu poświęcone było także spotkanie podczas VIII Konferencji Parnasa, w którym uczestniczyli prof. Andrey Moisseenok z Grodna oraz przedstawiciele władz FEBS (profesorowie Israel Pecht, Mathias Sprinzl i Adam Szewczyk), członkinie grupy WOGCEE (prof. Jolanta Barańska i dr Tatiana Borisova z Ukrainy), a także prezesi PTBioch (prof. Andrzej Dżugaj) i Ukraińskiego Towarzystwa Biochemicznego (prof. Serhiy Komisarenko).

Dzięki inicjatywie prof. Jana Barciszewskiego (Poznań) nawiązano kontakt z Niemieckim Towarzystwem Biochemii i Biologii Molekularnej. Trwają obecnie rozmowy na temat zorganizowania w 2012 r. w Poznaniu wspólnego Zjazdu obu towarzystw. Zaś dzięki inicjatywie prof. Andrzeja Dżugaja nawiązano kontakt z Izraelskim Towarzystwem Biologii Molekularnej i Biochemii, które zaowocowało zorganizowaniem w 2011 r. trójstronnej Konferencji Parnasa. Tak jak wcześniej wspomniano, kolejna Konferencja Parnasa odbędzie się w 2013 r. najprawdopodobniej w Jerozolimie.

**prof. Maria Jolanta Rędowicz**  
**sekretarz PTBioch**  
**i prof. Andrzej Dżugaj**  
**prezes PTBioch**  
**wrzesień 2011 r.**

# ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU IM. WITOLDA DRABIKOWSKIEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. Z O.O. NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2010 ROKU

Komisja w składzie: prof. Lilla Hryniewiecka, prof. Barbara Nawrot, prof. Zbigniew Madeja, prof. Krzysztof Sobolewski, prof. Michał Woźniak i prof. Anna Filipek (przewodnicząca), powołana przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i zaakceptowana przez przedstawiciela firmy „MERCK” (dr Karina

Błachnio), spośród 9 zgłoszonych na konkurs prac doktorskich zarekomendowała do nagrody rozprawę Pani dr Elżbiety Purta pt. „Identyfikacja i charakterystyka nowych enzymów modyfikujących RNA”. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza M. Bujnickiego w Międzynarodowym Instytucie

Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Decyzję Komisji zatwierdził jednomyślnie Zarząd Główny PTBioch na posiedzeniu w dniu 5 września 2011 r.

**prof. Anna Filipek**  
Przewodnicząca Komisji Konkursowej

## SYLWETKA NAUKOWA DR ELŻBIETY PURTA




Dr Elżbieta Purta ukończyła studia na kierunku Biologia na Uniwersytecie Warszawskim. Swoją przygodę z biologią molekularną rozpoczęła wykonując pracę magisterską w Zakładzie Biologii Molekularnej w Instytucie Biochemii, pod kierunkiem prof. Krzysztofa Staronia. Po ukończeniu studiów dołączyła do grupy kierowanej przez prof. Janusza Bujnickiego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. W Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka realizowała projekt doktorski dotyczący poszukiwania nowych metylotransferaz RNA, będąc jednocześnie (od 2005 r.) uczestnikiem studiów doktoranckich w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Swoją pracę doktorską wykonywała w ramach grantu badawczego prof. Bujnickiego „Doświadczalna charakteryzacja


pełnego zestawu metylotransferaz RNA w organizmach modelowych i identyfikacja ich odpowiedników w zsekwencjonowanych genomach”, przyznanego przez MNiSW. W trakcie pracy nad projektem doktorskim Elżbieta Purta odbyła szereg staży naukowych w europejskich laboratoriach zajmujących się badaniem modyfikacji kwasów nukleinowych. W ramach stypendium Marie Curie pracowała na Uniwersytecie Południowej Danii w Odense, a dzięki wsparciu FEBS oraz Fundacji Ernsta Scheringa w Instytucie Biotechnologii w Wilnie oraz na Wolnym Uniwersytecie w Brukseli. Elżbieta Purta jest współautorką 17 publikacji naukowych, w tym 14 z zakresu modyfikacji RNA, w takich czasopismach jak RNA, Journal of Molecular Biology i

Nucleic Acid Research. Jest laureatką programu START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej „Stypendia krajowe dla młodych uczonych” (edycja 2008 i 2009) oraz stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnego młodego naukowca (edycja 2011). Obrona pracy doktorskiej Elżbiety Purta „Identyfikacja i charakterystyka nowych enzymów modyfikujących RNA” odbyła się 5 października 2010 r. Na wniosek obu recenzentów, prof. Andrzeja Jerzmanowskiego i prof. Artura Jarmołowskiego, praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową IBB PAN. Obecnie dr Elżbieta Purta jest zatrudniona w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, w Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka.

## Identyfikacja i charakterystyka nowych enzymów modyfikujących RNA

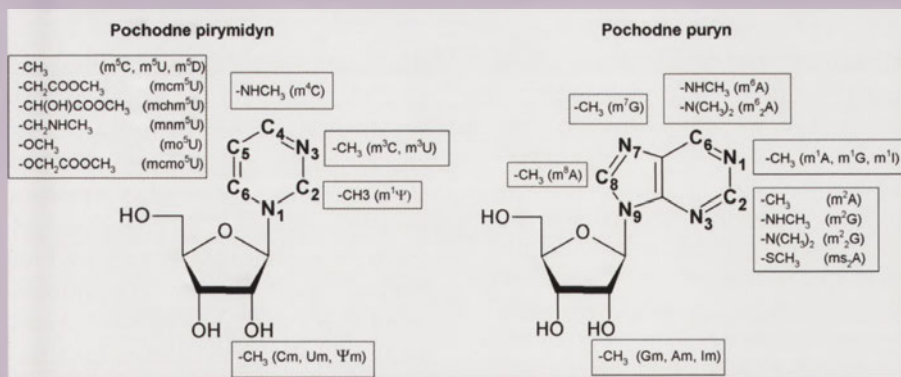
### STRESZCZENIE PRACY

**Elżbieta Purta** 

 Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Obok białek, niekodujące RNA stanowią najważniejsze cząsteczki biorące udział w metabolizmie ko-

mórkowym. Ich dojrzewanie odbywa się poprzez skomplikowaną serię procesów obróbki enzymatycznej obejmujących: usuwanie pewnych sekwencji nukleotydowych przez endonukleazy, rybozomy i egz nukleazy, dodawanie nukleotydów do końca 5' i 3' pierwotnego transkryptu lub produktu jego rozcięcia, a także chemiczne modyfikacje niektórych nukleotydów w obrębie zasad



Rycina 1. Różnorodność metylacji w RNA. Grupy funkcyjne charakterystyczne dla każdej pochodnej modyfikowanego nukleozydu zaznaczono w ramce. Symbole modyfikowanych nukleozydów podano w nawiasach.

azotowych lub reszt monocukrowych. W rezultacie, cząsteczki RNA zawierają liczne zmodyfikowane nukleozydy, pochodne naturalnie występujących czyli adenozyne, guanozyne, cytydyny i urydyny. Najczęstsze modyfikacje to izomeryzacja urydyny do pseudouracydu oraz metylacja w różnych pozycjach nukleozydu. Do chwili obecnej zidentyfikowano 122 zmodyfikowane nukleozydy naturalnie występujące w różnych typach RNA (tRNA, rRNA, mRNA, snRNA, snoRNA, miRNA, piRNA i innych) pochodzących z trzech głównych domen życia. Lista tych modyfikacji oraz struktury chemiczne zmodyfikowanych nukleozydów dostępne są w bazie danych modyfikacji RNA MODOMICS [1].

Rodzaj i lokalizacja modyfikacji zależy od typu cząsteczki RNA, organizmu, jak i lokalizacji komórkowej. Największą zawartość i różnorodność modyfikacji odnajdujemy w tRNA, zwłaszcza u organizmów wyższych. Pozostałe typy RNA (np. rRNA) również zawierają zmodyfikowane nukleozydy, lecz ich różnorodność jest mniejsza niż w cząsteczkach tRNA [2]. W organizmach modelowych (*E. coli* i *S. cerevisiae*) ustalono doświadczalnie pozycję i strukturę chemiczną większości zmodyfikowanych nukleozydów w cząsteczkach tRNA i rRNA. Informacja ta jest dostępna także dla wybranych cząsteczek RNA innych organizmów. Spośród występujących w organizmach zmodyfikowanych nukleozydów metylacje różnych atomów zasad lub/i grupy 2'-OH rybozy występują najczęściej i charakteryzują się największą róż-

norodnością (Ryc. 1). Metylowane nukleozydy powstają w wyniku pojedynczych lub podwójnych metylacji endocyklicznego atomu węgla, endocyklicznego atomu azotu lub egzocyklicznej grupy aminowej. Metylacja obejmuje również egzocykliczny tlen w pozycji 2' w cząsteczce rybozy. Reakcja metylacji jest katalizowana przez enzymy przenoszące grupę metylową z cząsteczki donora AdoMet na atom nukleofilowy substratu, nazywane metylotransferazami (MTazami).

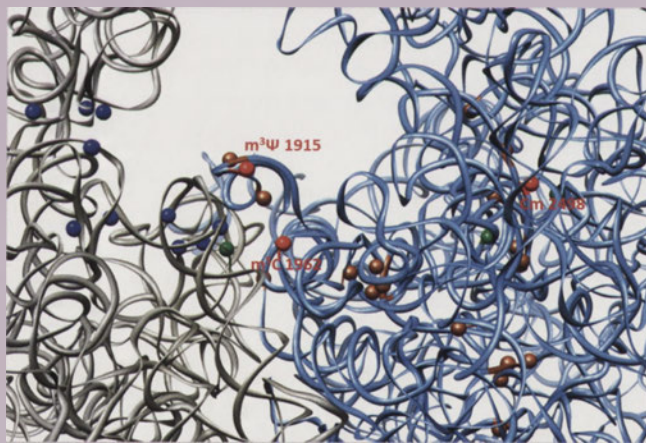
Mimo dużej liczby badań dotyczących modyfikowanych nukleozydów ich rola jest słabo poznana. Obecność grup metylowych w cząsteczkach RNA zmienia lokalne środowisko chemiczne. Dyskretne zmiany chemiczne mogą pomagać RNA w precyzyjnym zwijaniu się w funkcjonalną strukturę, zapobiegać błędom zwijania albo zwiększać specyficzność oddziaływań z innymi RNA (np. rozpoznanie kodonu przez antykodon) lub z białkami (np. rozpoznanie substratowego tRNA przez syntetazę aminoacylo-tRNA). Dlatego też w zależności od lokalizacji modyfikacji w cząsteczce RNA można oczekiwać, iż dołączenie grupy metylowej lub inna modyfikacja będą wpływać w różnym stopniu na wymienione procesy. Jednym z powodów niepełnego zrozumienia funkcji modyfikacji RNA jest brak informacji na temat procesu ich wprowadzania. Tylko dla nielicznych modyfikacji dostępny jest pełen zestaw danych: poznana struktura chemiczna zmodyfikowanego nukleozydu, zidentyfikowane miejsce modyfikacji, oczyszczony i

scharakteryzowany biochemicznie enzym wprowadzający modyfikację oraz zlokalizowany i scharakteryzowany gen kodujący to białko.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej stanowiły część interdyscyplinarnego projektu zmierzającego do identyfikacji nowych enzymów modyfikujących RNA i przewidywania ich funkcji biochemicznej (głównie specyficzności substratowej). Interdyscyplinarny charakter projektu zakładał połączenie możliwości oferowanych przez metody *in silico* z analizą doświadczalną. Zastosowanie zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych, a przede wszystkim modelowania molekularnego w połączeniu z analizą filogenetyczną, umożliwiło identyfikację kilkudziesięciu produktów otwartych ramek odczytu w genomie *Escherichia coli*, których przewidywana struktura i/lub kontekst genomowy wskazują na udział w procesie modyfikacji RNA. Dla niektórych enzymów przewidziano potencjalny typ katalizowanej reakcji i/lub najbardziej prawdopodobny substrat. W pracy przedstawiono wyniki doświadczalnej weryfikacji przewidywań dla metylotransferaz tRNA i rRNA. Doświadczalna analiza potencjalnych metylotransferaz była znacznie ułatwiona dzięki dostępności kompletnego zestawu sklonowanych genów kodujących poszczególne białka z dołączoną metką histydynową oraz kolekcji szczepów delecyjnych nie posiadających aktywności badanych metylotransferaz, które mogły stanowić źródło niemetylowanych substratów. Do weryfikacji przewidywań bioinformatycznych zastosowano szereg metod doświadczalnych, w tym dwuwymiarową chromatografię cienkowarstwową, spektrometrię mas, analizę metodą odwrotnej transkrypcji i wydłużania startera. Detekcja modyfikacji nukleozydów z użyciem wyżej wymienionych metod opierała się na wykorzystaniu jednej z trzech podstawowych zasad i) różnych właściwości fizykochemicznych, ii) różnej wrażliwości na trawienie nukleazami, iii) różnej reaktywności chemicznej modyfikowanych i niemodyfikowanych wariantów.

## METYLOTRANSFERAZY tRNA

Największą ilość i różnorodność modyfikacji odnajdujemy w tRNA, jedną z najczęściej występujących jest metylacja rybozy. Analizy porównawcze struktur i sekwencji w połączeniu z technikami modelowania pozwoliły na wytypowanie 3 potencjalnych metylotransferaz rybozy: YibK, LasT oraz YfhQ. Ich rozróżnienie wymagało jednak analizy doświadczalnej. Na podstawie analizy dostępnych w bazie danych MODOMICS sekwencji tRNA *E. coli* oraz występujących w nich modyfikacji nukleozydów wybrano potencjalne substraty dla badanych metylotransferaz – tRNA<sup>Ser1</sup> i tRNA<sup>Gln2</sup> dla metylacji w pozycji 32 oraz tRNA<sup>Leu5</sup> dla pozycji 34. Analizę potencjalnej aktywności MTaz tRNA YibK, LasT oraz YfhQ przeprowadzono *in vitro*, badając zdolność oczyszczonych białek do przeniesienia grupy metylowej na cząsteczki tRNA uzyskane w transkrypcji *in vitro* oraz cząsteczki tRNA izolowane ze szczepów delecyjnych. Status metylacji poszczególnych tRNA badano stosując rozdział zmody-



Rycina 2. Modyfikacje rybosomalnego RNA. Zaznaczono pozycje modyfikacji potranskrypcyjnych w 16S rRNA (kolor niebieski) i 23S rRNA (kolor brązowy). Pozycje nukleozydów, dla których w niniejszej pracy zidentyfikowano enzym modyfikujący, zaznaczono kolorem czerwonym. Kolorem zielonym zaznaczono pozycje, dla których enzym modyfikujący pozostaje nieznan.

fikowanych nukleozydów metodą 2D-TLC. Na tej podstawie ustalono, że kodowane przez gen *yfhQ* białko pełni funkcję metylotransferazy tRNA:Cm32/Um32 (TrmJ) [3].

## METYLOTRANSFERAZY rRNA

W rRNA *Escherichia coli* zidentyfikowano 11 zmodyfikowanych

nukleozydów w cząsteczkach 16S rRNA i 25 w cząsteczkach 23S rRNA; dla sześciu z nich enzymy wprowadzające modyfikacje pozostają nieznanne (Ryc. 2). Jedną z nich to metylacja m<sup>5</sup>C w pozycji 1962 dużej podjednostki rybosomu. Na podstawie analiz bioinformatycznych jako potencjalną MTazę m<sup>5</sup>C wskazano białko YccW (RlmI). Aby zweryfikować tę hipotezę, przeprowadzono analizę porównawczą wzorów metylacji cząsteczek rRNA wyizolowanych ze szczepu dzikiego i ze szczepu delecyjnego  $\Delta yccW$ . Analizie metodą spektrometrii mas poddano wyizolowany fragment rRNA obejmujący miejsce modyfikacji. Na tej podstawie wykazano, że cząsteczki rRNA wyizolowane ze szczepu  $\Delta yccW$  są pozbawione modyfikacji w pozycji 1962, a poprzez wprowadzenie kopii genu *yccW* na plazmidzie możliwe jest przywrócenie modyfikacji *in vivo*. Jednocześnie ustalono, że substratem reakcji *in vitro* z użyciem rekombinowanego białka są cząsteczki rRNA pozbawione białek rybosomalnych. Określenie specyficzności substratowej MTaz rRNA pozwoliło na wstępne

oszacowanie, na jakim etapie składania rybosomu wprowadzana jest konkretna modyfikacja. Utrata zdolności MTazy RlmI do modyfikacji C1962 po dołączeniu białek rybosomalnych do 23S rRNA sugeruje, że okno czasowe pomiędzy transkrypcją 23S rRNA i asocjacją podjednostek rybosomu jest zbyt małe, aby wszystkie cząsteczki 23S rRNA mogły zostać zmetylowane w pozycji C1962. Niezmodyfikowana frakcja 23S rRNA może zostać zmetylowana *in vivo* poprzez nadekspresję kopii genu *yccW* lub *in vitro* po usunięciu białek rybosomalnych. Oznacza to, że wszystkie cząsteczki 23S rRNA są substratem dla MTazy RlmI, a niepełna modyfikacja jest wynikiem zbyt małej zawartości

enzymu w komórce lub, jak wspomniano wcześniej, czas na przeprowadzenie reakcji jest niewystarczający [4]. Podobną analizę teoretyczno-doświadczalną przeprowadzono dla białka YbeA (RlmH). Wykazano, że enzym ten wprowadza metylację m<sup>3</sup>Ψ w pozycji 1915 dużej podjednostki rybosomu [5]. W ramach kontynuacji prac nad metylotransferazami rybozy ustalono specyficzność białka YgdE (RlmM), które katalizuje reakcję metylacji reszty rybozy w pozycji C2498 dużej podjednostki rybosomu [6].

Ustalenie specyficzności substratowej MTaz TrmJ, RlmM, RlmI i RlmH stanowi kolejny krok na drodze do odtworzenia szlaku modyfikacji bakteryjnego RNA, co z kolei pomoże w zrozumieniu roli poszczególnych zmodyfikowanych rybonukleozydów w regulacji funkcji niekodujących RNA. Znajomość zależności pomiędzy tymi enzymami oraz modyfikacjami bakteryjnego RNA pozwala na ich dokładniejszą charakterystykę, a także umożliwia identyfikację nowych enzymów.

## PIŚMIENICTWO

1. Czerwoniec A, Dunin-Horkawicz S, Purta E, Kamińska KH, Kasprzak JM, Bujnicki JM, Grosjean H, Rother K (2009) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2008 update. *Nucleic Acids Res* 37: D118-D121
2. Motorin Y, Grosjean H (1998) Chemical structures and classification of posttranscriptionally modified nucleosides in RNA. W: Grosjean H, Benne R, red. ) *Modification and editing of RNA*. ASM Press, Washington, D.C., str. 543-550
3. Purta E, van Vliet F, Tkaczuk KL, Dunin-Horkawicz S, Mori H, Droogmans L, Bujnicki JM (2006) The *yfhQ* gene of *Escherichia coli* encodes a tRNA:Cm32/Um32 methyltransferase. *BMC Mol Biol* 7: 23
4. Purta E, O'Connor M, Bujnicki JM, Douthwaite S (2008) YccW is the m<sup>5</sup>C methyltransferase specific for 23S rRNA nucleotide 1962. *J Mol Biol* 383: 641-651
5. Purta E, Kamińska KH, Kasprzak JM, Bujnicki JM, Douthwaite S (2008) YbeA is the m<sup>3</sup>Ψ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *RNA* 14: 2234-2244
6. Purta E, O'Connor M, Bujnicki JM, Douthwaite S (2009) YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Mol Microbiol* 72: 1147-1158



# VIII KONFERENCJA IM. JAKUBA KAROLA PARNASA WARSZAWA, 27-31 SIERPANIA 2011 ROKU

Od 27 do 31 sierpnia 2011 roku w Warszawie, w gmachu Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, odbyła się Polsko-Ukraińsko-Izraelska Konferencja Parnasa. Według naszej wiedzy była to pierwsza trójstronna konferencja naukowa z udziałem przedstawicieli tych trzech państw. Była to również pierwsza konferencja dofinansowana w ramach nowego programu FEBS 3+Meeting Programme, inicjatorem którego był prof. Adam Szewczyk, pełniący we władzach FEBS funkcję Congress Co-senior.

Jakub Karol Parnas był profesorem Uniwersytetu Lwowskiego w latach 1920-1941. W kierowanym przez niego Laboratorium Chemii Fizjologicznej zajmowano się metabolizmem glukozy. Glikoliza (rozkład glukozy poprzez estry fosforanowe) była wówczas badana w wielu laboratoriach Europy, uczestniczyły w tych badaniach dziesiątki uczonych; jednak uznano, że trzech uczonych Embden, Meyerhof i właśnie Parnas mają największy udział w odkryciu tego procesu (Embden-Meyerhof-Parnasa pathway), co stawia naszego rodaka w rzędzie najwybitniejszych biochemików pierwszej połowy dwudziestego wieku. Tragiczne losy Parnasa były wielokrotnie opisywane: aresztowany i uwięziony przez sowieckie władze bezpieczeństwa zmarł w więzieniu w Moskwie w 1949 roku w nigdy niewyjaśnionych okolicznościach. Ze zrozumiałych powodów ani władze sowieckie, ani PRL nie wspominały Profesora Parnasa, natomiast zarówno wśród polskich, jak i ukraińskich biochemików pamięć o nim była i jest wciąż żywa. Po zmianach systemowych w Polsce i po odzyskaniu niepodległości przez Ukrainę władze Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i grupa biochemików ze Lwowa postanowiły ocalić od zapomnienia tego wielkiego uczonego wychodząc z inicjatywą Polsko-Ukraińskich Konferencji Parnasa, organizowanych co dwa lata na przemian w Polsce i na

Ukrainie. W roku 2009 na VII Konferencji Parnasa w Jalcie Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, profesor Andrzej Dżugaj, wystąpił z inicjatywą zmiany dotychczasowej formuły Konferencji Polsko-Ukraińskiej na Polsko-Ukraińsko-Izraelską Konferencję Parnasa. Wynikało to z faktu, że w Laboratorium Parnasa pracowali nie tylko Polacy, ale również Żydzi i Ukraińcy. Odkrycie PFK, jednego z enzymów glikolizy, zostało dokonane przez trzech uczonych Osterna, który był Żydem, Gutkego – Polaka i Terszakowca – Ukraińca. Lwów w latach trzydziestych minionego stulecia był zamieszany głównie przez Polaków, Żydów i Ukraińców. Wzrastająca fala antysemityzmu i dążenie Ukraińców do utworzenia niepodległego państwa prowadziło do ostrych starć pomiędzy tymi grupami narodowymi. W takich czasach Laboratorium Parnasa było oazą spokoju, gdzie w przyjaznej atmosferze pracowali Polacy, Żydzi i Ukraińcy. Parnas był nie tylko wielkim uczonym, ale również człowiekiem wielkiego formatu. Inicjatywa Prezesa spotkała się z poparciem ze strony biochemików polskich, ukraińskich, jak również izraelskich. Postanowiono, że pierwsza Polsko-Ukraińsko-Izraelska Konferencja Parnasa odbędzie się w Warszawie w 2011 roku. Przewodniczącym Komitetu Naukowego został profesor Andrzej Dżugaj, zaś przewodniczącą Komitetu Organizacyjnego profesor Maria Jolanta Rędownicz, ówczesna Sekretarz Towarzystwa. W organizacji konferencji uczestniczyło

wielu pracowników i doktorantów, przede wszystkim z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, a także z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. Wspomagało ich ponad dwadzieścioro wolontariuszy, ze wspomnianych wyżej placówek oraz Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Patronat nad VIII Konferencją Parnasa objęli Minister Spraw Zagranicznych, Pan Radosław Sikorski oraz Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Pani profesor Barbara Kudrycka. W Komitecie Honorowym byli Ambasadorzy Izraela (uczestniczył w ceremonii otwarcia i w tzw. Gala Dinner) i Ukrainy w Polsce oraz Ambasadorzy Polski w Izraelu i na Ukrainie, a także Prezes Polskiej Akademii Nauk, profesor Michał Kleiber, Sekretarz Generalny Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, profesor Israel Pecht, Dyrektor Departamentu Badań Podstawowych i Inżynieryjnych UNESCO, profesor Maciej J. Nałęcz, Prezydent Miasta Stołecznego Warszawy, Pani Hanna Gronkiewicz-Waltz oraz byli Prezesi PTBioch, profesor Lech Wojtczak i profesor Jolanta Barańska. W Konferencji wzięło udział dwoje laureatów Nagrody Nobla, profesorowie Ada Yonath (Fot. 1) i Aaron Ciechanover (Fot. 2) oraz światowej sławy amerykański krystalograf polskiego pochodzenia dr Aleksander Włodawer



Fot. 1. Prof. Ada Yonath.



Fot. 2. Prof. Aaron Ciechanover.

(Fot. 3), jak również wybitny szwajcarski uczyony, pochodzący również z Polski, profesor Witold Filipowicz (Fot. 4). Swoją obecnością zaszczytili uczestników i organizatorów także profesorowie Israel Pecht i Maciej J. Nałęcz, którzy przedstawili sylwetki Noblistów.



Fot. 3. Dr Aleksander Włodawer.



Fot. 4. Prof. Witold Filipowicz.



Fot. 5. Prof. Israel Pecht.

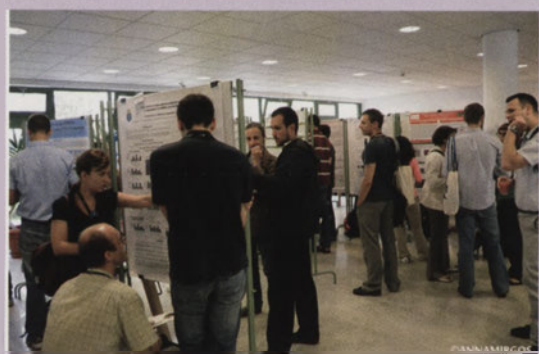


Fot. 6. Prof. Maciej J. Nałęcz.

W Konferencji uczestniczyła również rodzina prof. Parnasa, jego synowa Barbara, prawnuk Tomasz wraz z synem Mateuszem, który od jesieni br. roku studiuje biochemię w Royal College w Londynie.

W Komitecie Naukowym zasiadało po trzech przedstawicieli każdego z towarzystw; Polskie Towarzystwo

wała następujące zagadnienia: regulacja potranskrypcyjna, bioinformatyka w ekspresji genów, kierunkowanie komórek, ekspresja genów a choroby mózgu, struktura i funkcja białek oraz przekazywanie sygnałów poprzez jony wapnia.



Fot. 7. Sesja plakatowa.

Biochemiczne reprezentowali wybitni badacze – profesorowie Leszek Kaczmarek, Jacek Kuźnicki i Maciej Żylicz. Konferencja obejmo-

wała następujące zagadnienia: regulacja potranskrypcyjna, bioinformatyka w ekspresji genów, kierunkowanie komórek, ekspresja genów a choroby mózgu, struktura i funkcja białek oraz przekazywanie sygnałów poprzez jony wapnia.

W konferencji uczestniczyło ok. 270 osób, przede wszystkim z Polski, Ukrainy i Izraela, którzy wysłuchali trzech wykładów plenarnych, wygłoszonych przez dwoje Noblistów, prof. Adę Yonath i prof. Aarona Ciechanovera oraz dr Aleksandra Włodawera oraz 27 wykładów w dziewięciu sesjach tematycznych, wygłoszonych przez wybitnych specjalistów z całego świata. Warte podkreślenia były również wystąpienia 18 młodych badaczy, którzy zostali wybrani przez przewodniczących poszczególnych sesji (po dwie osoby w każdej sesji) na podstawie nadesłanych streszczeń. Zebrani obejrzeli 134 postery przedstawione w trzech sesjach (Fot. 7).



Fot. 8. Prof. Andrzej Dżugaj i prof. Maria J. Rędowicz wręczają nagrodę mgr Kavitie Ramji.

Nagrodę za najlepszy poster, przyznaną w głosowaniu tajnym, w którym mogli wziąć udział wszyscy uczestnicy otrzymała mgr Kavitia Ramji z Instytutu Nenckiego z Pracowni Regulacji Transkrypcji kierowanej przez prof. Bożenę Kamińską-Kaczmarek. Organizatorzy przyznali 50 stypendiów dla młodych badaczy z Polski, Ukrainy i Izraela, w tym 16 dla polskiej młodzieży.

Instytut Nenckiego, kierowany przez prof. Adama Szewczyka, był główną Instytucją wspierającą Konferencję (w ramach projektu Regpot-Bioimagine).

Współorganizatorami Konferencji były również Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej oraz Uniwersytet Wrocławski. Poza Instytutem Nenckiego znaczący wkład w finansowanie Konferencji mieli: FEBS (w ramach 3+ Meeting Programme), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego,



Fot. 9. Uczestnicy wybierają plakietki upamięniające ich pobyt w Warszawie.

Instytut Biochemii i Biofizyki, a także firmy biotechnologiczne, przede wszystkim Sigma-Aldrich Polska oraz Alab, Bio-Rad Polska, Carl Zeiss Polska, Comesa Polska, Eurx, John Wiley & Sons, Labart, Lab-Jot, Perkin Elmer, Sarstedt i TK Biotech.

**prof. Maria Jolanta Rędowicz**  
**prof. Andrzej Dżugaj**

# 52<sup>ND</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOSCIENCE OF LIPIDS, ICBL EXPANDING THE HORIZONS OF LIPIDOMICS WARSZAWA, 30 SIERPANIA-3 WRZEŚNIA 2011

W dniach 30 sierpnia-3 września 2011 roku odbyła się w Warszawie 52. Międzynarodowa Konferencja Biologii Lipidów (52<sup>nd</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids, ICBL). Konferencja ICBL, która jest organizowana rokrocznie od 52 lat, po raz pierwszy odbyła się w Polsce. Powierzenie Polsce zorganizowania



Fot. 1. Laureatki nagród za najlepsze wystąpienia ustne: Alessandra Ferrari i Małgorzata Gutkowska wraz z organizatorami Konferencji. Od lewej: George Carman, Ewa Świeżewska, Agnieszka Dobrzyń, Alessandra Ferrari, Małgorzata Gutkowska, Guenther Daum.

Konferencji było wyrazem uznania przez Międzynarodowy Komitet Założycielski ICBL dla wkładu naszego kraju w badania w tej dziedzinie. Głównymi organizatorami Konferencji były Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie oraz Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Patronat nad 52<sup>nd</sup> ICBL objęli Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Pani profesor Barbara Kudrycka oraz Polskie Towarzystwo Biochemiczne. W skład Komitetu Naukowego, kierowanego przez prof. Ewę Świeżewską i prof. Agnieszkę Dobrzyń, weszli profesorem Laszlo Vigh, Ivan Hapala, Jan Kopecky, Joanna Bandorowicz-Pikuła, Barbara Tudek, Wirginia Janiszowska. Honorowymi członkami Komitetu Organizacyjnego byli prof. Jolanta Barańska i prof. Tadeusz Chojnacki.

Miejscem obrad Konferencji była Stara Biblioteka Uniwersytetu War-

szawskiego. W konferencji wzięło udział 160 naukowców z 27 krajów. Najliczniejsza delegacja zagraniczna przyjechała z Japonii (30 uczestników), polskie środowisko naukowe reprezentowało 31 osób. Podczas konferencji przedyskutowano najnowsze badania dotyczące patogeny zaburzeń metabolicznych, roli lipidów w regulacji ekspresji genów, lipidów jako związków sygnałowych w komunikacji międzykomórkowej, lipidów izoprenoidowych, mechanizmów regulujących oddziaływanie białek i lipidów, mikrodomen błonowych oraz modyfikacji białek przez lipidy. Zaproszonymi wykładowcami byli światowej sławy specjaliści w w/w dziedzinach, m. in. James Ntambi (USA), Christian Wolfrum (Szwajcaria), Elina Ikonen (Finlandia), Gustav Dallner (Szwecja), Volker Gerke (Niemcy), Kirill Alexandrov (Australia), Po Huang Liang (Chiny). Wygłoszono 24 wykłady plenarne i 24 wykłady sesyjne zgrupowane w siedmiu sesjach tematycznych oraz zaprezentowano ponad 80 posterów. Wykład van Deenena wygłosił prof. Peter Quinn z King's Collage, Londyn. Warte podkreślenia były również wystąpienia 14 młodych badaczy, wybranych przez przewodniczących poszczególnych sesji na podstawie nadesłanych streszczeń.

Podczas konferencji ICBL przyznano 2 nagrody za najlepszą prezentację plakatową (ufundowane przez *Biochimica et Biophysica Acta/Elsevier*). Laureatami zostali Takanori Matsuda i współpracownicy (Kyushu University) oraz Riikka Hynynen i współpracownicy (Université de Nice). Nagrody za najlepsze wystąpienia ustne młodych naukowców otrzymały Alessandra Ferrari (Università degli Studi di Milano – nagroda *Journal of Biological Chemistry/Herbert Tabor Young Investigator Award*) oraz Małgorzata Gutkowska (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa –

nagroda *Progress in Lipid Research/Elsevier*) (Fot. 1). Streszczenia wykładów i plakatów (*Book of abstracts*) zostały opublikowane jako numer specjalny czasopisma *Chemistry and Physics of Lipids*, vol, 164, Suppl., Aug 2011.

Konferencja 52<sup>nd</sup> ICBL zakończyła się sukcesem, organizatorzy otrzymali podziękowania i gratulacje od ICBL Steering Committee i uczestników. Uznanie zyskał zarówno różnorodny program naukowy, dobór znakomych wykładowców jak i sprawna oprawa organizacyjna konferencji.

**prof. Agnieszka Dobrzyń**  
**prof. Ewa Świeżewska**  
**Komitet Organizacyjny ICBL**

## 52. KONFERENCJA ICBL – REFLEKSJA OSOBISTA

W ledwo kilkudziesięcioletniej historii nowoczesnej nauki zmieniającej kilkakrotnie swoją nazwę, od biochemii po nie przyswojony jeszcze naszemu językowi termin „biosciencje”, odbywanie się przez ponad 50 lat konferencji zawsze dotyczącej tematyki lipidów jest przykładem trwania pewnego oczekiwania, niespełnienia, a może tylko przywiązania do tradycji. W tematyce lipidów nie było spektakularnych przełomów prowadzących do genomiki i proteomiki, a raczej towarzyszenie badaniami nad lipidami rozwojowi w innych obszarach nauki. To towarzyszenie mogło w tych ponad 50. latach i liczbie 52. kolejnych konferencji wydawać się mniej ambitne lecz bez nich, bez poznania podstawowych faktów w „lipidologii” nie byłoby odkryć w innych obszarach (np. zdobycie danych o prostacyklinach, podstawowe informacje w innych dziedzinach fizjologii, rozwój metod analitycznych).

Ten obraz „lipidologii” jako wszechstronnej wiedzy biologicznej

dał o sobie znać w sposób bardzo wyraźny także w programie 52. konferencji organizowanej przez dwójkę polskich badaczy młodszego pokolenia prof. Ewę Świeżewską z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i prof. Agnieszkę Dobrzyń z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. W ich działaniach w budowaniu programu konferencji widać było zamiar zebrania najważniejszych współczesnych trendów bez niepotrzebnego preferowania innych mniej ważnych lokalnych tendencji. Spośród wielu dobrze dobranych przez organizatorki referatów szczególnie ważnym było wystąpienie „Lipidomics: making sense of the data lode” (Peter Quinn, Kings College London), w którym autor uhonorowany lau-

rem L. van Deenena przedstawił znaczenie wkładu „lipidologii” w postęp nauki. Bardzo ciekawe, nieopisane w streszczeniu wykładu, były nieoczekiwane obrazy dyfrakcji rentgenowskiej preparatów sfingomielin niejednorodnych pod względem składu acylogowego. Przykład, gdy w układzie modelowym niejednorodność prowadzi do uporządkowania struktury może mieć znaczenie także dla układów biologicznych. Duża grupa referatów i komunikatów dotyczyła lipidów izoprenowych (m.in. G. Dallnera i M. Rohmera). Zawierające w tytule słowo cholesterol lub izoprenoidy dotyczyły aparatu genetycznego ich biosyntezy. Tu trzeba wyróżnić prace P.-H. Lianga (Academia Sinica, Taipei) precyzyjnie opisujące kinetykę biosyntezy

oraz odrębny problem farmakologiczny statyn w streszczeniu referatu M. Banacha (Uniwersytet Medyczny, Łódź) i referacie autora z Hyderabad (A. Chattopadhyay). Zainteresowanie wzbudził referat J.-M. Ruyschaerta (Universite Libre de Bruxelles) o kationowych lipidach, także w związku z poprzednimi referatami J.-M. Ruyschaerta na poprzedniej konferencji ICBL w Ratyźbonie i kilkoma komunikatami o kationowych izoprenoidach przedstawianymi na obecnej ICBL przez grupę polską. Osobne sesje „Lipid modifications of proteins” i „Lipid-protein interactions” wyrażały nowe trendy w lipidologii.

**prof. Tadeusz Chojnacki**  
**Komitet Organizacyjny ICBL**

## WIADOMOŚCI KRAJOWE

### 6<sup>th</sup> European Meeting for Vascular Biology & Medicine odbywał się

w dniach 21-24 września 2011 r. w Krakowie i stanowił kontynuację cyklu spotkań w ramach European Vascular Biology Organization (EVBO powstała w 2006). Obrady toczyły się w Centrum Kongresowym Collegium Medicum UJ. Było to jedno z najważniejszych wydarzeń związanych z biologią naczyniową w naszym kraju w 2011 r. Znaczący udział w organizacji konferencji przypadł pracownikom Zakładu Biotechnologii Medycznej WBBiB Uniwersytetu Jagiellońskiego a także członkom Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. Organizatorem tegorocznej konferencji obok EVBO było Polskie Towarzystwo Biologii Komórki, a komitet organizacyjny tworzyli badacze z Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (Fot. 1) (prof. Józef Dulak, przewodniczący komitetu organizacyjnego, członek zarządu EVBO, prof. Alicja Józkowicz, współprzewodnicząca komitetu organizacyjnego, prezes



Fot. 1. Prof. Józef Dulak i prof. Alicja Józkowicz.

Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki i dr Agnieszka Łoboda) oraz z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (prof. Tomasz Guzik i prof. Maciej Małecki). Wykład otwierający konferencję wygłosił Pan profesor **Andrzej Szczeklik** z II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ (Fot. 2). Podczas konferencji referaty przedstawiło także kilkudziesięciu innych wybitnych naukowców z Europy, USA, Japonii oraz Australii m.in. prof. Kari Alitalo (Finlandia), prof. Peter Carmeliet (Belgia), prof. John P. Cooke (USA), prof. Elisabetta Dejana (Włochy), prof. Ingrid Fleming (Niemcy, obecna prezydent EVBO), prof. Andrew Newby (Wielka Brytania, poprzedni prezydent EVBO, Fot. 3) i prof. Alain Tedgui (Francja). W kongresie wzięło udział 313 osób z 23 krajów (Argentyny, Australii, Austrii, Belgii, Brazylii, Czech, Finlan-

dii, Francji, Grecji, Hiszpanii, Holandii, Japonii, Korei, Niemiec, Polski, Portugalii, Rosji, Słowacji, Szwecji, Szwajcarii, USA, Wielkiej Brytanii, Włoch), co jest sukcesem na tle poprzednich spotkań EVBO, m. in. w Marsylii w roku 2009 czy Bristolu w roku 2007. Podczas konferencji wyróżniono, za dotychczasowe osiągnięcia naukowe, kilkoro młodych badaczy z różnych krajów, w tym także z Polski, a wśród nich znaleźli się m. in.: doktoranci Zakładu Biotechnologii Medycznej WBBiB Uniwersytetu Jagiellońskiego **Urszula Florczyk** (wyróżnienie European Society of Cardiology za prezentację ustną pt.: *Nrf2 deficiency diminishes angiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro but improves neovascularization under ischemic conditions in vivo*) oraz **Krzysztof Szade**



Fot. 2. Wykład prof. Andrzeja Szczeklika podczas 6th EMVBM.

(nagroda za prezentację posteru zatytułowanego: *A novel spheroid-plug model to study tumor angiogenesis and development*). Patronat nad kongresem objęli: Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. Karol Musioł; Prezes Polskiej Akademii Umiejętności, prof. Andrzej Białas; Prezydent Miasta Krakowa, prof. Jacek Majchrowski; Wojewoda Małopolski, Stanisław Kracik oraz Marszałek Województwa Małopolskiego, Marek Sowa. Więcej informacji nt. konferencji znajduje się na stronie internetowej: <http://www.emvbm2011.org/en>. (wg info p. Joanny Uchto)

**Udział Polski w 7 Programie Ramowym (7PR).** W październiku b.r. podczas spotkania zorganizowanego przez Przedstawicielstwo Komisji Europejskiej w Polsce oraz Krajowy Punkt Kontaktowy Programów Badawczych Unii Europejskiej (KPK) podsumowano dotychczasowy udział Polski w 7PR. Program 7PR jest programem siedmioletnim, a budżet jego wynosi blisko 54

mld euro. Program umożliwia tworzenie i finansowanie badań naukowych na europejskim poziomie w okresie od 2007 do 2013 roku. Do tej pory w ramach 7PR zamknięto 274 konkursy. Polacy koordynują pracę w 127 projektach 7PR. **Finansowanie w kwocie przekraczającej 210 mln euro uzyskało ponad 1100 polskich zespołów.** Pod względem liczby dofinansowanych projektów, Polska zajmuje 12 miejsce w Europie. W ocenie koordynatora KPK polscy naukowcy mogą uzyskiwać większe dofinansowanie, jeśli lepiej przygotowywać będą wnioski i więcej będą się udzielać na arenie międzynarodowej. Wnioski są generowane głównie przez polskich naukowców, a nie przez udział dużych przedsiębiorstw, bo te nie prowadzą wła-

nych badań, i nie inwestują z rozmachem w technologie, i nie wdrażają projektów innowacyjnych. A 7 Program Ramowy jest instrumentem do realizacji celu jakim jest przekształcenie gospodarki w konkurencyjną i dynamiczną, gwarantującą większą spójność społeczną, przez tworzenie licznych i lepszych miejsc pracy. Unia Europejska planuje po zakończeniu 7PR kolejny Program, Horyzont 2020, przewidziany na lata 2014-2020. Program ten będzie się skupiał przede wszystkim na badaniach dotyczących wielkich wyzwań społecznych, podnoszeniu konkurencyjności europejskich firm i jednostek badawczych, jak również na badaniach pionierskich czy tworzeniu infrastruktury badawczej. Program Horyzont 2020 przyjęty ma być w 2013 roku; jego planowany budżet wyniesie 80 mld euro. (wg witryny Nauka w Polsce)

**Granty FNP.** W trzeciej edycji 2011 roku programu **Pomost** (granty dla rodziców ułatwiające powrót do pracy naukowej oraz wspierające kobiety w ciąży pracujące naukowo) w dziedzinie bio-info-techno granty



Fot. 3. Od prawej prof. Józef Dulak i prof. Andrew Newby, pierwsza od lewej prof. Sarah Jane George.

otrzymały Panie: dr Anna Bodzonska (biochemia) z AGH w Krakowie; dr Joanna Dzwonek (neurobiologia) z UAM; dr Agata Głuszyńska (chemia organiczna) z UAM; dr Maja Grabacka (biologia komórki) z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie; dr Anna Kurzyńska-Kokornak (biochemia) z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu; dr Dorota Matuszewska (chemia fizyczna) z Uniwersytetu Warszawskiego; dr Katarzyna Samson (chemia fizyczna) z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera; dr Agnieszka Stolarczyk (chemia fizyczna) z Politechniki Śląskiej w Gliwicach; dr Sylwia Studzińska

(chemia analityczna) z UMK w Toruniu; dr Marta Szajnik-Szczepańska (ginekologia) z UM w Poznaniu; dr Ewelina Szymańska (biologia molekularna) z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie; dr Aleksandra Walczyńska (biologia ewolucyjna) z UJ; dr Monika Wituśki-Perkowska (onkologia) z UM w Łodzi. Granty przyznano w kwocie od 221 tys. do 530 tys. na realizację projektów przedstawionych przez laureatki.

**FNP przedłużyła** dwuletnie subsydlum w programie **POWROTY/HOMING** laureatom z 2009 roku. W myśl regulaminu tego programu laureaci dwuletnich subsydiów mogą ubiegać się o przedłużenie subsydlum na trzeci rok. Przedłużenia przyznawane są w drodze konkursu. Można się o nie starać w drugim roku realizacji projektu. Laureatami konkursu są: dr Michał Chmielewski (Wydział Chemii UW) na badania w Strasburgu; dr Łukasz Cywiński (Instytut Fizyki PAN) na realizację badań w University of Maryland at College Park, USA; dr Piotr Faliszewski (AGH) na kontynuację badań w University of Rochester, Department of Computer Science, USA; dr Łukasz Gruszczyński (Instytut Nauk Prawnych PAN) na badania w European University Institute in Florence, Włochy; dr Bartosz Karaszewski (GUM) na prolongatę badań w Division of Clinical Neurosciences, University of Edinburgh, Wielka Brytania; dr Zofia Madeja (UP w Poznaniu) na badania w Developmental Genetics and Imprinting, The Babraham Institute, Cambridge; dr Agnieszka Słowikowska (Wydział Astronomii, Uniwersytet Zielonogórski) na dalsze badania w Foundation for Research and Technology - Hellas, Heraklion, Grecja; dr Renata Solarska (Wydział Chemii UW) na badania w EMPA, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, Dübendorf, Szwajcaria; dr Przemysław Wachulak (WAT) na kontynuację badań w Colorado State University; dr Paweł Wiczling (UMG) na badania w Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, State University of New York at Buffalo, USA.

**Dwudzieste urodziny Fundacji Nauki Polskiej.** W przedostatnią sobotę września b.r Fundacja wraz z przyjaciółmi i współpracownikami świętowała swoje 20. urodziny. A było to we wnętrzach Arkad Kubickiego Zamku Królewskiego w Warszawie. Na spotkanie licznie przybyli przede wszystkim laureaci

Fundacji, wspierani przez FNP w różnych formach w minionych dwudziestu latach. **Prof. Maciej Żylicz** (Fot. 4), prezes FNP dziękował w swoim wystąpieniu przede wszystkim im, laureatom, mówiąc: *Dzięki*

*Waszej pracy i osiągnięciom nasza dewiza „wspierać najlepszych, aby mogli stać się jeszcze lepsi” jest niezmienna i aktualna. (...)*

Laureat Nagrody Nobla Sir Paul Nurse powiedział: *„Największe osiągnięcia w nauce powstają, gdy uczonemu daje się wolność i zaufanie, aby mógł niezależnie realizować swoją wizję i plany”.* Właśnie tak nasza Fundacja stara się działać. W uroczystości

wzięli udział przedstawiciele władz państwowych i naukowych, instytucji publicznych oraz mediów. **Prof. Andrzej Członkowski**, przewodniczący Rady FNP podkreślał rolę codziennej współpracy pomiędzy Radą, Zarządem i pracownikami Fundacji, która w efekcie tworzy wizerunek odbierany przez środowisko uczonych, dla których Fundacja działa. Goście uroczystości obejrzeli dwa filmy przybliżające początki i kolejne etapy rozwoju Fundacji oraz efekty wsparcia udzielonego przez nią w ciągu dwudziestu lat jej beneficjentom i laureatom. Jubileusz Fundacji był okazją do wręczenia Honorowych Odznaczeń FNP przyznawanych od 2007 r. osobom, które

w szczególny sposób przyczyniły się do powstania i rozwoju FNP, a także do budowania jej dobrego imienia i wizerunku. Do grona laureatów tego wyróżnienia dołączyli: **dr Jan K. Frąckowiak**, prezes FNP w latach 1991-1992 (nieobecny na uroczystości) oraz **red. Krzysztof Michalski**, dziennikarz naukowy i znany popularyzator nauki. Gratulacje i życzenia dla Fundacji w imieniu Prezydenta RP przekazał **Maciej Klimczak**, podsekretarz stanu w Kancelarii Prezydenta oraz **prof. Maria Orłowska**, sekretarz stanu w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Przekazała Ona **prof. Żyliczowi** dyplom wzorowany na

pierwszej Nagrodzie Nobla dla **Marii Skłodowskiej-Curie** jako wyraz szczególnego uznania dla FNP i wyraz nadziei na polskiego naukowego Nobla w niedalekiej przyszłość. **Dr Wilhelm Krull**, sekretarz generalny Fundacji Volkswagena i **prof. Pavel Exner**, wiceprezydent European Research Council, przekazali od siebie słowa gratulacji i życzenia okolicznościowe. O muzyczną oprawę urodzin zadbała **Warszawska Orkiestra Smyczkowa im. Zenona Brzowskiego** pod dyrekcją profesora **Andrzeja Gębskiego**. (wg witryny FNP)

**Odtworzenie tura.** Zwierzę, od średniowiecza symbol polskich lasów, miałyby być odtworzone za pomocą DNA znajdującego się w muzealnych szczątkach turów. **Polscy naukowcy z Katedry Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu (prof. Ryszard Słomski, Fot. 5) oraz z Zakładu Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Jastrzębcu (prof. Jacek A. Modliński), skupieni w Polskiej Fundacji Odtworzenia Tura (PFOT) chcą się podjąć próby przywrócenia tura**

przyrodzie. Inicjatorem i koordynatorem zmierzających do tego badań jest **Polska Fundacja Odtworzenia Tura (PFOT)**, utworzona 13 października 2006 roku. Podczas inauguracji działalności PFOT odsłonięto tablicę poświęconą turowi w **Warszawskim Ogrodzie Zoologicznym**. Zadaniem Fundacji jest m. in. pozyskiwanie i gromadzenie potrzebnych funduszy, głównie od prywatnych sponsorów, a także ze środków unijnych. Projekt uzyskał poparcie Ministerstwa Ochrony Środowiska.

**Tur (*Bos primigenius*)** (Fot. 6) był jednym z największych zwierząt (masa ciała 800-1000 kg) zamieszkujących Europę. Dorosły samiec osiągał do 3 m długości i 2 m wysokości w kłębie. Należał do rzędu parzystokopytnych. Naukowcy uważają, że od tura udomowionego



Fot. 4. Prof. Maciej Żylicz dzieli jubileuszowy tort.



Fot. 5. Prof. Ryszard Słomski.



Fot. 6. Tur, ilustracja z książki Zygmunta Herbersteina (1556 r.).

w Azji 608 tysięcy lat temu, wywodzi się większość ras współczesnego bydła. Przodkowie tura pojawili się w epoce pliocenu (2 mln lat temu) w Indiach. Z czasem roślinożerne zwierzęta rozprzestrzeniły się na leśnych terenach Azji i Europy oraz na północy Afryki. Zamieszkiwały zwarte i położone w nizinach puszcze, zapewniające obfitą bazę pokarmową w postaci roślin jednoliściennych (wszelkiego rodzaju traw i turzyc). Samice turów, krowy cielili się corocznie po trwającej 9 miesięcy ciąży (tak jak krowa domowa), rodząc przeważnie jedno cielę. Proces wymierania turów rozpoczął się już w X wieku, ale później nastąpiło gwałtowne, skokowe zmniejszenie populacji tego zwierzęcia. Najwcześniej zwierzęta zniknęły z terenów Europy Zachodniej, we Francji w X wieku; w Niemczech na przełomie XI i XII wieku. W Polsce,

kraju, w którym tury utrzymały się najdłużej, w XIV wieku tury żyły już tylko na Mazowszu. Ostatecznie, w 1627 roku na terenie Puszczy Jaktorowskiej niedaleko Grodziska Mazowieckiego zginęła ostatnia krowa. (wg witryny Nauka w Polsce)

### Matryca termiczna dla niewidomych.

Matryca termiczna, zbudowana przez naukowców z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie umożliwiła „widzenie” przez niewidomych kształtów i barw. Twórcą matrycy jest prof. Andrzej Kos z Zespołu nano- i mikrosystemów AGH

(Fot. 7). Obraz rysowany przez edukatora zostaje przełożony na punkty termiczne umieszczone na matrycy. Punkty pod powierzchnią matrycy generują zróżnicowaną temperaturę, a jest to ważne dla zachowania funkcji czucia przez dotykającego. Dzięki kształtom o różnej temperaturze osoby niewidzące rozpoznają dłońmi, nie tylko opuszkami palców, ale bardziej nawet wierzchnią stroną dłoni, kształty, kolory i ruch. Matryca umożliwi też wyjaśnienie osobom niewidomym trudnych do wyobrażenia zjawisk np. przemieszczającej się fali. Matryca termiczna podobna jest do skrzynki wielkości kartki papieru i grubości 5-6 cm. Ma gładką powierzchnię, co odróżnia ją od klasycznych urządzeń do odczytywania alfabetu Braille’a. Urządzenie przygotowano przede wszystkim do celów dydaktycznych. Pewne możliwości matrycy dostępne są tylko dla osób, które wcześniej widziały. Osobie niewidomej od urodzenia trudno będzie wytłumaczyć kolor, ale ta, która potrafi go sobie przypomnieć, zidentyfikuje go również dzięki matrycy. Problemem jest stopień rozdzielczości, bo matryca ma mniej punktów niż ekran komputera. Matryca jest pionierskim opracowaniem, obecnie testowana przez osoby niewidome w Krakowie. (wg witryny Nauka w Polsce)



Fot. 7. Prof. Andrzej Kos.

**Monika Czapla, doktorantka Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego została laureatką Nagrody im. Marii Skłodowskiej-Curie, przyznanej przez III Europejski Kongres Kobiet.** Młoda badaczka nagrodzona została za badania nad białkami. Nagrodę i czek na kwotę 16,5 tys. zł wręczyła laureatce podczas ww. kongresu minister nauki i szkolnictwa wyższego prof. Barbara Kudrycka. Monika Czapla jest stypendystką Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w programie START; zajmuje się badaniem struktury i funkcji cytochromu bc1. Karolina

Adrianowicz doktorantka w Instytucie Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach i Jadwiga Sławińska z Uniwersytetu Łódzkiego z Wydziału Biofizyki i Informatyki Stosowanej dostały równorzędne wyróżnienia za prace naukowe. Wręczenie nagrody poprzedziła debata poświęcona Marii Skłodowskiej-Curie w związku z przypadającym w tym roku 100-leciem przyznania wybitnej uczzonej drugiej Nagrody Nobla oraz wystąpienie prof. Magdaleny Środy prezentujące ujęcie historyczne w odniesieniu do obecności kobiet w nauce łącznie z omówieniem ich obecnej sytuacji. (wg witryny Nauka w Polsce)

**Doktorantka Dominika Bijos otrzymała główną nagrodę w konkursie na popularyzowanie wiedzy i badań naukowych w szerokich kręgach społeczeństwa.** Konkurs towarzyszył konferencji stypendystów Programu Marie Curie, która odbyła się w Warszawie. Laureatka prowadzi swoje badania w Instytucie Urologii w Bristolu w Wielkiej Brytanii. Dominika Bi-

jos wymyśliła i narysowała krótki, zabawny komiks, który w prosty i przejrzysty sposób tłumaczy tzw. zespół nadwrażliwego pęcherza. Jest to schorzenie, na które cierpi ok. 10% ludzi. Praca Doktorantki pt. „to pee or not to pee” (siusiac albo nie siusiac) spotkała się niemal z jednomyślnym uznaniem jury, pod przewodnictwem prof. Magdaleny Fikus. Program Marie Curie, finansowany ze środków Unii Europejskiej, wspiera wybitnych naukowców z całego świata i zachęca ich, by prowadzili swoje badania i wiązali karierę naukową właśnie z Europą. Z programu, który w tym roku obchodzi 15-lecie istnienia, skorzystało już ponad 50 tys. wybitnych ludzi nauki. (wg witryny Nauka w Polsce)

**Michał Miśkiewicz, matematyk z Warszawy zdobył w Helsinkach 3. nagrodę w organizowanym przez Komisję Europejską 23. Konkursie Prac Młodych Naukowców UE (Fot. 8).** Laureat napisał pracę pod tytułem „Urok zbioru mi” na temat szczególnych własności pewnego zbioru punktów na płaszczyźnie. Michał

Miśkiewicz studiuje matematykę na Uniwersytecie Warszawskim, ale pracę, zgodnie z regulaminem konkursu, przygotował jeszcze w liceum, bo w rywalizacji biorą udział prace badawcze autorstwa osób, które nie podjęły jeszcze studiów. Laureat zdobył jedną z trzech trzecich nagród, o wartości 3,5 tys. euro. Organizatorem polskich eliminacji unijnego konkursu jest Krajowy Fundusz na Rzecz Dzieci (KFRD). Według

informacji KFRD, poza pracą laureata Polskę reprezentowały dwa projekty młodych biologów: Magdaleny Nowikiewicz, licealistki z Bydgoszczy, p.t. „Zawartość witaminy C w malinach (*Rubus idaeus* L.) odmiany Polana w zależności od sposobu, czasu i temperatury przechowywania oraz w ogórkach (*Cucumis datus* L.) odmiany Krak F1 w zależności od metod przechowywania i czasu przechowywania”; Norberta Wąsika, studenta medycyny z Żar, p.t.



Fot. 8. Plakat 23<sup>rd</sup> European Union Contest for Young Scientist, 23-28.09.2011 r., Helsinki.

„Wpływ temperatury na szybkość, długość i głośność śpiewu miecznika *Conocephalus fuscus*” (Fot. 9). W 23. Konkursie Prac Młodych Naukowców UE Polacy uczestniczyli po raz 17. Do tej pory aż 37 projektów polskich nagrodzono, a to sprawia, że Polska zajmuje trzecie miejsce, po Niemczech i Wielkiej Brytanii, wśród krajów najczęściej wyróżnianych, przy czym pamiętać należy, że Konkursy rozpoczęły się w roku 1989, a Polska zaczęła brać w nich udział dopiero sześć lat później.



Fot. 9. *Conocephalus fuscus*.

Dr Gracjan Maciejewski z Centrum Astronomii UMK otrzymał Nagrodę Młodych przyznaną przez Polskie Towarzystwo Astronomiczne (PTA). Wyróżnienie wręczono w Gdańsku podczas otwarcia XXXV Zjazdu PTA. Gracjan Maciejewski obronił w 2007 roku pracę doktorską pod tytułem „Fotometryczne przeglądy nieba. Poszukiwanie zmienności i astrofizyka gromad otwartych”. Zajmuje się poszukiwaniem planet poza układem słonecznych oraz badaniami gromad otwartych gwiazd i układów podwójnych gwiazd. Laureat pracuje w kilku projektach badawczych: Semi-Automatic Variability Search (SAVS), Open Cluster Survey (OCS), Young Exoplanet Transit Initiative (YETI). Był także członkiem zespołu, który odkrył planetę koło gwiazdy HD 17092. Z kolei w latach 2009-2010 odkrył dwie potencjalne planety pozasłoneczne w układach WASP-3 oraz WASP-10. Nagroda Młodych jest przyznawana co dwa lata przez Polskie Towarzystwo Astronomiczne za wybitny, indywidualny dorobek w dziedzinie astronomii uzyskany podczas całej działalności naukowej. Mogą ją otrzymać polscy astronomowie w wieku do 35 lat. Historia Nagrody Młodych sięga 1970 roku. Otrzymali ją m.in. Bohdan Paczyński (w 1970 roku) i Aleksander Wolszczan (w 1977 roku). W 1995 roku nagrodę otrzymał Andrzej Niedzielski, pro-

motor pracy doktorskiej tegorocznej laureata. (wg witryny Nauka w Polsce)

Porozumienie o współpracy na rzecz rozwoju onkologii w Polsce podpisał Warszawski Uniwersytet Medyczny z Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

we wrześniu bieżącego roku. Dokument podpisali Rektor prof. Marek Krawczyk i Kierownik Instytutu prof. Marian Reinfuss (Fot. 10). Obie placówki naukowe będą wspólnie zabiegać o lepszą jakość dydaktyki, współdziałać na polu naukowym i instytucjonalnym. Ze strony Centrum Onkologii umowa stała się pierwszym krokiem do tworzenia sieci onkologicznej.

Strony porozumienia rozszerzają współpracę w zakresie kształcenia przed- i podyplomowego obecnej i przyszłej kadry medycznej w dziedzinie onkologii. Będą wspólnie działały na rzecz podnoszenia jakości ochrony zdrowia oraz dostępności społeczeństwa do świadczeń medycznych na wysokim poziomie. Porozumienie obejmuje również współpracę na rzecz rozwoju nowych technologii i technik leczenia w onkologii oraz promocję zdrowia służącą obniżeniu zachorowalności na nowotwory złośliwe. Uniwersytet i Centrum w swoich działaniach będą dążyć do koncentracji i koordynacji wysiłków na rzecz osiągnięcia następujących celów w obszarze badań naukowych i prac badawczo rozwojowych: zapewnienia aktywnego, a także zwiększonego uczestnictwa Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w programach badawczych oraz działaniach zmierzających do utworzenia Europejskiej Przestrzeni Badaw-

czej; podniesienia konkurencyjności ośrodków badawczych; rozszerzenia i wzbogacenia oferty dotyczącej usług badawczych; zwiększenia udziału prac badawczo-rozwojowych powiązanych z potrzebami społeczeństwa i jednostek ochrony zdrowia; wprowadzenia i rozwoju nowoczesnych rozwiązań technologicznych oraz organizacyjnych; transferu nowoczesnych technologii i wiedzy na linię nauka – przemysł. (wg informacji w witrynie WUM)

**Komercjalizacja wyników.** Warszawski Uniwersytet Medyczny i spółka BTM Mazowsze we wrześniu b.r. zainicjowały wspólną realizację innowacyjnego projektu „HUMON”. Oprócz finansowania ze środków prywatnych firmy BTM Mazowsze,



Fot. 10. Od lewej prof. Marian Reinfuss i prof. Marek Krawczyk.

powstałe konsorcjum występuje do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju o dofinansowanie projektu w ramach programu INNOTECH. Celem projektu „HUMON”, realizowanego ze strony WUM

przez zespół prof. Jakuba Gołąba (Fot. 11) z Zakładu Immunologii Centrum Biostruktury, jest opracowanie i wdrożenie do praktyki nowatorskiej metody produkcji ludzkich przeciwciał do celów diagnostycznych i leczniczych w onkologii. Jest to pierwsza umowa dotycząca projektu B+R nastawionego na komercjalizację jego wyników. Pozytywne zakończenie projektu i wdrożenie do praktyki

wyników badań, może mieć istotne znaczenie w postępiach terapii nowotworów, a nadto Warszawski Uniwersytet Medyczny może mieć z tego poważne zyski. W spotkaniu ze strony Uczelni wraz z Prorektorem prof. Sławomirem Majewskim, uczestniczyła Kanclerz Małgorzata Kozłowska oraz prof. Jakub Gołąb



Fot. 11. Prof. Jakub Gołąb.



wraz z Zespołem, który będzie pracował przy Projekcie. Obecni byli przedstawiciele spółki BTM Mazowsze, Prezes Tomasz Roniker, dr Marcin Szumowski oraz ekspert Roland Kozłowski. (wg info w witrynie WUM)

**Stypendia naukowe dla profesorów tytularnych** Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wręczył we wrześniu b.r. Rektor Uczelni. Zgodnie z Zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 18 lipca 2011 r., stypendia naukowe mogą otrzymać profesorowie, którzy m. in. legitymują się wybitnymi osiągnięciami w pracy naukowej i są wszechstronnie zaangażowani w pracę na rzecz Uniwersytetu. Wśród wyróżnionych znaleźli się profesorowie: Anna Goździcka-Józefiak, Artur Jarmołowski i Tomasz Osiejuk z Wydziału Biologii i Ogrodu Botanicznego, Henryk Koroniak, Marek Kręglewski, Grzegorz Schroeder z Wydziału Chemii oraz Grzegorz Kamieniarz, Ryszard Tanaś i Tadeusz Michałowski Wydział Fizyki. (wg info z witryny UAM)

**Stypendia Województwa Mazowieckiego dla doktorantów.** W ramach I edycji projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego pt. *Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendia dla doktorantów* (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki Działanie 8.2 Transfer wiedzy Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007–2013), przyznano stypendia doktorantom m. in. w dziedzinie biologii, chemii, fizyki z Uczelni i jednostek PAN województwa Mazowieckiego: Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Zakład Biologii Molekularnej; Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie; Instytutu Chemii Organicznej PAN; Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Insty-

tut Badawczy, Radzików; Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN; Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW; Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW; Katedry Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW; Wydziału Biologii, Wydziału Chemii i Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego; Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego; Wydziału Nowych Technologii i Chemii WAT; Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Zakład Higieny i Zarządzania Jakością Żywności. Kwota przyznanego stypendium dla doktoranta wyniesie nie mniej niż 3020 zł miesięcznie, czyli łącznie 27 180 zł.

**Stypendia Miasta Poznania dla olimpijczyków** podejmujących studia w Poznaniu. W październiku 2011 r. w Urzędzie Miasta Poznania odbyła się uroczystość wręczenia Stypendiów Miasta Poznania dla laureatów i finalistów ogólnopolskich olimpiad przedmiotowych, którzy zdecydowali się podjąć naukę na uczelniach poznańskich. Po raz kolejny największym zainteresowaniem wśród Stypendystów cieszy się Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, na którym naukę podjęło 20 studentów. Korzystający z programu stypendyści to wybitnie zdolni



Fot. 12. Pani Elżbieta Penderecka.

i wartościowi młodzi ludzie, którzy w wielu przypadkach zdobyli więcej niż jeden tytuł w różnych olimpiadach. Olimpiady najliczniej reprezentowane w tej edycji to olimpiada literatury i języka polskiego, chemiczna, matematyczna oraz historyczna. O możliwość otrzymania stypendium w ramach programu „Akademicki i naukowy Poznań” aplikowało 58 osób z różnych zakątków Polski. Tegoroczni stypendyści pochodzą z jedenastu województw, przede wszystkim z województwa wielkopolskiego (12 osób) i kujawsko-pomorskiego (5),

ale studenci pochodzą także z odległych miejscowości; zasięg promocji studiowania w Poznaniu wykracza daleko poza granice Wielkopolski. Po zapoznaniu się z opinią Rady Zarządzającej Programu, której przewodniczy prof. dr hab. Andrzej Legocki z PAN, Prezydent Miasta przyznał stypendium wybranym 31 kandydatom. W gronie wyróżnionych studentów jest 24 laureatów oraz 7 finalistów olimpiad. Miasto oferuje wybranym studentom stypendia w wysokości 1600 zł dla laureatów oraz 1200 zł dla finalistów olimpiad. Stypendia będą wypłacane przez jeden rok akademicki, od października do czerwca. Więcej informacji na stronie [www.poznan.pl/studia](http://www.poznan.pl/studia). (wg info w witrynie UAM)

**Odnakę Zasłużony dla Uniwersytetu Jagiellońskiego** otrzymała w roku 2011 Pani Elżbieta Penderecka (Fot. 12). Odnakę tę przyznaje Senat na wniosek Rektora osobom wyjątkowo zasłużonym dla Uniwersytetu Jagiellońskiego. Odnaka jest wręczana w czasie uroczystości związanych ze świętem Uniwersytetu 12 maja lub w czasie inauguracji roku akademickiego. Nadanie Odnaki wpisuje się do Księgi Zasłużonych. Pani Elżbieta Penderecka jest działaczką kultury, członkinią wielu międzynarodowych fundacji muzycznych, była w latach 1990–1995 prezesem pierwszej prywatnej agencji Heritage Promotion of Music and Art. Przez rok studiowała fizykę na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Za działalność charytatywną od 1995 roku na rzecz Fundacji Profilaktyki i Leczenia Chorób Krwi im. Profesora Juliana Aleksandrowicza, wspomagającej rozwój Kliniki Hematologii Collegium Medicum UJ, otrzymała w grudniu 2000 roku Medal im. profesora Juliana Aleksandrowicza. Prywatnie, od 1965 roku, jest żoną kompozytora Krzysztofa Pendereckiego. (wg witryny UJ)


**pod redakcją Teresy Wesołowskiej**

# Józef Heller – współtwórca polskiej biochemii w latach 1942–1973

## Z historii biochemii

Zofia Zarębska 

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

 Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. A. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; e-mail: zozar@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 7 czerwca 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 8 czerwca 2011 r.

**Podziękowanie:** Autorka składa serdeczne podziękowania profesorowi Kazimierzowi Lechowi Wierchowskiemu oraz profesor Marii Monice Jeżewskiej za wspomnienia o Profesorze oraz za ich cenne sugestie, uwzględnione w tekście.

### STRESZCZENIE

Artykuł przedstawia sylwetkę Józefa Hellera, poczynając od roku 1921, gdy był asystentem w grupie Jakuba Parnasa we Lwowie, która zajmowała się wykrywaniem źródeł energii w procesach biochemicznych, a w szczególności procesem fosforolizy glikogenu. Opisane są mniej znane fakty Jego biografii: służba wojskowa w Legionach Piłsudskiego w trakcie formowania się Państwa Polskiego w latach 1917–1920; następnie uczestnictwo w tajnych kompletach medycyny w czasie okupacji Polski przez Niemców. Po wojnie, Profesor wykładał fizjologię dla studentów medycyny we Wrocławiu i w Warszawie. W 1954 zaczął tworzyć Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk składający się z rozproszonych laboratoriów biochemicznych w Warszawie; Instytut ten nadal prowadzi współczesne badania w dziedzinie biochemii i biofizyki molekularnej. Profesor zainicjował wydawanie trzech ważnych czasopism biochemicznych w Polsce, w tym *Postępów Biochemii* (1954). Również pod Jego kierownictwem wydano pierwszy Polski Słownik Medyczny (1981). Artykuł podsumowuje udział profesora Hellera w wielu przedsięwzięciach życia akademickiego, które są ciągle doceniane przez następne pokolenia polskich biochemików.

### WPROWADZENIE

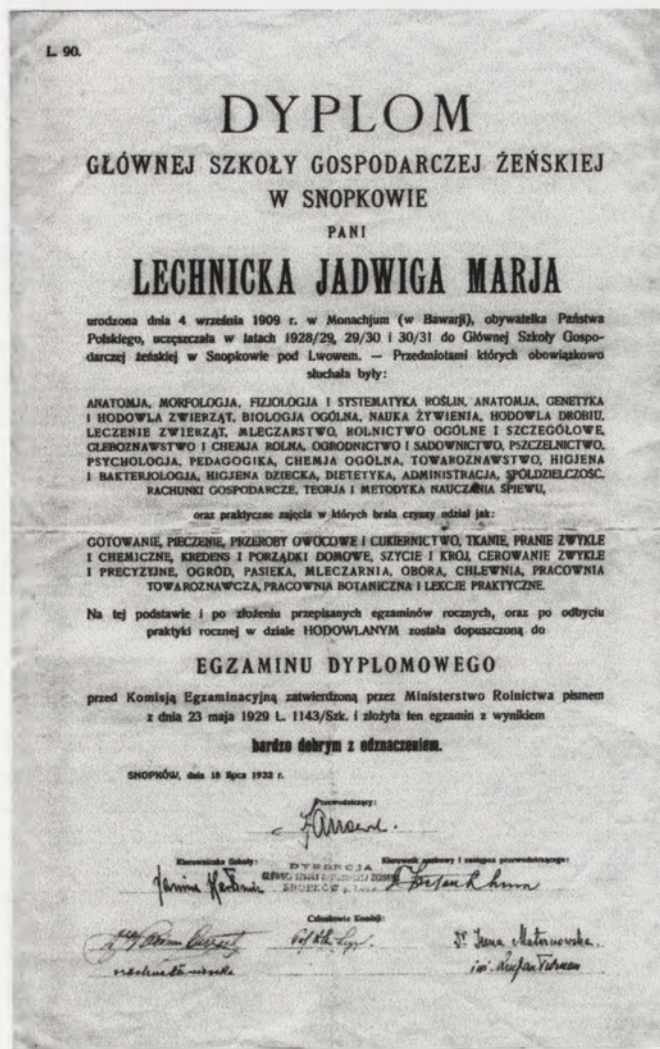
Minęło prawie 30 lat od śmierci Profesora Hellera, a 40 lat od zakończenia przezeń działalności naukowej i organizacyjnej, ten dystans czasu pozwala pełniej docenić Jego działalność. Z tej okazji przejrzałam archiwum Profesora, pieczołowicie zbierane przez Jego długoletnią sekretarkę Panią Małgorzatę Wilczewską i z wypełnianych przez Niego ankiet, protokołów posiedzeń, listów, konspektów wykładów, odbitek publikacji, ukazało się jak różnorodna była Jego aktywność. Walka w Legionach i w Wojsku Polskim o niepodległość kraju, studia i działalność naukowa w okresie lwowskim w latach 1922–1939, tajne nauczanie w Warszawie w czasie wojny i następnie odbudowa polskiej biochemii po wojnie w niepodległej Polsce. Wkrótce po śmierci Profesora opublikowano w kilku czasopismach Jego życiorysy [1-4]. Przedstawiały one najważniejsze fakty z Jego życia i działalności, a przejrzenie archiwum pozwoliło na ich poszerzenie i wzbogacenie. W niniejszym artykule na wstępie przedstawiam wybrane cytaty z autobiograficznych życiorysów Profesora, a następnie wiele poczyznań z Jego działalności, mających po dziś dzień wielkie znaczenie dla środowiska naukowego, a ponadto nigdzie dotąd nie opisane zdarzenia.

### AUTOBIOGRAFIA

Archiwum Profesora zawiera trzy życiorysy składane przy zatrudnieniu w 1950, 1954 i 1966 roku oraz przed odejściem na emeryturę w 1973. Przytoczone fragmenty uzmysławiają, które czyny w swoim życiu Profesor uznał za ważne (zachowuję ówczesną pisownię).

#### ROK 1950

„Urodziłem się dnia 3 stycznia 1896 roku we Lwowie. Egzamin dojrzałości złożyłem w czerwcu 1914 w VI Gimnazjum we Lwowie. W sierpniu 1914 wstąpiłem ochotniczo do Legionów, skąd poszedłem do Polskiego Wojska. Zdemobilizowany w kwietniu 1921 w stopniu kapitana wzięłem udział w III Powstaniu Górnos Śląskim, poczem kontynuowałem zaczęte podczas służby wojskowej studia medyczne i w dniu 11 listopada 1922 uzyskałem stopień Doktora Wszech Nauk Lekarskich we Lwowie. W latach 1923–1925 uzupełniałem studia na Wydziale Przyrodniczym we Lwowie, grupa: chemia. Jako asystent pracowałem w Instytucie Chemii Lekarskiej Uniwersytetu im. Jana Kazimierza od 1.X.1921 do 30.IX.1928 i w Instytucie Higieny UJK od 1.X.1930 do 30.IX.1935, łącznie 12 lat. W tym okresie w ciągu 6 lat wykładałem Chemię Ogólną i Fizjologiczną w Głównej Szkole Gospodarczej Żeńskiej w Snopkowie w Małopolsce (Ryc. 1).



Rycina 1. Dyplom Lechnickiej Jadwigi Marii z 1932 roku. Kopia dyplomu z książki Antoniego Kroha „Starorzeczka”, Iskry, Warszawa, 2010, str. 140; zwraca uwagę lista wykładów obowiązujących w tej Szkole Gospodarczej w latach 1929–1931.

W dniu 1.VI.1926 rozpocząłem organizację Pracowni Analityczno-Lekarskiej Kasy Chorych we Lwowie (później Zakłady Analityczne Ubezpieczalni Społecznej) i kierowałem tą placówką do 30.VI.1935 r. 1.III.1936 powierzono mi organizację Filii Państwowego Zakładu Higieny w Krakowie, której Kierownikiem byłem do wybuchu wojny. W roku 1937 habilitowałem się z biochemii w Uniwersytecie Wileńskim (na podstawie rozprawy habilitacyjnej pt. *Badania nad przeobrażeniem owadów*).

Kampanię wrześniową odbyłem jako major-lekarz w X Kadrze Sanitarnej. Po rozbrojeniu wróciłem do Lwowa, gdzie pracowałem jako analityk w I Poliklinice. 1 stycznia 1940 powołany na katedrę biochemii Wydziału Przyrodniczego we Lwowie wykładałem przez dwa lata akademickie. W maju 1941 zostałem powołany uchwałą Rady Wydziału na Katedrę Chemii Nieorganicznej Instytutu Medycznego we Lwowie.

Po wkroczeniu Niemców przenieśliśmy się do Warszawy i tu pod nazwiskiem Kazimierza Mokłowskiego wykładałem na kompletach tajnego Uniwersytetu Warszawskiego

Chemię Fizjologiczną i Fizjologię do wybuchu powstania. Wywieziony przez Niemców do obozu pracy w Hanowerze pracowałem jako pomocnik maszynisty kolejowego do uwolnienia przez wojska amerykańskie w dniu 10.IV.1945. Następnie pełniłem funkcje lekarza obozu, zaś w sierpniu 1945 powołany na komendanta Polskiego Szpitala Wojskowego w Bomlitz, pozostawałem na tym stanowisku do repatriacji w dniu 1.II.1946.

Z dniem 1.IV.1946 zostałem powołany na Katedrę Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu we Wrocławiu. Równocześnie podjąłem się prowadzenia wstępnych prac nad organizacją Filii Państwowego Zakładu Higieny w Szczecinie, dokąd dojeżdżałem w miarę potrzeby. W dniu 15.IX.1946 objąłem zastępstwo kierownika Filii Wrocławskiego PZH, zajmując się równocześnie etat kierownika Oddziału Wodnego tej Filii. Zrezygnowałem w 1947, nie mogąc pogodzić tych obowiązków z profesurą. W dniu 24.III.1948 mianowany profesorem zwyczajnym, od roku 1949 pełnię dodatkowo obowiązki profesora – konsultanta naukowego w Akademii Lekarskiej w Rokitnicy.”

ROK 1954

„Z dniem 1.X.1951 objąłem Katedrę Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie i kierownictwo Działu Biochemii w PZH w Warszawie. Z dniem 1.V.1954 przeszedłem z PZH do nowopowstałego Zakładu Biochemii PAN na stanowisko Kierownika. Jestem członkiem-korespondentem Polskiej Akademii Nauk i doktorem Nauk Medycznych. Byłem delegowany na Kongresy Naukowe: do Anglii w 1947 i 1949 roku, do Francji w 1952. W 1953 odwiedziłem NRD w drodze wymiany kulturalnej, zaś w maju 1954 byłem z delegacją PAN w Budapeszcie. W 1951 roku otrzymałem Państwową Nagrodę Naukową II stopnia. Posiadam następujące odznaczenia (wymieniono tylko niektóre spośród 10 odznaczeń, ZZ): Krzyż Niepodległości, Krzyż Walecznych i Złoty Krzyż Zasługi, Medal Zwycięstwa i Wolności.”

ROK 1966

„W jesieni 1951 powołano mnie w Warszawie do kierowania Katedrą Chemii Fizjologicznej w Uniwersytecie Medycznym, a równocześnie kierownictwo partii zobowiązało mnie do zorganizowania Badawczego Centrum Biochemii. Zacząłem od organizacji Zakładu Biochemii w Państwowym Instytucie Higieny. W 1952 roku powstała Polska Akademia Nauk; zostałem jej członkiem-korespondentem. Przewodniczyłem Komitetowi Biochemii i Biofizyki PAN od początku aż do 1969.

W 1954 utworzono Zakład Biochemii PAN, bazując głównie na Zakładzie Biochemii w Państwowym Instytucie Higieny. W 1957 przekształcił się on w Instytut Biochemii i Biofizyki pod moim kierownictwem aż do roku 1966, gdy odszedłem na emeryturę. W 1963 przeszedłem na emeryturę w Uniwersytecie Medycznym. Poczynając od 1966 pełnię funkcję Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu.

W 1952 zaczęliśmy wydawanie Biuletynu Akademii i byłem naczelnym redaktorem Serii Biologicznej przez cały okres. W 1953 zapoczątkowałem wydawanie kwar-



Rycina 2. Józef Heller – gimnazjalista podczas lekcji fechtunku w domu rodzinnym, 1912 rok.

talnika *Acta Biochimica Polonica*, a w 1954 *Postępow Biochemii*, w którym przez pewien okres pełniłem funkcje redaktora naczelnego. Od 1955 byłem krajowym delegatem do Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB), a od 1961 członkiem Rady IUB i w okresie 1967–1973 wice-prezydentem IUB. Brałem udział w opracowaniu statutu Unii w 1965. W 1962 zostałem członkiem Niemieckiej Akademii Leopoldina. Od 1947 jestem członkiem Towarzystwa Biochemicznego w Londynie i byłem członkiem-założycielem Towarzystwa Porównawczej Endokrynologii. Jestem Honorowym Członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. Otrzymałem kilka odznaczeń państwowych, w tym najwyższe Krzyż Komandorski Gwiazdy Polonia Restituta. Jestem żonaty z Antoniną Mokłowską-Heller, doktorem medycyny; mamy cztery córki i czternaścioro wnucząt.”

## JÓZEF HELLER – LEGIONISTA

Józef Heller wstąpił do Legionów w sierpniu 1914 roku, tuż po zdaniu egzaminu maturalnego. Był dobrze przygotowany do służby wojskowej, gdyż należał do skautów i do Związku Strzeleckiego we Lwowie, a w domu pobierał lekcje fechtunku (Ryc. 2).

W maju 1915 roku zwolniono go ze służby w Legionach po pobycie w szpitalu, gdzie leżał chory na czerwonkę, która wywołała niedomogi serca. Pomimo to, w marcu 1917 roku wrócił do służby czynnej w Legionach. Uczestniczył w walkach o Lwów i w bitwach w Małopolsce Wschodniej. W maju 1919 roku zachorował na tyfus plamisty i znowu po wyleczeniu wrócił do pułku, gdzie pełnił funkcję lekarza, po ukończeniu kursu dla medyków wojskowych we Lwowie. W wojnie polsko-bolszewickiej odznaczył się w bitwie pod Brodzianką w czerwcu 1920 roku, gdzie pod silnym ostrzałem wynosił rannych żołnierzy; odznaczono Go za to Krzyżem Walecznych. W 1921 roku uczestniczył w III Powstaniu Śląskim, w grupie ks. Pawła Brandysa. Dopiero w sierpniu 1921 roku, po siedmiu latach wojowania, przeszedł do rezerwy w stopniu kapitana (Ryc. 3).



Rycina 3. Józef Heller w mundurze legionisty, 1921 rok.

czł. kurs przeszkolenia oficerów lekarzy rezerwy w 1936 roku, w wieku 42 lat. Z tego kursu warto zacytować wydaną o Nim opinię: „Bardzo zrównoważony, opanowany, cichy, spokojny. Przejawia wiele inicjatywy, jednak niezbyt energiczny i za mało stanowczy. Bardzo ambitny. Wybitnie obowiązkowy i skrupulatny ... koleżeńki i uczynny. W stosunku do przełożonych szczerzy, oddany i bez zastrzeżeń lojalny. Służbę wojskową traktuje bardzo ideowo. Fizycznie dość sprawny i ruchliwy. Uzdolnienia wojskowe na ogół dobre. Nadaje się na stanowisko naczelnego lekarza pułku.” [5].

## SPUŚCIZNA JAKUBA KAROLA PARNASA

Po uzyskaniu tytułu doktora na Uniwersytecie Lwowskim, Józef Heller został zatrudniony w charakterze asystenta w Katedrze Chemii Fizjologicznej kierowanej przez prof. Jakuba Parnasa (Ryc. 4). Było to pierwsze miejsce pracy, które przez dziesięć lat (1921–1931) kształtowało zainteresowania naukowe i charakter przyszłego uczonego. Nic



Rycina 4. Pracownicy Zakładu Chemii Lekarskiej Uniwersytetu im. Jana Kazimierza we Lwowie: Józef Nuckowski, J. Sieniawski, Włodzimierz Mozolowski, Józef Heller, Jakub Karol Parnas, Cecylia Lutwak-Mann, W. Chrząszczewski, Andrzej Jan Klisiecki (1926–1929).



187 w 1948

Kochany Panie Kolego, dawno noszę się z odpowiedzią, a dziś już zdecydowałam mi nadejście Waszych odbitek, którymi się szczerze ucieszyłam i byłam wzruszony naprawdę niezasłużonym podziękowaniem; od takiej serdeczności niestety odwykłam.

List Wasz nadszedł w początku moich chorób, dlatego pozostał tak długo bez odpowiedzi. Mam się coraz to lepiej, nie powiem z dnia na dzień, ale z tygodnia na tydzień czuję poprawę. Nadzieje na podróż do Polski tej jesieni – do Wrocławia i Krakowa – niestety się rozwiały przez te choroby, jeszcze nie rychło będę mógł myśleć – realnie, nie w marzeniach – o podróży.

Prace nad deilephile – która, jak widzę, zmieniła nazwisko, jak tyłu innych, a dlaczego? Rozwinęły się dopracowały wspaniale, może Pan być z nich dumny. Posyłam najserdeczniejsze życzenia dla Pana i Jego Rodziny, i przyjaciół wspólnych. Do Włodka piszę jednocześnie. Najserdecznie!

Renata

Rycina 5. Poczтівka od J.K. Parnasa z Moskwy z 1948 roku.

dziwnego, że po odzyskaniu niepodległości przez Polskę w 1945 roku, Heller poczynił starania aby nawiązać kontakt z prof. Parnasem, który pozostał w Związku Radzieckim.

Na pocztówce z 17 listopada 1948 roku z Moskwy Parnas pisał do Hellera do Wrocławia: „Kochany Panie Kolego, dawno noszę się z odpowiedzią, a dziś już zdecydowałam mi nadejście Waszych odbitek, którymi się szczerze ucieszyłam; i byłam wzruszony naprawdę niezasłużonym podziękowaniem; od takiej serdeczności niestety odwykłam. List Wasz nadszedł w początku moich chorób, dlatego pozostał tak długo bez odpowiedzi. Mam się coraz to lepiej, nie powiem z dnia na dzień, ale z tygodnia na tydzień czuję poprawę. Nadzieje na podróż do Polski tej jesieni – do Wrocławia i Krakowa – niestety się rozwiały przez te choroby, jeszcze nie rychło będę mógł myśleć – realnie, nie w marzeniach – o podróży” (Ryc. 5).

Po przedwczesnej śmierci Profesora Parnasa w radzieckim więzieniu w Moskwie, co szczegółowo dokumentuje artykuł Barańskiej i współautorów w Kosmosie [6], Józef Heller wymienił szereg listów z Jego żoną, Renatą Parnasową na temat uczczenia pamięci Profesora. W liście z 1.X.1958 J. Heller napisał: „Przedewszystkim omówię je na najbliższym zebraniu Komitetu Biochemicznego a równocześnie porozmawiam z sekretarzem Wydziału II PAN profesorem Stefańskim. Sądzę, że myśl poświęcenia jednej z sesji II lub



Rycina 6. Jakub Parnas z żoną Renatą, Berlin, 1938 rok.

IV Wydziału uczczeniu rocznicy Profesora ma widoki. Pewną formalną trudność może stanowić fakt, żeśmy w bieżącym roku poświęcili Profesorowi osobny numer *Postępów Biochemii*.”

W zeszycie 1, IV tomu *Postępów Biochemii*, wydanym w 1958 roku, oprócz wspomnień o Profesorze zamieszczono współczesne prace naukowe sześciu uczniów Parnasa z kraju i z zagranicy, w objętości 221 stron. Na stronach 8–16 zamieszczono po raz pierwszy kompletny spis 119 publikacji Jakuba K. Parnasa oraz spis 40 tytułów podręczników i prac referatowych z Jego udziałem. Należy wspomnieć, że prof. Heller był wówczas redaktorem naczelnym *Postępów Biochemii*. O roli profesora Jakuba Parnasa w kształtowaniu lekarzy i biochemików ukazał się osobny artykuł [7].

W liście z Człuchowa, datowanym 10 września 1963 roku Pani Renata Parnasowa napisała do prof. Hellera: „Wczoraj dotarła wiadomość, że na wniosek Pana Profesora, Profesor Mochnackiej i Profesora Korzybskiego, na Walnym Zgromadzeniu PTB zapadła uchwała stworzenia corocznej Nagrody Naukowej imienia ś. p. Męża mojego. Jestem Panu Profesorowi niesłychanie wdzięczna, do Irki i Pana Tadeusza piszę oddzielnie, myślę, że pamięć mojego ś. p. Męża nie może być lepiej i godniej uczczona” (Ryc. 6). Doroczna Nagroda PTBioch im. Jakuba Parnasa jest przyznawana za najlepszą pracę doświadczalną po dziś dzień i była wielokrotnie przyznawana pracownikom Instytutu, który prof. Heller stworzył.

O roli Jakuba Parnasa w rozwoju biochemii prof. Heller napisał w liście skierowanym do Sekretarza Naukowego Wydziału VI PAN (13.IV.1959 r.): „Zasługi Jakuba K. Parnasa dla Nauki Polskiej należy rozpatrywać pod dwojakim kątem widzenia, jako badacza o światowej sławie i jako

twórcy polskiej szkoły biochemicznej. J.K. Parnas wśród licznych swych osiągnięć naukowych, które mu zyskały światową sławę dokonał dwóch wielkich odkryć, które wywarły wpływ na kierunek rozwoju biochemii światowej w ciągu co najmniej 20 lat. Pierwsze to odkrycie istoty powiązania przemiany materii z przemianą energii i wykazanie, że dzieje się to za pośrednictwem grup fosforanowych kwasu adenozyno-trójfosforowego (ATP). Odkrycie to dokonane w roku 1934, zostało należycie ocenione i opracowane dopiero w latach powojennych, głównie przez laureata nagrody Nobla w 1953 roku Fritza Lipmanna. Drugie, dokonane w 1935 roku, to odkrycie fosforolizy glikogenu. Odkrycie to natychmiast podjęte przez małżonków Gerty i Carla Cori przyniosło im nagrodę Nobla w 1947 roku. Wedle powszechnie spotykanej w świecie biochemicznym opinii, nagroda ta co najmniej w połowie należała się Parnasowi i ominęła go tylko dlatego, że w tym czasie przebywał stale w Związku Radzieckim. Splot nieszczęśliwych okoliczności sprawił, że zasługi Parnasa były celowo pomijane w ostatnim dziesięcioleciu na wschód jak i na zachód od Łaby. Obecnie uczeni Radzieccy starają się przywrócić nazwisku Parnasa należną mu rangę."

Zasługi Parnasa jako twórcy polskiej szkoły biochemicznej wynikają już z samego zestawienia nazwisk Jego uczniów, mających powszechne uznanie w dziedzinie biochemii. Są to: w Gdańsku prof. Włodzimierz Mozołowski, w Warszawie prof. Józef Heller, prof. Tadeusz Korzybski, prof. Irena Mochnacka, we Wrocławiu prof. Tadeusz Baranowski i doc. Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen. Również prof. Janina Opieńska-Blauth w Lublinie przez pewien czas była Jego współpracownicą. Do uczniów Parnasa należą również pracujący w Anglii Tadeusz Mann, jego żona dr Cecylia Lutwak-Mann oraz dr Józef Reis."

#### TAJNE NAUCZANIE W OKRESIE OKUPACJI (1939-1944)

Po pierwszych miesiącach *blitz-kriegu* Niemców na terenie Polski stało się jasne, że należy się liczyć z co najmniej kilkuletnią okupacją kraju. Zdawano sobie sprawę, jakie skutki wywołuje każdy rok przerwy w kształceniu wobec niepowetowanych strat wojennych i systematycznego wyniszczania inteligencji.

Poczynając od końca 1939 zaczęły powstawać tajne komplety organizowane przez profesorów z Akademii Medycznej. W Warszawie działały cztery ośrodki kształcące przyszłych medyków, farmaceutów i stomatologów: Szkoła doc. Jana Zaorskiego obejmująca około 1900 słuchaczy; Wydział Lekarski UW, 445 słuchaczy; Wydział Farmacji Uniwersytetu Ziemi Zachodnich, około 250 słuchaczy oraz Kurs dla medyków w getcie warszawskim obejmujący około 500 słuchaczy. Stopniowo podobne ośrodki tajnego nauczania organizowano na terenie całej Polski. Chronologiczny wykaz powstawania tych ośrodków obejmuje aż 14 placówek: w Warszawie, Krakowie, Wilnie, Częstochowie i Kielcach [8].

Na jesieni 1941 roku funkcjonował już dobrze zorganizowany Wydział Lekarski Uniwersytetu Warszawskiego, działający na początku na terenie Uniwersytetu, w dawnej siedzibie oraz jego filia działająca w getcie warszawskim. Tajne nauczanie medycyny odbywało się pod płaszczkiem

programu „Szkoły dla Pomocniczego Personelu Sanitarne-go”, a w getcie pod nazwą „Kursu Przyniesienia Sanitarne-go do Walki z Epidemiami” [9].

Po wybuchu II wojny światowej, Józef Heller zmobilizowany jako oficer rezerwy w Przemyślu, dostał się pod okupację radziecką we Lwowie. Przez pewien czas pracował na uczelniach radzieckich, ale już w marcu 1942 roku nielegalnie przedostał się do Warszawy pod nazwiskiem swej żony jako Kazimierz Mokłowski. Od razu się zgłosił do Wydziału Lekarskiego, gdzie wykładał aż do czasu aresztowania po Powstaniu Warszawskim w 1944 roku. Z listu Profesora do dr Witolda W. Głowackiego z 9.III.1972 roku: „Wykładałem w ramach tajnego UW w latach 1942/43 i 1943/44. Zasadniczo wykładałem chemię fizjologiczną dla medyków i farmaceutów oraz fizjologów, która była moją specjalnością badawczą (funkcje roślinne – głównie u owadów). ... W roku 1943/44 wykładałem chemię fizjologiczną wraz z fizjologią wedle jednolitego, konsekwentnie przemyślanego planu. Na podstawie stenogramów z tego właśnie kursu wydali słuchacze skrypt, który odbito potajemnie w Banku Gospodarstwa Krajowego”. Nie był to jedyny skrypt: młodzież odczuwała brak podręcznika, obszerna dwutomowa „Chemia fizjologiczna”, wydana w 1937 roku pod redakcją Jakuba Parnasa została wyczerpana. Do tego podręcznika Józef Heller napisał dwa rozdziały do tomu drugiego: „Krew”, 41 stron oraz „Immunochemia”, 13 stron [10].

Prof. Stanisław Przyłęcki napisał w 1942 roku nowy podręcznik chemii fizjologicznej, który został wydany przez młodzież w postaci skryptu. Sam profesor wraz ze swym synem-studentem zginęli w Powstaniu Warszawskim [8]. Podręcznik ten, ponownie zredagowany, funkcjonował również w pierwszych latach po wojnie. Ukazał się w Łodzi w 1948 roku pod redakcją A. Dmochowskiego; zamieszczono w nim trzy rozdziały autorstwa Józefa Hellera: „Trawienie”, „Krew” i „Przemiana pośrednia węglowodanów”. W następnym roku, we Wrocławiu, nakładem Bratniej Pomocy Studentów ukazał się podręcznik: J. Heller, St. Karpiak „Zarys fizjologii zwierząt kręgowych z podstawami biochemii” liczący 190 stron.

Na końcu wyżej wspomnianej książki „Tajne nauczanie medycyny...” [11] zamieszczono listę wykładowców i pomocniczych pracowników, a wśród nich: prof. Stefan Pieńkowski i prof. Andrzej Sołtan (fizyka), doc. Tadeusz Jaczewski (zoologia), prof. Ernest Sym, prof. Antoni Dmochowski, Józef Heller i Włodzimierz Niemierko (fizjologia z elementami biochemii); Feliks Przesmycki (mikrobiologia) Aleksander Szczygieł (higiena); Alicja Dorabalska, Maria Trenkner, Antoni Gałęcki (chemia); dr Jan Żabiński (dyrektor warszawskiego Zoo); oraz inni w tej liście wymienieni, z którymi zetknęli się studenci pierwszych lat powojennych. A więc tajne nauczanie w czasie okupacji, spełniając rolę kształcenia przyszłych kadr medycznych, równocześnie pozwoliło naukowcom na zachowanie sprawności intelektualnej.

W trakcie tajnego nauczania pracownia chemiczna mieściła się w dawnym Zakładzie Chemii Fizjologicznej przy Krakowskim Przedmieściu. Po roku Niemcy zarządzili eksmisję. Wtedy większą część szkła i sprzętu przeniesiono do

prywatnych garaży na Hożej, a później do gimnazjum im. Górskiego, gdzie ćwiczenia odbywały się aż do Powstania Warszawskiego. I chociaż czasowo pracownię przy Krakowskim Przedmieściu użytkowano inaczej, po wojnie wróciła do swego pierwotnego przeznaczenia. W tych to pomieszczeniach prof. Heller wraz z prof. Ireną Mochnącką utworzyli w 1951 roku załóżek przyszłego Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN pod nazwą Pracownia Ewolucyjna.

## UTWORZENIE INSTYTUTU BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN

Swoją działalność powojenną zaczął profesor Józef Heller od Wrocławia. Główne swoje wysiłki poświęcał wykładom dla studentów oraz zabiegom organizacyjnym wokół Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu we Wrocławiu. Dodatkowo udzielał się w oddziałach PZH w Szczecinie i w Warszawie. I właśnie ta ostatnia placówka stworzyła platformę dla przyszłego Instytutu Biochemii i Biofizyki. W październiku 1951 Profesor przeniósł się do Warszawy, obejmując Katedrę Chemii Fizjologicznej AM, a następnie kierownictwo Działu Biochemii w Państwowym Zakładzie Higieny przy ulicy Chocimskiej w Warszawie. Główna Jego aktywność była wówczas skupiona wokół wydawania czasopism: *Postępów Biochemii*, *Biuletynu PAN* i *Acta Biochimica Polonica*. Dużo czasu i nerwów zajmowały Mu posiedzenia w Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej; dydaktykę przejęła najbliższa współpracownica Profesora, prof. Irena Mochnącka.

Już w początkach 1953 roku Profesor omawiał z prof. Tadeuszem Baranowskim we Wrocławiu kształt przyszłego Instytutu Biochemicznego. Na bazie Działu Biochemii w PZH, gdzie kierownikami zespołów byli David Shugar, Aleksander Szenberg i Jerzy Meduski utworzono Zakład Biochemii PAN w dniu 1.VI.1954 roku z prof. Józefem Hellerem jako jego kierownikiem. W notatkach z 1 stycznia 1955 roku, zapis: „*Brak pracy doświadczalnej nie może trwać dłużej. Trzeba pozbyć się części posiadzeń i wrócić do poczwarek*”. Już w listopadzie tegoż roku podjęwane są dalsze kroki organizacyjne Instytutu; sprowadzone zostają izotopy fosforanów, bez których nie mogła iść dalej praca doświadczalna. Profesor zaczyna współpracę z Przemysławem Szafrąnskim i Ludmiłą Szarkowską; powstają wówczas ważne publikacje w *Nature* o roli ubichinonów w oddychaniu.

O postępie prac w realizacji marzenia Profesora świadczą wzmianki w listach. W liście do prof. Ignacego Reifera do Kopenhagi, z 13.03.1957 roku czytamy: „Sprawa powołania Instytutu ruszyła i posuwa się różnie odkąd wydobyłem ją z archiwum PAN. Jutro będzie rozpatrywana na Prezydium Rządu po uzyskaniu przeze mnie zgody 5 różnych resortów”.

W listach do dr Zofii Oparty na stażu w Madison (28.03.1960 r.): „Podjęcie prac na Rakowieckiej opóźnia się, jakkolwiek przyrzekają skończyć w bieżącym roku”. Następnie 12.02.1960 r.: „U nas niewiele się zmieniło. Sprawa ul. Rakowieckiej przeciąga się spowodu nowych bardzo rygorystycznych formalności. Organizacyjnie waszą dawną Pracownię łączymy z Shugarem jako Pracownię Genetyczną, organizujemy zaś nową Pracownię Immunochemii pod



Rycina 7. Profesor Józef Heller w okresie powstawania Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, zdjęcie legitymacyjne około 1956 roku.

kierunkiem prof. Mikulaszka. Ta pracownia będzie się zajmować składem chemicznym drobnoustrojów, głównie otoczek” (Ryc. 7).

Instytut powstawał z kilku Pracowni, funkcjonujących w latach 1951-1956, umiejscowionych w kilku punktach miasta:

- Pracownia Biochemii Ewolucyjnej na Krakowskim Przedmieściu 26/28, zatrudniała 11 pracowników naukowych (kierownictwo - prof. Irena Mochnącka);

- Pracownia Biochemii Roślin w dawnym gmachu SGGW na Rakowieckiej, 7 osób (kierownictwo - prof. Ignacy Reifer);

- Pracownia Immunochemii przy ul. Oczki w gmachu Akademii Medycznej, 6 osób (kierownictwo - prof. Edmund Mikulaszek);

- Pracownia Fizykochemii w gmachu PZH przy ul. Chocimskiej 24, 5 osób (kierownictwo - doc. David Shugar). W gmachu PZH mieściły się dwie inne placówki: Pracownia Cytochemii, zatrudniająca 4 osoby oraz Pracownia Biochemii Makromolekularnej, 3 osoby. Łącznie Instytut na początku zatrudniał 36 pracowników naukowych; administracja zajmowała dwa pokoje w Pałacu Staszica.

Za początek Instytutu przyjmuje się decyzję o powołaniu Zakładu Biochemii PAN przez Prezydium Polskiej Akademii Nauk w 1954 roku, w gmachu PZH, co opisano wyżej. Po trzech latach wszystkie wymienione wyżej pracownie formalnie zostały przekształcone w Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, na podstawie uchwały PAN z 10 stycznia 1956 roku, zatwierdzonej uchwałą Rady Ministrów z dnia 14 marca 1957 roku.

Jednak dopiero po 6 latach nieustannych zabiegów Profesora przy współudziale prof. Ignacego Reifera i prof. Davida Shugara, te rozproszone pracownie znalazły się pod wspólnym dachem, przy ulicy Rakowieckiej 36 [12]. Tymczasowo Instytut pomieścił się w lokalach wynajmowanych od Instytutu Fermentacyjnego. Powstała wtedy możliwość przeniesienia do dwóch skrzydeł tego budynku innych pracowni warszawskich: Zakładu Biochemii Drobnoustrojów, Pracowni Antybiotyków a trochę później Zakładu Genetyki, mieszczącego się w Ogrodzie Botanicznym w Alejach Ujazdowskich. Instytut wówczas współpracował z Pracownią Biochemii Patologicznej w Gdańsku i z Pracownią Alkaloidów w Poznaniu (pracownie te mieściły się formalnie w strukturze organizacyjnej IBB).

W 1965 roku, pod wspólnym dachem, Instytut podwoił liczbę pracowników naukowych do 66; ponadto zatrudniał 46 pracowników technicznych, 18 pracowników fizycznych, 13 pracowników Administracji i 4 bibliotekarzy, łącznie, z

10 doktorantami, Instytut zatrudniał 157 osób. Dzięki dużej powierzchni lokalowej i zastrzykom pieniędzy z PAN można było unowocześnić aparaturę i zaadaptować ją, dzięki sprawnie działającym warsztatom. W rok później, profesor Heller odchodząc na emeryturę, przekazał funkcję Dyrektora Instytutu prof. Wacławowi Gajewskiemu. Odchodząc ze stanowiska Dyrektora, profesor Heller czuwał nad całością Instytutu aż do końca 1981 roku jako Przewodniczący Rady Naukowej.

W Archiwum Hellera osobny segregator zawiera zaproszenia na zebrania referatowe, odbywające się w latach 1956–1958 w „Bibliotece Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28”; *de facto* zebrania te miały miejsce w bibliotece Zakładu Biochemii Ewolucyjnej. SeminaRIA te niewątpliwie odegrały rolę integracyjną wśród rozproszonych pracowników Instytutu. Tytuły referatów odzwierciedlają rozpiętość tematów i technik podejmowanych przez różne pracownice. Było to zgodne z myślą przewodnią Dyrektora Hellera: „Bezpośrednio po wojnie mogłem wybrać jedno zagadnienie i nad nim z grupą naukowców pracować. Dałoby to może szybsze rezultaty. Ale uważałem, że lepiej będzie rozciągnąć działalność na wiele kierunków. Myślałem o przyszłości, o wykształceniu kadr w wielu dziedzinach biochemii [3]”. Spis list pracowników, z ich odręcznymi podpisami na zawiadomieniach o zebraniach referatowych zawierały niezmiennie adnotację: „Z uwagi na to, że zebranie wchodzi w skład planu szkolenia – udział wszystkich pracowników nauki Instytutu jest obowiązkowy”.

Referaty przeważnie wygłaszali młodzi ze stopniem magistra, którzy później z całym zapalem spełnili pokładane w nich nadzieje, stając się uczonymi znanymi w świecie; byli to m.in. profesorowie: Tadeusz Chojnacki, Zofia Lassota, Maria Monika Jeżewska, Eugeniusz Sułkowski, Przemysław Szeliga-Szafrański, Ludmiła Szarkowska, Andrzej Koziński, Zofia Opara, Irena Pietrzykowska, Kazimierz Kleczkowski, Kazimierz Lech Wierzchowski, Celina Janion, Halina Sierakowska. Na tychże zebraniach dzielili się swymi wrażeniami z podróży zagranicznych i zjazdów międzynarodowych profesorowie Ignacy Reifer, David Shugar, Józef Heller, Włodzimierz Niemierko. Przychodzili również zapraszani pracownicy naukowcy z 15 innych placówek biochemicznych w Warszawie, stąd można wnioskować, że seminaRIA te wówczas odegrały istotną rolę w rozpowszechnianiu ponad podręcznikowej, aktualnej wiedzy biochemicznej.

## KORESPONDENCJA I WYJAZDY ZAGRANICZNE

W organizacji nowoczesnego Instytutu Biochemii i Biofizyki Profesorowi znacznie dopomogły dwa wyjazdy za granicę: dwumiesięczny na wiosnę 1957 do USA (Madison, Harvard, New York) oraz czteromiesięczny wyjazd, sponsorowany przez fundację Rockefellera w okresie marzec-czerwiec 1958 roku. Profesor zwiedził wówczas wszystkie znaczące placówki biochemiczne w świecie: Londyn, Nowy York, Waszyngton, Baltimore, Filadelfia, San Francisco, Houston, Chicago, Boston New Haven, Paryż, Strasbourg, Bruksela. Profesor zdawał sobie sprawę, że aby zapełnić wyrwę wojenną należy poznać czym się zajmują czołowe placówki biochemiczne. Plonem tej podróży była starannie

opracowana tematyka w poszczególnych zakładach oraz nawiązanie kontaktów, z których wynikły późniejsze wyjazdy na staż pracowników Instytutu, a także zaproszenia na ważniejsze zjazdy międzynarodowe [13]. W osobistych wspomnieniach prof. Moniki Jeżewskiej czytamy: „Przychodził opowiedzieć (nam, młodym pracownikom) o swoich wizytach w zagranicznych laboratoriach i czuło się jaką przyjemność sprawiało Mu zaprezentowanie tam naszych wyników czy stwierdzenie, że nasze osiągnięcia są znane” [14].

Prof. Heller poczynił ogromne wysiłki aby podtrzymać ciągłą łączność z placówkami zagranicznymi. Jego korespondencja obejmuje ponad 50 nazwisk, wśród nich znajdują się najwybitniejsi biochemicy lat powojennych: A.E. Braunstein i W.A. Engelhardt (Moskwa, Akademia Nauk), M. Florin (Liège, Belgia), David E. Green (Madison, Enzymes Research), Peter Karlson (Marburg), Hilary Koprowski (Filadelfia), Michał Laskowski, Sr. (Buffalo), Albert Lehninger (Baltimore), L. Levenbook (Bethesda), Claude Liébecq (Liège), Fritz Lipmann i Severo Ochoa (New York), A.N. Oparin (Moskwa), Fr. Straub (Szeged, Budapeszt), H. Theorell (Sztokholm), R.H.S. Thompson (Londyn), Middlesex Hospital, Šorm František (Praga), G. Wald (Cambridge), D.F. Waterhouse (Canberra, Australia), H.G. Wood (Cleveland), F. Young (Cambridge).

W liście skierowanym do Biura Współpracy Naukowej z Zagranicą PAN prof. Heller napisał w rubryce 9 ankiety „korzyści osiągnięte ze współpracy”: „Prawo bezpłatnego udziału we wszystkich zebraniach, konferencjach etc. Głównie: ogromna zniżka ceny prenumeraty i wszystkich wydawnictw książkowych np. *Biochemical Journal* roczna prenumerata wynosi 124 £, dla członków – 25£. Jeden z roczników lat 50-ych istnieje w Polsce tylko w rękach członków *Biochemical Society*, bo „Ruch” wstrzymał na ten rok prenumeratę *Biochem. J.* Umożliwiło to nam w najcięższych latach utrzymanie kontaktu z nauką światową”. Jak ograniczone to były kontakty, zaświadcza statystyka z 1976 roku o przynależności do *Biochemical Society*: liczba wszystkich członków 5599; z krajów socjalistycznych: z Bułgarii 2, z Czechosłowacji 7, z Polski 11, z Rumunii 2, z Węgier 2.

Poza kontaktami z wyżej wymienionymi naukowcami, Profesor korespondował ze wszystkimi byłymi wychowankami Instytutu oraz ze stażystami zagranicą. Ponadto utrzymywał żywe kontakty z kierownikami wszystkich wiodących ośrodków w Polsce.

## OJCOWSKA OPIEKA NAD WYCHOWANKAMI INSTYTUTU

W archiwum znajdują się listy do Profesora, wysyłane przez wielu naukowców ze stażu naukowego za granicą, w okresie 1956–1966: Zofia Opara, Ludmiła Szarkowska, Roman Pakuła, Monika Jeżewska, Kazimierz Kleczkowski, Tadeusz Kłopotowski, Maciej Wiewiórowski, Helena Kozdrój, Henryka Kurzepa.

Listy słaNe do Profesora miały odmienny charakter od suchych sprawozdań, których wymagała administracja PAN w Pałacu Kultury i Nauki czy Ministerstwo Szkol-



nictwa Wyższego. Każdy z piszących dokładnie opisywał wyniki doświadczeń i planowane następne, oraz wszystkie swoje zamartwienia i nadzieje, tak jakby siedział przed Profesorem w jego gabinecie. Profesor Maciej Wiewiórowski w liście dołączonym do oficjalnego sprawozdania w 1966 roku napisał: „... tego typu zaproszenia (dla kanadyjskiego naukowca do Polski) są dla nas bardzo cenne, bo umożliwiają szerokie powiązania placówek polskich z dobrymi zagranicznymi. Jak dotąd nie udało mi się nawiązać tego typu kontaktu, gdyż wymaga on w naszym kraju conajmniej rocznego planowania a przecież tego typu kontakty wymagają błyskawicznej akcji i reakcji. Potrafią to nasi sąsiedzi z za Olzy i nawet ci z NRD”.

Dr Tadeusz Kłopotowski z pracowni Ames w NIH, Bethesda (list z 14.IX.1966 r.): „Moje zadanie tutaj polega na znalezieniu czegoś nowego w sprawie genetycznej regulacji biosyntezy histydyny. To tak ogólnikowe sformułowanie zostawia mi całkowitą swobodę planowania doświadczeń. Wobec prawie idealnych warunków technicznych własna pomysłowość, wiedza i chęć do pracy są jedynymi czynnikami, które limitują tempo doświadczeń.”

List dr Kazimierza Kleczkowskiego z Marburga (z 16.II.1966 r.) ilustruje ówczesną biedę techniczną i odczynnikową. „My nie mamy tutaj oryginalnych naczynek Conveya i męczymy się w prowizorycznie zrobionych z szalek Petri. Naczynka zamówione w USA są bardzo drogie. Ja zaproponowałem, żeby zwrócić się z prośbą do prof. Reifera o przysłanie nam 300 naczynek (bez przykrywek) a w zamian za to doc. Koeting skłonny jest kupić nam odczynniki, które potrzebujemy i nie możemy kupić w kraju.”

Józef Heller do Zofii Oparzy na stażu w Uniwersytecie Wisconsin (26.X.1961 r.): „Sądząc z opowiadań Przemka (Szafrąńskiego), droga do doktoratu nie jest usłana różami i nie wiem, czy cel ten usprawiedliwia tyle wyrzeczeń. Łącznie z osobistymi komplikacjami sytuacja Pani jest tak złożona, że nie śmiałybym ryzykować żadnych rad. W każdym razie przy decydowaniu proszę pamiętać, że w razie powrotu może Pani zawsze liczyć na życiowe przyjęcie z mojej strony i że zawsze gotów jestem Pani pomóc także w ewentualnym rozplątywaniu innych komplikacji, gdybyście się zdecydowali na powrót. .... O zamierzonej dacie powrotu proszę napisać conajmniej na 4 miesiące naprzód, bym miał czas załatwić formalności etatowe z Oddziałem Personalnym P.A.N. W ostatnim kwartale 1959 r. nastąpiły drakońskie obostrzenia w tej dziedzinie z kasowaniem lub przenoszeniem nieobsadzonych etatów i teraz wszystkie pociągnięcia personalne trzeba uzgadniać z najwyższymi władzami Akademii. Ale to są już moje troski.”

Jakie to były troski ilustruje przebieg zatrudnienia mgr Danieli Barszcz w Instytucie. Podjęła ona prace zlecone w Pracowni prof. Shugara w połowie 1959 roku, a w listopadzie tegoż roku straciła zatrudnienie etatowe w poprzednim miejscu pracy. Nie mogąc jej zatrudnić formalnie, profesor Heller przez trzy miesiące wypłacał jej pieniądze z własnej kieszeni.

Serdeczny ton przebija w listach z prof. Włodzimierzem Niemierko czy z prof. Janiną Opieńską-Blauth. Widać, że

przede wszystkim łączyła ich wspólna troska o stan polskiej biochemii i właściwe zagospodarowanie kadr po wojnie. W rekomendacji dla prof. Włodzimierza Niemierki na członka-korespondenta PAN (11.IV/1957 r.), prof. Heller napisał: „Wszystkie te prace (omówienie prac poprzedza 2-stronicowy opis), stanowiące bardzo poważny wkład do biochemii porównawczej są owocem pracy zespołu, który z biegiem lat wyrósł pod kierunkiem Niemierki. Trudno dziś oddzielić i omówić osobno te prace, w których Niemierko brał bezpośredni udział, od tych które planował i którymi kierował, i wreszcie od takich, które wyrosły na podłożu poprzednich prac Niemierki przy czynnym wkładzie myśli Jego uczniów. W skład zespołu bowiem wchodzi samodzielni już dzisiaj pracownicy nauki. Wychowanie tak poważnej grupy samodzielnych pracowników naukowych stanowi również poważną pozycję w dorobku naukowym Niemierki.”

Inny dokument wysłany do Australian Academy of Sciences (31.X.1962 r.), świadczący o szacunku prof. Hellera dla swego przyjaciela: „Professor W. Niemierko is a very outstanding worker in the field of insect biochemistry and his achievements are well known, especially among the investigators of this problem. The scientific activity of Prof. W. Niemierko covers moreover the domains of lipid metabolism and muscle biochemistry. He represented many times Poland at the international Symposia concerning the biochemistry of lipids. Professor Niemierko, actually the Director of The Institute of Experimental Biology in Warsaw, is a very successful teacher. Three of his pupils are now Assistant-Professors in biochemistry well known in the field of insect biochemistry and of lipid metabolism. Professor Niemierko is an excellent lecturer with a very perfect knowledge of the English language.”

## WYKŁADY I ODCZYTY PUBLICZNE

Profesor Heller wykładał dla różnych gremiów, popularyzując badania naukowe. Wykłady te często stanowiły materiał do późniejszych publikacji, które sam profesor uznawał za ważne w swoim dorobku naukowym. Poniżej zestawiono tytuły kilku wykładów, mających szeroki oddźwięk w środowisku naukowym. J. Heller i A.J. Klisiecki, „O rozmieszczeniu ciał macierzystych amonjaku w krwi owczej pomiędzy surowicę i krwinkę” – wygłoszone w Krakowie i we Lwowie w 1934; J. Heller, „O zawartości kwasu moczowego w krwinkach ludzkich”, w Towarzystwie Lekarskim we Lwowie, 1935 r.; J. Heller, „O regulacji przemiany u motyla wilczomlecza”, w Towarzystwie Fizjologicznym w Krakowie, 9.XII.1937 r.; J. Heller, „J.P. Pawłow – sylwetka naukowa”, XI.1949 r., referat wygłoszony w 100-lecie urodzin uczonego na plenarnym posiedzeniu PAN; J. Heller, „O profilaktyce jodowej wola endemicznego”, referat wygłoszony na Zjeździe Przeciwwolowym we Wrocławiu, 2 marca 1951 r.; tematyka poruszona w tym ostatnim wykładzie zaowocowała wprowadzeniem jodowanej soli w handlu spożywczym; J. Heller, „Biochemia polska w okresie dziesięciolecia 1944–1954”, wykład na plenarnym posiedzeniu Polskiej Akademii Nauk. W wykładzie tym przedstawia wizję planów badawczych dla przyszłego Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

W marcu-maju 1963 roku, profesor wygłosił cykl wykładów dla lekarzy poświęcony przemianie materii z następu-

jącymi rozdziałami (łącznie 61 stron maszynopisu): Fosforylacje ustrojowe, Przemiana cukrów, Przemiana tłuszczów, Przemiana białkowa, Synteza rdzeni pirolu, pirydyny, pirymidyny i puryny, Synteza białka. Wykłady te stały się podstawą do opracowania hasła „PRZEMIANY MATERII” dla Encyklopedii Przyroda i Technika 1964, str. 958–961, J. Heller i I. Mochnacka.

## POLSKI SŁOWNIK MEDYCZNY

Polski Słownik Medyczny zaczął powstawać jeszcze w dwudziestoleciu międzywojennym. Hasła były zbierane nawet w czasie okupacji, jednak długo po wojnie wydanie słownika nie dochodziło do skutku mimo zgromadzenia około 92000 kart słownikowych. Praca nad słownikiem dopiero nabrała przyspieszenia w 1969 roku, gdy VI Wydział Nauk Medycznych PAN powierzył funkcję redaktora prof. Ksaweremu Rowińskiemu, a jego zastępcą mianował lekarza Tadeusza Roźniatowskiego, ówczesnego dyrektora Państwowego Zakładu Wydawnictw Lekarskich (PZWL). Powołano Komitet Redakcyjny, powierzając przewodnicztwo prof. Józefowi Hellerowi. Do Kolegium Redakcyjnego Słownika weszli wybitni polscy uczeni nauk medycznych, profesorowie: Dymitr Aleksandrow, Tadeusz Korzybski, Jan Karol Kostrzewski, Mirosław Mossakowski, Ksawery Rowiński, Witold Rudowski; w skład Komitetu Naukowego oprócz uczonych weszli wybitni lekarze praktycy, profesorzy: Jan Nielubowicz (chirurgia) i Tadeusz Orłowski (urologia).

Wydanie Słownika okazało się bardzo żmudnym zajęciem, pochłaniającym wiele czasu i trudu. Po przejrzeniu kart zebranych do roku 1969 stwierdzono, że należy odrzucić ponad 20% haseł powtórzonych lub nie mających bezpośredniego związku z medycyną. Do współpracy pozyskano wielu zapalonych naukowców, którzy przepisywali na maszynie karty w większości wypełniane odręcznie. Zostało uwzględnione mianownictwo wprowadzone przez współczesne międzynarodowe kongresy w dziedzinie biochemii, histologii i embriologii. Definicje polskie z odpowiednikami łacińskimi zostały zrecenzowane. Wydanie Słownika planowano na rok 1974, niestety terminu tego nie udało się dotrzymać, został przeciągnięty na cztery następne lata. W protokołach posiedzeń Komitetu Redakcyjnego (22.I.1973 r.), uzasadniając powolną i żmudną pracę nad Słownikiem, przytoczono stwierdzenie Witolda Doroszewskiego: „Jeżeli twardy wyrok sędziego skazał czyjąś głowę na pracę i męki, to niech skazany spisuje hasła słownikowe, bo ten jeden trud ma, mówiąc wprost znamiona wszystkich innych kar”. Prace nad Słownikiem trwały 11 lat, zakończono je w marcu 1978 roku, a w księgarniach Słownik ukazał się w czerwcu 1981, zawierając ponad 100000 haseł. Kolejna edycja, powiększona o około 200 stron, pod nazwą „Wielki słownik medyczny PAN” ukazała się dopiero 15 lat później w 1996 roku.

## PROMOCJE BIOCHEMIKÓW

Profesor spełniał ogromną rolę opiniotwórczą w promocji biochemików w kraju. Archiwum zawiera trzy segregatory z kopiami ponad 170 opinii! W ciągu 20 lat profesor napisał 18 recenzji habilitacyjnych, 50 recenzji doktoratów, włączając w to 6 ocen prac kandydackich w latach 1951–

1957. W sekcji Nauk Biologicznych PAN przedstawił blisko 40 wniosków na profesora nadzwyczajnego i to z różnych dziedzin, jakie wówczas obejmowała Sekcja Nauki Rolnicze weterynaryjne i medyczne. Rzadko przedstawiał opinie ujemne, zawsze znajdując jakieś wątki pozytywne w recenzowanej pracy. Jednak niekiedy trafiały na jego biurko prace kuriozalne. W 1962 roku Stanisław Grabiec przedstawił pracę o „biotelereprodukcji bakterii *Staphylococcus albus*”, w której „wykazał” namnażanie się bakterii za pomocą metalowego przewodnika. Powołano specjalną komisję do zbadania zjawiska zaobserwowanego w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW i stwierdzono, że rzeczywiście bakterie „wędrowały poprzez drucik” do innej kolbki z powodu nieuszczelnienia w szkle, w miejscu wtopienia drucika.

## PUBLIKACJE I WYDAWNICTWA

W latach 1924–1939 Józef Heller opublikował 40 prac oryginalnych; w latach 1947–1954, 18 prac; w okresie dyktowania w IBB (1954–1970), 45 prac. Łącznie opublikował 103 prace oryginalne (pełny spis w Archiwum IBB). Jest to dorobek imponujący, zważając na przerwę wojenną oraz ogromną pracę organizacyjną po wojnie poświęconą odbudowie polskich instytucji naukowych, stworzenie Instytutu Biochemii i Biofizyki oraz nauczanie studentów.

W rzeczywistości prac oryginalnych z bezpośrednim udziałem Profesora powstało mniej, około 90; niektóre prace pod bardzo zbliżonym tytułem drukowano w odmiennych wersjach, w różnych czasopismach. Podobnie postępowali uczniowie i współpracownicy Profesora w latach 50-tych. Nie było wówczas Internetu, więc wydruk pracy w różnych czasopismach sprzyjał szybszemu udostępnianiu osiągnięć w badaniach.

Profesor zwięźle podsumował swoje osiągnięcia naukowe w życiorysie z 1973 roku:

„1924: z J.K. Parnasem „O amoniaku we krwi” kontynuowane z A.J. Klisieckim w 1932.

– 1924–1929: seria publikacji w *Biochemische Zeitschrift* poświęcona metabolizmowi owadów, oddychaniu, metamorfozie, hemolimfie itd.

– 1930–1934 z W. Mozołowskim: publikacje w *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* „O rozmieszczeniu kwasu moczowego pomiędzy surowicę i cząsteczki u człowieka.”

– 1947–1950: Pyrofosforany nieorganiczne u owadów.

– 1954–1966: z P. Szafrąnskim, L. Szarkowską i M. Jeżewską i in.: Przyczynki do poznania procesów: Biosynteza białka, Ubichinony w oddychaniu, Biosynteza kwasu moczowego u owadów i mięczaków.”

Osobno w archiwach są spisane „Prace referatowe” (tak klasyfikował je Profesor), które obejmują rozdziały do podręczników i skryptów, publikacje popularnonaukowe, hasła do encyklopedii, omówienia zjazdów biochemicznych. W okresie 1928–1953 „Prac referatowych” opubli-



Rycina 8. Profesor ze współpracownikami w 50-lecie pracy naukowej, w lutym 1973 roku: Zofia Połębska, Tadeusz Kłopotowski, Jan Szarkowski, Hanna Wehrowa, Leszek Tomaszewski, Zofia Lassotowa, Przemysław Szafranski-Szeliga, Józef Heller, Jerzy Buchowicz, Antonia Mokłowska-Hellerowa, Kazimierz Kleczkowski, Maria Monika Jeżewska, Kazimierz Lech Wierzchowski, Maria Piechowska.

kowano w liczbie 14, po 1954 roku 19, w sumie 33 prace. Wyliczenie powyższe nie obejmuje recenzji prac doktorskich, habilitacyjnych i książek oraz wypowiedzi w prasie, bardzo licznych w latach 60-tych w okresie powstawania naszego Instytutu.

Profesor Heller przywiązywał wielką wagę do publikowania odkryć dokonanych w Instytucie w najlepszych czasopismach światowych, tak aby one jak najszybciej weszły w obieg nauki. Archiwum zawiera znamienne korespondencje do *Nature*: A.W. Koziański, Z. Opara, Z. Kraft, Effect of antimetabolites on antigen Vi synthesis and variability in *S. typhi*, *Nature* 179, 201, 1957; J. Heller, P. Szafranski, E. Sułkowski, Amino acids activation in relation to the synthesis of silkproteins, *Nature* 183, 397, 1959; J. Heller, L. Szarkowska, M. Michałek, Ubiquinone /Coenzyme Q/ in insects, *Nature* 188, 491, 1960. Obydwie publikacje z udziałem J. Hellera były zaopatrzone w odpis listu T. Manna (Cambridge, Anglia), który rekomendował prace do druku.

Profesor Heller zadbał o to by rozwinąć polskie wydawnictwa prac biochemicznych i biologicznych. W 1951 roku powstał *Biuletyn PAN* (Józef Heller redaktor naczelny), wydawany w pięciu seriach: nauki biologiczne (prof. Józef Heller), nauki matematyczne, astronomiczne i fizyczne (prof. Andrzej Mostowski), nauki chemiczne (prof. Jan Michalski), nauk o Ziemi (prof. Kazimierz Smulikowski), nauk technicznych (prof. Witold Nowacki).

Zygmunt Nierada, gratulując Profesorowi jubileuszu 50-lecia pracy naukowej, w tym 20 lat prowadzenia serii nauk biologicznych *Biuletynu* pisze (w liście z 22.II.1973 r.): „Sam Pan Profesor opublikował w *Biuletynie* 18 własnych prac, a doniesienia 374 innych autorów wprowadził.” Wyżej, w autobiografii Profesor wspominał: „W 1953 zapoczątkowałem wy-

dawanie kwartalnika *Acta Biochimica Polonica*, a w 1954 *Postępów Biochemii*, w którym przez pewien okres pełniłem funkcje redaktora naczelnego.” Można powiedzieć, że energii i wysiłkowi Profesora zawdzięczamy w odstępie trzech lat powstanie trzech ważnych pism biochemicznych w Polsce. Korespondencja z wydawnictwami stanowi świadectwo, jak ważne były wskazówki Józefa Hellera w kierowaniu do przekładu na język polski najnowszych książek z nauki światowej. W pewnych przypadkach sugerował, aby przekład książki zawierał uzupełnienia, świadczące o udziale polskich uczonych w danej dziedzinie. Natomiast w recenzjach artykułów do publikacji Profesor wykazywał wielką przenikliwość i skromność. Podejmował się jedynie recenzji artykułów z dziedziny, w której czuł się ekspertem; inne artykuły odsyłał do odpowiednich uczonych, których uznawał w tej dziedzinie za autorytet.

## POPULARYZACJA BIOCHEMII W PRASIE

W trakcie starań o powstanie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, a następnie w jego początkowym stadium organizacji profesor

Heller przekazywał prasie liczne informacje o Instytucie, przy czym informacje te ukazywały się na łamach różnych gazet: *Trybuna Ludu* „Tradycje, które nie mogą wygasnąć” (4.X.1956 r.) Artykuł ten przedrukowały *Postępy Biochemii* 51/1 (2005) 233-234; *Stolica* „Biochemia odsłania tajniki życia”, Mieczysław Zawadka (5.X.1958 r.); *Argumenty* „Twórczość naukowa – sztuką kojarzenia” (20-27.XII.1959 r.); *Kurier Polski* „Od stanu biochemii zależy postęp”, Kazimierz Moczarski (6/7. IX.1958 r.); *Ekspres Wieczorny*, *Tygodnik Demokratyczny* i inne.

Najliczniejsze wypowiedzi w prasie ukazały się w trakcie obrad V Międzynarodowego Kongresu Biochemików w Moskwie, w sierpniu 1961 roku. Prasa informowała na pierwszych stronach o udziale polskich biochemików, o wyborze prof. Hellera na członka Zarządu Międzynarodowej Unii Biochemicznej. Profesor wraz ze współpracownikami redagował anglojęzyczne wydanie przebiegu obrad V Kongresu Biochemicznego w Moskwie w 1961 roku, które ukazało się w prestiżowym wydawnictwie Pergamon Press we współpracy z polskim PWN w roku 1963. Profesor Heller był inicjatorem wydania po polsku monografii J.A. Bashama i M. Calvina „Udział węgla w fotosyntezie” w tłumaczeniu dr Zofii Kasprzyk, wydanej w 1962 roku, w wydawnictwie PWRiL.

W 1961 roku w periodyku *Nauka Polska*, *The review of the Polish Academy of Sciences* w języku polskim i angielskim ukazał się artykuł J. Hellera: „Instytut Biochemii i Biofizyki. Założenia, osiągnięcia i perspektywy”, podsumowujący osiągnięcia i rozwój młodego Instytutu. W Instytucie powstał nowy kierunek badań, w oparciu o nowoczesne techniki biofizyczne, który zaprezentowano w artykule pt. „List do Redakcji w sprawie biologii molekularnej” *Kosmos A*, t.XI, nr 3, 1962.

W styczniu 1973 roku świętowano Jubileusz 50-lecia pracy naukowej prof. Hellera (Ryc. 8); sprawozdania z tego



Rycina 9. Prezydium uroczystej sesji w 25-lecie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN: prof. Kazimierz Lech Wierchowski (dyrektor), prof. Józef Heller (przewodniczący Rady Naukowej) prof. Tadeusz Korzybski, 1979 rok.

wydarzenia zamieściły *Życie Warszawy*, 18-19.II.1973 r. i *Miesięcznik Literacki* „(Rok VIII, nr 7, str. 98-113, 1973) pt. „Medycyna i cywilizacja, panel dyskusji z udziałem uczonych i dziennikarzy.” Ze względu na pogarszający się stan zdrowia Profesor odszedł na emeryturę już w 1966, mając 70 lat. Nie stracił jednak kontaktu z Instytutem; przez 15 lat pełnił funkcję Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu, aż do roku 1981 (Ryc. 9).

Znamienny jest napis na nagrobku Profesora: „żołnierz, uczony”; mieści się w tym cały Jego kodeks etyczny, przede wszystkim bronił Ojczyzny, gdy tego wymagała (Ryc. 10). Najpierw z karabinem w Legionach, a w trakcie II wojny światowej wykładając na tajnych kompletach, na których uczył młodzież fizjologii i biochemii.

#### PIŚMIENICTWO

1. Jeżewska MM (1982) Pamięci prof. Józefa Hellera. Referat wygłoszony 25.X.1982 na sesji plenarnej Wydziału Nauk Medycznych PAN. Archiwum Autorki
2. Uczniowie (1982) Wspomnienie o profesorze Hellerze. *Postępy Biochem* 28: 387-390
3. Jeżewska MM (1984) Józef Heller (1896-1982). *Nauka Polska* 2: 149-152
4. Szarkowski JW, Wierchowski KL (1984) Professor Józef Heller (1896-1982). *Acta Biochim Polon* 31: 5-7



Rycina 10. Nagrobek rodziny Hellerów na Północnym Cmentarzu Komunalnym w Warszawie, kwatera W VII/4-13/5-6 (zdjęcie M. A. Siweckiej z listopada 2009 roku).

5. Gałęzowski M (2010) Na wzór Berka Joselewicza. Żołnierze i oficerowie pochodzenia żydowskiego w Legionach Polskich. IPN, Warszawa, str. 317-321
6. Barańska J, Dżugaj A, Kwiatkowska-Korczak J (2008) Życie i tragiczna śmierć Jakuba Karola Parnasa, wybitnego polskiego biochemika, współodkrywcy glikolizy. *Kosmos* 57: 1-17
7. Heller J, Mozołowski W (1958) Jakub K. Parnas. Działalność nauczycielska w latach 1916-1939. *Postępy Biochem* 4: 5-16
8. Dawidowicz A, red (1977) Tajne nauczanie medycyny i farmacji w latach 1939-1945. PZWL, Warszawa, str. 170-173, 382-383
9. Tomaszewski P, Kubiak-Tomaszewska G, Pachecka J (2001) Tajne studia farmaceutyczne w getcie warszawskim w: „Dzieje warszawskiego Wydziału Farmaceutycznego” 1926-2001, Warszawa, str. 92-94
10. Chemia fizjologiczna, J.K. Parnas, red, Warszawa, 1937, cz. II, str. 57-98, 145-158
11. Dawidowicz A, red (1977) Tajne nauczanie medycyny i farmacji w latach 1939-1945. PZWL, Warszawa, str. 383-387
12. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 1954-2004. Agencja Wydawnicza Akces, Warszawa, 2005, 143 str.; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, album z dziejów, Agencja Wydawnicza Akces, Warszawa, 2006, 110 str.
13. Notatki z podróży spisane przez J. Hellera w 1974 roku, po odejściu na emeryturę, 75 stron maszynopisu
14. Jeżewska MM (1980) Prof. Józef Heller w: *Medycyna-dydaktyka-wychowanie*, XII/3: 245-247

## Józef Heller – One of organizers of Polish biochemistry in 1942-1973

Zofia Zarębska

Institute of Biochemistry and Biophysics PAS, 5A Pawiński St., 02-106 Warsaw, Poland

e-mail: zozar@ibb.waw.pl

#### ABSTRACT

The article commemorates the activity of Józef Heller starting in 1921 with Jakub Parnas's group in Lvov which investigated the phosphorolysis of glycogen. The unknown events of His biography were disclosed, like military service in the Piłsudski's Legions at the rebirth of the Polish State and, subsequently, during the Nazi occupation of Poland – participation in the clandestine teaching of medical students. In the post-war times Józef Heller undertook teaching of medical students in Wrocław and next in Warsaw. In 1954 He begun to organize the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences – it now continues its activity. Professor Heller initiated the publication in Poland of three major biochemical journals, including *Postępy Biochemii* (1954). Thanks to His leadership the first Polish Medical Dictionary was published (1981). The article summarizes the pursuit of Józef Heller in various branches of academic life, which were and still are appreciated by subsequent generations of Polish biochemists.

# Charakterystyka molekularna i fizjologiczna neuropeptydów owadzich z rodziny pirokinin

## STRESZCZENIE

Neuropeptydy z rodziny pirokinin (PK) stanowią dużą grupę strukturalnie i funkcjonalnie zróżnicowanych peptydów produkowanych przez komórki neurosekrecyjne układu nerwowego owadów. Należą do nich krótkie, zbudowane z kilku reszt aminokwasowych, cząsteczki oraz długie zbudowane z kilkudziesięciu reszt aminokwasowych związki. Wszystkie charakteryzują się występowaniem na C-końcu cząsteczki sekwencji -FXPRLamidu. Poznane do tej pory funkcje fizjologiczne peptydów z tej rodziny, to stymulacja skurczów mięśni narządów trzewnych, kontrola syntezy feromonów oraz regulacja czasu trwania diapauzy i przepoczwarzania. Pirokininy kodowane są przez dwa geny, *PBAN* i *capa*, które ulegają ekspresji głównie w komórkach zwoju podprzelykowego. Syntetyzowane peptydy transportowane są do kompleksu retrocerebralnego i uwalniane do hemolimfy. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem peptydów z rodziny pirokinin jako potencjalnych biopestycydów w regulacji liczebności owadów szkodliwych. Obecnie projektuje się analogi syntetycznych peptydów o zmienionych właściwościach fizykochemicznych cząsteczek, poszukując skuteczniejszych sposobów dostarczenia ich do komórek docelowych.

## WPROWADZENIE

Neuropeptydy produkowane przez układ neuroendokryny owadów mogą działać jako neuroprzebieżniki, neuromodulatory lub klasyczne hormony. Wykazują one często właściwości pleiotropowe w regulacji wielu procesów fizjologicznych w ciele owada [1]. Jedną z większych rodzin neuropeptydów owadów stanowią pirokininy (PK) oraz peptydy do nich pokrewne, posiadające w cząsteczce na C-końcu łańcucha sekwencję aminokwasową -FXPRLamidu [2]. Pierwszy peptyd z tej rodziny zidentyfikowano w 1986 roku z ekstraktu głowowego karaczana *Leucophaea maderae* i ze względu na jego właściwości strukturalne (resztę kwasu pirolglutaminowego na N-końcu cząsteczki) oraz aktywność fizjologiczną (miostymulującą jelita tylnego) określono akronimem leukopirokinina [3]. Biotest z jelitem tylnym wykorzystany został również przy izolacji i identyfikacji izoform pirokinin z centralnego układu nerwowego i kompleksu gruczołów neurohemalnych ciał kardialnych i przyległych (CC/CA, łac. *corpus cardiacum* – *corpus allatum*) szarańczy wędrowniej *Locusta migratoria* [4] i karaczana amerykańskiego *Periplaneta americana* [5]. Za pomocą technik spektrometrii mas pirokininy zidentyfikowano również u wielu innych gatunków owadów między innymi komara, pluskwiaków czy chrząszczy (Tab. 1). Do rodziny peptydów pokrewnych do pirokinin zaliczono ponadto peptydy o znacznie przedłużonym rejonie N-końcowym łańcucha aminokwasowego, izolowane z różnych gatunków ciem [2]. Uwzględniając jednak ich funkcjonalne zróżnicowanie wyróżniono peptydy aktywujące syntezę feromonów (PK/PBAN, ang. *pheromone biosynthesis activating neuropeptides*), identyczne pod względem strukturalnym z hormonami melanizacji i zabarwienia kutikuli (PK/MRCH, ang. *melanization and reddish coloration hormone*) oraz hormony diapauzy (PK/DH, ang. *diapause hormones*). Formy skrócone wszystkich wymienionych peptydów, zawierające sekwencję -FXPRLa, wykazują zarówno działanie feromonotropowe, jak i miotropowe. Poza owadami peptydy z rodziny PK/PBAN/DH izolowano z krewetki *Penaeus vannamei* [6], a pokrewny pentapeptyd (FXPRGa) z układu nerwowego jamochłona *Hydra magnipapillata* [7]. Charakterystyczna sekwencja N-końcowa -FXPRLamidu wykazuje homologię do peptydów z rodziny neuromedyny kręgowców.

## STRUKTURA GENU/mRNA

Jak dotąd poznano dwie rodziny genów (*PBAN* i *capa*), których produktami są peptydy należące do rodziny pirokinin. Gen *PBAN* koduje cztery lub pięć peptydów z C-końcową sekwencją -FXPRLa (Ryc. 1), w tym hormon diapauzy (DH), neuropeptyd  $\alpha$  (tylko u *Lepidoptera*), neuropeptyd  $\beta$ , neuropeptyd akty-

Paweł Marciniak<sup>✉</sup>

Joanna Pacholska-Bogalska

Monika Szymczak

Grzegorz Rosiński

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>✉</sup>Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul.  
Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: (61) 829 59  
27, e-mail: pmarcin@amu.edu.pl

Artykuł otrzymano 4 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 13 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** neuropeptydy, owady, pirokininy, feromony, gen *PBAN*, gen *capa*, biopestycydy

**Wykaz skrótów:** DH – hormony diapauzy; GPCR – receptory związane z białkiem G; MRCH – neuropeptydy zmieniające zabarwienie kutikuli; *PBAN* – neuropeptydy aktywujące biosyntezę feromonów; PK – pirokininy; SEG – zwoj podprzelykowy

**Podziękowanie:** Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego MNiSW nr IP2010 024370 oraz projektu badawczego nr PBWB-10/2010 finansowanego przez Dziekana Wydziału Biologii UAM.

Tabela 1. Przykładowe sekwencje peptydów z rodziny pirokinin u owadów.

Gatunek	Akronim	Sekwencja aminokwasowa
<i>Periplaneta americana</i>	Peram-PK-1	HTAGFIPRLa
	Peram-PK-2	SPPFAPRLa
	Peram-PK-3	LVPFRPRLa
	Peram-PK-4	DHLPHDVYSPRLa
	Peram-PK-5	GGGSGSETSGMWFGPRLa
	Peram-PK-6	SESEVPGMWFGPRLa
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drome-PK-1	TGPSASSGLWFGPRLa
	Drome-PK-2	SVPFKPRLa
<i>Bombyx mori</i>	Bommo-PBAN	LSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRLa
	Bommo-DH	TDMKDESDRGAHSERGA LWFGPRLa
	Bommo $\alpha$ -SGNP	LIIFTPKLa
	Bommo $\beta$ -SGNP	SVAKPQTHESLEFIPRLa
	Bommo $\gamma$ -SGNP	TMSFSPRLa
<i>Tribolium castaneum</i>	Trica-PK-1	SPPFAPRLa
	Trica-PK-2	HSSPFSRLa
	Trica-PK-3	HVVNFTPRLa
<i>Zophobas atratus</i>	Zopat-PK-1	LPHYPRLa
	Zopat-PK-2	SPPFAPRLa

wujący biosyntezę feromonów (PBAN) i neuropeptyd  $\gamma$  [8]. Gen *capa* natomiast koduje jeden neuropeptyd z rodziny pirokinin z zachowanym w trakcie ewolucji motywem -WFG-PRL na C-końcu łańcucha aminokwasowego [9-10].

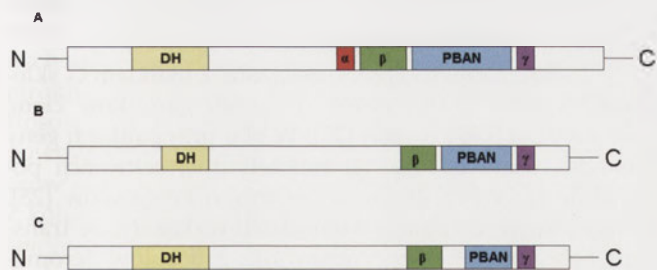
Jako pierwszy sklonowany został gen kodujący pirokininy z jedwabnika morwowego *Bombyx mori*. Wykazano, że hormon diapauzy (DH), neuropeptyd aktywujący biosyntezę feromonów (PBAN) oraz trzy krótsze -FXPRLamidy (neuropeptydy  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  z podprzetykowego zwoju nerwowego) są produktami prekursorowego polipeptydu, który kodowany jest przez jeden mRNA. Analiza molekularna cDNA wykazała, że mRNA koduje otwartą ramkę odczytu, składającą się z 192 reszt aminokwasowych. Podobne geny, kodujące zawsze pięć -FXPRLamidów, zostały następnie zsekwencjonowane u wielu innych gatunków motyli [2,11].

W zależności od gatunku owada geny *PBAN* są różnej długości i zawierają od 3 do 6 krótkich eksonów [10,12]. Porównanie genów *PBAN* błonkoskrzydłych (*Hymenoptera*) i motyli (*Lepidoptera*) sugeruje, że z eksonu 1 translacji ulega peptyd sygnałny. Eksony 2 i 3 u błonkoskrzydłych odpowiadają, odpowiednio, eksonom 2-3 oraz 4-6 u motyli [8,10]. cDNA *Solin-PBAN* mrówki *Solenopsis invicta* koduje peptyd homologiczny do DH, który ulega translacji z eksonu 2, a trzy inne peptydy  $\beta$ -NP,  $\gamma$ -NP i *Solin-PBAN* ulegają translacji z eksonu 3. U dwóch innych gatunków błonkoskrzydłych, *Apis mellifera* i *Nasonia vitripennis*, geny *PBAN* również zbudowane są z 3 eksonów, ale w przeciwieństwie do *S. invicta* zawierają krótkie introny. U motyli DH kodowany jest przez ekson 1 i 2, a eksony 2, 3 i 4 łącznie kodują nieznaną bliżej sekwencję białkową zlokalizowaną pomiędzy DH i neuropeptydem  $\alpha$ . Ekson 4 koduje neuropeptydy  $\alpha$  i  $\beta$  oraz część *PBAN*. Natomiast ekson 5 koduje część *PBAN*,

neuropeptyd  $\gamma$  oraz niezdefiniowaną sekwencję peptydową znajdującą się za sekwencją neuropeptydu  $\gamma$  [12].

Najistotniejszą różnicą w strukturze genu *PBAN* u poszczególnych grup owadów jest sekwencja kodująca neuropeptyd  $\alpha$  (VIFTPKL), występująca u wszystkich dotychczas badanych gatunków motyli, a której brak u błonkoskrzydłych, chrząszczy (*Coleoptera*) i muchówek (*Diptera*) [13]. Peptyd ten ma podobną sekwencję do *Leuma-PK*, która stymuluje skurcze mięśni jelita tylnego karaczanów, ale nie wiadomo czy pełni podobną rolę u motyli [13].

Występujący u *Drosophila melanogaster* gen *PBAN*, nazywany również *hugin*, koduje co najmniej 2 neuropeptydy [2,14]. Jeden z nich, *Drome-PK-2-2* wykazuje podobieństwo do pirokinin, natomiast drugi, *hug  $\gamma$*  do hormonu włączającego linienie [14]. W peptydzie *hug  $\gamma$*  nie występuje reszta fenyloalaniny w motywie -FXPRLa, charakterystycznym dla pirokinin. Jednakże peptydy *hug  $\gamma$*  i *Drome-PK-2-2* ulegają najprawdopodobniej amidacji *in vivo* i przez to należą do rodziny pirokinin. Również miejsce ekspresji mRNA genu *hugin*, podprzetykowy zwój nerwowy SEG (ang. *suboesophageal ganglion*), jest typowe dla peptydów z tej rodziny [14]. Sekwencja kodująca genu *hugin D. melanogaster* składa się z 573 pz. W procesie translacji powstaje zbudowany z 191 reszt aminokwasowych polipeptyd o przewidywanej masie około 21 kDa z sekwencją sygnałną (reszty aminokwasowe 1-24) [2,14]. Transkrypcja tego genu zachodzi zarówno podczas embriogenezy, jak i u dorosłych organizmów w podprzetykowym zwoju nerwowym. Najwięcej transkryptów powstaje pod koniec embriogenezy oraz podczas pierwszych dwóch stadiów larwalnych [14]. Sugeruje się, że gen *hugin* u *D. melanogaster* odpowiada genom *PBAN* u



Rycina 1. Struktura polipeptydu prekursorowego PBAN u motyli (A), muchówek (B) i chrząszczy (C), według [10]. DH – hormon diapauzy,  $\alpha$  – neuropeptyd  $\alpha$ ,  $\beta$  – neuropeptyd  $\beta$ , PBAN – neuropeptyd aktywujący biosyntezę feromonów,  $\gamma$  – neuropeptyd  $\gamma$ .

motyli i komarów [13]. Jednakże u komarów z tego genu powstają cztery peptydy, tak jak u błonkoskrzydłych i chrząszczy [11].

Nazwa drugiego genu *capa* (z ang. *capability*) pochodzi od możliwości tego genu do kodowania neuropeptydów spokrewnionych z peptydami kardiostymulującymi, produkowanymi w brzuszonym łańcuszku nerwowym i narządach perisympatycznych ćmy *Manduca sexta* [9]. Pierwszy gen *capa* został zidentyfikowany po ukończeniu projektu sekwencjonowania genomu *D. melanogaster*. Poza *D. melanogaster* występowanie genów *capa* potwierdzono między innymi u komara *Anopheles gambiae*, pszczoły *A. mellifera*, chrząszcza *Tribolium castaneum* oraz mszycy *Acyrtosiphon pisum* [2]. Gen *capa* u większości gatunków koduje 3 peptydy: pirokininę oraz dwa nienależące do rodziny pirokinin peptydy, CAP<sub>2b</sub>, nazwane poprzednio periwiscerokininami (PVK). Jednakże stwierdzono, że u pszczoły *Apis mellifera* gen ten nie koduje pirokininy a koduje tylko jeden peptyd CAP<sub>2b</sub>. Również u modliszek (*Mantodea*) z genu *capa* nie powstają pirokininy. Z dotychczasowych analiz wynika, że pirokininy kodowane przez gen *capa* mają na końcu karboksylowym sekwencji aminokwasowej -WFGPRLamid, a jedynie u szarańczy -WFGPRVamid [9,11]. -WFGPRLamid na końcu karboksylowym występuje również w hormonach diapauzy, kodowanych przez gen *PBAN* motyli oraz w pirokininach Peram-PK-6 i 7 karaczana amerykańskiego, które ulegają ekspresji w neuronach neurosekrecyjnych podprzetykowego zwoju nerwowego [9].

Gen *capa* u *D. melanogaster* zawiera 2 introny [9,15-17]. Ekson 2 tego genu koduje peptyd Drome-CAP<sub>2b</sub>-1, natomiast ekson 3 koduje peptydy Drome-CAP<sub>2b</sub>-2 oraz Drome-PK-1-1 [9,15]. Wycięcie przewidywanych aktywnych peptydów z prekursora, który ma długość 151 reszt aminokwasowych, zostało potwierdzone techniką spektrometrii mas w tkance nerwowej zarówno larw, jak i osobników dorosłych [9]. Poza Drome-CAP<sub>2b</sub>-1 i -2 oraz Drome-PK-1-1, w organach neurohemalnych *D. melanogaster* wykryto również peptyd CPPB (ang. *CAPA precursor peptide B*). Peptyd ten łączy Drome-CAP<sub>2b</sub>-2 oraz Drome-PK-1-1 w obrębie prekursora. Mimo, że CPPB jest obecny w organach neurohemalnych i może być z nich uwalniany, nie zostało wyjaśnione czy pełni on jakąś rolę fizjologiczną [9]. Jedynym jak dotąd gatunkiem owada, u którego stwierdzono duplikację genu *capa* jest pluskwiak *Rhodnius prolixus*. Wykryto u niego występowanie jednego aktywnego peptydu CAP<sub>2b</sub>-1 i dwóch

aktywnych form peptydu CAP<sub>2b</sub>-2 [11]. Najnowsze badania wskazują, że peptydy podobne do pirokinin mogą być kodowane przez wiele genów. Geny *capa* kodujące peptydy z rodziny pirokinin zidentyfikowano w odwłokowych narządach neurohemalnych kilku grup owadów [9].

## OBRÓBKA POTRANSLACYJNA

W literaturze brak jest szczegółowych danych odnośnie enzymów endoproteolitycznych, które wycinają przewidywane pirokininy z białek prekursorowych, choć prowadzono badania techniką spektrometrii mas, identyfikując część finalnych sekwencji peptydów [2]. Typowym sygnałem cięcia prekursora peptydowego przez konwertazy są miejsca, gdzie obecna jest pojedyncza reszta argininy (R) lub dwie reszty aminokwasowe arginina/lizyna (RR, KR) oskrzydłujące aminowy i karboksylowy koniec aktywnych peptydów. Sekwencje prekursorowe PK/PBAN/DH zazwyczaj zawierają miejsca cięcia i sygnały amidacji pomiędzy przewidywanymi peptydami, bez dodatkowych sekwencji łącznikowych. Jednakże u chrząszcza *T. castaneum*, u którego przewidywany peptyd PBAN ma 8 reszt aminokwasowych i jest najkrótszym z dotychczas zidentyfikowanych, w strukturze propeptydu pomiędzy neuropeptydem  $\beta$  i PBAN występuje fragment sekwencji aminokwasowej, stanowiący swego rodzaju przerwę wynikającą z obecności reszty argininy [13,18]. Natomiast prekursor peptydów, które powstają z genów *hugin* i *capa* zawierają dłuższe fragmenty łącznikowe pomiędzy przewidywanymi sekwencjami peptydów [2].

Dotychczasowe badania wykazały, że ekspresja prekursora *hugin* w komórkach linii S2 *D. melanogaster* spowoduje intensywną potranslacyjną obróbkę według schematu typowego dla substratów konwertazy feromonów. Zidentyfikowano wiele produktów pośrednich procesu obróbki, które są prawdopodobnie wynikiem wysokiego poziomu ekspresji prekursora w komórkach linii S2 [14]. Na podstawie oznaczonych sekwencji aminokwasowych produktów obróbki, określono również dwa miejsca cięcia endoproteolitycznego prekursora *hugin* w komórkach linii S2 oraz ustalono trzy kolejne, domniemane miejsca jego cięcia przez endoproteazy [14].

W strukturze prekursora *capa* peptyd pirokininy jest oskrzydłony przez dwuaminokwasowe miejsce cięcia, podczas gdy peptydy CAP<sub>2b</sub> mają dwuaminokwasowe miejsce cięcia powyżej oraz jednoaminokwasowe poniżej peptydu. Prekursor *capa* *D. melanogaster* zawiera także rzadko spotykaną sekwencję lizyna-lizyna (KK) powyżej CAP<sub>2b</sub>-2 [9]. Zróżnicowana obróbka prekursora *capa* u *D. melanogaster* może być spowodowana występowaniem różnych zestawów konwertaz prohormonów w komórkach, w których geny *capa* ulegają ekspresji. W niektórych neuronach mogą występować enzymy zdolne do cięcia miejsc dwuaminokwasowych, podczas gdy w innych komórkach enzymy rozpoznające zarówno miejsce jedno i dwuaminokwasowe. Alternatywnie, podobne zestawy proteaz mogą być obecne w neuronach produkujących peptydy *capa*, ale pH i inne czynniki środowiska wewnętrznego komórki różnią się, prowadząc do zróżnicowania specyficzności enzymów [9].

## ROZMIESZCZENIE mRNA I PEPTYDÓW W UKŁADZIE NEUROENDOKRYNNYM

Tkankowe rozmieszczenie peptydów z rodziny pirokinin w układzie neuroendokrynnym owadów jest znane dla wielu gatunków. Głównymi miejscami biosyntezy tej grupy peptydów są komórki neurosekrecyjne zwoju podprzelykowego i zwojów tułowiowych brzuszego łańcuszka nerwowego [2]. Zastosowanie techniki hybrydyzacji *in situ* wykazało, że głównym źródłem peptydów PK/PBAN/DH u ciem są komórki medialne zwoju podprzelykowego, z których hormony te uwalniane są do hemolimfy [19]. Praktycznie identyczny jak u ciem profil ekspresji i rozmieszczenia peptydów obserwowano w SEG karaczanów i szarańczaków [5,20]. U owadów hemimetabolicznych dużą zawartość peptydów z rodziny pirokinin wykryto dodatkowo w zamózgowie (*tritocerebrum*), skąd przekazywane są do ciał przyległych (*corpus allatum*) i dalej do brzuszego łańcuszka nerwowego [21].

Peptydy PK/PBAN/DH kodowane przez geny *capa* ulegają ekspresji w zwojach tułowiowych brzuszego łańcuszka nerwowego [2]. Mimo, że liczba komórek neurosekrecyjnych różni się u poszczególnych gatunków, wszystkie neuryty biegną do gruczołów perisympatycznych, miejsca uwalniania pirokinin do hemolimfy. Ponadto, jak wykazano u *D. melanogaster* i *M. sexta* prekursor pochodzący z genu *capa* ulega ekspresji w SEG razem z prekursorami genów *PBAN* u *M. sexta* [22] i *hugin* u *D. melanogaster* [15]. Występowanie peptydów z rodziny PK/PBAN/DH jest cechą charakterystyczną u wszystkich do tej pory badanych gatunków owadów [2].

## RECEPTORY PIROKININ

U *D. melanogaster* zidentyfikowano dwa strukturalnie powiązane receptory dla peptydów PK/PBAN/DH, które mogą być aktywowane przez niskie stężenia Drome-PK-1-2 [23]. cDNA zidentyfikowanych genów *CG8784* i *CG8795* dla receptorów został sklonowany i poddany ekspresji w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO). Okazało się, że cDNA koduje białka o długości 658 (*CG8784*) i 595 (*CG8795*) reszt aminokwasowych, które zawierają siedem helis transbłonowych, co sugeruje, że są to receptory łączące się z białkiem G (GPCR). Drugi peptyd Drome-PK-1-1 występujący u *D. melanogaster* wykazywał słabe oddziaływanie z tymi receptorami, ale aktywował inny receptor związany z białkiem G kodowany przez gen *CG9918*. Jednakże stężenie peptydu Drome-PK-1-2 potrzebne do aktywacji tego receptora było zdecydowanie wyższe [24].

Geny *Tc 30*, *Tc 31* i *Tc 32* prawdopodobnie kodują receptory pirokinin u *T. castaneum*, ponieważ są bliskimi ortologami *CG8784*, *CG8795* i *CG9918* występującymi u *D. melanogaster*. Dodatkowo mają dwa introny wspólne z genami receptorów pirokinin u muszki owocowej. Do tej pory nie stwierdzono, które z tych trzech receptorów są receptorami dla Drome-PK-1-1 lub -2 i dlatego wstępnie przydzielono je do receptorów, które mają najbardziej podobne reszty aminokwasowe z tymi u *D. melanogaster*. Ponadto, gen *Tc 32* ma trzy introny, takie jak *CG9918* receptora Drome-PK-1-1

u *D. melanogaster*, co wskazuje na występowanie u *T. castaneum* genu dla receptora PK-1-1 [25].

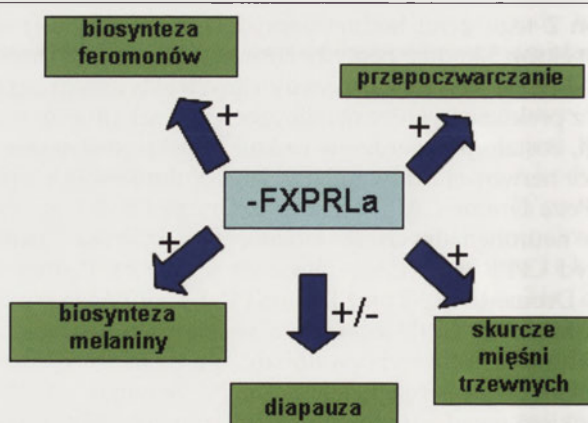
PBAN-pokrewne receptory związane z białkiem G sklonowano i scharakteryzowano u dwóch gatunków ciem, *Helicoverpa zea* [26] i *B. mori* [27]. W obu przypadkach geny zidentyfikowano bazując na hipotetycznej sekwencji podobnej do receptora dla neuromedyny u kręgowców [28]. Analizy rozmieszczenia w komórkach wykazały, że transkrypt receptora jest specyficzny dla gruczołów feromonowych, gdzie ulega uwolnieniu w dniu poprzedzającym wylinkę. Receptory PBAN reagują na PBAN i pokrewne peptydy przez mobilizację zewnątrzkomórkowego wapnia. Tym samym PK/PBAN/DH działają bezpośrednio na gruczoły feromonowe przy wykorzystaniu wapnia jako drugorzędowego przekaźnika. Receptor PBAN u *B. mori* różni się strukturalnie i funkcjonalnie od tego u *H. zea* tym, że część C-końcowa cząsteczki, która pośredniczy w internalizacji receptora po przyłączeniu PBAN, jest dłuższa o 67 reszt aminokwasowych [27].

## AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA PIROKININ OWADÓW

Hormony z grupy PBAN regulują biosyntezę feromonów u samic ciem poprzez bezpośrednią aktywację receptorów w komórkach gruczołów feromonowych [29]. Kaskada transdukcji sygnału inicjowana jest napływem jonów wapnia [30], który prowadzi do produkcji gatunkowo-specyficznych feromonów płciowych drogą indukowanej przez PBAN syntezy kwasów tłuszczowych. Uwolnienie hormonów diapauzy może indukować diapauzę embrionalną u *B. mori*, choć badania przeprowadzone przez Zhang i wsp. [31] pokazały, że te same peptydy mogą być zaangażowane w hamowanie diapauzy poczwarkowej u *Helicoverpa armigera*.

Neuropeptydy z rodziny PK/PBAN regulują różne procesy fizjologiczne i behawioralne u owadów (Ryc. 2). Mogą stymulować biosyntezę melaniny i feromonów płciowych u ciem, wpływać na behawior poczwarkowy u much [32] oraz indukować diapauzę embrionalną u motyli [6]. Wykazują również aktywność miotropową u szarańczy i karaczanów [33] i oddziałują na kurczliwość jajowodu u szarańczy [6].

W stosunku do gruczołów feromonowych, odwrotnie niż w przypadku oddziaływania na mięśnie narządów trzew-



Rycina 2. Pleiotropowe właściwości fizjologiczne pirokinin owadów. „+” – stymulacja, „-/-” – hamowanie.



nych, różne izoformy pirokinin nie wykazują efektów dawkowo zależnych. W badaniach przeprowadzonych na różnych mięśniach trzewnych karaczana *P. americana* natywne pirokininy wykazują dawkowo zależne działanie [34]. Zastosowanie również syntetycznej Leuma-PK u *P. americana* powodowało zwiększenie częstotliwości i amplitudy skurczów serca tego owada w zależności od rosnącej dawki [35]. Z kolei wyciszenie genów dla receptorów pirokinin u *D. melanogaster*, tak samo jak zmiana ekspresji genów, prowadzi do śmiertelności larw [14,23].

## BADANIA ZALEŻNOŚCI STRUKTURALNO – FUNKcjONALNYCH

Identyfikacja sekwencji reszt aminokwasowych PBAN i innych bioanalogów z rodziny PK/PBAN umożliwiła przeprowadzenie szczegółowych badań zależności struktura – aktywność z użyciem syntetycznych peptydów [33]. Badania na różnych gatunkach ciem wykazały, że wspólny dla peptydów PK/PBAN/DH C-końcowy pentapeptydowy fragment (-FXPRLa, gdzie X = S, T, G lub V) jest niezbędny dla zachowania aktywności biologicznej i warunkuje oddziaływanie na biosyntezę feromonów, kurczliwość jelita tylnego i jajowodu, stymulację melanizacji i indukowanie diapauzy, przy czym dłuższe sekwencje są wymagane dla wywołania pełnej odpowiedzi fizjologicznej [2]. Natomiast u *Sarcophaga bullata* sekwencją aktywną, wywołującą przyspieszenie przepoczwarzania jest C-końcowy tripeptyd PRL, połączony z grupą amidową [36], choć dla pełnej aktywności wymagane są dłuższe sekwencje. Z kolei skrócenie pentapeptydu od C-końca do formy -FTPRamidu [36,37] lub pozostawienie tylko dipeptydu RLamidu [38] powoduje całkowitą utratę jego aktywności do stymulowania przepoczwarzania much.

Zastosowanie serii analogów, w których podstawiono resztę alaniny w różnych pozycjach pentapeptydu pozwoliło na określenie sekwencji PK/PBAN niezbędnej dla przyspieszenia przepoczwarzania much. Alanina jest aminokwasem o średniej wielkości i polarności wśród innych aminokwasów i dlatego jest wykorzystywana do identyfikacji reszt kluczowych dla aktywności biologicznej [38]. W wyniku tych analiz ustalono, że są to dwie C-końcowe reszty aminokwasowe [36]. Zastąpienie reszty argininy resztą alaniny lub asparaginy prowadzi do utraty aktywności, natomiast podstawienie reszty lizyny prowadzi do obniżonej aktywności neuropeptydów. Analogi YFTPRa lub QTSFTPRa, w których reszta alaniny zastępowała resztę leucyny wykazywały odpowiednio brak lub bardzo niską aktywność [36]. Jest to dowód na znaczący udział reszty leucyny w zachowaniu aktywności. Reszty F, T lub P w N-końcowej części pentapeptydu mogą być zastąpione resztą alaniny bez całkowitej utraty aktywności. Reszta treoniny występująca w zmiennej pozycji X pentapeptydu wykazuje największą tolerancję przy wymianie jej na resztę alaniny, bez zmiany właściwości analogu w porównaniu z natywnym peptydem Leuma-PK. Zastąpienie reszt fenyloalaniny lub proliny resztą alaniny powoduje znaczącą redukcję aktywności peptydu [36].

Badania przeprowadzone przez Nachman'a i wsp. [39] pozwoliły na zidentyfikowanie sztywnej konformacji  $\beta$  dla aktywnej części rdzenia cyklo[Asn<sup>1</sup>]Leuma-PK, obejmującej resztę -TPRLa [39]. Cykliczny analog zachowywał bio-

logiczną aktywność, co sugeruje, że C-końcowa sekwencja  $\beta$  jest aktywną częścią pirokininy, rozpoznawaną przez receptor [39]. Pirokininy i pirokinino-podobne neuropeptydy stymulują kurczliwość jajowodu i inicjują biosyntezę feromonów u różnych gatunków owadów, co dowodzi, że biologicznie aktywna konformacja  $\beta$  ma znaczenie dla wielu procesów biologicznych [39]. Późniejsze badania przeprowadzone przez Wang i wsp. [40] oraz Clark i Prestwich [41] także dostarczyły dowodów na występowanie  $\beta$ -zgięcia w regionie rdzenia. Cykliczne analogi, których łańcuch boczny zawierał D fenyloalaninę w zmiennej pozycji X w rdzeniu wykazywały antagonizm do PK/PBAN w biotestach feromonotropowych [33]. Analogi amfifilne aktywnego rdzenia pirokinin, zawierające różne hydrofobowe składniki związane z aminowym końcem, po podaniu topikalnym, jak i z pokarmem, powodują przedłużenie okresu biosyntezy feromonów u ćmy *Heliothis virescens* [42,43].

## MODYFIKACJE PIROKININ I ICH ZASTOSOWANIE JAKO BIOPESTYCYDÓW

W ostatnich kilkunastu latach neuropeptydy i receptory owadów coraz częściej wykorzystywane są jako podstawa do zaprojektowania potencjalnych bioinsektycydów [44]. Dynamiczny wzrost dostępnych informacji odnośnie biologii neuropeptydów, w tym również pirokinin, pozwala obecnie na syntezę wysoce selektywnych w działaniu, gatunkowo specyficznych i nie obciążających środowiska związków. Natywne cząsteczki neurohormonów muszą jednak zostać zmodyfikowane w taki sposób, aby można było pokonać trzy główne bariery ograniczające bezpośrednio ich stosowanie z pokarmem lub topikalnie, a mianowicie: 1) słabą rozpuszczalność większości związków w wodzie i innych rozpuszczalnikach, także organicznych; 2) brak stabilności w środowisku (peptydy są często niestabilne w wysokich temperaturach); 3) szybką degradację neuropeptydów przez peptydazy występujące w przewodzie pokarmowym owadów oraz na powierzchni kutikuli. Ograniczenia te wymuszają modyfikacje sekwencji natywnych neuropeptydów i syntezę związków pseudopeptydowych, zawierających ugrupowania nieorganiczne, lub peptydomimetyków [45]. W odniesieniu do pirokinin, modyfikacje struktury natywnych związków mają na celu stworzenie głównie antagonistów fizjologicznych lub związków o właściwościach amfifilnych, zachowujących aktywność feromonotropową czy miotropową po aplikacji topikalnej. W natywnej postaci polarne cząsteczki peptydów nie są zdolne do penetracji hydrofobowej, lipidowej matriks kutikuli owadów [46]. Aby osiągnąć ten cel zastosowano dwie odmienne strategie. Pierwsza polegała na syntetyzowaniu antagonistów PBAN poprzez cyklizację cząsteczek z wykorzystaniem łańcuchów bocznych [47]. Najpierw określono najkrótszy fragment peptydu Helze-PBAN niezbędny do zachowania aktywności cząsteczki (PBAN<sub>28-33</sub> = YFSPRLa). Następnie w miejsce reszt seryny i fenyloalaniny wprowadzono izomer D fenyloalaninę. Największą aktywność wykazywał analog [D-Phe<sup>30</sup>]-PBAN-(28-33). W kolejnych badaniach otrzymano cykliczne analogi PBAN. Do syntezy związków cyklicznych wykorzystano peptyd [Arg<sup>27</sup>, D-Phe<sup>30</sup>]-PBAN-(28-33), w którym resztę proliny w pozycji 31 zastąpiono resztą *N*-a-( $\omega$ -aminoalkilo)-glicyny o różnej długości łańcucha alkilowego. Następnie wolną grupę  $\omega$  aminową *N*-a-( $\omega$ -aminoalkilo)-glicyny połączono z wolną grupą *a* aminową argininy za pomocą dikarboksyłowego łącznika kwasowego.

Takie podejście doprowadziło do uzyskania analogów o aktywności antagonistycznej na poziomie 96%.

Druga strategia zakładała wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych (zaprojektowanie pseudopeptydów), modyfikujących właściwości fizykochemiczne cząsteczki. Nachman i wsp. [48] wykazali, że wprowadzenie w miejsce pierścienia fenyloalaniny w pentapeptydowym fragmencie (-FTPRLa) peptydu PBAN grupy karboranowej lub reszty kwasu hydroksycynamonowego prowadzi do wzmocnienia właściwości feromonotropowych cząsteczki po iniekcji ćmom. Ponadto związki te stymulują również syntezę feromonów po aplikacji topikalnej nawet do kilku godzin od ekspozycji na peptyd [49]. Wprowadzenie dodatkowo grup fenyloowych, takich jak w analogach 9-fluorenyloacetylo-FTPRLamidzie i 1-pirenylobutyrylo-FTPRLamidzie lub kwasów tłuszczowych jako ugrupowań hydrofobowych powoduje zwiększenie amfifilności cząsteczek, a ich efekt feromonotropowy utrzymuje się nawet do 20 godzin [50]. Inną stosowaną modyfikacją, zapewniającą oporność na peptydazy występujące na powierzchni kutikuli owada jest zamiana prolina na hydroksyprolinę lub kwas oktahydroindolo-2-karboksyowy w sekwencji -FTPRLamidu otrzymanych wcześniej analogów o właściwościach amfifilnych. Analogi te zachowują zdolność do penetracji kutikuli, natomiast ich właściwości miotropowe i feromonotropowe są niższe niż cząsteczek natywnych [43].

## PODSUMOWANIE

Pirokininy i pokrewne peptydy są pleiotropowymi neuropeptydami produkowanymi głównie w komórkach neurosekrecyjnych zwojów brzuszno-łancuszkowego nerwu. Regulują one różne procesy związane z rozwojem owadów (synteza feromonów, diapauza) i posiadają również właściwości miotropowe, przez co mogą wpływać na zdecydowaną większość narządów trzewnych i pełnione przez nie funkcje fizjologiczne. Duże zróżnicowanie funkcjonalne i strukturalne pirokinin w obrębie poszczególnych gatunków owadów oraz często niekompletne dane odnośnie biologii tych neuropeptydów wskazują, że nie wszystkie ich funkcje zostały poznane. Obecny stan wiedzy dotyczący peptydów z grupy pirokinin pozwolił na zsyntetyzowanie, w oparciu o ich sekwencje aminokwasowe, kilku potencjalnych związków mających duże znaczenie praktyczne. Otrzymane pseudopeptydowe analogi w niedalekiej przyszłości mogą zostać wykorzystane jako wysoce specyficzne gatunkowo, nie obciążające środowiska naturalnego bioinsektycydy. Pozwoli to na bardziej racjonalną walkę z owadami szkodliwymi roślin uprawnych oraz wektorami niebezpiecznych dla człowieka chorób.

## PIŚMIENNICTWO

1. Nassel DR (2002) Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol* 68: 1-84
2. Predel R, Nachman R (2006) The FXPRLamide (Pyrokinin/PBAN) peptide family. *Handbook of biologically active peptides*. Elsevier, str. 207-212
3. Holman GM, Cook BJ, Nachman RJ (1986) Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Comp Biochem Physiol C* 85: 219-224
4. Schoofs L, Veelaert D, Vanden Broeck J, De Loof A (1997) Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 18: 145-156

5. Predel R, Eckert M (2000) Tagma-specific distribution of FXPRLamides in the nervous system of the American cockroach. *J Comp Neurol* 419: 352-363
6. Torfs P, Nieto J, Cerstiaens A, Boon D, Baggerman G, Poulos C, Waelkens E, Derua R, Calderon J, De Loof A, Schoofs L (2001) Pyrokinin neuropeptides in a crustacean. Isolation and identification in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Eur J Biochem* 268: 149-154
7. Takahashi T, Muneoka Y, Lohmann J, Lopez de Haro MS, Solleder G, Bosch TC, David CN, Bode HR, Koizumi O, Shimizu H, Hatta M, Fujisawa T, Sugiyama T (1997) Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1241-1246
8. Choi MY, Vander Meer RK (2009) Identification of a new member of the PBAN family of neuropeptides from the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insect Mol Biol* 18: 161-169
9. Predel R, Wegener C (2006) Biology of the CAPA peptides in insects. *Cell Mol Life Sci* 63: 2477-2490
10. Choi MY, Meer RK, Shoemaker D, Valles SM (2011) PBAN gene architecture and expression in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *J Insect Physiol* 57: 161-165
11. Jurenka R, Nusawardani T (2011) The pyrokinin/pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) family of peptides and their receptors in Insecta: evolutionary trace indicates potential receptor ligand-binding domains. *Insect Mol Biol* 20: 323-334
12. Jing TZ, Wang ZY, Qi FH, Liu KY (2007) Molecular characterization of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide from the black-back prominent moth, *Closteria anastomosis* (L.) (Lepidoptera, Notodontidae). *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1262-1271
13. Choi MY, Vander Meer RK, Valles SM (2010) Molecular diversity of PBAN family peptides from fire ants. *Arch Insect Biochem Physiol* 74: 67-80
14. Meng X, Wahlstrom G, Immonen T, Kolmer M, Tirronen M, Predel R, Kalkkinen N, Heino TI, Sariola H, Roos C (2002) The *Drosophila* hugin gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mech Dev* 117: 5-13
15. Kean L, Cazenave W, Costes L, Broderick KE, Graham S, Pollock VP, Davies SA, Veenstra JA, Dow JA (2002) Two nitridergic peptides are encoded by the gene capability in *Drosophila melanogaster*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1297-1307
16. Vanden Broeck J (2001) Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 22: 241-254
17. Hewes RS, Taghert PH (2001) Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res* 11: 1126-1142
18. Li B, Predel R, Neupert S, Hauser F, Tanaka Y, Cazzamali G, Williamson M, Arakane Y, Verleyen P, Schoofs L, Schachtner J, Grimmelikhuijzen CJ, Park Y (2008) Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res* 18: 113-122
19. Sato Y, Ikeda M, Yamashita O (1994) Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen Comp Endocrinol* 96: 27-36
20. Braunig P, Bohme C, Stauer B (1996) Morphology of locust neurosecretory cells projecting into the *Nervus corporis allati* II of the suboesophageal ganglion. *Microsc Res Tech* 35: 230-241
21. Tips A, Schoofs L, Paemen L, Ma M, Blackburn M, Raina A, Deloof A (1993) Colocalization of locustamyotropin-like and pheromone biosynthesis activating neuropeptide-like immunoreactivity in the central-nervous-system of 5 insect species. *Comp Biochem Phys A* 106: 195-207
22. Loi PK, Tublitz NJ (2004) Sequence and expression of the CAPA/CAP2b gene in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 207: 3681-3691
23. Rosenkilde C, Cazzamali G, Williamson M, Hauser F, Sondergaard L, DeLotto R, Grimmelikhuijzen CJ (2003) Molecular cloning, functional expression, and gene silencing of two *Drosophila* receptors for the *Drosophila* neuropeptide pyrokinin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 485-494

24. Cazzamali G, Torp M, Hauser F, Williamson M, Grimmelikhuijzen CJ (2005) The *Drosophila* gene CG9918 codes for a pyrokinin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 14-19
25. Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Park Y, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S, Schachtner J, Verleyen P, Grimmelikhuijzen CJ (2008) A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front Neuroendocrinol* 29: 142-165
26. Choi MY, Fuerst EJ, Rafaeli A, Jurenka R (2003) Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuro-peptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9721-9726
27. Hull JJ, Ohnishi A, Moto K, Kawasaki Y, Kurata R, Suzuki MG, Matsumoto S (2004) Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. Significance of the carboxyl terminus in receptor internalization. *J Biol Chem* 279: 51500-51507
28. Park Y, Kim YJ, Adams ME (2002) Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11423-11428
29. Rafaeli A (2009) Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN): Regulatory role and mode of action. *Gen Comp Endocrinol* 162: 69-78
30. Clynen E, Baggerman G, Huybrechts J, Vanden Bosch L, De Loof A, Schoofs L (2003) Peptidomics of the locust corpora allata: identification of novel pyrokinins (-FXPRLamides). *Peptides* 24: 1493-1500
31. Zhang TY, Sun JS, Zhang LB, Shen JL, Xu WH (2004) Cloning and expression of the cDNA encoding the FXPRL family of peptides and a functional analysis of their effect on breaking pupal diapause in *Helicoverpa armigera*. *J Insect Physiol* 50: 25-33
32. Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, Van Lommel A, Vanden Bosch L, De Loof A, Zdarek J, Schoofs L (2004) Fraenkel's pupariation factor identified at last. *Dev Biol* 273: 38-47
33. Altstein M (2004) Role of neuropeptides in sex pheromone production in moths. *Peptides* 25: 1491-1501
34. Predel R, Nachman RJ (2001) Efficacy of native FXPRLamides (pyrokinins) and synthetic analogs on visceral muscles of the *American cockroach*. *J Insect Physiol* 47: 287-293
35. Rosinski G (1995) *Metaboliczne i miotropowe neuropeptydy owadów*. Adam Mickiewicz University Press, Poznan
36. Nachman RJ, Zdarek J, Holman GM, Hayes TK (1997) Pupariation acceleration in fleshfly (*Sarcophaga bullata*) larvae by the pyrokinin/PBAN neuropeptide family – Structure-activity relationships. *Neuropeptides Develop Aging* 814: 73-79
37. Nagasawa H, Kuniyoshi H, Arima R, Kawano T, Ando T, Suzuki A (1994) Structure and activity of *Bombyx* Pban. *Arch Insect Biochem Physiol* 25: 261-270
38. Zdarek J, Nachman RJ, Hayes TK (1998) Structure-activity relationships of insect neuropeptides of the pyrokinin/PBAN family and their selective action on pupariation in fleshfly (*Neobellera bullata*) larvae (*Diptera : Sarcophagidae*). *Eur J Entomol* 95: 9-16
39. Nachman RJ, Roberts VA, Dyson HJ, Holman GM, Tainer JA (1991) Active conformation of an insect neuropeptide family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4518-4522
40. Wang YS, Kempe TG, Raina AK, Mazzocchi PH (1994) Conformation of a biologically-active C-terminal hexapeptide analog of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide by Nmr-spectroscopy. *Int J Pept Protein Res* 43: 277-283
41. Clark BA, Prestwich GD (1996) Evidence for a C-terminal turn in PBAN - an NMR and distance geometry study. *Int J Pept Protein Res* 47: 361-368
42. Abernathy RL, Teal PE, Meredith JA, Nachman RJ (1996) Induction of pheromone production in a moth by topical application of a pseudo-peptide mimic of a pheromonotropic neuropeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12621-12625
43. Nachman RJ, Teal PE, Strey A (2002) Enhanced oral availability/pheromonotropic activity of peptidase-resistant topical amphiphilic analogs of pyrokinin/PBAN insect neuropeptides. *Peptides* 23: 2035-2043
44. Scherckenbeck J, Zdobinsky T (2009) Insect neuropeptides: structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorg Med Chem* 17: 4071-4084
45. Nachman RJ, Mahdian K, Nassel DR, Isaac RE, Pryor N, Smaghe G (2011) Biostable multi-Aib analogs of tachykinin-related peptides demonstrate potent oral aphicidal activity in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (*Hemiptera: Aphidae*). *Peptides* 32: 587-594
46. Gade G, Goldsworthy GJ (2003) Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag Sci* 59: 1063-1075
47. Altstein M (2001) Insect neuropeptide antagonists. *Biopolymers* 60: 460-473
48. Nachman RJ, Teal PE, Radel PA, Holman GM, Abernathy RL (1996) Potent pheromonotropic/myotropic activity of a carboranyl pseudo-tetrapeptide analogue of the insect pyrokinin/PBAN neuropeptide family administered *via* injection or topical application. *Peptides* 17: 747-752
49. Teal PE, Meredith JA, Nachman RJ (1999) Development of amphiphilic mimics of insect neuropeptides for pest control. *Ann N Y Acad Sci* 897: 348-360
50. Teal PE, Meredith JA, Nachman RJ (1999) Comparison of rates of penetration through insect cuticle of amphiphilic analogs of insect pyrokinin neuropeptides. *Peptides* 20: 63-70

## Molecular and physiological characterization of the pyrokinin insect neuropeptide family

Paweł Marciniak<sup>✉</sup>, Joanna Pacholska-Bogalska, Monika Szymczak, Grzegorz Rosiński

Department of Animal Physiology and Development, Adam Mickiewicz University, 89 Umultowska St., 61-614 Poznan, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: pmarcin@amu.edu.pl

**Key words:** neuropeptides, insects, pheromones, pyrokinins, PBAN gene, *capa* gene, biopesticides

### ABSTRACT

Peptides from the pyrokinin (PK) family are a large, structurally and functionally diverse group of the insect neuropeptides produced by neurosecretory cells of the insect nervous system. This family contains short and long peptides which share C-terminal -FXPRLa amino acid sequence. Pyrokinins regulate the visceral muscle contractions, pheromone biosynthesis, pupariation and diapause duration in insects. They are encoded by two genes *PBAN* and *capa*, which are mainly expressed in the suboesophageal ganglion. Peptides are then transported to the retrocerebral complex and released into haemolymph. Recent studies are focused on application of pyrokinins as biopesticides in the regulation of insect pests growth and development.

Agnieszka Belter<sup>1,2</sup>

Małgorzata Giel-Pietraszuk<sup>1</sup>

Stefan Oziewicz<sup>3</sup>

Piotr Chomczyński<sup>4</sup>

Jan Barciszewski<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup>AdvaChemLab, Poznań

<sup>3</sup>Cinna - Produkty Zdrowia, Pobiedziska

<sup>4</sup>Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA

✉ Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; tel.: (61) 852 83 98, e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

Artykuł otrzymano 19 stycznia 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 8 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** likopen, nowotwory, karotenoidy, choroby układu krążenia

**Wykaz skrótów:** ADME (ang. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) – wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, eliminacja; ARS (ang. *autonomously replicating sequence*) – sekwencja autonomicznej replikacji; CCD (ang. *carotenoid cleavage dioxygenase*) – dioksygenaza karotenoidów; CI (ang. *confidence interval*) – przedział ufności; CMO1 (ang. *β-carotene-15,15'-monooxygenase*) – monoooksygenaza 15,15'-β-karotenu; CMO2 (ang. *carotene-9',10'-monooxygenase*) – monoooksygenaza 9',10'-β-karotenu; LDL (ang. *low density lipoproteins*) – lipoproteiny o małej gęstości; OR (ang. *odds ratio*) – iloraz szans; PDGF-BB (ang. *platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

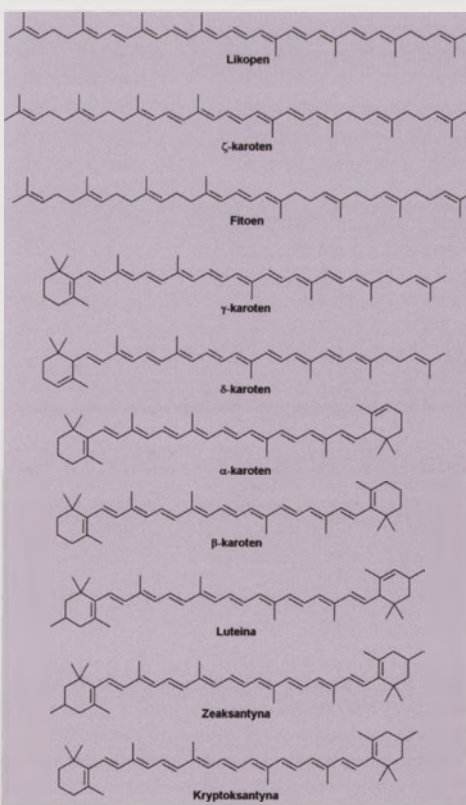
## STRESZCZENIE

Likopen występuje w dużych ilościach w owocach pomidora oraz produktach ich przetwarzania. Charakteryzuje się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Ponadto likopen zaangażowany jest w regulację cyklu komórkowego oraz indukcję programowanej śmierci komórki. Związek ten coraz częściej traktowany jest nie tylko jako suplement diety, ale również jako potencjalny lek. Dieta bogata w likopen wpływa korzystnie na zdrowie oraz zapobiega rozwojowi szeregu chorób, w tym nowotworów.

## WPROWADZENIE

Wraz z rosnącą skalą problemów zdrowotnych wzrasta zainteresowanie i zapotrzebowanie na nowe, nieinwazyjne sposoby leczenia oparte na produktach naturalnych o określonych właściwościach. Od wielu lat znajdują one zastosowanie w terapii i mogą być alternatywą lub uzupełnieniem dla stosowanych obecnie leków syntetycznych. W 1873 roku wyodrębniono związek nadający czerwoną barwę owocom przełaja pospolitego (*Tamus communis*). Dwa lata później Pierre-Marie-Alexis Millardet wyizolowała go z pomidorów (*Lycopersicon esculentum* L.), a następnie otrzymała jego kryształy zawierające jednak również inne karotenoidy. Pierwsze kryształy czystego likopenu uzyskał Edward Schunck [1].

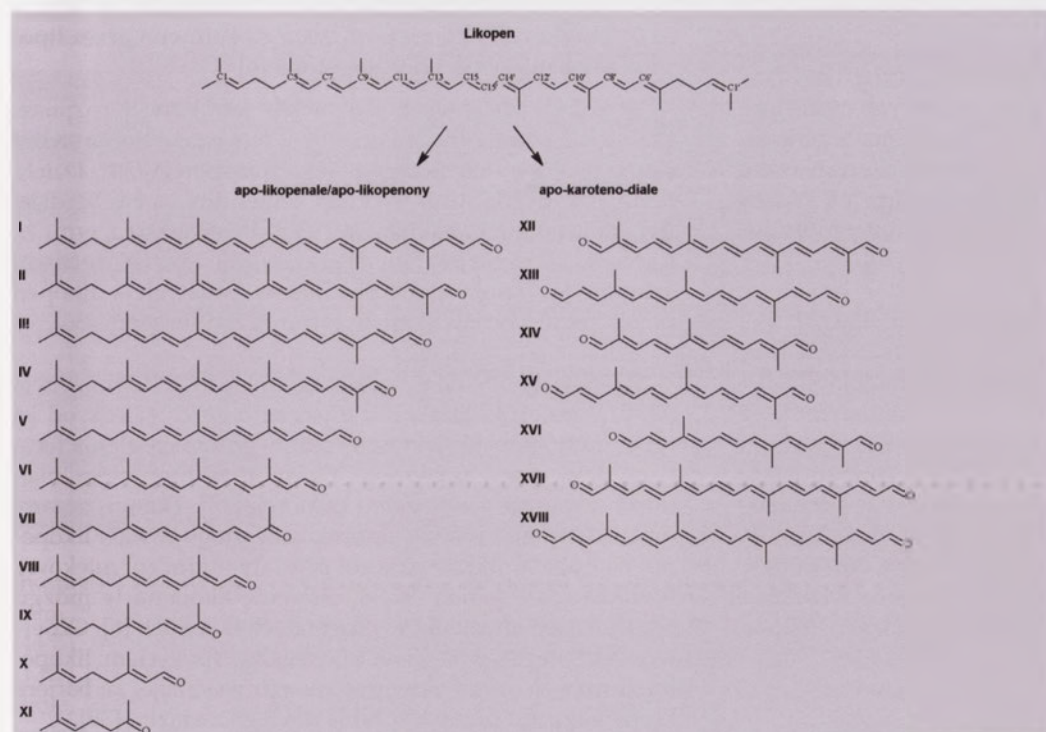
Likopen jest alkenem o wzorze sumarycznym  $C_{30}H_{56}$  (IUPAC: 2,6,10,14,19,23,27,31-oktametylo-dotriakonta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridekaen) syntetyzowanym przez rośliny oraz bakterie autotroficzne [1]. W odróżnieniu od większości karotenoidów ma strukturę liniową. 13 wiązań podwójnych, z czego 11 sprzężonych tworzy układ niezwykle efektywnie usuwający wolne rodniki (Ryc. 1) [1]. Likopen ulega rozpadowi m.in. na skutek promieniowania X i UV, w obecności tlenu oraz jonów metali [2]. Czas połowicznego rozpadu w mieszaninie eteru metylo-tert-butyłowego i acetonitrylu (1:1, v/v) bez dostępu światła i powietrza oraz temperaturze 4°C wynosi 16 godzin, w wodzie w 30°C i w obecności azotu 5,5 godziny, a w obecności tlenu – 1,7 godziny [2]. Pod wpływem silnych utleniaczy, m.in. nadmanganianu potasu oraz ozonu, następuje utlenienie jednego ze sprzężonych wiązań podwójnych likopenu, rozpad i powstanie apo-likopenalu lub apo-likopenonu posiadających na jednym z końców odpowiednio grupę aldehydową lub ketonową. W wyniku wieloetapowego rozpadu likopenu powstają także apo-karoteno-diole posiadające grupę aldehydową na obu końcach cząsteczki (Ryc. 2) [3,4].



Rycina 1. Wzory strukturalne głównych karotenoidów.

Likopen jest związkiem hydrofobowym. Dobrze rozpuszcza się w heksanie, benzenie, chloroformie, acetonie oraz eterze, słabiej

Likopen jest związkiem hydrofobowym. Dobrze rozpuszcza się w heksanie, benzenie, chloroformie, acetonie oraz eterze, słabiej



**Rycina 2.** Likopen oraz produkty jego utleniania; apo-likopenale i apo-likopenony: I – apo-6'-likopenal, II – apo-8'-likopenal, III – apo-10'-likopenal, IV – apo-12'-likopenal, V – apo-14'-likopenal, VI – apo-15-likopenal, VII – apo-13-likopenon, VIII – apo-11-likopenal, IX – apo-9-likopenon, X – apo-7-likopenon, XI – apo-5-likopenon oraz likopenone-diale: XII – apo-8,8'-karoteno-dial, XIII – apo-6,10'-karoteno-dial, XIV – apo-8,12'-karoteno-dial, XV – apo-6,12'-karoteno-dial, XVI – apo-10,8'-karoteno-dial, XVII – apo-8,6'-karoteno-dial, XVIII – apo-6,6'-karoteno-dial.

w metanolu i etanolu. Absorbuje promieniowanie w zakresie światła widzialnego o długości fali  $\lambda=444, 470$  oraz  $502$  nm, stąd warunkuje czerwoną barwę owoców oraz innych części roślin bogatych w ten związek [5]. Mimo, że od odkrycia likopenu minęło już ponad 140 lat ciągle odkrywane są jego nowe właściwości.

#### WYDRĘBNIANIE LIKOPENU ORAZ UTRWALANIE PRODUKTÓW BOGATYCH W LIKOPEN

Najpowszechniejszym źródłem likopenu są pomidory zawierające w zależności od odmiany 3,1–7,74 mg tego związku na 100 g owocu [6]. Ponadto występuje on w świeżych owocach papai, guawy, różowego grejfruta, brzoskwini,

**Tabela 1.** Występowanie likopenu w produktach spożywczych [7-10].

Produkt	Stężenie likopenu [mg/100g]*
Pomidor	0,9-11,19 (3,58)
Sok pomidorowy	5,0-42,74 (7,05)
Suszone pomidory	46,5 (ND)
Sos pomidorowy	3,80-49,46 (9,21)
Papaja	2,0-5,3 (2,99)
Arbuz	2,3-7,2 (3,78)
Różowy grejfruit	3,36 (3,35)
Suszona brzoskwinia	0,86 (0,79)

\*Zakres stężeń likopenu w poszczególnych produktach spożywczych, określono w oparciu o cytowane piśmiennictwo. Rozpiętość wartości jest duża i wynika głównie ze zróżnicowania badanych prób oraz różnych metod pomiaru likopenu w tych produktach. W nawiasach podano średnie stężenia likopenu [mg/100g] w produktach dostępnych na polskim rynku. ND – nieoznaczono.

arbuza, dzikiej róży, a także ich przetworach (sokach, pastach, przecierach) (Tab. 1) [7-10].

Ważnym źródłem likopenu są produkty uboczne produkcji przetworów pomidorowych, stosowane do niedawna głównie jako dodatki do pasz [11,12]. Pozyskiwany z tych odpadów likopen stanowi cenny surowiec do produkcji tzw. żywności funkcjonalnej (ang. *functional food*), która zyskuje w ten sposób nowe wartości odżywcze i smakowe [13,14]. Likopen stosowany jest również jako składnik kosmetyków [15].

Likopen otrzymuje się z materiału roślinnego poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi w wysokiej temperaturze, pod zwiększonym ciśnieniem [16-18]. Dodatek cel-

lulaz i pektynaz zwiększa wydajność ekstrakcji likopenu nawet 20 krotnie [19,20]. Jednocześnie wysoka temperatura, a także tlen i kationy metali powodują izomeryzację 7 wiązań podwójnych oraz wzrost zawartości izomerów mono- i poli-*cis* oraz produktów ich utleniania do 6–18% [21,22]. W znacznych ilościach powstaje apo-8'-likopenal, apo-6'-likopenal oraz apo-12'-likopenal, a w mniejszych apo-10'-likopenal oraz apo-14'-likopenal [23]. Rzadko dochodzi do rozpadu wiązania podwójnego C15-C15' [4]. Niesprężone wiązania podwójne znajdujące się przy końcach cząsteczki nie ulegają utlenianiu (Ryc. 2) [24]. Najbardziej korzystna pasteryzacja produktów zawierających likopen przebiega w 121°C przez 40 sekund [25], albo 92°C przez 5 minut, w kilku powtórzeniach oddzielonych interwałami o niższej temperaturze (60°C) [26]. Korzystne jest ograniczenie zawartości wody w produktach poddawanych utrwalaniu [3,21,27]. Przechowywanie w temperaturze 4–35°C, nie wpływa istotnie na zawartość likopenu. Zalecane jest przechowywanie produktów likopenowych w ciemnych naczyniach lub zaciemnionych pomieszczeniach [25].

#### WŁAŚCIWOŚCI

Efekt terapeutyczny likopenu zależy od wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME, ang. *absorption, distribution, metabolism, excretion*). Analiza właściwości ADME oraz parametrów farmakokinetycznych likopenu dała podstawę do określania optymalnej dla człowieka dawki tego związku oraz częstości jego podawania [6].

## WCHŁANIANIE

Likopen dostaje się do organizmu drogą pokarmową. W żołądku oraz dwunastnicy wchodzi w skład tzw. fazy lipidowej, która pod wpływem soli żółciowych oraz lipaz trzustkowych ulega dyspersji [28]. W dwunastnicy powstają wielowarstwowe liposomy, które na drodze transportu biernego ulegają wchłonięciu przez ściany jelita [6]. Wchłanianie likopenu odbywa się również przez transportery karotenoidów znajdujące się w nabłonku jelita [29].

Wchłanianie likopenu przez komórki linii Caco-2 (komórki nowotworu okrężnicy człowieka) jest 2, 3 i 4 razy mniejsze niż luteiny,  $\alpha$ -karotenu oraz  $\beta$ -karotenu [30]. Zależy ono od zawartości tłuszczów w diecie, które stymulując produkcję soli żółciowych zwiększają dyspersję lipidów i tym samym biodostępność likopenu [31]. Dzielne spożycie 5–10 gramów tłuszczów zapewnia optymalne wchłanianie karotenoidów. Z kolei niekorzystny wpływ ma obecność w pokarmie m.in. błonnika, steroli roślinnych oraz statyn. Związki te wiążą likopen uniemożliwiając jego wchłanianie. Obniżają jego stężenia w surowicy nawet o 40% [32].

## DYSTRYBUCJA

Likopen jest transportowany z układu pokarmowego do wątroby w postaci chylomikronów [6]. Tam tworzy kompleksy z lipoproteinami o bardzo małej i małej gęstości, które powracają do krwiobiegu i przenoszą likopen do tkanek organizmu. Jego stężenie we krwi wynosi 0,1–1  $\mu$ M i jest najwyższe u mieszkańców Włoch oraz Grecji (~1  $\mu$ M), mniejsze Japończyków i Irlandczyków (0,1–0,3  $\mu$ M) [11,33]. Jako związek silnie hydrofobowy, likopen znajduje się w

centralnej części lipoprotein [6]. Inne karotenoidy związane są na powierzchni i transportowane są zarówno przez lipoproteiny o małej, jak i dużej gęstości [6].

W solach żółciowych izomer *cis* jest łatwiej rozpuszczalny niż izomer *trans*. Ponadto silniej wiąże lipoproteiny i inne białka uczestniczące w jego transporcie [34]. Dzięki temu jego dystrybucja w organizmie odbywa się bardziej dynamicznie niż *trans*-likopenu [35]. W związku z tym, że forma *cis* likopenu jest łatwiej przyswajalna przez organizm zalecane jest spożywanie produktów bogatych w likopen po uprzedniej obróbce, np. gotowaniu lub suszeniu [36].

Stężenie likopenu w poszczególnych tkankach wynosi 0,2–21,4 nmol/g tkanki i w znacznej mierze zależy od jej typu, diety, przyswajalności, efektywności wydalania likopenu oraz różnej aktywności receptorów lipoprotein znajdujących się na powierzchni komórek [37]. Tkanki/organy można uszeregować wg stężenia zawartego w nich likopenu: wątroba > płuca > gruczoł prostaty > gruczoł mlekowy > nadnercza > jajniki [37,38]. Stężenie likopenu w mózgu jest znacząco niższe niż w pozostałych tkankach [6]. Obserwowana, negatywna korelacja między spożyciem likopenu, a rozwojem nowotworów mózgu wskazuje, że bariera krew-mózg jest przepuszczalna dla tego związku [39].

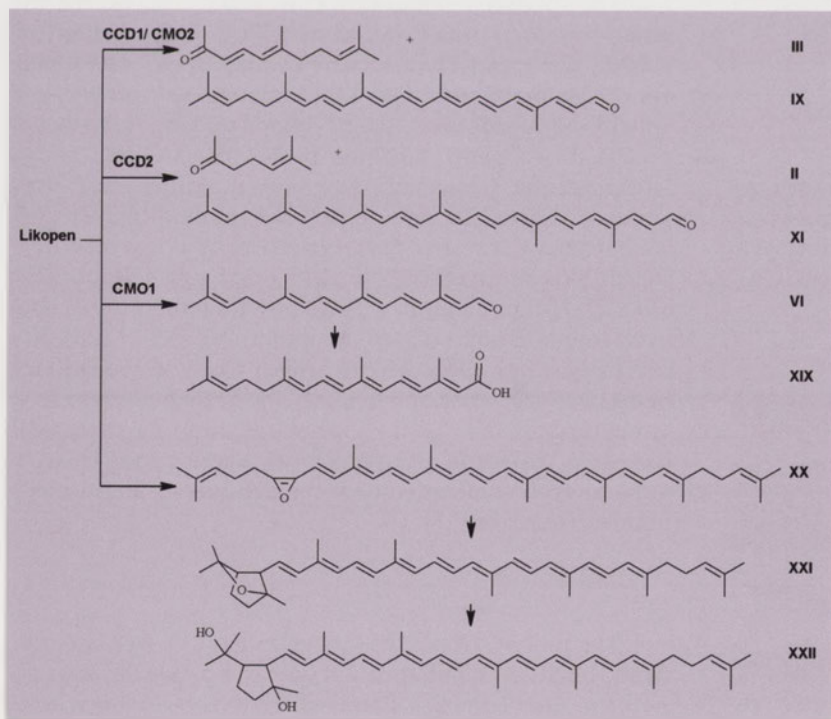
## METABOLIZM

W przewodzie pokarmowym, głównie pod wpływem niskiego pH soku żołądkowego następuje izomeryzacja oraz utlenianie likopenu [40]. Po podaniu szczurom [ $^{14}$ C]likopenu obserwowano produkty jego rozkładu: [ $^{14}$ C]apo-8'-likopenal oraz [ $^{14}$ C]apo-12'-likopenal [41]. W metabolizmie

likopenu udział biorą dioksygenazy karotenoidów (CCD, ang. *carotenoid cleavage dioxygenase*) CCD1 oraz CCD7 uczestniczące w rozpadzie  $\beta$ -karotenu [42]. CCD1 katalizuje rozerwanie wiązań C5'-C6' i C9'-C10' [43], a CCD7 wiązania C9'-C10' (Fig. 3) [42]. Inny enzym ssaków, monooksygenaza 15,15'- $\beta$ -karotenu (CMO1, ang.  *$\beta$ -carotene-15,15'-monooxygenase*), uczestniczący w przemianach  $\beta$ -karotenu, katalizuje rozerwanie wiązania podwójnego znajdującego się w centralnej części cząsteczki  $\beta$ -karotenu i likopenu. W efekcie powstaje: retinol i apo-15-likopenal (VI), (Ryc. 3) [44]. Inne białko, monooksygenaza 9',10'- $\beta$ -karotenu (CMO2, ang. *carotene-9',10'-monooxygenase*) katalizuje rozpad *trans*- $\beta$ -karotenu oraz *cis*-likopenu tworząc apo-10'-karotenoidy [44]. Warunkiem koniecznym tej reakcji jest izomeryzacja *trans*-likopenu do izomeru *cis* przy węglu 5 lub 13 cząsteczki. Przypuszcza się, że izomery *cis* na końcach przyjmują strukturę przypominającą pierścień  $\beta$ -karotenu, co umożliwia ich wpasowanie do centrum aktywnego enzymu [44,45].

## WYDALANIE

Likopen oraz jego pochodne wykazują silną tendencję do kumulacji w tkankach [46]. Po 96 godzinach od jego podania aż 24% spożytego



Rycina 3. Produkty enzymatycznego rozpadu likopenu: II – apo-8'-likopenal, III – apo-10'-likopenal, VI – apo-15-likopenal, IX – apo-9-likopenon, XI – apo-5-likopenon, XIX – kwas apo-15-likopenowy, XX – 5-epoksyd likopenu, XXI – 2,6-cyklolikopenylo-1,5-epoksyd, XXII – 2,5-cyklolikopene-1,5-diol. CCD1 – dioksygenaza karotenoidów 1, CMO2 – monooksygenaza 9',10'- $\beta$ -karotenu, CCD2 – dioksygenaza karotenoidów 2, CMO1 – oksygenaza 15,15'- $\beta$ -karotenu.

**Tabela 2.** Reakcje wolnych rodników z likopenem oraz rodników likopenu z innymi antyoksydantami.

A	likopen + R → R-likopen
B	likopen + R → likopen <sup>•</sup> + R
C	likopen + R → likopen + RH
D	NO <sub>2</sub> + likopen → NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> + likopen <sup>•</sup>
E	CCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> + likopen → [CCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -likopen] → CCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>•</sup> + likopen <sup>•</sup>
F	Likopen + O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ↔ likopen <sup>•</sup> + O
G	likopen + ROO → ROO-likopen
H	ROO-likopen + O <sub>2</sub> → ROO-likopen-OO
I	ROO-likopen-OO + RH → ROO-likopen-OOH + R
J	R + O <sub>2</sub> → ROO
K	ROO-likopen-OO + ROO → obojętne produkty
L	Likopen + TOH <sup>•</sup> → likopen <sup>•</sup> + TOH
Ł	Likopen <sup>•</sup> + ASCH <sub>2</sub> → likopen + ASCH + H <sup>•</sup>
M	Likopen <sup>•</sup> + ASCH <sup>•</sup> → likopen + ASCH + H <sup>•</sup>
N	Likopen <sup>•</sup> + α-TOH → likopen + α-TO

likopenu pozostaje w organizmie [47]. W badaniach z użyciem <sup>14</sup>C likopenu wykazano, że jest on wydalany z moczem (44%), z solami żółciowymi (20%) oraz przez ewaporację (13%) [47]. Produkty jego ulnienia, 2,6-cyklolikopeno-1,5-diole, występują również w mleku oraz surowicy karmiących matek [48].

## WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE

### USUWANIE WOLNYCH RODNIKÓW

Reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), rodnik hydroksylowy (OH<sup>•</sup>), nadtlenkowy (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>), alkilowy (RO<sup>•</sup>) oraz tlen singletowy, ozon (O<sub>3</sub>) oraz nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) są ważnymi naturalnymi elementami szlaku przekazu sygnałów w komórce. Zaburzenie mechanizmów ich neutralizacji jest przyczyną stresu oksydacyjnego uważanego za podłoże szeregu chorób. ROS powodują modyfikacje DNA, lipidów oraz białek, a także rozregulowują cykl komórkowy [49]. Likopen w reakcji z wolnymi rodnikami może pełnić funkcję donora protonów, przy czym sam staje się rodnikiem (Tab. 2) [28].

Efektywność usuwania wolnych rodników przez karotenoidy zależy od liczby sprzężonych wiązań podwójnych w cząsteczce [50]. Likopen neutralizuje wolne rodniki dwa razy wydajniej niż β-karoten i dziesięć razy niż α-tokoferol [28,51]. Odbywa się to na drodze addycji rodnika (Tab. 2A), przeniesienia elektronu (Tab. 2B) lub oderwania wodoru (Tab. 2C). W reakcji rodnika azotanowego (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) oraz trichlorometyloperoksydowego (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>•</sup>) z likopenem powstaje kationorodnik likopenowy, a w wyniku reakcji z rodnikiem nadtlenkowym (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) anionorodnik likopenowy (Tab. 2D, F) [52].

Wolne rodniki oddziałują z wiązaniem podwójnym w centralnej części likopenu. Powstający R-likopen jest stosunkowo stabilny co umożliwia przyłączenie kolejnego rodnika. Rodnik peroksydowy (ROO<sup>•</sup>) reaguje z likopenem tworząc ROO-likopen [53]. W wyniku reakcji ROO-likopenu z tlenem cząsteczkowym powstaje ROO-likopen-OO, który łącząc się z rodnikiem peroksydowym może tworzyć obojęt-

ne (niereaktywne) produkty. Powstający w obecności dużej koncentracji O<sub>2</sub> ROO-likopen-OO powoduje peroksydację lipidów (RH) oraz syntezę nowych rodników peroksydowych (Tab. 2D-K) [28,54].

Likopen wykazuje silne powinowactwo do błon komórkowych zwiększając ich płynność i przepuszczalność, co pośrednio aktywuje szlaki odpowiedzi antyoksydacyjnej w komórce [55]. Chroni zatem bezpośrednio lipidy błony komórkowej przed reakcją z wolnymi rodnikami, a w cytosolu powoduje neutralizację rodników przy współdziałaniu innych antyoksydantów. Likopen zwiększa efektywność usuwania wolnych rodników przez witaminy C i E oraz β-karoten [56]. Uczestniczy także w neutralizacji rodników tokoferolowych (TOH<sup>•</sup>), czemu towarzyszy utworzenie kationorodników likopenowych (likopen<sup>•</sup>), których powrót do stanu podstawowego przebiega w obecności witaminy C, bądź α-tokoferolu (α-TOH) (Tab. 2L-N) [28].

### INDUKCJA SZLAKÓW ODPOWIEDZI NA STRES OKSYDACYJNY

W odpowiedzi na stres oksydacyjny, likopen oprócz neutralizacji wolnych rodników aktywuje ekspresję genów kodujących m.in. oksygenazę hemową 1 (HO-1), oksydoreduktazę NAD(P)H:ubichinon (NQO1), S-transferazę glutationową (GSTs), reduktazę glutationową (GSR), ligazę glutationowo-cysteinową (GCL), mitochondrialną hydrolazę epoksydową typu 1 (mEH-1), UDP-glukuronylotransferazę [57]. Ich ekspresja zależy od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (Nrf2, ang. *NF-E2-related factor*) wiążącego się do sekwencji odpowiedzi na przeciwutleniacze (ARE, ang. *antioxidant response elements*) znajdujący się w rejonie oskrzydłającym przy końcu 5' wspomnianych genów [58]. Czynniki Nrf2 występuje głównie w cytoplazmie w postaci kompleksu z białkiem sensorowym Keap1 (ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Wzrost stężenia likopenu w komórce powoduje rozpad kompleksów Nrf2-Keap1 oraz translokację czynnika Nrf2 do jądra, gdzie wiążąc się do sekwencji autonomicznej replikacji (ARS, ang. *autonomously replicating sequence*) indukuje ekspresję enzymów neutralizujących wolne rodniki i toksyny [58]. Podobne właściwości wykazują produkty rozpadu likopenu, jak apo-10'-likopenal, apo-10'-likopenol oraz kwas apo-10'-likopenowy [58]. Likopen, za pośrednictwem ARS, wpływa na ekspresję genów odpowiedzi antyoksydacyjnej w nabłonkowych komórkach pęcherzyków płucnych [58].

### REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO

Likopen hamuje ekspresję cyklin D i E oraz powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub> [6]. Obserwowano to w ludzkich komórkach wątroby (Hep3B), nowotworu prostaty (LNCaP), raka piersi (MCF-7), macicy (ECC-1), jelita (HCC), komórkach nowotworu prostaty szczura (AT3) oraz w badaniach *in vivo* na myszach [6]. Niedobór cykliny E, dodatkowo zwiększa ekspresję białek p21 i p27 uniemożliwiając komórkom przejście cyklu z fazy G<sub>1</sub> do S [6].

### APOPTOZA

Eliminacja komórek uszkodzonych oraz zainfekowanych z organizmu odbywa się na drodze apoptozy, której zabu-

Tabela 3. Badania epidemiologiczne potwierdzające negatywną korelację między spożyciem pomidorów, jego przetworów i likopenu oraz jego stężeniem w surowicy a ryzykiem rozwoju raka prostaty.

Chorzy/ grupa kontrolna	Surowe pomidory		Produkty bogate w likopen <sup>1</sup>		Likopen		Stężenie w surowicy [µg/dl]	OR, CI = 95% Wszystkie przypadki	OR, CI = 95% Ciężkie przypadki	Piśmiennictwo
	Spożycie *[g/dzień]; **[sztuk/tydzień]	OR, CI = 95%	Dzienne spożycie [g]	OR, CI = 95%	Dzienne spożycie [µg]	OR, CI = 95%				
Badania kliniczno-kontrolne										
	<9,3*	1,00								
617/636	9,3-45,5	0,77								[77]
	45,5-109,6	0,78								
	>109,6	0,64								
317/480			<18,7	1,00	<662	1,00				[78]
			18,7-39,0	0,97	662-1212	0,77				
			39,1-64,2	0,85	1213-1994	0,86				
			>64,2	0,82	>1994	0,76				
65/132					<1458,21	1,00	<10,6	1,00		[79]
					1458,21-2370,58	1,14	10,61-14,77	0,64		
					2370,59-3450,01	0,91	14,78-21,52	0,29		
					>3450,01	0,69	>21,52	0,17		
209/228							0,5-10,7	1,00	1,00	[80]
							10,8-17,1	0,97	0,93	
							17,2-24,7	0,74	0,79	
							24,8-57,4	0,65	0,37	
Badania kohortowe										
180/1400	<1**	1,00								[81]
	1-4	0,62								
	>4	0,57								
578/1294							<26,17	1,00	1,00	[83]
							26,171-35,36	0,89	0,64	
							35,361-44,29	0,90	0,71	
							44,291-58,01	0,87	0,70	
							>58,01	0,75	0,56	
182/364							<21,7	1,00	1,00	[83]
							21,71-31,1	0,86	0,86	
							31,11-41,1	0,74	0,74	
							41,11-54,9	0,96	0,96	
							>54,9	0,83	0,83	
142/284							<24,3	1,00	1,00	[83]
							24,31-38,2	0,88	0,88	
							38,21-48,8	0,77	0,77	
							48,81-62,8	0,83	0,83	
							>62,8	0,79	0,79	

<sup>1</sup>Gotowane pomidory, sok pomidorowy, zupa pomidorowa, sos pomidorowy, lizania, spaghetti



rzenie może powodować inicjację procesu nowotworzenia. Likopen selektywnie aktywuje proces apoptozy, w zależności od rodzaju komórek [59]. W komórkach nowotworu prostaty (LNCaP) obserwowano inicjację apoptozy już przy stężeniu 10 nM. W ludzkich komórkach nowotworu jelita (HuCC) oraz chłoniaka Burkitt'a (Raji cells) efektywne stężenie likopenu wynosi odpowiednio 2-4  $\mu\text{M}$  i 2  $\mu\text{M}$  [60]. Natomiast ludzkie komórki linii chronicznej białaczki (EHEB) oraz białaczki erytroblastycznej (K562) były obojętne względem 4  $\mu\text{M}$  likopenu [61].

#### HAMOWANIE ANGIOGENEZY I METASTAZY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Częstość podziałów, inwazyjność oraz metastaza komórek nowotworowych zależy od płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF-BB, ang. *platelet-derived growth factor*), który może być dobrym celem dla terapii antynowotworowej [61]. Badając wpływ likopenu na rozwój fibroblastów ludzkich Hs68 oraz ludzkich komórek czerniaka A2058 stwierdzono, że hamuje on migrację komórek zależną od PDGF-BB [62]. Likopen wiąże się do PDGF-BB w surowicy, co dodatkowo zwiększa jego potencjał antynowotworowy. Ponadto obniża aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, a w konsekwencji hamuje adhezję oraz metastazę bardzo inwazyjnych komórek nowotworu wątroby (SK-Hep-1) [61,62].

#### WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE PRODUKTÓW ROZPADU LIKOPENU

Apo-10'-likopen (III) oraz jego pochodne: kwas apo-10'-likopenowy (VI) i apo-10'-likopenal (IX) mają właściwości podobne do likopenu (Ryc. 3). Dowiedziono, że kwas apo-10'-likopenowy (VI) hamuje proliferację komórek raka płuc [63]. Powoduje również obniżenie ekspresji cykliny E, a w konsekwencji zahamowanie syntezy DNA i zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 [63]. Indukuje ekspresję białek p21 i p27 hamujących cykl komórkowy w fazie G1. Kwas apo-10'-likopenowy hamuje rozwój nowotworu płuc u myszy, poddanych uprzednio działaniu 4-(N-metylo-N-nitrozamino)-1-(3-pyrydylo)-1-butanonu [63]. Właściwości przeciwnowotworowe wykazuje również 2,5-cyklolikopeno-1,5-diol (XXII), będący produktem rozpadu 2,6-cyklolikopenylo-1,5-epoksydu (XXI) (Fig. 3). Związek ten stymuluje ekspresję koneksyny 43 uczestniczącej w tworzeniu połączeń między komórkami, które warunkują prawidłową komunikację, regulację wzrostu, proliferację oraz apoptozę. Spadek ekspresji koneksyny 43, typowy dla komórek nowotworowych, obniża siłę oddziaływań między sąsiadującymi komórkami. 2,7,11-trimetylo-tetradekaheksano-1,4-diol (XII), produkt rozkładu wiązań podwójnych likopenu C5-C6 oraz C12'-C11' także stymuluje syntezę koneksyny 43 [64]. W wyniku rozpadu wiązania C15-C15' likopenu z udziałem CMO1, a następnie utleniania powstającego apo-15-likopenalu (VI) w obecności cytozolowych lub mikrosomalnych dehydrogenaz retinalu powstaje kwas acykloretinolowy [27]. Podobnie jak kwas retinowy aktywuje on promotor RAR $\beta$ , genu supresji nowotworów [65].

#### PROZDROWOTNE DZIAŁANIE LIKOPENU

Pierwsze doniesienia na temat korzystnego wpływu likopenu na zdrowie pojawiły się już ponad 50 lat temu [66]. Za-

obserwowano korelacje między ilością podawanego likopenu, a odpornością na infekcje bakteryjne oraz zachorowalnością na nowotwory jamy brzusznej napromieniowanych zwierząt [66]. Spostrzeżenia te dały początek badaniom na liniach komórkowych, zwierzętach oraz badaniom epidemiologicznym na ludziach, które potwierdziły prozdrowotne działanie likopenu [66].

#### CHOROBY NOWOTWOROWE

Wykazano, że likopen w stężeniu 1-4  $\mu\text{M}$  chroni komórki przed uszkodzeniami, obniża ryzyko zachorowania na raka prostaty, płuc, piersi, nowotwory układu pokarmowego oraz białaczkę, a w stężeniu dziesięć razy wyższym, także raka wątroby i jajnika [67]. Przy stężeniu 20-60  $\mu\text{M}$  hamuje proliferację komórek i aktywuje ich apoptozę [68]. Ponadto ogranicza podziały komórek raka jelita, ostrej białaczki szpikowej, białaczki erytroblastycznej oraz chłoniaka typu Burkitta [67,69]. Uważa się, że osiągnięcie efektu terapeutycznego zależy od akumulacji likopenu w poszczególnych komórkach [67].

Wyniki badań epidemiologicznych nie są jednoznaczne. W wielu pracach wskazuje się na silną korelację między spożyciem likopenu oraz produktów bogatych w ten związek, a zachorowalnością na nowotwory, szczególnie prostaty [66-70]. W innych badaniach dotyczących również raka prostaty a także żołądka oraz piersi, zależność ta nie została w pełni potwierdzona [6,71-77]. Wydaje się, że powodem rozbieżności wyników może być złożoność testów stosowanych w badaniach oraz duża liczba zmiennych wpływających na ich rezultaty [78]. Meta analiza wyników epidemiologicznych pozwoliła wybrać te wyniki, w których precyzyjnie zdefiniowano źródła likopenu, prawidłowo dobrano grupy badane i kontrolne oraz przedstawiono wartości istotne statystycznie [79]. Ich zestawienie wskazuje na pozytywną korelację między stężeniem likopenu w surowicy krwi, a zachorowalnością na raka (Tab. 3). Wyższe stężenie likopenu we krwi stwierdzano u osób spożywających przetworzone pomidory. Jest to związane z faktem, że w produktach poddanych obróbce termicznej wzrasta ilość *cis*-likopenu [80-84]. Ryzyko rozwoju nowotworu prostaty w grupie osób, u których stężenie likopenu w surowicy mięsici się w przedziale 24,8-57,4  $\mu\text{g}/\text{dl}$  jest o 45% niższe niż u osób ze stężeniem 0,5-10,7  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . W ciężkiej postaci raka jest ono niższe nawet o 63% [83]. Zależności takiej nie obserwuje się dla innych karotenoidów, co wskazuje na specyficzność i skuteczność działania likopenu [85,86].

#### CHOROBY UKŁADU KRĄŻENIA

Przyczyną większości tych chorób jest wysokie stężenie w osoczu lipoprotein o małej gęstości (LDL, ang. *low density lipoproteins*) oraz wysoki stopień utlenienia LDL, który koreluje z zapadalnością m.in. na arteriosklerozę oraz zawał serca [11]. Wysokie spożycie likopenu zmniejsza ryzyko rozwoju chorób układu krążenia. W grupie osób z dietą bogatą w likopen, obserwuje się wolniejsze odkładanie płytek miażdżycowych w naczyniach [87]. Likopen powoduje również obniżenie ciśnienia krwi u pacjentów z nadciśnieniem [87]. Przyjmuje się, że ochronne działanie likopenu na układ krążenia jest efektem ograniczenia peroksydacji lipi-

dów oraz oksydacji lipoprotein o małej gęstości [87]. W badaniach epidemiologicznych, w grupie osób z najwyższym stężeniem likopenu w surowicy (>0,62 µg/g) obserwowano niższe o 46% ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego niż u osób ze stężeniem likopenu w surowicy <0,11 µg/g [88].

## PODSUMOWANIE

Od pierwszych sugestii o pozytywnym wpływie likopenu na zdrowie minęło już ponad pięćdziesiąt lat. Badania na liniach komórkowych i zwierzętach potwierdzają ochronne działanie tego związku przed chorobami nowotworowymi, metabolicznymi, układu krążenia oraz układu nerwowego. W badaniach epidemiologicznych wykazano negatywną korelację między dietą bogatą w likopen, a ryzykiem rozwoju raka prostaty. Zachorowalność na nowotwory osób będących na diecie bogatej w pomidory i jego przetwory jest średnio o 30–40% niższa niż w grupie kontrolnej. Rosnąca liczba dowodów wskazujących na korzystne dla zdrowia działanie likopenu sprawia, że produkty zawierające ten związek cieszą się coraz większym zainteresowaniem.

## PIŚMIENNICTWO

1. Britton G (1995) Carotenoids 1: structure and properties of carotenoids in relation to function. FESEB J 9: 1551-1558
2. Henry LK, Pspitasari-Nienaber NL, Jaren-Galan J, van Breemen RB, Catignani GI, Schwartz SJ (2000) Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. J Agric Food Chem 48: 5008-5013
3. Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M, Bohm V (2003) Cleavage products of lycopene produced by *in vitro* oxidations: characterization and mechanisms of formation. J Agric Food Chem 51: 7318-7325
4. Kopec RE, Riedel KM, Harrison EH, Curley RWJ, Hruszkewycz DP, Clinton SK, Schwartz SJ (2010) Identification and quantification of apo-lycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. J Agric Food Chem 48: 3290-3296
5. Miller ES, Mackinnney G, Zscheile FP (1935) Absorption spectra of alpha and beta carotenes and lycopene. Plant Physiol 10: 375-381
6. Clinton SK (1998) Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. Nutr Rev 56: 35-51
7. Bohm V, Frohlich K, Bitsch R (2003) Rosehips – a “new” source of lycopene? Mol Aspects Med 24: 385-389
8. Wawrzyniak A, Marciniak A, Rajewska J (2005) Lycopene content of selected foods available on the Polish market and estimation of its intake. Pol J Food Nutr Sci 14: 195-200
9. Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E (1993) Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. J Am Diet Assoc 93: 284-296
10. Markovic K, Hruskar M, Vahcic N (2006) Lycopene content of tomato products and their contribution to the lycopene intake of Croatsians. Nutr Res 26: 556-560
11. Kong K-W, Khoo H-E, Prasad KN, Ismail A, Tan Ch-P, Rajab NF (2010) Revealing the power of the natural red pigment lycopene. Molecules 15: 959-987
12. Al-Wnadawi H, Abdul-Rahman M, Al-Shaikhly K (1985) Tomato processing wastes as essential raw materials source. J Agric Food Chem 33: 804-807
13. Calvo MM, Garcia ML, Selgas MD (2008) Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. Meat Sci 80: 167-172
14. Benakmoum A, Abbeddou S, Ammouche A, Kefalas P, Gerasopoulos D (2008) Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. Food Chem 110: 684-690
15. Chiu YT, Chiu CP, Chien JT, Ho GH, Yang J, Chen BH (2007) Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly( $\gamma$ -glutamic acid) as carrier. J Agric Food Chem 55: 5123-5130
16. Jun X (2006) Application of high hydrostatic pressure processing of food to extracting lycopene from tomato paste waste. High Pressure Res 29: 736-739
17. Naviglio D, Caruso T, Iannece P, Aragon A, Santini A (2008) Characterization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach. J Agric Food Chem 56: 6227-6231
18. Naviglio D, Pizzolongo F, Ferrara I, Naviglio B, Aragon A, Santini A (2008) Extraction of pure lycopene from industrial tomato waste in water using the extractor Naviglio. Afr J Food Sci 2: 37-44
19. Lavecchia R, Zuorro A (2008) Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degradation enzymes. Eur Food Res Technol 228: 153-158
20. Stahl W, Sies H (2007) Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. Mol Biotechnol 37: 26-30
21. Goula AM, Adamopoulos KG, Chatzidakis PC, Nikas VA (2006) Prediction of lycopene degradation during a drying process of tomato pulp. J Food Eng 74: 37-46
22. Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, Applegate LA, Offord EA (2002) A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. J Nutr 132: 404-408
23. Shi J, Le Maguer M, Kakuda Y, Liptay A, Niekamp F (1999) Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. Food Res Int 32: 15-21
24. Gartner C, Stahl W, Sies H (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. Am J Clin Nutr 66: 116-122
25. Lin CH, Chen BH (2005) Stability of carotenoids in tomato juice during processing. Eur Food Res Technol 221: 274-280
26. Hsu KC (2008) Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. LWT-Food Sci Technol 41: 450-459
27. Kim S-J, Nara E, Kobayashi H, Terao J, Nagao A (2001) Formation of cleavage products by autooxidation of lycopene. Lipids 36: 191-200
28. Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol Aspects Med 26: 459-516
29. During A, Harrison EH (2004) Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: Insights from cell culture. Arch Biochem Biophys 430: 77-88
30. During A, Harrison EH (2005) An *in vitro* model to study the intestinal absorption of carotenoids. Food Res Int 38: 1001-1008
31. Stahl W, Sies H (1992) Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. J Nutr 122: 2161-2166
32. Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G (1999) Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. J Nutr 129: 2170-2176
33. Al-Delaimy WK, Van Kappel AL, Ferrari P, Slimani N, Steghens J-P, Bingham S, Johansson I, Wallstrom P, Overvad K, Tjonneland A, Key TJ, Welch AA, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PHM, Boeing H, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Guibout C, Navarro C, Quiro JR, Palli D, Celentano E, Trichopoulou A, Benetou V, Kaaks R, Riboli E (2004) Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: Report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). Publ Health Nutr 7: 713-722
34. Boileau TW-M, Boileau AC, Erdman JW (2002) Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. Exp Biol Med 227: 914-919
35. Failla ML, Chitchumroonchokchai C, Ishida BK (2008) *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. J Nutr 138: 482-486
36. Unlu NZ, Bohn TM, Francis DM, Nagaraja HN, Clinton SK, Schwartz SJ (2007) Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. Br J Nutr 98: 140-146

37. Goralczyk R, Siler U (2004) The role of lycopene in human health, W: Bao Y, Fenwick R (red) *Phytochemicals in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc, New York, USA, str. 255-275
38. Erdman JW (2005) How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene? *J Nutr* 135: 2046S-2047S
39. Sinclair AJ, Bayer AJ, Johnston J, Warner C, Mawxell SR (1998) Altered plasma antioxidant status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Geriatric Psychiatry* 13: 840-845
40. Re R, Fraser PD, Long M, Bramley PM, Rice-Evans C (2001) Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 576-581
41. Gajic M, Zaripheh S, Sun F, Erdman JW Jr (2006) Apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal are metabolic products of lycopene in rat liver. *J Nutr* 136: 1552-1557
42. Schwartz SH, Qin X, Loewen MC (2004) The biochemical characterization of two karotenoid cleavage enzymes from arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibit lateral branching. *J Biol Chem* 279: 46940-46945
43. Vogel JT, Tan B, Mccarty DR, Klee HJ (2008) The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J Biol Chem* 283: 11364-11373
44. Hu K-Q, Lu Ch, Ernst H, Krinsky NI, Russell RM, Wang X-D (2006) The biochemical characterization of ferret carotene-9',10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 281: 19327-19338
45. Lindqvist A, He YG, Andersson S (2005) Cell type-specific expression of  $\beta$ -carotene 9',10'-monooxygenase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 53: 1403-1412
46. Zaripheh S, Boileau T, Lila M, Erdman J (2003) [<sup>14</sup>C]-Lycopene and [<sup>14</sup>C]-labelled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats pre-fed lycopene. *J Nutr* 133: 4189-4195
47. Wendt G, Bausch J (1996) <sup>14</sup>C-Lycopene: absorption, distribution and excretion after single oral administration to untreated and pretreated rats and to bile-duct cannulated rats (Study performed at RCC, Itingen). Roche Research Report No. B-106'828
48. Khachik F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* 69: 1873-1881
49. Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44: 479-496
50. Fund WCR (1997) Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research
51. Ukai N, Lu Y, Etoh H (1994) Photosensitized oxygenation of lycopene. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1718-1719
52. Mortensen A, Skibsted LH (1998) Reactivity of  $\beta$ -carotene towards peroxy radicals studied by laser flash and steady-state photolysis. *FEBS Lett* 426: 392-396
53. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Philip DM, Truscott TG, Young AJ (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant or pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430: 37-48
54. Kiokias S, Gordon MH (2004) Antioxidant properties of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *Food Rev Int* 20: 99-121
55. Young AJ, Lowe GM (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385: 20-27
56. Liu D, Shi J, Colina Ibarra A, Kakuda Y, Jun Xue S (2008) The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Sci Technol* 41: 1344-1349
57. Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J (2000) Dose-dependent effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 154: 201-210
58. Lian F, Wang X-D (2008) Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer* 123: 1262-1268
59. Ivanov NI, Cowell SP, Brown P, Rennie PS, Guns ES, Cox ME (2007) Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgen-responsive and -independent prostate cancer cell lines. *Clin Nutr* 26: 252-263
60. Fornelli F, Leone A, Verdesca I, Minervini F, Zacheo G (2007) The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol In Vitro* 21: 217-223
61. Hwang ES, Lee HJ (2006) Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med* 231: 322-327
62. Chiang HS, Wu WB, Fang JY, Chen DF, Huang CC, Chen YT, Hung CF (2007) Lycopene inhibits PDGF-BB-induced signaling and migration in human dermal fibroblasts through interaction with PDGF-BB. *Life Sci* 81: 1509-1517
63. Lian F, Smith DE, Ernst H, Russell RM, Wang X-D (2007) Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth *in vitro*, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model *in vivo*. *Carcinogenesis* 28: 1567-1574
64. Aust O, Ale-Agha N, Zhang L, Wollersen HM, Sies H, Stahl W (2003) Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chem Toxicol* 41: 1399-1407
65. Kotake-Nara E (2002) Acyclo-retinoic acid induces apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 22: 689-695
66. Lingen C, Ernster L, Lindberg O (1959) The promoting effect of lycopene on the non-specific resistance of animals. *Exp Cell Res* 16: 384-393
67. Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H (2007) Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother* 61: 366-369
68. Mohanty NK, Saxena S, Singh UP, Goyal NK, Arora RP (2005) Lycopene as a chemopreventive agent in the treatment of high-grade prostate intraepithelial neoplasia. *Urol Oncol - Semin Ori* 23: 383-385
69. Burgess LC, Rice E, Fischer T, Seekins JR, Burgess TP, Sticka SJ, Klatt K (2008) Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an *in vitro* system with doses across the physiological range. *Toxicol In Vitro* 22: 1297-1300
70. Giovannucci E (2002) A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med* 227: 852-859
71. Kirsh VA, Mayne ST, Peters U, Chatterjee N, Leitzmann MF, Dixon LB, Urban DA, Crawford ED, Hayes RB (2006) A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 92-98
72. Jatoi A, Burch P, Hillman D, Vanyo JM, Dakhil S, Nickevich D, Rowland K, Morton R, Flynn PJ, Young C, Tan W (2007) A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: Results of a phase II study from the North Central Cancer Treatment Group. *Urology* 69: 289-294
73. Key TJ, Appleby PN, Allen NE, Travis RC, Roddam AW, Jenab M, Egevad L, Tjonneland A, Johnsen NF, Overvad K, Linseisen J, Rohrmann S, Boeing H, Pischon T, Psaltopoulou T, Trichopoulou A, Trichopoulou D, Palli D, Vineis P, Tumino R, Berrino F, Kiemeny LALM, Bueno-De-Mesquita HB, Quiros JR, Gonzalez CA, Martinez C, Larranaga N, Chirlaque MD, Ardanaz E, Stattin P, Hallmans G, Khaw TK, Bingham S, Slimani N, Ferrari P, Rinaldi S, Riboli E (2007) Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Am J Clin Nutr* 86: 672-681
74. Tajoma K, Tominaga S (1985) Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn J Cancer Res* 76: 705-716
75. Ramon JM, Serra L, Cerdo C, Oromi J (1993) Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. *Cancer* 71: 1731-1735
76. Larsson SC, Bergkvist L, Naslund I, Rutegard J, Wolk A (2007) Vitamin A, retinol, and carotenoids and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 85: 497-503

77. Jarvinen R, Knekt P, Seppanen R, Teppo L (1997) Diet and breast cancer risk in a cohort of Finnish women. *Cancer Lett* 114: 251-253
78. Deweerdt S (2011) The omnivore's labyrinth. *Nature* 471: S22-S24
79. Etmnian M, Takkouche B, Caamano-Isorna F (2004) The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 340-345
80. Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P (1999) Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutr Cancer* 34: 173-184
81. Norrish AE, Jackson RT, Sharpe SJ, Skeaff CM (2000) Postate cancer and dietary carotenoids. *Am J Epidemiol* 151: 119-123
82. Lu QY, Hung JC, Heber D, Go VL, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Scher HI, Marshall JR, Zhang ZF (2001) Inverse association between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 749-756
83. Vogt TM, Mayne ST, Graubard BI, Swanson CA, Sowell AL, Schoenberg JB, Swanson GM, Greenberg RS, Hoover RN, Hayes RB, Ziegler RG (2002) Serum lycopene, other serum carotenoids, and risk of prostate cancer in US Blacks and Whites. *Am J Epidemiol* 155: 1023-1032
84. Mills PK, Beeson WL, Philips RL, Fraser GE (1989) Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* 64: 598-604
85. Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ (1999) Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 59: 1225-1230
86. Huang HY, Alberg AJ, Norkus EP, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ (2003) Prospective study of antioxidant micronutrients in the blood and the risk of developing prostate cancer. *Am J Epidemiol* 157: 335-344
87. Hu M-Y, Li Y-L, Jiang C-H, Liu Z-Q, Qu S-L, Huang Y-M (2008) Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition* 24: 1030-1038
88. Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinal AF, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ (1998) Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am J Epidemiol* 148: 131-132

## Lycopene – occurrence, properties and applications

Agnieszka Belter<sup>1,2</sup>, Małgorzata Giel-Pietraszuk<sup>1</sup>, Stefan Oziewicz<sup>3</sup>, Piotr Chomczyński<sup>4</sup>, Jan Barciszewski<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 12/14 Noskowskiego St., 61-704 Poznan, Poland

<sup>2</sup>AdvaChemLab, 8 Topazowa St., 61-680 Poznan, Poland

<sup>3</sup>Cinna - Produkty Zdrowia, 88 Poznanska St., 62-010 Pobiedziska, Poland

<sup>4</sup>Molecular Research Center, 5645 Montgomery Rd, Cincinnati, OH, USA

✉e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

**Key words:** lycopene, cancers, carotenoids, cardiovascular diseases

### ABSTRACT

Natural products from plants, fungi and higher animals are valuable sources of attractive alternatives for therapeutics. One of them, lycopene is a bright red carotene found in several fruits and vegetables. Tomato, tomato-based sauces and juices are the most abundant sources of this compound for human. There is a positive correlation between lycopene intake and health. It plays an important role in preventing several diseases, including cancers. Lycopene is the most efficient oxygen and free radicals scavenger. Moreover it controls cell cycle and activates phase II detoxification enzymes. Epidemiological studies confirm its significant role in preventing diseases. Constant progress on this field makes lycopene an interesting object of researches.

# Retinoidy – ich metabolity, działanie i rola w rozwoju serca

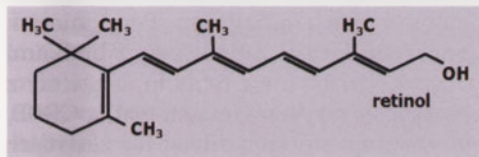
## STRESZCZENIE

Retinoidy stanowią grupę związków aktywnych biologicznie, znanych jako pochodne witaminy A. Poza niezaprzeczalną rolę jaką związki te odgrywają w dorosłym organizmie, retinoidy odgrywają też fundamentalną rolę w wielu procesach rozwoju zarodkowego np. kształtowaniu osi zarodka i tworzeniu narządów. Najbardziej aktywną formą witaminy A jest kwas retinowy, powstający z retinolu. Zarówno u osobników dorosłych jak i w przypadku zarodka przekazywanie sygnałów z udziałem kwasu retinowego zachodzi na różnych poziomach poprzez oddziaływanie ze specyficznymi białkami i receptorami. W trakcie rozwoju serca polega to głównie na ograniczeniu ekspansji komórek wtórnego pola sercowotwórczego i kontroli prawidłowego dodawania tych komórek do cewy serca. Oddziaływanie to wymaga odpowiedniego lokalnego stężenia kwasu retinowego, którego nadmiar lub niedobór powoduje powstawanie wad serca. Szlaki przekazywania sygnałów z udziałem retinoidów w rozwijającym się sercu są wielce istotnym lecz nie w pełni jeszcze poznany zagadnieniem. W niniejszej pracy przedstawiono syntezę najnowszej wiedzy dotyczącej tego tematu.

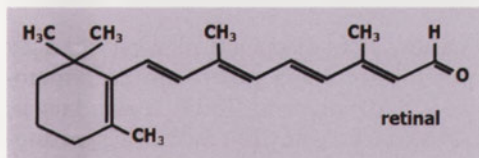
## WPROWADZENIE

Retinoidy to grupa aktywnych związków chemicznych o różnorodnym działaniu biologicznym. Są one analogami retinolu i noszą wspólną nazwę witaminy A. Poza niezaprzeczalną rolę jaką związki te odgrywają w dorosłym organizmie, m. in. w mechanizmie widzenia, rozrodzie, prawidłowej funkcji skóry i układu immunologicznego, retinoidy odgrywają fundamentalną rolę w wielu procesach rozwoju zarodkowego.

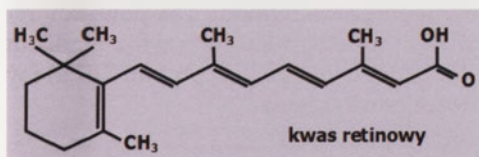
Do tej grupy związków należą: retinol (Ryc. 1), retinal (Ryc. 2) i kwas retinowy (Ryc. 3) oraz ich dalsze metabolity i izomery. Retinol nie wywiera znaczącego efektu biologicznego na tkanki, lecz staje się czynny po przekształceniu w bardziej aktywne metabolity, z których najważniejszym jest, charakteryzujący się wielostronnym działaniem, kwas retinowy [1]. Niektóre z metabolitów retinolu posiadają różnorodne funkcje biologiczne, np. 11-*cis* retinal jest niezbędny do prawidłowego widzenia, podczas gdy *retro*-retinoidy biorą udział w immunologicznej funkcji limfocytów [2]. Jednakże to właśnie kwas retinowy (RA), w postaci dwóch izomerów: formy całkowicie-*trans* i formy 9-*cis*, wpływa na proliferację i różnicowanie się komórek poprzez regulację odpowiednich genów [2,3]. Tak więc w trakcie rozwoju zarodkowego kwas retinowy jest najbardziej ak-



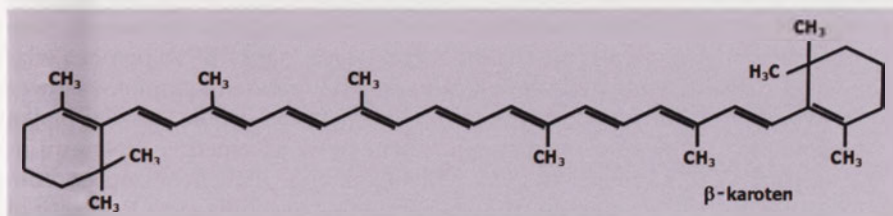
Rycina 1. Wzór chemiczny retinolu.



Rycina 2. Wzór chemiczny retinalu.



Rycina 3. Wzór chemiczny kwasu retinowego.



Rycina 4. Wzór chemiczny  $\beta$ -karotenu.

Emilia Stachurska

Anna Ratajska

Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

☉Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel.: (22) 628 10 41 wew. 1120, e-mail: arataj@ib.amwaw.edu.pl

Artykuł otrzymano 17 stycznia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 29 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** retinoidy, receptory retinoidów, RBP, CRBP, CRABP, embriopatia kwasu retinowego, wady serca

**Wykaz skrótów:** ARAT – Acyl-CoA acylotransferaza retinolu, (2.3.1.76); ADH – dehydrogenaza alkoholowa; *at*-RA – kwas całkowicie *trans* retinowy; CRBP I, II, III – wewnątrzkomórkowe białka łączące retinol; CRABP I, II – wewnątrzkomórkowe białka łączące kwas retinowy; *dpc* (ang. *day post coitus*; łac. *dies post copulationem*) – doba życia płodowego (dotyczy zarodków mysich); LRAT – acylotransferaza lecytyno-retinowa (2.3.1.135); RA (ang. *retinoic acid*) – kwas retinowy; RALDH – dehydrogenaza aldehydu retinowego, RALDH1-4 (=ALDH1a1-3; ALDH8); RAR (ang. *retinoic acid receptor*) – receptor dla kwasu retinowego; RBP – białko łączące retinol; RDH – dehydrogenaza retinolu; REH – hydrolaza estrów retinolu (enzym hydrolityczny); RXR (ang. *retinoid X receptor*) – receptor X dla retinoidów

**Podziękowanie:** Artykuł powstał w trakcie realizacji programu badawczego N401 270139 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

tywną formą retinoidów. Cząsteczki wszystkich retinoidów mają kilka charakterystycznych cech strukturalnych: pierścien  $\beta$ -jononu, łańcuch izoprenoidowy, tzw. „ogon” i polarną grupę końcową, która decyduje o ich właściwościach chemicznych i funkcjach biologicznych [2].

Najważniejszym prekursorem aktywnych retinoidów, zawartym w pokarmie roślinnym jest  $\beta$ -karoten (Ryc. 4), który w komórkach nabłonka jelita cienkiego zostaje przekształcony przez 9'10' dioksygenazę  $\beta$ -karotenową (BCO-II) w formy pośrednie apokarotenoidów, które są dalej metabolizowane do kwasu retinowego przy udziale nieokreślonego jeszcze enzymu. Występowanie enzymu BCO II stwierdzono w komórkach przedstawicieli różnych grup kręgowców, ale nie ma jak dotąd dowodu na to, że gen tego enzymu ulega ekspresji u ssaków [4]. Natomiast monooksygenaza 15,15'  $\beta$ -karotenowa (BCO-I) przekształca  $\beta$ -karoten w dwie cząsteczki całkowicie-*trans*-aldehydu retinowego. BCO-I wykryto u morskich strunowców i bezstrunowców; sklonowano też gen tego enzymu m. in. u człowieka, myszy, kurczęcia i muszki owocowej [4,5]. Warto nadmienić, że powstały z  $\beta$ -karotenu aldehyd retinowy jest jedną z aktywnych form witaminy A biorącą udział przede wszystkim w mechanizmie widzenia. Stąd też u zwierząt występuje m. in. w komórkach fotoreceptorowych. Formą retinolu przechowywaną w tkankach zwierzęcych, której prekursorem jest również  $\beta$ -karoten, są estry retinyłu. Retinol ulega estryfikacji z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi, najczęściej z kwasem palmitynowym [5]. Pokarm zwierzęcy zawiera więc estry retinyłu, które są rozkładane przez esterazy zawarte w soku trzustkowym, a powstały w ten sposób wolny retinol jest absorbowany przez komórki nabłonkowe jelita cienkiego. Retinol zostaje następnie utleniony do retinalu (aldehydu retinowego) przez dehydrogenazy zależne od  $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ . Do rodziny tych dehydrogenaz należy dehydrogenaza alkoholowa (ADH) oraz dehydrogenaza retinolu (RDH).

## PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT RETINOLU

W komórkach nabłonkowych jelita cienkiego retinol łączy się z komórkowym białkiem łączącym retinol (CRBP II), które, podobnie do białka CRBP I powszechnego w różnych tkankach i narządach ciała jak i CRBP III, umożliwia jego prezentację odpowiednim enzymom. Wiązanie z CRBP II oraz z CRBP I zapobiega powtórnemu utlenianiu retinolu do retinalu, i jednocześnie umożliwia do niego dostęp acyltransferazie lecytyno-retinowej (LRAT, ang. *lecithin-retinol acyltransferase*), która przeprowadza jego estryfikację. Niezwiązany retinol może być estryfikowany przez Acyl-CoA acylotransferazę retinolu (ARAT, ang. *Acyl-CoA retinol acyltransferase*) oraz przez LRAT, choć ten ostatni enzym przeprowadza estryfikację wolnego retinolu ze znacznie mniejszą wydajnością. Rola białka wiążącego retinol typu III (CRBP III) polega na ułatwieniu włączania retinolu do mleka matki [2,5].

W nabłonku jelita cienkiego estry retinyłu są wbudowywane do chylomikronów, które opuszczają komórki nabłonkowe jelita i poprzez system limfatyczny są transportowane do krwiobiegu. W kapilarach zlokalizowanych poza wątrobą są one metabolizowane przez lipazę lipo-

proteinową co prowadzi do powstania estrów cholesterolu („reszkowych” chylomikronów) obecnych w krążącej krwi. „Reszkowe” chylomikrony są następnie wychwytywane przez wątrobę. „Reszkowe” chylomikrony, zawierające estry retinyłu pobrane przez hepatocyty, są następnie rozkładane przez hydrolazy estrów retinyłu (REH) takie jak karboksylolizaza ES-10 czy ES2 lub inne hydrolazy, np. lipazę zależną od cAMP, w wyniku czego powstaje retinol [6]. Retinol przedostaje się do komórek gwiaździstych w wątrobie, gdzie ulega ponownej estryfikacji i w postaci estrów retinyłu może być przechowywany w kroplach tłuszczu [2]. W wątrobie estry retinyłu stanowią rezerwuar dla dalszych potrzeb organizmu.

Przypuszcza się, że wewnątrzkomórkowe białka wiążące retinol: CRBP I i II, obecne m. in. w komórkach wątroby, biorą udział w mechanizmie prezentowania retinoidów odpowiednim enzymom, przeprowadzającym ich estryfikację [2,6]. CRBP I, II i III mają zdolność wiązania się z całkowicie-*trans* retinolem i całkowicie-*trans* retinalem, co wskazuje na ich udział w metabolizmie retinoidów [2]. Myszy pozbawione genów dla CRBP I i II wykazują zmniejszony poziom estrów retinyłu w wątrobie [5]. Z kolei CRBP III bierze udział w mobilizacji retinolu z jego estrów zgromadzonych w tkance tłuszczowej [5].

Wewnątrzkomórkowe białka wiążące retinol (CRBP I, II i III) charakteryzują się niską masą cząsteczkową, która wynosi ok. 15 kDa. Ich strukturę II-rzędową stanowią dwie  $\beta$ -harmonijki (ang.  *$\beta$ -sheets*), z których każda składa się z pięciu antyrównoległych nici. Obie harmonijki fałdują się tworząc kieszeń, wewnątrz której wiązany jest ligand. Kieszeń ta jest spojona dwiema  $\alpha$ -helisami. Podobnie jak w przypadku wiązania się kwasu retinowego z białkami CRBP, polarna grupa hydroksylowa retinolu wiąże się z resztą glicyny znajdującą się na dnie kieszeni białka CRBP, natomiast pierścień znajduje się najbardziej na zewnątrz kieszeni. Co ciekawe, podobne ułożenie przestrzenne przyjmuje kwas retinowy, łącząc się z CRBP I i II.

Jeśli poziom witaminy A w diecie jest niewystarczający estry retinyłu są przemieszczane z powrotem do hepatocytów, gdzie enzymy hydrolityczne (REH) rozkładają je, uwalniając retinol. Proces ten zwany jest mobilizacją retinolu. W przypadku deficytu witaminy A estryfikacja retinolu jest zatem hamowana, podczas gdy indukowana jest hydroliza estrów retinyłu i mobilizacja retinolu. Tak powstały retinol łączy się z białkiem transportującym, czyli z białkiem łączącym retinol (RBP, ang. *retinol binding protein*, RBP4) i w tej formie jest uwalniany do krążenia.

Białko RBP, będące głównym nośnikiem retinolu we krwi, charakteryzuje się małą masą cząsteczkową (21kDa). Zbudowane jest ono z 8-łańcuchowych antyrównoległych struktur harmonijkowych  $\beta$ , które fałdują się tworząc kieszeń wiążącą ligand. Retinol łączy się z RBP za pomocą wiązania hydrofobowego pomiędzy resztami aminokwasowymi znajdującymi się po wewnętrznej stronie kieszeni białka wiążącego, a znajdującymi się w jej wnętrzu częściami ligandu, czyli pierścieniem jononu i łańcuchem izoprenoidu. Ze względu na fakt, iż podczas wiązania się z RBP retinol przyjmuje odwrotną konfigurację przestrzenną niż w przy-

padku połączenia z CRBP, grupa hydroksylowa retinolu wystaje z kieszeni RBP i nie bierze udziału w wiązaniu.

We krwi białko RBP wiąże się z białkiem transportującym – transtyretyną (TTR) [2,7], co zapobiega filtracji kłębuszkowej retinolu i wydaleniu przez układ moczowy. Kompleks RBP-TTR dostarcza retinol do komórek docelowych. Transport retinolu do komórki odbywa się prawdopodobnie za pośrednictwem transbłonowego receptora dla RBP-STR6 [7]. Retinol może także wnikać do niektórych komórek docelowych dzięki gradientowi stężeń, który zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia wolnego retinolu [2]. Do wnętrza większości komórek retinol dostaje się jako wolny związek, po dysocjacji od transtyretyny.

## METABOLIZM W KOMÓRKACH DOCELOWYCH

Różne formy witaminy A pełnią rolę w ważnych etapach embriogenezy, biorąc udział w rozwoju układu nerwowego [8], kończyn [9], wątroby [10] serca [11-13], płuc, nerek, gonad [6], jelita przedniego oraz oka [14]. W komórkach docelowych tych narządów i tkanek retinol zostaje przekształcony w aktywną formę, kwas retinowy. Odbywa się to za pośrednictwem kilku szlaków metabolicznych podczas dwustopniowej reakcji oksydoredukcyjnej. Początkowo, po wnikięciu do komórki i związaniu się z białkiem CRBP I, retinol zostaje utleniony do retinalu (Ryc. 5).

Reakcję utleniania przeprowadza dehydrogenaza alkoholowa (ADH) zależna od NADP, lub dehydrogenaza retinolu (RDH). Badania genetyczne wskazują, że co najmniej trzy izoformy dehydrogenazy ADH: ADH1, ADH3, ADH4 oraz dwie w przypadku RDH (RDH1, RDH10) odgrywają rolę w syntezie aldehydu retinowego. Synteza enzymów utleniających retinol jest powszechna w wielu tkankach, a obszary ich występowania często zachodzą na siebie, jakkolwiek najbardziej efektywna w tkankach kręgowców jest dehydrogenaza alkoholowa typu IV (ADH4). Natomiast

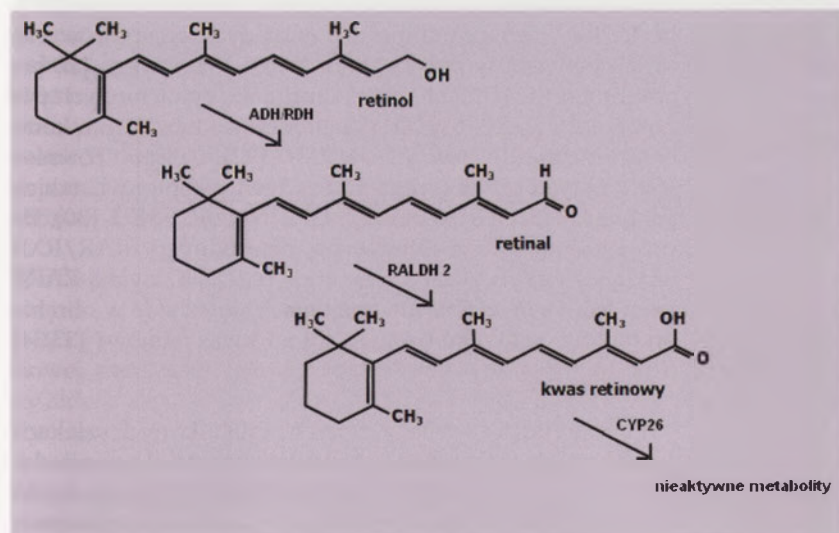
jeśli chodzi o lokalizację wewnątrzkomórkową, dehydrogenazy ADH obecne są we frakcji cytosolu, podczas gdy RDH obecna jest we frakcji mikrosomalnej. W drugim etapie przekształcania retinolu do formy aktywnej aldehyd retinowy zostaje utleniony do kwasu retinowego przez dehydrogenazę aldehydu retinowego, RALDH [5,14] (Ryc. 5).

Opisano cztery klasy enzymów RALDH: RALDH1, która występuje jedynie w niewielkiej liczbie rozwijających się organów zlokalizowanych w przedniej i tylnej części ciała zarodka, biorąc głównie udział w rozwoju oka, RALDH2, stanowiącą najbardziej powszechną formę dehydrogenazy aldehydu retinowego i uważaną za najważniejszy enzym produkujący kwas retinowy (RA) w tkankach embrionalnych, a także RALDH3, która uczestniczy w późniejszych stadiach rozwoju oka i nosa [4,15,16] oraz RALDH4, biorącą udział w biosyntezie 9-*cis* kwasu retinowego [5].

Reakcja utleniania retinalu do kwasu retinowego może być także przeprowadzona przez inne enzymy, jak np. należące do rodziny cytochromu P450, enzymy CYP. Rodzina ta stanowi liczny zbiór enzymów, zdolnych do przeprowadzania monooksygenacji wielu związków biologicznych [17,18]. Z pośród nich w przekształcanie retinalu do kwasu retinowego zaangażowane są m. in.: CYP1B1, 1A2, 2B4, 2C3, 2J4 [5,20]. CYP1B1, w przeciwieństwie do należącego do tej samej rodziny, CYP26, odgrywającego kluczową rolę w metabolizmie kwasu retinowego (patrz poniżej), nie posiada zdolności degradowania kwasu retinowego. Enzymy z rodziny CYP mogą same podlegać regulacji przez retinoidy, gdyż w aktywacji kodujących je genów udział biorą zależne od retinoidów receptory jądrowe [18]. Wykazano np., że poziom CYP1B1 zależy od regulacji przez kwas retinowy (RA). Ponadto udowodniono, że CYP1B1, w podobny sposób do kwasu retinowego, wpływa na regulację ważnych morfogenów, jak *Hox1*, *Shh*, czy *Isect1* [19]. Synteza enzymów syntetyzujących kwas retinowy, takich jak RALDH1, RALDH3 i CYP1B1 w różnych tkankach embri-

onalnych sugeruje złożoność metabolizmu tego związku. Chociaż obecność i działanie tych enzymów ukazuje różnorodność dróg syntezy kwasu retinowego podczas embriogenezy, ich działanie nie może zniwelować defektów powstających u myszy pozbawionych genu kodującego drugą formę dehydrogenazy aldehydu retinowego (*Raldh2*<sup>-/-</sup>), które giną w 10,5 dpc z powodu malformacji serca. Wskazuje to na najważniejszą rolę RALDH2 w syntezie kwasu retinowego podczas rozwoju zarodka i sugeruje, że ta forma enzymu nie może być zastąpiona jego innymi odmianami.

Utlennianie retinolu do aldehydu retinowego jest reakcją odwracalną, i wiele enzymów może katalizować reakcją odwrotną, tj. konwersję aldehydu retinowego do retinolu, co wskazuje na istnienie dodatkowego mechanizmu regulującego lokalne stężenie kwasu retinowego w tkankach. Natomiast utlenianie retinaldehydu do kwasu retinowego jest nieodwracalne. Biorąc pod uwagę powszechną dostępność retinolu który dociera do tkanek



Rycina 5. Szlak metabolizmu retinolu w komórkach docelowych. Po wnikięciu do komórki pierwszym etapem przekształcania retinolu stanowi jego utlenienie do aldehydu retinowego przez dehydrogenazę alkoholową (ADH) lub dehydrogenazę retinolu (RDH). Retinal utleniany jest do kwasu retinowego przez dehydrogenazę retinaldehydu (np. RALDH2) lub niektóre enzymy z rodziny CYP (patrz tekst). Dalsze utlenianie kwasu retinowego przez enzym CYP26 prowadzi do powstania nieaktywnych metabolitów witaminy A.

przez system krążenia jest wielce możliwe, że wszystkie komórki mogą zapewnić mechanizm równowagi między retinolem i retinaldehydem, lecz tylko te z nich, które są wyposażone w jedną z odmian RALDH mogą lokalnie syntetyzować kwas retinowy [14]. Dalsze utlenianie kwasu retinowego prowadzi do jego degradacji. Enzymami odpowiedzialnymi za ten proces są trzy odmiany CYP26: CYP26A1, CYP26B1 i CYP26C1 należące do rodziny cytochromu P450. Enzymy te charakteryzują się specyficznym rozmieszczeniem w rozwijających się tkankach embrjonalnych, co sugeruje ich udział w regulowaniu sygnału kwasu retinowego w poszczególnych strukturach i narządach [14].

Aktywność biologiczna kwasu retinowego w komórce jest również regulowana przez wiążące go białka CRABP I i II. CRABP I wychwytuje obecny w komórce wolny kwas retinowy i prezentuje go enzymom, które rozkładają ten związek, lub konwertują go do form nieaktywnych, polarnych, o krótszym łańcuchu. Metabolizm do form nieaktywnych odbywa się w wątrobie, a powstałe produkty mogą być łatwo usuwane przez nerki i/lub z żółcią [19]. Rola CRABP I polega na buforowaniu wewnątrzkomórkowego poziomu wolnego kwasu retinowego [20-23] i ograniczaniu jego dostępności dla CRABP II. Białko CRABP I spełnia zatem rolę w ochronie komórki przed teratogennym wpływem nadmiaru wolnego RA [1,24], zjawiskiem jakie zostało zaobserwowane *in vitro*, w hodowli komórkowej [25].

Przypuszcza się, że kwas retinowy może wywierać na komórki działanie parakryne, tzn. syntetyzowany w określonych komórkach, dociera do komórek sąsiednich, dopiero w nich wywierając swój ostateczny efekt. W zależności od ekspresji genów metabolizujących kwas retinowy w komórce, losy tego związku mogą być różne. Na przykład w komórkach, w których ekspresji ulega jeden z genów *Cyp26*, metabolizm kwasu retinowego przebiega w kierunku jego degradacji, tak więc przekazywanie biologicznego sygnału tego związku zostaje zablokowane. W komórkach, w których gen *Cyp26* nie ulega ekspresji kwas retinowy przenika do jądra komórkowego i łączy się z receptorami RAR. Natomiast w komórkach wykazujących ekspresję genu *Crabp II* łączenie się kwasu retinowego z jego receptorami jądrowymi jest znacznie ułatwione za sprawą przechwytywania go przez białko CRABP II [14].

Rozmieszczenie białka CRABP II pokrywa się z występowaniem innych białek, takich jak CRBP I, ADH i RALDH [22], jest zatem ściśle związana z syntezą kwasu retinowego. Ponieważ zaobserwowano także współwystępowanie CRABP II z receptorami jądrowymi RAR i RXR, przypuszcza się, że uczestniczy ono w transporcie kwasu retinowego do jądra komórkowego i prezentowaniu go odpowiednim receptorom [24,26]. Podczas tego procesu tworzą się przejściowe kompleksy CRABP II-RAR i/lub CRABP II-RAR-RXR [27,28]. W związku z tym uważa się, że CRABP II może uczestniczyć w regulacji ostatecznego działania kwasu retinowego na komórkę, jakim jest aktywacja odpowiednich genów oraz proliferacja komórek, zależna od receptorów RAR/RXR. CRABP II może być zatem uznany za koaktywator tych receptorów [27,29]. Z kolei białko CRABP I, dostarcza kwas retinowy do jądra komórkowego w sposób bierny, nie tworząc kompleksów z receptorami jądrowymi

RAR/RXR. Tuż przed połączeniem z receptorami jądrowymi kwas retinowy związany z CRABP I ulega dysocjacji i samodzielnie przyłącza się do powyższych receptorów [28].

W zarodkach myszy pozbawionych genu (ang. *knock-out*) *Crabp I*<sup>-/-</sup> lub *Crabp II*<sup>-/-</sup> nie stwierdzono występowania malformacji, ani zmniejszenia ich przeżywalności, co wskazuje, że żadne z tych białek nie jest niezbędne do prawidłowej morfogenezy podczas życia prenatalnego. Myszy pozbawione obu genów *Crabp I*<sup>-/-</sup> i *Crabp II*<sup>-/-</sup> wykazują niewielki wzrost śmiertelności, ale pozostałe przy życiu osobniki są prawie normalne pod względem morfologii. Jedynym objawem zablokowania funkcji genów dla *Crabp I* i *II* u tych osobników są zduplikowane palce kończyn [30].

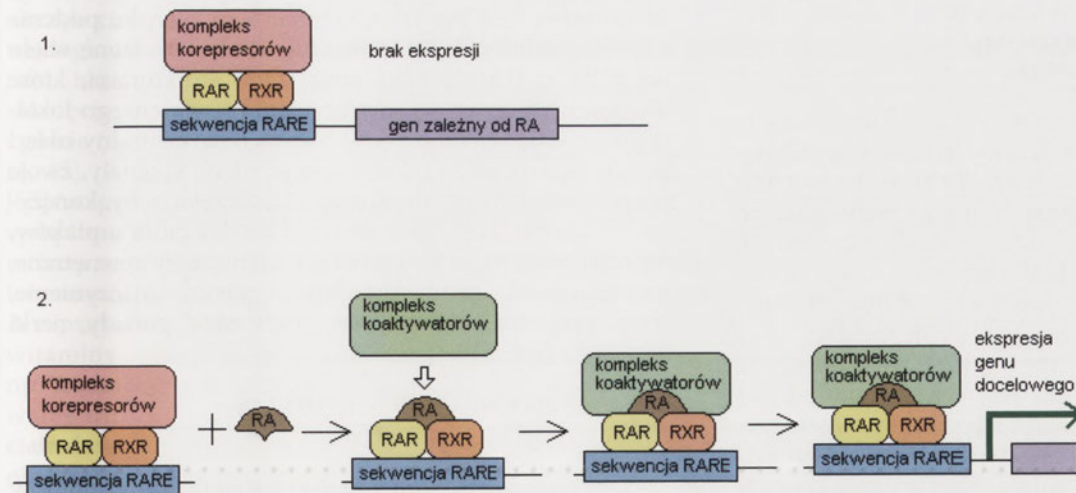
Przekazywanie sygnałów za pośrednictwem retinoidów jest regulowane na wielu poziomach, co decyduje o kompleksowości i złożoności tych procesów. Wiele aktywnych transkrypcyjnie odmian retinoidów i ich metabolitów (patrz niżej) może łączyć się ze specyficznymi białkami i oddziaływać z różnymi kombinacjami receptorów jądrowych. Białka łączące retinoidy (RBP, CRBP, CRABP) odgrywają kluczową rolę w ich transporcie w osoczu oraz wewnątrz komórki i prezentowaniu retinoidów odpowiednim enzymom lub kierowaniu ich do określonych obszarów komórkowych.

## RECEPTORY JĄDROWE

Receptorami, z którymi oddziałuje kwas retinowy, są RAR i RXR, należące do nadrodziny receptorów jądrowych. Każda z rodzin receptorów retinoidów składa się z kilku odmian, różniących się nieznacznie składem i/lub sekwencją aminokwasową. Są to: RAR $\alpha$ 1,2, RAR $\beta$ 1,2,3,4, RAR $\gamma$ 1,2, RXR $\alpha$ 1,2, RXR $\beta$ 1,2, RXR $\gamma$ 1,2. Ligandami dla tych receptorów są *at*-RA, *9-cis* RA oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe [4,12,31]. RAR funkcjonują jako heterodimery z RXR. RXR natomiast mogą działać w formie homodimerów lub tworzyć heterodimery z różnymi innymi receptorami jądrowymi takimi jak receptory witaminy D3, receptory hormonu tarczycy, receptory aktywatorów peroksydomów [31]. Wykazano, że homodimery powyższych receptorów nie są tak aktywne w przyłączaniu kwasu retinowego jak heterodimery (RAR/RXR). Różnorodność wymienionych powyżej odmian RAR i RXR daje łącznie 48 możliwych kombinacji heterodimerów (RAR/RXR) [32]. Opisano również wiele aktywatorów i represorów tych receptorów, takich jak Sug1, TIF1, RIP140, SRC1, TIF2, N-CoR, SMRT [30]. Po przyłączeniu kwasu retinowego, heterodimery RAR/RXR wiążą się ze specyficzną sekwencją na DNA, zwaną RARE (ang. *RA response element*), znajdującą się zwykle w obrębie promotora genu regulowanego przez kwas retinowy [33,34] (Ryc. 6).

Poprzez udział w wielu różnych molekularnych szlakach przekazywania sygnałów, prowadzących do aktywacji docelowych genów, receptory RAR i RXR przyczyniają się do zróżnicowania sygnału pochodzącego od kwasu retinowego [35]. W celu poznania molekularnych mechanizmów aktywowanych poprzez poszczególne formy receptorów jądrowych wykorzystano myszy pozbawione genów dla różnych form tych receptorów. W ten sposób udowodniono np., że u myszy z brakiem genu dla RAR $\alpha$  lub RAR $\gamma$  ob-





**Rycina 6.** Aktywacja genów docelowych przez kwas retinowy za pośrednictwem receptorów RAR i RXR. 1. W przypadku braku obecności kwasu retinowego do kompleksu receptorów RAR/RXR związanych z sekwencją RARE w DNA danego genu, przyłączonych jest wiele korepresorów (patrz tekst), które zapobiegają inicjacji transkrypcji genu. 2. W przypadku przyłączenia do heterodimeru RAR/RXR kwasu retinowego, następuje oddysocjowanie korepresorów, a w ich miejsce przyłączane są koaktywatory co umożliwia rozpoczęcie transkrypcji genu.

serwuje się defekty systemu sercowo-naczyniowego, wady oka, degenerację gonad i zwiększoną umieralność [1,21]. Wykazano, że RAR $\beta$  bierze udział w prawidłowej segmentacji tyłomózgowia podczas tworzenia granic rombomerów poprzez oddziaływanie z dwoma czynnikami transkrypcyjnymi *Hoxb4* i *Hoxd4* [36]. Ponadto w rozwój niektórych struktur w zarodku, takich jak tyłomózgowie, kręgosłup czy kończyny, mogą być wspólnie zaangażowane różne typy receptorów RAR [1,37].

Z powodu występowania charakterystycznych wad wrodzonych u myszy pozbawionych genu dla receptora RXR $\alpha$ , uważany jest on za jedyny receptor spośród RXR, niezbędny do prawidłowego rozwoju zarodkowego [1,38]. Niektóre badania sugerują, że RXR $\beta$  również może mieć pewien udział w prawidłowej embriogenezie [1,38]. W związku z obecnością wad serca u myszy pozbawionych genów dla receptorów RAR $\alpha$  i  $\beta$  oraz RXR $\alpha$ , przypuszcza się, że to właśnie te receptory biorą udział w sterowanym przez kwas retinowy rozwoju tego narządu [1,19,37]. Ponadto występowanie RAR $\gamma$  [39] i RXR $\gamma$  [40] w rozwijającym się sercu sugeruje rolę tych receptorów w przekazywaniu sygnału kwasu retinowego do tego narządu.

## METABOLITY KWASU RETINOWEGO

CYP26 obok rodopsyny, acylotransferazy lecytyno-retinowej, dehydrogenaz: retinolu i alkoholowej, dehydrogenazy aldehydu retinowego 2 oraz esterazy retinolu jest głównym enzymem metabolizującym retinoidy; co istotne, metabolizuje on aktywną biologicznie formę retinoidów, kwas retinowy, do związków nieaktywnych lub mogących się od niego różnić pod względem roli biologicznej [6]. Metabolitami kwasu retinowego są: całkowicie *trans*-3,4-didehydrokwas retinowy, 4-hydroxy-kwas retinowy, (4-OH-RA), 4-oxo-całkowicie-*trans*-kwas retinowy, 4-oxo-13-*cis*-kwas retinowy, 16-hydroxy-4-oxo-kwas retinowy, 18-hydroxy-kwas retinowy (18-OH-RA), 14-hydroxy-4,14-*retro*-retinol i

5,6-epoxy-kwas retinowy [41,42]. Do chwili obecnej nie ustalono, czy wszystkie metabolity kwasu retinowego produkowane przez CYP26 są aktywne biologicznie podczas organogenezy. Całkowicie-*trans*-4-oxo-RA jest uznawany za nieaktywny produkt degradacji RA podczas rozwoju embrionalnego myszy [5,16]. Inne produkty degradacji kwasu retinowego, np. 18-hydroxy-RA i 5,6-epoxy-RA hamują wzrost linii komórek nowotworowych raka piersi [41] i podobnie jak *at*-RA stymulują różnicowanie się linii komórkowych

hodowanych *in vitro* [42]. U zarodków *Xenopus* całkowicie-*trans*-4-oxo-RA jest związany z regulacją specyfikacji regionalnej; jego działanie teratogenne silniej niż nadmiar *at*-RA może zaburzać organizację przednio-tylnej osi zarodka, poprzez wzmocnienie ekspresji genów *Hoxb4* i *Hoxb-9*, skutkujące zanikiem przedniej części zarodka. Z kolei w przypadku embrionów przepióranych udowodniono, iż działanie całkowicie-*trans*-oxo-RA jak również 4-OH-RA oraz 5,6-epoxy-RA jest w stanie w pełni zniwelować negatywne efekty niedoboru witaminy A [42]. Całkowicie-*trans*-4-oxo-RA ma również większe powinowactwo do RAR $\alpha$  niż *at*-RA i może także aktywować RAR $\beta$  [41,42].

## IZOMERY KWASU RETINOWEGO

Poza *at*-RA, również inne izomery kwasu retinowego, takie jak 9-*cis*-RA i 13-*cis*-RA mogą łączyć się z trzema typami receptorów RAR, wykazując największe powinowactwo do RAR $\alpha$ , a najsłabsze do RAR $\gamma$  [41]. Wrażliwość na działanie poszczególnych izomerów kwasu retinowego jest zmienna u różnych gatunków zwierząt kręgowych, np. ludzie są bardziej wrażliwi na 13-*cis*-RA niż myszy i szczury, które prawie wcale nie są wrażliwe na ten izomer [1]. Izomery kwasu retinowego, takie jak 13-*cis*-RA i *at*-RA różnią się także w poszczególnych tkankach względem powinowactwa do białka CRABP I [22]. Wskazuje to na złożoność obecności w kręgowców systemu sygnalizowania przez retinoidy, i możliwy udział różnych metabolitów i izomerów kwasu retinowego w przesyłaniu tego sygnału.

Niektóre izomery kwasu retinowego, np. 9-*cis*-RA są jedynymi odmianami tego związku, mającymi zdolność aktywacji receptora RXR. Endogenną formę 9-*cis*-RA wykryto jednak jedynie u zarodków *Xenopus leavis*, co wskazuje na możliwość indywidualnej aktywacji receptorów RXR jedynie u tego gatunku. Z kolei u wyższych kręgowców, główną drogą przekazywania sygnału retinoidów jest aktywacja heterodimerów RAR/RXR przez *at*-RA [12].

## ENZYMY SYNTETYZUJĄCE I DEGRADUJĄCE KWAS RETINOWY ORAZ ICH ROLA W REGULACJI LOKALNEGO POZIOMU TEGO ZWIĄZKU W TKANKACH

Dla prawidłowego rozwoju zarodka niezbędne jest wytworzenie i podtrzymanie precyzyjnych miejscowych stężeń kwasu retinowego w tkankach. Związek ten nie jest produkowany przez wszystkie komórki rozwijających się tkanek, lecz występuje lokalnie, w ściśle określonych strukturach zarodka i płodu [14]. Przypuszcza się, że stężenie RA w tkankach jest regulowane przez dwa enzymy: najważniejszy enzym syntetyzujący RA, tj. RALDH2 oraz enzym rozkładający kwas retinowy, CYP26 [43] (Ryc. 5). Synteza obydwu enzymów jest regulowana przez kwas retinowy, co stanowi mechanizm sprzężenia zwrotnego, zapobiegający powstawaniu jego nieprawidłowych stężeń w tkankach. Promotor genu *Cyp26* zawiera sekwencję RARE, co wskazuje na istnienie mechanizmu samoregulującego jeśli chodzi o poziom lokalnego stężenia kwasu retinowego [1]. Ponadto w przypadku zarodków mysich wykazano, że kwas retinowy podany egzogennie w 8,5 dobie życia płodowego (8,5dpc) wpływa na obniżenie transkrypcji genu dla *Raldh2* po upływie pierwszych 12 i 27 godzin. Wskazuje to na pośredni, opóźniony wpływ egzogenego kwasu retinowego na zahamowanie syntezy retinoidów i co za tym idzie wyciszenie endogenego sygnału kwasu retinowego i zniwelowanie teratogenego efektu tego związku [44]. W okresie około 8,5dpc mysie zarodki są najbardziej wrażliwe na egzogenne działanie kwasu retinowego [45]. Natomiast stadium 4/5 somitów zbiegające się z zapoczątkowaniem procesu neurulacji, jest „okienkiem czasowym”, w którym kwas retinowy jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju zarodka [1]. Rola enzymów CYP26 i RALDH2 w kontrolowaniu sygnału kwasu retinowego w rozwijających się narządach, m. in. w sercu została udowodniona u zwierząt, w przypadku których zablokowana została ekspresja genów dla tych enzymów, co powodowało wystąpienie w zarodkach charakterystycznych wad, związanych z nieprawidłowym poziomem sygnału kwasu retinowego [8,16,44,46-48].

## WITAMINA A A TERATOGENEZA

Od wielu lat znany jest udział witaminy A w wielu procesach fizjologicznych dorosłego organizmu, oraz jej rola jako potencjalnego morfogenu w kształtowaniu osi organizmu (lewo- i prawostronności) i organogenezie podczas rozwoju embrionalnego [1]. Przykładem może być stymulowanie ekspresji niektórych genów ważnych dla morfogenezy zarodka, takich jak genu hormonu wzrostu czy genów *Hox* przez kwas retinowy [49]. Badania wykazały wysoki stopień zachowania podobieństwa budowy w obrębie genów kodujących białka odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów retinoidów wśród całego typu strunowców (*Chordata*), a szczególnie wśród kręgowców [50].

Witamina A wraz z jej najbardziej aktywnym metabolitem kwasem retinowym różni się od innych witamin tym, że jej stężenie w tkance musi być ściśle określone aby nie doprowadzić do jej niedoboru jak i nadmiaru. Od ponad pół

wieku intensywne badania nad rolą witaminy A dowiodły, że zarówno niedobór jak i nadmiar tego związku podczas rozwoju embrionalnego powoduje wady wrodzone wielu narządów i tkanek. Najważniejszymi strukturami, które ulegają teratogenezie pod wpływem niewłaściwego lokalnego stężenia witaminy A w tkankach są: centralny układ nerwowy, zwłaszcza tyłomózgowie, rdzeń kręgowy, zwoje czaszkowe, elementy twarzoczaszki, szczęka, zęby, kończyny, pochodne skóry takie jak łuski u ryb i pióra u ptaków, organy czucia jak oczy, pęcherzyk uszny, uszy zewnętrzne, łuki gardłowe, układ oddechowy, grasica, unaczynienie, serce, przepona, układ moczowo-płciowy, gonady, nerki oraz ogon [1,49,51-54].

## WPLYW NIEDOSTATKU WITAMINY A NA ROZWÓJ ORGANIZMÓW

Najwcześniejszy model zwierzęcy deficytu retinoidów opracowano w pierwszej połowie XX wieku. U potomstwa ciężarnych samic zwierząt utrzymywanych na diecie pozbawionej witaminy A powstawały wady takie jak: nedorozwój oczu lub ich brak, rozszczepienie podniebienia i wargi, ekotopowe położenie nerek, i różne defekty dróg moczowo-płciowych [53]. Z powodu braku witaminy A powstawały również wady serca i wielkich naczyń, takie jak nieprawidłowe kształtowanie łuków aorty, łącznie z brakiem 4-tych i 6-tych łuków po jednej lub po obu stronach, wady stożka tętniczego, ubytek przegrody międzykomorowej oraz nedorozwój ściany miokardium przejawiający się jej ścieńczeniem [53]. Objawy wad nie były widoczne przed 13dpc, ale ich powstawaniu można było zapobiec, poprzez podanie ciężarnym samicom witaminy A najpóźniej w 10dpc [53]. Poza efektami teratogennymi tylko 30% zarodków rozwijało się do końca ciąży, pozostałe obumierały, zatem brak witaminy A miał również wpływ letalny.

W innym modelu doświadczalnym pozbawienie genu *Raldh2*, kodującego dehydrogenazę aldehydu retinowego 2 (RALDH2), główny enzym syntetyzujący kwas retinowy podczas embriogenezy, powodowało, że zwierzęta nie przeżywały dłużej niż do 10,5dpc [44,46]. Zarodki obumierały z takimi defektami jak nieprawidłowe zagięcie zarodka, nieprawidłowa segmentacja tyłomózgowia (zaburzone granice ekspresji genów *Hox*, oraz *Wnt8* i *Egf8*), nieprawidłowy rozwój pęcherzyka usznego, tułowia i kończyn oraz wadliwe zapętlenie się serca. Wady otrzymane u myszy pozbawionych genu *Raldh2* można zniwelować przez podanie witaminy A [44] lub wszczepienie graftów z komórek dzikich [48]. Podobne wady oraz zmniejszenie rozmiarów wątroby wraz ze ścieńczeniem ściany miokardium wywołało u kurcząt [10], a takie jak niewłaściwa segmentacja tyłomózgowia i zaburzenia kardiogenezy nawet u płazów [11].

## WPLYW NADMIARU WITAMINY A NA ROZWÓJ ORGANIZMÓW

Zagadnienie wpływu nadmiaru retinoidów na rozwój zarodka zostało po raz pierwszy opisane w pionierskich pracach opublikowanych przez Cohlan [45] oraz Giroud i Martinet [54]. W zależności od dawki i czasu podania, obserwowano różny odsetek przeżywalności zarodków szczura oraz szerokie spektrum wad u przeżywających

zarodków. Wśród różnorodnych zmian obserwowano: obrzęk ciała, przepuklinę mózgową (ang. *exencephalia*), wodogłowie, rozszczepienie kręgosłupa (ang. *spina bifida*), brak ogona u zwierząt, małowózgowie, brak zamknięcia cewy nerwowej, redukcję rozmiarów tyłomózgowia (brak wykształcenia się niektórych rombomerów, r4, r5). Podobne wady zaobserwowali Lammer i wsp. [55] w przypadku płodów ludzkich i opisali tę grupę symptomów jako embriopatia kwasu retinowego (ang. *retinoic acid embryopathy*). Zmiany te były spowodowane leczeniem ciężarnych kobiet dużymi dawkami witaminy A z przyczyn dermatologicznych (leczenie pochodnymi witaminy A stosuje się w niektórych schorzeniach skóry, np. trądziku guzowatym czy łuszczyca). Obecnie podawanie dużych dawek witaminy A (od 0,5 mg/kg masy ciała dziennie wzwyż) u kobiet w wieku rozrodczym jest obwarowane koniecznością wykluczenia ciąży nawet w ciągu dwóch lat od zaprzestania leczenia.

Opisane powyżej modele zwierzące zarówno braku (niedoboru) jak i nadmiaru witaminy A znajdują obecnie zastosowanie w prowadzeniu badań doświadczalnych, w takich przypadkach jak badanie szlaków przekazywania sygnałów przez retinoidy oraz analiza embriogenezy wad wrodzonych spowodowanych nadmiarem bądź niedoborem retinoidów.

## ROLA RETINOIDÓW W ROZWOJU SERCA ORAZ UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Serce jest narządem, który podczas rozwoju embrionalnego kształtuje się najwcześniej i najszybciej. Wraz z rozwijającym się układem krążenia podtrzymuje przy życiu rosnący zarodek. Układ sercowo-naczyniowy pełni zatem rolę nadrzędną względem innych części zarodka, a jego rozwój znajduje się między innymi pod wpływem mechanizmów regulowania przez kwas retinowy. Udowodniono, że pełni on istotną rolę w kształtowaniu się tego narządu.

W oparciu o badania nad niższymi kręgowcami jak *Danio rerio* i *Xenopus laevis* wykazano rolę sygnałową kwasu retinowego w kształtowaniu się mezodermy bocznej, z której pochodzą komórki progenitorowe cewy sercowej. Blokowanie sygnału kwasu retinowego zapobiega tworzeniu pierwotnej cewy sercowej u *Xenopus* [11] natomiast u *Danio rerio* powoduje przestrzenne współzawodnictwo między komórkami progenitorowymi mezodermy bocznej dającymi początek cewie serca i kończynie przedniej. Rezultatem współzawodnictwa tych dwu populacji komórek progenitorowych jest wydłużenie wtórnego pola sercotwórczego (patrz niżej) i brak wykształcenia się kończyny przedniej [56].

W modelu doświadczalnym podwójnych knock-outów *Raldh2*<sup>-/-</sup> u myszy wykazano, że prawidłowe przekazywanie sygnału z udziałem kwasu retinowego jest niezbędne dla wytworzenia pierwotnych naczyń w pęcherzyku żółtkowym w procesie waskulogenezy. Zatem związek ten w określonych stężeniach lokalnych reguluje proliferację i różnicowanie się śródbłonna hemogennego i jest odpowiedzialny za utrzymanie potencjału hematogennego tej linii

komórkowej oraz zapewnienie prawidłowego kształtowania się naczyń i przebudowy naczyńniowej [57,58].

W badaniach wczesnych etapów rozwoju serca wykazano, że kwas retinowy wpływa na wytworzenie fenotypu przedsionkowego w rozwijających się komórkach progenitorowych serca [50] oraz tych, które zostały już predestynowane do fenotypu komór [12]. Kwas retinowy wpływa zatem na kształtowanie się pierwotnej cewy serca wzdłuż jej przednio-tylnej osi oraz na jej specyfikację na poszczególne struktury [59]. Zgodnie z tą teorią przestrzenna zmienność sygnału kwasu retinowego pojawia się dzięki gradientowi stężeń w mezodermie bocznej oraz gradientowi stężeń jego głównego enzymu syntetyzującego, RALDH2, narastającemu w kierunku tylnej części tuby serca [50]. Rola kwasu retinowego we wczesnych etapach rozwoju serca polega na ograniczeniu puli kardiomiocytów oraz ograniczeniu zawiązków komór wzdłuż przednio-tylnej osi zarodka. Badania nad zwierzętami pozbawionymi genu *Raldh2* wykazały, że podczas rozwoju serca kwas retinowy nie działa bezpośrednio na geny docelowe, lecz pośrednio, poprzez ograniczenie ekspresji *Fgf8* w tylnej części mezodermy sercotwórczej [60,61].

Zakres współczesnych badań nad udziałem retinoidów w rozwoju serca ssaków i ptaków rozszerzył się znacznie w wyniku odkrycia, że cewa serca powstaje z dwu populacji komórkowych: jednej wywodzącej się z pierwotnego a drugiej z wtórnego pola sercotwórczego. Pierwotne pole sercotwórcze (FHF) pochodzi z komórek progenitorowych mezodermy bocznej, które migrują bocznie i w kierunku przodu zarodka tworząc zawiązek w kształcie podkowy. Komórki pola sercotwórczego są predestynowane do rozwoju i różnicowania się w kardiocyty oraz komórki wsierdzia. Podczas rozwoju pierwotnej cewy serca oba końce podkowy zlewają się w jeden twór podobny do cewy. Wczesna cewa serca pochodząca z komórek FHF stanowi „rusztowanie” dla dalszego wzrostu i rozwoju serca. Dalszy rozwój serca jest zależny od innej populacji komórek tworzących tzw. wtórne pole sercotwórcze (SHF, ang. *secondary heart field*) i zasiedlających początkowo część przyśrodkową i doogonową podkowy serca, a po zagięciu głowowym zarodka, zlokalizowanych w tzw. mezodermie gardłowej [62-64]. Komórki SHF stanowią w przewodzie materiał dla rozwoju drogi odpływu i prawej komory, oraz w niewielkim stopniu przedsionków, podczas gdy komórki pierwszego pola budują lewą komorę i drogę napływu (zatokę żylną i przedsionki) [65]. Podczas zapętlania się serca komórki wtórnego pola sercotwórczego są dodawane do cewy serca od strony bieguna tętniczego. Powoduje to wydłużenie drogi odpływu niezbędne do przyjęcia prawidłowej pozycji aorty względem lewej komory i pnia płucnego względem prawej komory, co związane jest z m. in. rotacją wielkich naczyń względem siebie. Komórki wtórnego pola sercotwórczego są dodawane również od strony bieguna żylnego serca wchodząc w skład przedsionków [66].

Wyniki najnowszych badań z wykorzystaniem markerów molekularnych tej populacji wskazują, że rozwój

tej linii komórkowej oraz prawidłowe dodawanie SHF do rozwijającej się cewy serca, zależą w dużej mierze od precyzyjnego poziomu kwasu retinowego w „okienku czasowym”, które w zarodku mysim rozciąga się pomiędzy 7,75dpc a 10,5dpc [61,67,68]. Ponadto lokalizacja docelowa komórek pochodzących z wtórnego pola sercotorwórczego odpowiada miejscom najbardziej podatnym na teratogenne właściwości kwasu retinowego. Podobieństwo wad serca otrzymanych w wyniku teratogennego działania kwasu retinowego do tych otrzymanych na skutek ablacji SHF [65] nasuwa przypuszczenie, że sygnał kwasu retinowego jest bardzo istotny dla prawidłowego rozwoju komórek wywodzących się z tej populacji. We wczesnych etapach kardiogenezy źródłem kwasu retinowego jest mezoderma przyosiowa. Z tego obszaru sygnał tego związku dociera do serca, skutkując kształtowaniem się przednio-tylnej osi tuby sercowej oraz ograniczając tylną granicę SHF. Główna droga sygnałowa kwasu retinowego w obrębie wtórnego pola sercotorwórczego, odbywa się poprzez jego wpływ na ekspresję czynników wzrostu takich jak *Fgf8*, *Fgf9*, *Fgf10*, oraz czynników transkrypcyjnych takich jak *Islet1* i *Tbx1*, z których dwa ostatnie podlegają regulacji ze strony *Fgf8*. Zbyt słaby sygnał kwasu retinowego powoduje odkształcenie wtórnego pola sercotorwórczego i jego ekspansję w kierunku tylnym zarodka, co jest widoczne w postaci wydłużonej w kierunku tyłu zarodka ekspresji genów *Fgf8*, *Fgf10*, *Islet1* i *Tbx1* [60,61]. Skutkuje to niepełnym dodawaniem komórek SHF do cewy serca. Rezultatem tego zmniejszenia udziału komórek SHF w budowie cewy serca jest skrócenie drogi odpływu i niedopasowanie aorty do lewej komory, a pnia płucnego do prawej komory, przejawiające się wadami stożka i pnia tętniczego serca. U myszy z brakiem obu genów dla *Raldh2*, wtórne pole sercotorwórcze przybiera wydłużony kształt i nie rozwija się prawidłowo [60]. Kwas retinowy działa zatem na wtórne pole sercotorwórcze poprzez ograniczenie obszaru ekspresji *Fgf8* i innych związanych z tym czynnikami genów. Kwas retinowy działa również na biologię komórek progenitorowych, których siedzibą jest serce płodowe, na co wskazują ostatnie badania [69]. Podwójne mutanty *Raldh2*<sup>-/-</sup> wykazują zwiększoną liczbę komórek progenitorowych serca, w których obserwuje się wzrost ekspresji ich charakterystycznych markerów, oraz znaczne zmniejszenie liczby nowopowstałych naczyń wieńcowych. W późniejszych etapach rozwoju najważniejszym źródłem kwasu retinowego w sercu jest nasierdzie. Nasierdzie pełni rolę regulatorową w stymulowaniu wzrostu miokardium. Ablacja nasierdzia prowadzi do zmniejszenia grubości warstwy miokardium, a regulacja tego oddziaływania odbywa się poprzez RA, który kontroluje ekspresję genów *Fgf8* i *Fgf9*. Ponadto za pośrednictwem czynników wzrostu kwas retinowy oddziałuje także na rozwój naczyń żylnych serca [69].

U wyższych kręgowców, takich jak ptaki, czy myszy, stwierdzono udział kwasu retinowego w kształtowaniu się naczyń pochodzących z łuków gardłowych oraz jego wpływ na wczesne i dalsze etapy rozwoju serca, takie jak prawidłowe zapętlanie się cewy serca, formowanie się poduszczek wsierdziowych, kształtowanie stożka i pnia tętniczego, przegrody międzykomorowej i prawidłowej grubości miokardium. W wyniku blokowania

szlaku przekazywania sygnału, w którym uczestniczy kwas retinowy obserwowano również zmniejszenie liczby komórek grzebienia nerwowego migrujących do serca [8,46]. Wady stożka i pnia tętniczego serca prowadzące do transpozycji wielkich naczyń (TGA), dwuuściowej prawej komory (DORV), tetralogii Fallota (ToF) wraz z towarzyszącym ubytkiem przegrody międzykomorowej oraz atrezią zastawki aortalnej i mitralnej obserwowano u myszy poddanych jednorazowej dawce kwasu retinowego w 8,5dpc rozwoju embrionalnego [70]. Mechanizmem działania nadmiaru kwasu retinowego w powstawaniu tych wad jest między innymi nieprawidłowe odkładanie się macierzy pozakomórkowej w poduszczkach wsierdziowych serca [71].

#### KOMÓRKI GRZEBIENIA NERWOWEGO JAKO CEL DZIAŁANIA SYGNAŁU RETINOIDÓW W ZARODKOWYM SERCU

Populacja komórek grzebienia nerwowego leżąca w tyłomózgowiu, pomiędzy plakodą uszną, a końcem somitu trzeciego, zwana populacją sercowych komórek grzebienia nerwowego, zasiedla serce i wielkie naczynia. Począwszy od 8dpc do 9,5dpc u myszy rozpoczyna się migracja sercowych komórek grzebienia nerwowego w kierunku serca [72]. U kurcząt migracja rozpoczyna się dwiema falami: pierwsza począwszy od stadium 9 HH druga od stadium 12 HH (w skali Hamburgera i Hamiltona) [73]. W czasie migracji komórki te są już predestynowane aby stać się składnikami struktur serca. U myszy pierwsza pula komórek grzebienia nerwowego osiąga biegun tętniczy serca między 9,5 a 10,5dpc [12], podczas gdy biegun żylny osiąga około 11,5dpc. Migracja odbywa się grzbietowo-bocznie i środkowo oraz pomiędzy somitami, następnie komórki wnikają w przestrzeń między tętnicami łuków 3, 4 i 6 i docierają do serca [72]. W sercu komórki te wchodzi w skład istotnych struktur: przegrody aortalno-płucnej [74], bieguna żylnego serca [74-76], unerwienia współczulnego i przywspółczulnego serca [77], nasierdzia otaczającego ujście tętnic wieńcowych oraz w niewielkiej liczbie wchodzi w skład poduszczek wsierdziowych przedsińkowo-komorowych, tworząc „języki”, które z przegrody aortalno-płucnej wnikają do poduszczek wsierdziowych stożka [74,75]; nieliczne komórki znajdują się także w krezce grzbietowej serca i wokół obszaru żył płucnych [74,75]. Komórki grzebienia nerwowego późno migrującej populacji zasiedlają proksymalne części tętnic łuków gardłowych i stanowią niewielką część poduszczek wsierdziowych stożka [73]. Ablacja sercowych komórek grzebienia nerwowego powoduje wady stożka i pnia tętniczego serca, podobne do tych, które są wynikiem nadmiaru lub niedoboru kwasu retinowego. Wykazano, że sygnał tego związku jest niezbędny do prawidłowej migracji komórek grzebienia nerwowego [1,44,46]. Zmiana jego poziomu może zaburzać ten proces przez zmianę miejsca emigracji komórek grzebienia nerwowego z cewy nerwowej [54], ich wzmożoną apoptozę w trakcie migracji [44] oraz zaburzone różnicowanie się tych komórek [12,44]. Również u myszy o zmutowanym genie *Fgf8* (lub *Tbx1*) wykazano zmniejszoną inwazję sercowych komórek grzebienia nerwowego do serca oraz ich zwiększoną apoptozę w łukach

gardłowych [51,73]. Zatem szlaki sygnałowe, w których uczestniczą *Fgf8*, *Tbx1* oraz kwas retinowy są podobne pod względem wpływu na migrację populacji komórek grzebienia nerwowego do serca. Hutson i wsp. [77] wykazali, że ablacja komórek grzebienia nerwowego podnosi poziom *Fgf8* w rejonie wtórnego pola sercotwórczego i zapobiega dodawaniu komórek SHF do rosnącej cewy serca. Rezultatem braku migracji komórek SHF do cewy serca jest brak jej wydłużania, niezbędny do prawidłowego zapętlania się serca i prawidłowego kształtowania się drogi odpływu w relacji komory lewej z aortą i komory prawej z pniem płucnym [78]. Zatem komórki grzebienia nerwowego działają w sposób pośredni na rozwój komórek wtórnego pola sercotwórczego, za pomocą FGF8. Ich działanie jest podobne do efektu wywieranego przez kwas retinowy, tj. ograniczające ekspansję komórek SHF w kierunku ogonowym zarodka [77].

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, sygnał pochodzący od kwasu retinowego za pośrednictwem FGF8 oraz nieznany sygnał idący od sercowych komórek grzebienia nerwowego również za pośrednictwem FGF8 odgrywają znaczącą rolę w prawidłowym kształtowaniu się stożka i pnia tętniczego. Subtelne zaburzenia w tym szlaku przekazywania sygnałów przyczyniają się do powstawania wad stożka i pnia tętniczego w rozwijającym się sercu. Pełne scharakteryzowanie szlaków sygnałowych, w których związki chemiczne pochodzące z diety matki mają wpływ na aktywność genów w rozwijającym się sercu płodu ma znaczenie nie tylko w sensie czysto poznawczym. Może ono odegrać kluczową rolę w zrozumieniu mechanizmu powstawania rozlicznych wad w rozwijającym się sercu i w efekcie doprowadzić do opracowania skutecznych metod terapeutycznych służących zapobieganiu występowania tych defektów. Sprawia to, że temat ten jest atrakcyjnym obszarem badań i najprawdopodobniej będzie on dogłębnie eksplorowany przez wiele grup badawczych w najbliższych latach.

## PIŚMIENNICTWO

- Ross SA, McCaffery PJ, Drager U, De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80: 1021-1054
- Noy N (2000) Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348: 481-495
- Desvergne B (2007) RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. *Vitam Horm* 75: 1-32
- Niederreither K, Dolle P (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature Rev Genet* 9: 541-553
- Theodosiou M, Laudet V, Schubert M (2010) From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 67: 1423-1445
- Napoli JL (1999) Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 1440: 139-162
- Wolf G (2007) Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr Rev* 65: 385-388
- Niederreither K, Vermot J, Le Roux I, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P (2003) The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* 130: 2525-2534
- Berggren K, Ezerman EB, McCaffery P, Forehand CJ (2001) Expression and regulation of the retinoic acid synthetic enzyme RALDH-2 in the embryonic chicken wing. *Dev Dyn* 222: 1-16
- Ijpenberg A, Perez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sanchez V, Macias D, Hohenstein P, Miles CM, Hastie ND, Munoz-Chapuli R (2007) *Wt1* and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* 312: 157-170
- Collop AH, Broomfield JAS, Chandratana RAS, Yong Z, Deimling SJ, Kolker SJ, Weeks DL, Drysdale TA (2006) Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Dev Biol* 291: 96-109
- Hoover LL, Burton EG, Brooks BA, Kubalak SW (2008) The expanding role of retinoid signaling in heart development. *ScientificWorldJournal* 8: 1904-211
- Pan J, Baker KM (2007) Retinoic acid and the heart. *Vitam Horm* 75: 257-283
- Duester G (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134: 921-931
- Niederreither K, McCaffery P, Dräger UC, Chambon P, Dollé P (1997) Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62: 67-78
- Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, Petkovich M, Chambon P, Dolle P (2002) Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet* 31: 84-88
- Wiśniewska A, Mazerska Z (2009) Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogenych. *Postepy Biochem* 55: 259-271
- Niemira M, Wiśniewska A, Mazerska Z (2009) Rola polimorfizmu i zróżnicowanej ekspresji genów cytochromów P450 w metabolizmie ksenobiotyków. *Postepy Biochem* 55: 279-289
- Chambers D, Wilson L, Maden M, Lumsden A (2007) RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development* 134:1369-1383
- Miano JM, Berk BC (2000) Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res* 87: 355-362
- Boylan JF, Gudas LJ (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-*trans*-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267: 21486-21491
- Fiorella PD, Napoli JL (1994) Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J Biol Chem* 269: 10538-10544
- Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dollé P (1997) Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev Dyn* 208: 199-210
- Everts HB, Sundberg JP, Ong DE (2005) Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems. *Exp Cell Res* 308: 309-319
- Huang FJ, Hsuw YD, Lan KC, Kang HY, Chang SY, Hsu YC, Huang KE (2006) Adverse effects of retinoic acid on embryo development and the selective expression of retinoic acid receptors in mouse blastocysts. *Hum Reprod* 21: 202-209
- Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Suzuki S, Handa M, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H (2002) Retinoid receptors in the developing human lung. *Clin Sci* 103: 613-621
- Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Krad'ba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C (1999) Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 7158-7167
- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274: 23695-23698
- Wolf G (2000) Cellular retinoic acid-binding protein II: a coactivator of the transactivation by the retinoic acid receptor complex RAR.RXR. *Nutr Rev* 58: 151-153
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dolle P, Mark M, Lufkin T, Le Meur M, Chambon P (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid


- binding protein II (CRABP II) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121: 539-548
31. Jazurek M, Dobrzyń P, Dobrzyń A (2008) Regulacja transkrypcji genów przez długolącuchowe kwasy tłuszczowe *Postepy Biochem* 54: 242-250
  32. Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10: 940-954
  33. Bastien J, Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328: 1-16
  34. Goncalves MBCV, Agudo M, Connor S, McMahon S, Minger SL, Maden M, Corcoran JPT (2009) Sequential RAR $\beta$  and  $\alpha$  signaling in vivo can induce adult forebrain neural progenitor cells to differentiate into neurons through Shh and Fgf signaling pathways. *Dev Biol* 326: 305-313
  35. Bour G, Lalevee S, Rochette-Egly C (2007) Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* 17: 302-309
  36. Serpente P, Tümpel S, Ghyselinck NB, Niederreither K, Wiedemann LM, Dollé P, Chambon P, Krumlauf R, Gould AP (2005) Direct cross-regulation between retinoic acid receptor  $\beta$  and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development* 132: 503-513
  37. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2009) Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 7: e002
  38. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58: 760-772
  39. Romeih M, Cui J, Michaille JJ, Jiang W, Zile MH (2003) Function of RAR $\gamma$  and RAR $\alpha$ 2 at the initiation of retinoid signaling is essential for avian embryo survival and for distinct events in cardiac morphogenesis. *Dev Dyn* 228: 697-708
  40. Cui J, Michaille JJ, Jiang W, Zile MH (2003) Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev Biol* 260: 496-511
  41. Idres N, Marill J, Flexor MA, Chabot GC (2002) Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem* 277: 31491-31498
  42. Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M (2005) The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285: 224-237
  43. Roberts C, Ivins S, Cook AC, Baldini A, Scambler PJ (2006) Cyp26 genes a1, b1 and c1 are down-regulated in Tbx1 null mice and inhibition of Cyp26 enzyme function produces a phenocopy of DiGeorge syndrome in the chick. *Hum Mol Genet* 15: 3394-3410
  44. Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21: 444-448
  45. Cohlan SQ (1953) Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117: 535-536
  46. Niederreither K, Vermot J, Schaub B, Chambon P, Dollé P (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127: 75-85
  47. Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15: 213-25
  48. Vermot J, Messaddeq N, Niederreither K, Dierich A, Dollé P (2006) Rescue of morphogenetic defects and of retinoic acid signaling in retinaldehyde dehydrogenase 2 (*Raldh2*) mouse mutants by chimerism with wild-type cells. *Differentiation* 74: 661-668
  49. Vaessen M-J, Meijers JHC, Bootsma D, Geurts van Kessel A (1990) The cellular retinoic-acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid-induced malformations. *Development* 110: 371-378
  50. Simoes-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CYI, Davidson B, Xavier-Neto J (2005) The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol* 277: 1-15
  51. Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN (2002) *Fgf8* is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 129: 4613-4625
  52. Williams SS, Mear JP, Liang HC, Potter SS, Aronow BJ, Colbert MC (2004) Large-scale reprogramming of cranial neural crest gene expression by retinoic acid exposure. *Physiol Genomics* 19: 184-197
  53. Wilson JG, Roth CB, Warkany J (1953) An analysis of the syndrome of malformations included by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 92: 189-217
  54. Giroud A, Martinet M (1955) Malformations embryonnaires par hypervitaminose A. *Arch Fr Pediatr* 12: 292-300
  55. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Lott IT (1985) Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313: 837-841
  56. Waxman JS, Keegan BR, Roberts RW, Poss KD, Yelon D (2008) Hoxb5b acts downstream of retinoic acid signaling in the forelimb field to restrict heart field potential in zebrafish. *Dev Cell* 15: 923-934
  57. Goldie LC, Lucitti JL, Dickinson ME, Hirschi KK (2008) Cell signaling directing the formation and function of hemogenic endothelium during murine embryogenesis. *Blood* 112: 3194-3204
  58. Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, Hirschi KK (2003) Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development* 130: 6465-6474
  59. Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N (2000) Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol* 219: 129-141
  60. Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin SC, Chi X, Schwartz R, Zaffran S, Niederreither K (2008) Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2913-8
  61. Sirbu IO, Zhao X, Duester G (2008) Retinoic acid controls heart antero-posterior patterning by downregulating *Isla1* through the *Fgf8* pathway. *Dev Dyn* 237: 1627-1635
  62. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from *Fgf10*-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 1: 435-440
  63. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR (2001) The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* 238: 97-109
  64. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128: 3179-3188
  65. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-835
  66. Galli D, Domínguez JN, Zaffran S, Munk A, Brown NA, Buckingham ME (2008) Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field which acquires left-right identity as *pitx2c* is expressed. *Development* 135: 1157-1167
  67. Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM (2005) Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* 8: 85-95
  68. Vincent SD, Buckingham ME (2010) How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol* 90: 1-41
  69. Lin S-C, Dollé P, Ryckebusch L, Nosedá M, Zaffran S, Schneider MD, Niederreither K (2010) Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 9234-9239
  70. Yasui H, Morishima M, Nakazawa M, Ando M, Aikawa E (1999) Developmental spectrum of cardiac outflow tract anomalies encompassing transposition of the great arteries and dextroposition of the aorta: pathogenic effect of extrinsic retinoic acid in the mouse embryo. *Anat Rec* 254: 253-260

71. Yan M, Sinning AR (2001) Retinoic acid administration is associated with changes in the extracellular matrix and cardiac mesenchyme within the endocardial cushion. *Anat Rec* 263: 53-61
72. Chan WY, Cheung CS, Yung KM, Copp AJ (2004) Cardiac neural crest of the mouse embryo: axial level of origin, migratory pathway and cell autonomy of the *spotch* (*Sp<sup>211</sup>*) mutant effect. *Development* 131: 3367-3379
73. Boot MJ, Gittenberger-de Groot AC, Van Iperen L, Hierck BP, Poelmann RE (2003) Spatiotemporally separated cardiac neural crest subpopulations that target the outflow tract septum and pharyngeal arch arteries. *Anat Rec Part A* 275: 1009-1018
74. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (1999) A subpopulation of apoptosis-prone cardiac neural crest cells targets to the venous pole: multiple functions in heart development? *Dev Biol* 207: 271-286
75. Poelmann RE, Mikawa T, Gittenberger-de Groot AC (1998) Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis. *Dev Dyn* 212: 373-384
76. Hildreth V, Webb S, Bradshaw L, Brown N A, Anderson R H, Henderson D J (2008) Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart. *J Anat* 212: 1-11
77. Hutson MR, Zhang P, Stadt HA, Sato AK, Li YX, Burch J, Creazzo TL, Kirby ML (2006) Cardiac arterial pole alignment is sensitive to Fgf8 signaling in the pharynx. *Dev Biol* 295: 486-497
78. Yelbuz TM, Waldo KL, Kumiski DH, Stadt HA, Wolfe RR, Leatherbury L, Kirby ML (2002) Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation. *Circulation* 106: 504-510

## Retinoids – their metabolites, action, and role in heart development

Emilia Stachurska, Anna Ratajska 

Department of Pathological Anatomy, Medical University of Warsaw, Center of Biostructure, 5 Chalubińskiego St., 02-004 Warsaw, Poland

 e-mail: arataj@ib.amwaw.edu.pl

**Key words:** retinoids, retinoid receptors, CRABP I and II, RBP, retinoid embryopathy, heart defects

### ABSTRACT

Retinoids constitute a group of active compounds known as vitamin A. Apart from an unquestionable function in adults, retinoids also play a profound role in many events during embryonic development for instance in axial patterning and organogenesis. Retinoic acid is the most active biological form of vitamin A. Its signaling both in adults and during embryonic development occurs at different levels through interaction with specific proteins and nuclear receptors. Retinoic acid signaling in heart development occurs mostly via interaction with secondary heart field cells by restricting their spatial expansion and controlling proper addition of these cells to the cardiac tube. This signal requires precise level of local retinoic acid, excess or insufficiency of which causes various malformations of the embryo and embryonic heart. Although retinoid signaling in the developing heart is a highly significant developmental factor, it is not yet fully understood. The following review summarises recent developments regarding this subject.

Marzena Jędrzejczak-Krzepkowska

Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; tel.: (42) 631 33 54, e-mail: marzena.jedrzejczak-krzepkowska@p.lodz.pl

Artykuł otrzymano 4 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 16 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** bifidobakterie, fruktany typu inuliny, inulina, fruktooligosacharydy, oligosacharydy

**Wykaz skrótów:** ABC (ang. *ATP-Binding Cassette Transporters*) – transportery ABC; BSH (ang. *bile salt hydrolase*) – hydrolaza soli żółci; FOS – fruktooligosacharydy; IL – interleukina; GPH – ang. *cation symporter family*; GNB – galakto-N-bioza; LNB – lacto-N-bioza; MFS – ang. *major facilitator superfamily*; MIP – ang. *major intrinsic protein family*; PTS (ang. *phosphotransferase system*) – system fosfotransferazowy

## STRESZCZENIE

Bifidobakterie i metabolizowane przez nie cukry od kilkadziesiąt lat cieszą się ogromnym zainteresowaniem w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Prowadzenie obszernych badań nad bifidobakteriami jest podyktowane rosnącą wiedzą na temat roli tych mikroorganizmów. Przedstawiona praca stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat bifidobakterii i fermentowanych przez nie fruktanów typu inuliny. W pierwszej części artykułu opisano bifidobakterie, w tym ich występowanie i udokumentowany, korzystny wpływ na zdrowie człowieka. W drugiej części scharakteryzowano fruktany typu inuliny, m.in. ich strukturę i występowanie, jak również enzymy hydrolizujące wiązania  $\beta$ -(2,1)-glikozydowe w fruktanach, a także zróżnicowaną aktywność bifidobakterii w degradacji tych cukrów.

## WPROWADZENIE

Bifidobakterie po raz pierwszy zostały wyizolowane przez H. Tissier'a w 1899 roku i pod nazwą *Bacillus bifidus* opisane jako dominująca u niemowląt karmionych mlekiem matki mikroflora jelitowa, która korzystnie wpływa na zdrowie gospodarza. Taksonomia tych bakterii ulegała zmianom. Próbowano zaliczać je do rodzajów *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* i *Corynebacterium*, zanim wreszcie w 1974 roku zostały uznane jako oddzielny rodzaj *Bifidobacterium* [1]. Obecnie rodzaj ten obejmuje aż 31 gatunków i 9 podgatunków, pogrupowanych na podstawie naturalnego środowiska występowania oraz cech fenotypowych, takich jak morfologia komórki, czy profil fermentacji sacharydów. Do detekcji i identyfikacji tych bakterii stosowane są tradycyjne metody hodowlane z użyciem selektywnych podłoży, zawierających np. chlorek litu, propionian sodu, błękit aniliny czy antybiotyki, np. neomycynę, polimyksynę B, mupirocynę, a także metody biologii molekularnej oparte na analizie kwasów nukleinowych. Do najczęściej wykorzystywanych należą: hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH), elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), analiza restrykcyjna amplifikowanego genu *ldh* czy 16S rRNA (ARDRA) oraz analiza zachowanych w ewolucji sekwencji nukleotydowych, m.in. 16S rRNA, *recA*, *ldh*, *tuf*, *GroEL* [2,3]. Użycie metod genetycznych pozwoliło zaklasyfikować większość spośród znanych dotąd gatunków bifidobakterii do sześciu klastrow filogenetycznych, takich jak *B. boum*, *B. asteroides*, *B. adolescentis*, *B. pollorum*, *B. longum* i *B. pseudolongum* [4].

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIFIDOBAKTERII

Bifidobakterie są jednymi z najważniejszych drobnoustrojów zasiedlających przewód pokarmowy człowieka i zwierząt, jak również owadów (np. pszczoły miodnej), a także błony śluzowej jamy ustnej i dróg rodnych [2]. W organizmach ludzi występuje aż 12 gatunków tych bakterii, przede wszystkim *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. pseudocatenulatum* i *B. breve* [5-8]. Wykazano, że bifidobakterie są jednymi z pierwszych mikroorganizmów zasiedlających jelitowy przewód pokarmowy noworodka i stanowią największą grupę mikroflory jelitowej (nawet 95% całej populacji) w okresie karmienia mlekiem matki [9,10]. Wynika to ze zdolności bifidobakterii do wykorzystywania składników mleka ludzkiego, zwłaszcza sacharydów, takich jak: laktuloza, krótkołańcuchowe trisacharydy (np. sialyllaktoza, fukozyllaktoza) oraz wysokocząsteczkowe glikany zbudowane z N-acetyllaktozaminy [3,4,11-13]. Bifidobakterie, pomimo obserwowanych wraz z wiekiem i dietą zmian w mikroflorze jelitowej, występują również u osób dorosłych, chociaż w znacznie mniejszej liczbie. Wyniki metod hodowlanych pokazują, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* są pod względem udziału ilościowego trzecim rodzajem (po *Bacteroides* i *Eubacterium*) i stanowią od 3% do 6% całkowitej populacji tej mikroflory [14-17]. Natomiast analizy metagenomowe wskazują na większą różnorodność ekosystemu jelita. Stwierdzono, iż u dorosłego człowieka dominują głównie dwa



typy, tj. *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, a ponadto licznie występują *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* i *Tenericutes*, zaś bifidobakterie stanowią grupę nieliczną [3,8].

Mikroorganizmy z rodzaju *Bifidobacterium* są bakteriami Gram(+), katalazo ujemnymi (za wyjątkiem *B. indicum* i *B. asteroides*) i nie tworzą przetrwalników. Ich komórki mają zwykle postać nieregularnych, rozgałęzionych pałeczek w kształcie litery V lub Y, a ich forma morfologiczna zależy od gatunku, warunków hodowli i fazy wzrostu [3,18]. Omawiane mikroorganizmy nie poruszają się, natomiast wykazują zdolność adhezji do komórek nabłonka jelita. Ważną rolą w utrzymaniu ich w naturalnym środowisku bytowania pełnią białka powierzchniowe z motywem LPXTG [3], lipoproteina BopA, kwasy lipoteichoje [19], fimbrie, a także egzopolisacharydy, które w przypadku *B. longum*, zbudowane są głównie z reszt galaktozy i glukozy, zaś w przypadku *B. breve* i *B. bifidum* – z cząsteczek ramnozy [4,15,18].

Bifidobakterie zalicza się do bakterii beztlenowych, chociaż wśród niektórych gatunków obserwuje się tolerancję na tlen. Do szczególnie wyróżniających się należą *B. boum* i *B. thermophilum*, które charakteryzują się nawet lepszym wzrostem w atmosferze zawierającej 20% O<sub>2</sub> i 80% N<sub>2</sub>, natomiast w typowych warunkach tlenowych nie wykazują wzrostu [18,20]. W przypadku niektórych szczepów stwierdzono, że tolerancja na tlen jest spowodowana aktywnością oksydazy NADH, peroksydazy NADH, dysmutazy nadtlenkowej lub reduktazy tioredoksyny [3,15]. Najnowsze badania wykazały, że szczepy *B. scardovii* BAA773 i *B. adolescentis* ATCC15703 hodowane w pożywce zawierającej niskie stężenia czynnika redukującego tlen (np. chlorowodorek cysteiny) lub nawet bez takiego dodatku, mogą syntetyzować granule polifosforanu (poli P). Ziarna te są wytwarzane i gromadzone wewnątrz komórki przez bifidobakterie w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Mogą również przyczynić się do większej tolerancji na inne czynniki środowiska, takie jak np. niskie pH, a także pozwolić na efektywniejszą kolonizację tych bakterii *in vivo*. W przypadku *B. scardovii* BAA773 zidentyfikowano gen *ppk* kodujący kinazę polifosforanową (EC 2.7.4.1), która katalizuje reakcję syntezy poli P. Co więcej, na bazie analizy sekwencji nukleotydowej stwierdzono, że w/w gen wykazuje od 91 do 87% identyczności z sekwencjami genu *ppk* innych bifidobakterii [21].

Bifidobakterie należą do typu *Actinobacteria*. Ich materiał genetyczny charakteryzuje się wysoką zawartością nukleotydów G+C (od 42 do 67 mol%). Natomiast ze względu na beztlenowy rozkład sacharydów klasyfikuje się je do bakterii fermentacji mlekowej, chociaż filogenetycznie są od tej grupy odległe [18].

Środowisko zasiedlane przez bifidobakterie, jak np. jelito grube, jest ubogie w mono- i disacharydy, obfituje zaś w nie trawione przez endogenne enzymy w górnej części przewodu pokarmowego oligo- i polisacharydy, takie jak galaktoligosacharydy, ksylooligosacharydy, fruktany typu inuliny, arabinogalaktany, arabinoksylany, celuloza, hemiceluloza, oligosacharydy sojowe, laktuloza, izomaltoligosacharydy, pektyny, pullulan, a także substancje produkowane przez gospodarza, np. mucynę, glikosfingolipidy, kwas hia-

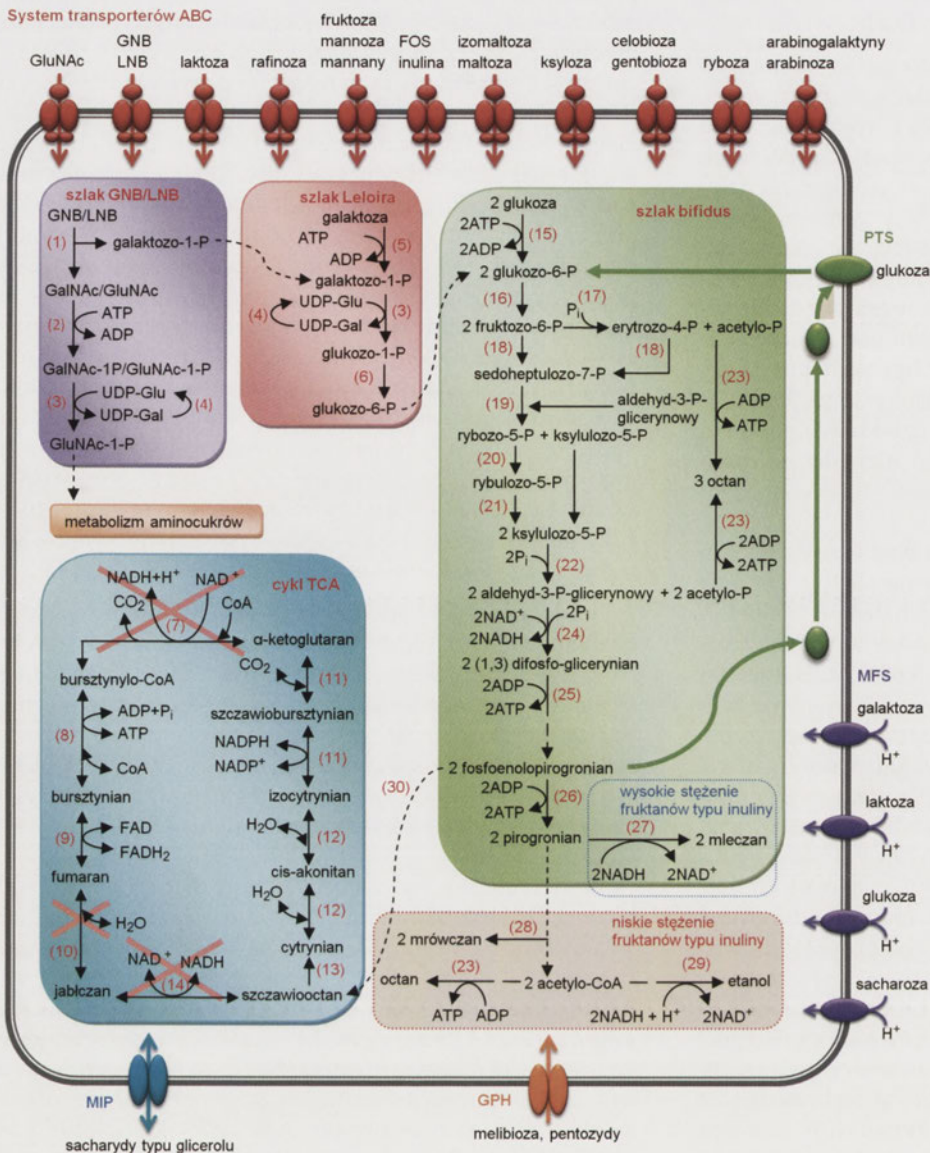
luronowy, czy heparynę [3,15,18]. Opiswane drobnoustroje bardzo dobrze przystosowały się do wykorzystania jako źródła węgla dostępnych w jelicie złożonych sacharydów, głównie poprzez biosyntezę licznych enzymów o zróżnicowanych właściwościach hydrolitycznych [4,22]. Przykładowo Schell i wsp. [15] wykazali, że ponad 8% genomu *B. longum* NCC2705 stanowią geny związane z metabolizmem oligosacharydów, przy czym samych tylko hydrolaz glikozydowych, kodowanych w sekwencji nukleotydowej jest ponad 40. Enzymy te, wewnątrz lub na zewnątrz komórki, degradują złożone sacharydy do monocukrów. Uzyskane produkty hydrolizy mogą być dalej metabolizowane w unikalnym tzw. szlaku bifidus do kwasu octowego i mlekowego (w teoretycznej proporcji 3:2), a część pirogronianu może być przekształcana w etanol i kwas mrówkowy. Wiadomo, że rodzaj i zawartość końcowych metabolitów zależy od szczepu, rodzaju i stężenia sacharydów. W przypadku fermentacji stężonych fruktanów typu inuliny obserwowano wzrost produkcji kwasu octowego kosztem mlekowego, zaś przy niskim stężeniu tych cukrów powstawało więcej kwasu octowego i mrówkowego oraz etanolu (Ryc. 1) [23].

Bifidobakterie charakteryzują się unikalnym sposobem fermentacji sacharydów, ze względu na udział ketolazy fruktozo-6-fosforanowej, która rozczepia fruktozo-6-fosforan do erytrozo-4-fosforanu i acetylofosforanu. Gen kodujący ketolazę fruktozo-6-fosforanową zidentyfikowano tylko w blisko spokrewnionych z rodzajem *Bifidobacterium* bakteriach rodzaju *Gardnerella vaginalis* oraz gram ujemnych bakteriach *Gluconacetobacter xylinus* [3].

W dotychczas zsekwencjonowanych genomach bifidobakterii zidentyfikowano geny kodujące zarówno białka szlaku bifidus, szlaku Leloir, jak i białka cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA), za wyjątkiem dehydrogenazy 2-oksoglutarynowej, dehydrogenazy jabłczanowej oraz fumarazy (Ryc. 1). Co więcej, w wyniku przeprowadzonych badań molekularnych, zidentyfikowano sekwencje kodujące białka odpowiedzialne za transport cukrów do komórki, takie jak transportery ABC, PTS, MFS, GPH i MIP [3,17]. Ostatnie badania ujawniły istnienie nowego unikalnego szlaku metabolicznego GNB/LNB, niezbędnego do hydrolizy disacharydów mleka ludzkiego, LNB oraz glikokoniugatów, GNB. Kluczowym enzymem tego szlaku jest fosforylaza  $\beta$ -1,3-galaktozylo-N-acetyloheksosaminy, która hydrolizuje substraty z udziałem nieorganicznego fosforu (Ryc. 1) [12].

## PROZDROWOTNE WŁAŚCIWOŚCI BIFIDOBAKTERII

Powszechnie uważa się, że omawiane bakterie korzystnie wpływają na organizm gospodarza, jednakże oddziaływanie to musi być udokumentowane. Wiadomo, że aktywność probiotyczna jest charakterystyczna tylko dla danego szczepu i nie można jej przypisać innym szczepom należącym do tego samego gatunku, czy blisko spokrewnionym [24,25]. Nazwa „probiotyk” pochodzi z języka greckiego od *pro bios*, co oznacza „dla życia”. Według definicji podawanej przez Schrezenmeier i De Vrese [26] probiotyk, to preparat lub produkt zawierający wystarczającą liczbę żywych, zdefiniowanych mikroorganizmów, które zmieniają mikroflorę w poszczególnych organach gospodarza przez



Rycina 1. Szlaki metaboliczne ustalone na podstawie analiz sekwencji nukleotydowych genomu bifidobakterii; (1) fosforylaza β-1,3-galaktozylo-N-acetyloheksosaminy (EC 2.4.1.211); (2) kinaza N-acetyloheksosaminy (EC 2.7.1.162); (3) rydylotransferaza galaktozo-1-P (EC 2.7.7.12); (4) 4-epimeraza UDP-glukozy (EC 5.1.3.2); (5) galaktokinaza (EC 2.7.1.6); (6) fosfoglukomutaza (EC 5.4.2.2); (7) kompleks dehydrogenazy α-ketoglutaranowej; (8) syntetaza bursztynilo-CoA (EC 6.2.1.5); (9) dehydrogenaza bursztynianowa (EC 1.3.99.1); (10) fumaraza; (11) dehydrogenaza izocytrynianowa (EC 1.1.1.42); (12) akonitaza (EC 4.2.1.3); (13) syntaza cytrynianowa (EC 2.3.3.1); (14) dehydrogenaza jablczanowa; (15) heksokinaza (EC 2.7.1.2); (16) izomeraza glukozyfosforanowa (EC 5.3.1.9); (17) ketolaza fruktozo-6-fosforanowa (EC 4.1.2.22); (18) transaldolaza (EC 2.2.1.2); (19) transketolaza (EC 2.2.1.1); (20) izomeraza rybozofosforanowa (EC 5.3.1.6); (21) 3-epimeraza rybulozofosforanowa (EC 5.1.3.1); (22) fosfoketolaza (EC 2.2.1.1); (23) acetokinaza (EC 3.6.1.7); (24) dehydrogenaza aldehydu-3-P-glicerynowego (EC 5.4.2.1); (25) kinaza 3-P-glicerynianowa (EC 4.2.1.11); (26) kinaza pirogonianowa (EC 2.7.1.40); (27) dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27); (28) liaza mrovczanowa (EC 2.3.1.54); (29) dehydrogenaza alkoholowa (EC 1.1.1.1); (30) karboksylaza fosfoenolpirogonianowa (EC 4.1.1.31); na podstawie artykułów [3,12,17,23]

implantację lub kolonizację i w ten sposób pozytywnie oddziałują na jego zdrowie.

Liczne przeprowadzone badania wskazują, że ważnym czynnikiem są wytwarzane przez bifidobakterie w procesie fermentacji monocukrów metabolity, takie jak krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe. Produkty te są absorbowane z okrężnicy i dalej metabolizowane przez wątrobę, mięsień sercowy i mózg [9,27,28]. Dodatkowo, kwas octowy poprawia przepływ krwi przez błonę śluzową i stymulu-

je rozrost komórek nabłonka okrężnicy [29]. Wykazano również, że kwasy mlekowy i octowy mogą być przekształcane do kwasu masłowego przez inne bakterie zasiedlające okrężnicę, tj. należące do rodzaju *Roseburia* i *Eubacterium* [30,31]. Z kolei kwas masłowy stymuluje apoptozę komórek rakowych, a więc może chronić przed rozwojem nowotworów i/lub wrzodzącym zapaleniem okrężnicy. Ponadto, kwas ten jest preferowanym źródłem energii dla komórek nabłonka jelita, wpływa na ich rozrost poprzez uwalnianie czynników wzrostu albo w wyniku bezpośredniego działania na geny regulujące ich rozmnażanie [27,32-34].

Istnieją również dowody, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe i kwas mlekowy stymulują absorpcję wody i sodu oraz polepszają perystaltykę jelita, przez co chronią przed zaparciami [1,35]. Co więcej, kwasy te przyczyniają się do zwiększenia przyswajalności składników mineralnych, w tym głównie wapnia, magnezu i żelaza. Wymienione minerały zwykle występują w połączeniu z innymi związkami w żywności, w postaci tzw. kompleksów, z których są uwalniane dopiero po osiągnięciu jelita grubego. Możliwość ich wchłaniania przez nabłonek okrężnicy to efekt większej rozpuszczalności tych składników oraz wzrostu ich ilości w formie jonowej, w zakwaszonym przez krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe środowisku [35-38].

Kolejną zdrowotną właściwością bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz ich kwasowych metabolitów jest obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi. Proponowany mechanizm

zmniejszenia stężenia tego składnika w organizmie wiąże się z biosyntezą hydrolazy soli żółci, nazywanej też hydrolazą choliloglicyny (EC 3.5.1.24). Stwierdzono, że większość bifidobakterii wykazuje wyższą aktywność BSH niż inne mikroorganizmy jelitowe. Enzym ten hydrolizuje wiązania amidowe w kwasach żółciowych skoniugowanych z tauryną lub glicyną, z uwolnieniem pierwotnych kwasów żółciowych. Produkty te, z powodu słabej rozpuszczalności, łatwo ulegają wytrąceniu w niskim pH, co w rezultacie pro-

wadzi do ich wydalania z przewodu pokarmowego. Ilość kwasów żółciowych, która nie została zaadsorbowana z jelita do ponownego użycia, musi być wytworzona na nowo w wątrobie z cholesterolu zawartego we krwi [39-41].

Innym mechanizmem redukującym stężenie cholesterolu w surowicy może być zmniejszenie absorpcji tego składnika z pokarmu do krwi. Proces ten może zachodzić na skutek asymilacji cholesterolu przez komórki bifidobakterii albo jego wytrącania w zakwaszonym środowisku jelita. Jak zaobserwowano w badaniach *in vitro*, cholesterol ulega precipitacji z podłoża hodowlanego bifidobakterii razem z dekonjugowanymi solami żółci, w pH poniżej 5,0 [42].

Bifidobakterie znane są również z tego, że obniżając pH treści jelita przyczyniają się do zmniejszenia poziomu licznych szkodliwych substancji, m.in. amoniaku we krwi. W obecności jonów wodorowych amoniak przekształca się w jony amonowe, a te nie ulegają dyfuzji z jelita grubego, co zapobiega hiperamonemii [9,43]. Obniżenie poziomu amoniaku w okrężnicy może być także wynikiem zdolności bifidobakterii do wykorzystania tego związku jako źródła azotu [1,15]. Udowodniono też, że zakwaszenie treści jelita przez metabolity wytworzone przez bifidobakterie w procesie fermentacji sacharydów hamuje wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych z rodzajów *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, czy enteropatogennych szczepów *E. coli*, a także niektórych gatunków *Bacillus* i *Clostridium* [1,9,32,35,43-45]. Co więcej, antagonizm bifidobakterii w stosunku do szkodliwych drobnoustrojów jest związany z biosyntezą substancji innych niż kwasy organiczne [46-48]. Takimi związkami mogą być np. bakteriocyny. Wykryto, że szczep *B. bifidum* NCFB1454 syntetyzuje bakteriocynę o nazwie Bifidocin B, która wykazuje aktywność antybakteryjną wobec kilku rodzajów, takich jak *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus* i *Pedococcus* [49]. Natomiast w genomie szczepu *B. longum* DJO10A Lee i wsp. [50] zidentyfikowali gen kodujący lantibiotyk, czyli peptyd zaliczany do I grupy bakteriocyn. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* mogą również wytwarzać substancje podobne do bakteriocyn oraz cząsteczki lipofilowe o masie <35 kDa [6,51,52]. Utrzymaniu równowagi w składzie mikroflory jelitowej i ochronie przed infekcjami, czy złagodzeniu ich objawów sprzyja też zdolność adhezencji bifidobakterii do nabłonka jelita oraz konkurencja o składniki pokarmowe.

Ustabilizowany skład mikroflory jelitowej chroni przed stanami zapalnymi, a tym samym przed powstawaniem nowotworów. Wiadomo, że do głównych czynników wirulencji zalicza się toksyny bakteryjne, które działają specyficznie na komórki gospodarza – ingerują w szlaki przekazywania sygnałów, zakłócają prawidłowy podział komórek i procesy apoptozy, a niektóre toksyny, np. CDT bakterii *E. coli*, *Campylobacter* spp., bezpośrednio uszkadzają DNA [53]. Ponadto, bifidobakterie hamując rozwój niekorzystnych mikroorganizmów w okrężnicy, powodują obniżenie zawartości produktów ich metabolizmu, a w szczególności enzymów uczestniczących w procesie kancerogenezy, takich jak  $\beta$ -glukuronidaza (EC 3.2.1.31), nitroreduktaza (EC 1.7.1.1), azoreduktaza (EC 1.7.1.6), hydrolaza kwasu glikocholowego (EC 3.5.1.24), przez co chronią przed rozwojem nowotworów okrężnicy [1,34,36].

Jeszcze inny mechanizm działania przeciwnowotworowego może wiązać się ze stymulacją systemu immunologicznego. Lee i wsp. [54] na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* stwierdzili, że ekstrakt bezkomórkowy *B. adolescentis* SPM0212 otrzymany przy użyciu butanolu hamuje proliferację ludzkich komórek nowotworowych nabłonka jelita linii HT-29, Caco-2. Natomiast w przypadku mysich makrofagów RAW 264.7 powoduje zmianę morfologii oraz indukuje ich aktywność, co prowadzi do znacznego wzrostu sekrecji czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor*) i tlenu azotu, czynniki te są regulatorami immunologicznymi i są cytostatyczne wobec komórek nowotworowych. W innych badaniach zaobserwowano, że na stymulację systemu immunologicznego mają wpływ zarówno żywe komórki bifidobakterii, jak i ekstrakty bezkomórkowe oraz frakcje ściany komórkowej. Molekularny mechanizm immunomodulacji pozostaje nadal nie wyjaśniony, chociaż uważa się, że biorą w nim udział specyficzne cząsteczki bakteryjne i receptory komórek gospodarza, które modulują dalszą odpowiedź. Cząsteczkami bakteryjnymi są najczęściej komponenty ściany komórkowej: peptydoglikan, kwas lipoteichojowy, wewnątrz i zewnątrzkomórkowe polisacharydy oraz lipoproteina BopA [55-57].

W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że poszczególne gatunki bifidobakterii, a nawet szczepy należące do tych samych gatunków, indukują specyficzny profil cytokin w liniach komórkowych nabłonka jelita. Testowane szczepy najczęściej stymulują wytwarzanie IL10, a także zwiększają odpowiedź typu Th1 poprzez wzrost poziomu interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i redukcję IL-4 [55,56,58-61]. Co więcej, ostatnie analizy profilu cytokin wytwarzanych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) inkubowanych w obecności trzech szczepów *B. bifidum* wykazały po raz pierwszy znaczące wydzielanie IL-17 oraz wysoki stopień IL-1 $\beta$ /IL-12, co według Lopez i wsp. [56] może mieć ważne znaczenie w obronie gospodarza przeciw szkodliwym mikroorganizmom.

Najnowsze badania wskazują, że działanie przeciwnowotworowe *B. animalis* AHC7 wynika z modulacji aktywności czynnika jądrowego  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*), aktywowanego w odpowiedzi na infekcje związane z modulacją produkcji prozapalnych cytokin w błonie śluzowej [61]. NF- $\kappa$ B występuje w stanie nieaktywnym w cytoplazmie w połączeniu z inhibitorem I $\kappa$ . Dopiero fosforylacja i degradacja tego inhibitora powoduje aktywację NF- $\kappa$ B i jego transport do jądra komórkowego, gdzie kontroluje ekspresję około 200 genów, związanych z ważnymi procesami komórkowymi, takimi jak proliferacja, różnicowanie oraz apoptoza. NF- $\kappa$ B jest m.in. odpowiedzialny za wytwarzanie antyapoptycznych białek np. IAP, Bcl-2 [53,62]. O'Mahony i wsp. stwierdzili, że porównaniu z próbami kontrolnymi, myszy zainfekowane *S. typhimurium* i karmione *B. animalis* AHC7 wykazywały zmniejszoną aktywność NF- $\kappa$ B. Molekularny mechanizm modulacji NF- $\kappa$ B dotychczas nie został wyjaśniony. Przypuszcza się, iż *B. animalis* AHC7 indukuje odpowiedź komórek dendrycznych, co poprzez zwiększenie ekspresji czynnika Foxp3 (ang. *forkhead box P3*) w natywnych limfocytach T, prowadzi do zmniejszenia aktywności NF- $\kappa$ B [61].

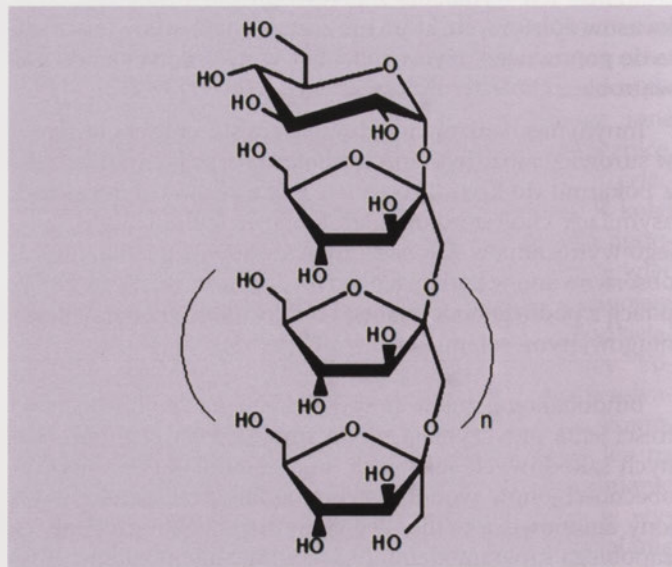
Stymulacja systemu immunologicznego przez bifidobakterie chroni przed chorobami atopowego zapalenia skóry i alergiami pokarmowymi. W badaniach przeprowadzonych przez Kim i wsp. [63] na indukowanych albuminą jaja kurzego modelowych myszach, którym podawano *Bifidobacterium lactis* ADO11, zaobserwowano w surowicy zahamowanie wytwarzania przeciwciał IgE i IgG1, specyficznych wobec owoalbuminy w porównaniu z próbą kontrolną (myszy nie karmione bifidobakteriami).

Bifidobakterie poprawiają również tolerancję wobec laktozy. Wiadomo, że objawiający się zaburzeniami jelitowymi (wzdęcia, biegunki), syndrom nietolerancji, dotyczy licznej populacji osób dorosłych i związany jest z obniżeniem, a nawet całkowitym zanikiem aktywności  $\beta$ -galaktozydazy w błonie śluzowej jelita. Złagodzenie nietolerancji na ten disacharyd, to efekt hydrolitycznej aktywności  $\beta$ -galaktozydazy, która jest wytwarzana przez bifidobakterie nawet w postaci kilku izoform [36,64-66]. W odniesieniu do niektórych szczepów bifidobakterii istnieją również laboratoryjne dowody na to, że syntetyzują one aminokwasy (alaninę, walinę, kwas asparaginowy, glutaminę, treoninę) oraz witaminy z grupy B, czyli tiaminę ( $B_1$ ), pirydoksal ( $B_6$ ), kobalaminę ( $B_{12}$ ), kwas foliowy i kwas nikotynowy [1,6,25]. W przypadku szczepu *B. longum* NCC2705 na poziomie sekwencji nukleotydowej zidentyfikowano kompletny szlak biosyntezy witamin, takich jak kwas foliowy, tiamina i kwas nikotynowy [15]. Przeprowadzone liczne badania *in vitro*, jak również *in vivo* wykazały, że na wzrost bifidobakterii i/lub opisywaną powyżej aktywność probiotyczną wpływają stymulująco oligo- oraz polisacharydy, w tym szczególnie fruktany typu inuliny [43,67-71].

## FRUKTANY TYPU INULINY

Fruktany typu inuliny, to cukry bardzo dobrze poznane pod względem chemicznym i klinicznym. Są uważane za modelowe prebiotyki [72], czyli odporne na enzymy trawienne człowieka składniki żywności, które korzystnie wpływają na organizm przez selektywną stymulację wzrostu i/lub aktywności jednego gatunku lub ograniczonej liczby gatunków bakterii w okrężnicy i w ten sposób poprawiają stan zdrowia gospodarza [9]. Do fruktanów typu inuliny zalicza się inulinę, oligofruktozę oraz FOS. Związki te charakteryzują się podobną strukturą chemiczną (Ryc. 2), a różnią się tylko stopniem polimeryzacji oraz brakiem glukozy na początku łańcucha fruktozowego w przypadku oligofruktozy.

Inulina jest polimerem liniowym złożonym z cząsteczki sacharozy i jednostek  $\beta$ -D-fruktozy, połączonych za pomocą wiązania  $\beta$ -(2,1) glikozydowego. Stopień polimeryzacji inuliny waha się od 2 do 60 jednostek fruktozy, średnio wynosi 12. Polisacharyd ten jest w świecie roślin szeroko rozpowszechnionym materiałem zapasowym oraz pełni prawdopodobnie funkcję ochronną przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Głównym naturalnym źródłem inuliny są cykoria, cebula, słonecznik bulwiasty (topinambur), pszenica, żyto, jęczmień, banan, por, czosnek, karczoch, pomidor, szparagi, dalia, mniszek lekarski, a także miód [73-75].



Rycina 2. Struktura chemiczna fruktanów typu inuliny.  $n=0$  kestoza,  $n=1$  nystoza,  $n > 9$  inulina.

Inulina i oligofruktoza są dostępne na rynku pod nazwą Raftilose i Raftiline, a producentem tych preparatów jest firma Orafit w Belgii. Podobne produkty są wytwarzane przez firmę Sensus (Holandia), ich komercyjna nazwa to Frutafit [76,77]. Na skalę przemysłową inulinę pozyskuje się z cykorii (*Cichorium intybus*) lub topinamburu (*Helianthus tuberosus*), w procesie ekstrakcji i oczyszczania. Oligofruktozę zaś wytwarza się w wyniku kontrolowanej hydrolizy inuliny z udziałem endoinulinyazy. Stopień polimeryzacji łańcucha oligofruktozy wynosi od 2 do 10 jednostek fruktozy, średnia wartość DP to 4 [36,73]. Z kolei FOS są krótkołańcuchowymi oligosacharydami, produkowanymi na skalę przemysłową z sacharozy, przy zastosowaniu enzymów o aktywności fruktozylotransferazy ( $\beta$ -fruktofuranazy EC 3.2.1.26 lub inulosacharaza EC 2.4.1.9) pochodzenia mikrobiologicznego, głównie z pleśni rodzajów *Aspergillus* i *Aureobasidium* [78,79]. Na rynku od dawna są dostępne wysokooczyszczone FOS, otrzymane przy użyciu  $\beta$ -fruktofuranazy, w których nie przereagowany substrat oraz produkty uboczne zostały oddzielone przy użyciu metod chromatograficznych. Tymi komercyjnymi preparatami są np. Meiligo i Nutraflora, produkowane przez firmę Meiji Seika Kaisha w Japonii oraz produkt o nazwie Actilight, wytwarzany we Francji przez firmę Beghin-Meiji Industries [76].

Z powodu budowy wiązania glikozydowego fruktany typu inuliny nie są degradowane przez enzymy trawienne człowieka. Charakteryzują się niską wartością kaloryczną  $\sim 1,5$  kcal/g (6,3 kJ/g) oraz niewielką słodkością. W przypadku 1-kestozy, nystozy i 1<sup>F</sup>-fruktozyl-nystozy oszacowano słodcz na poziomie odpowiednio 31, 22 i 16% w porównaniu do sacharozy. Zaobserwowano również, że wraz ze wzrostem DP rośnie lepkość wodnych roztworów fruktanów [74,80]. Cukry te, z powodu ich prebiotycznych właściwości, są stosowane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Co więcej, znajdują zastosowanie w produkcji żywności, ze względu na właściwości fizykochemiczne. Są wykorzystywane jako zamienniki tłuszczu i sacharozy, peł-

nią rolę stabilizatorów piany, poprawiają smak, konsystencję, a także jakość wyrobów piekarniczych, tzn. powodują, że są one bardziej kruche i dłużej zachowują świeżość. Gotowe produkty zawierające fruktany typu inuliny wykazują znacznie obniżoną kaloryczność, nie przyczyniają się do wzrostu poziomu glukozy i insuliny we krwi, dzięki czemu mogą być stosowane przez diabetyków. Sacharydy te dodaje się do wyrobów cukierniczych, pieczywa, dżemów, lodów, czekolad, produktów mlecznych, żywności dla dzieci, a nawet niektórych przetworów mięsnych [36,73,81]. Inulina jest wykorzystywana jako substrat w przemysłowych procesach fermentacyjnych oraz w przemyśle spożywczym, gdyż jest tanim i dostępnym źródłem dla mikrobiologicznej produkcji syropów fruktozowych, etanolu, a także acetonu i butanolu [75].

## ENZYMY ROZKŁADAJĄCE FRUKTANY TYPU INULINY

Fruktany typu inuliny są składnikami diety powszechnie występującymi w naturalnych produktach oraz stosowanymi jako funkcjonalne dodatki do żywności. Nie są one rozkładane przez enzymy trawienne człowieka i dopiero w okrężnicy ulegają asymilacji przez zasiedlającą mikroflorę, szczególnie przez bifidobakterie. W badaniach *in vivo* wykazano, że ~100% nie rozkładanych oligosacharydów dociera do jelita, z czego 86+88% osiąga koniec jelita cienkiego. Pozostała ilość, tj. 12+14% tych cukrów jest hydrolizowana przez bakterie kolonizujące część dystalną jelita cienkiego. Co więcej, sacharydy te nie są wykrywane w moczu, co wskazuje, że nie są w znaczącym stopniu absorbowane ze światła jelita [80]. Wysoka specyficzność fruktanów typu inuliny, jako źródła węgla wykorzystywanego tylko przez nieliczne drobnoustroje jelitowe, wynika z wytwarzania przez te ostatnie specyficznego enzymu degradującego wiązania  $\beta$ -(2,1) glikozydowe [82-84].

Wiadomo [85], że enzymy, które mogą hydrolizować fruktany typu inuliny, to przede wszystkim:

– inulinaza (EC 3.2.1.7), która hydrolizuje wewnętrzne wiązania  $\beta$ -(2,1) glikozydowe inuliny z wytworzeniem inulo-oligosacharydów; enzym ten syntetyzują np. *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficcum*, *Xanthomonas oryzae*, *Penicillium purpurogenum*;

– fruktohydrolaza  $\beta$ -D-fruktofuranosydów (EC 3.2.1.26), która stopniowo uwalnia cząsteczki fruktozy od nie redukującego końca  $\beta$ -D-fruktofuranosydów; obecność tego białka wykazano np. u *Thermotoga maritima*, *Lactobacillus reuteri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Arabidopsis thaliana*, *Bifidobacterium infantis* ATCC15697, *Bifidobacterium lactis* DSM 10140;

–  $\beta$ -fruktozydaza fruktanowa (EC 3.2.1.80), która hydrolizuje wiązania  $\beta$ -(2,1) i  $\beta$ -(2,6) we fruktanach według mechanizmu egzo; enzym ten jest wytwarzany np. przez *Lactobacillus pentosus*, *Aspergillus awamori*, *Cichorium intybus*;

–  $\beta$ -(2,1)-fruktozydaza fruktanowa (EC 3.2.1.153), która hydrolizuje wiązania  $\beta$ -(2,1) od nie redukującego końca fruktanów; preferowanymi substratami są fruktany typu inuliny, szczególnie kestoza i nystoza; natomiast fruktany

typu lewanu mogą być hydrolizowane bardzo wolno albo w ogóle, zaś sacharoza jest słabo degradowanym substratem, a nawet może znacząco hamować aktywność enzymu; obecność tego białka wykazano np. u *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus*.

## HYDROLIZA FRUKTANÓW TYPU INULINY PRZEZ BIFIDOBAKTERIE

Od kilkunastu lat trwają intensywne badania nad fermentacją fruktanów typu inuliny przez mikroorganizmy jelitowe, a szczególnie przez bifidobakterie [83,84,86,87]. Przeprowadzone dotąd liczne analizy wskazały na zróżnicowaną degradację w/w cukrów. Przykładowo, Rossi i wsp. [88] stwierdzili, że preferowanym substratem do wzrostu bifidobakterii były FOS, zaś w podłożu z inuliną rosło tylko 8 spośród 55 testowanych szczepów. W doświadczeniach *in vitro* opisanych przez Biedrzycką i Bielecką [89], wysoko spolimeryzowana inulina również nie była degradowana przez bifidobakterie. Natomiast w badaniach *in vivo* autorki zaobserwowały, że w porównaniu z próbą kontrolną, polisacharyd ten spowodował wyższą liczebność populacji bifidobakterii. W związku z tym wydaje się, że selektywne i zróżnicowane wykorzystanie fruktanów przez bifidobakterie zależy od właściwości enzymu rozkładającego FOS, a także od obecności i zdolności innych drobnoustrojów do hydrolizy tych sacharydów.

Analizy degradacji oligofruktozy przez bakterie rodzaju *Bifidobacterium*, jak również *Lactobacillus*, *Bacteroides* oraz *Rosuberia* wykazały różnice w mechanizmie ich rozkładu. Stwierdzono w badaniach *in vitro*, że bakterie z rodzaju *Bacteroides* czy *Rosuberia* hydrolizują wszystkie frakcje fruktanów typu inuliny tak samo, to jest niezależnie od wielkości DP, uwalniając przy tym duże ilości fruktozy i krótkich oligosacharydów do podłoża. Natomiast bifidobakterie charakteryzują się wewnątrzkomórkową degradacją tych cukrów lub mechanizmem hydrolizy powiązanym z komórką. Zaobserwowano, że preferują krótkołańcuchowe fruktany, zaś dłuższe łańcuchy hydrolizują dopiero wtedy, gdy krótkie frakcje są dostępne w niewielkich ilościach. Taki mechanizm wskazuje na symbiotyczne interakcje pomiędzy wymienionymi bakteriami, a ponadto sugeruje lepsze przystosowanie do konkurencji z innymi mikroorganizmami o zasiedlenie jelita i wykorzystanie dostępnego tam źródła węgla [23,31,83,84]. Co więcej, nie wszystkie bifidobakterie są zdolne do metabolizowania fruktanów typu inuliny w takim samym stopniu. Różnorodność wykorzystania tych cukrów wiąże się z ich systemem transportu do komórki oraz właściwościami hydrolaz glikozydowych. W przypadku *B. longum* NCC2705 zidentyfikowano aż 19 systemów transportu cukrów, z czego 9 było indukowanych przez Raftilose P95 (oligofruktoza z fimy Orafiti) [17]. Przeprowadzone dotąd badania wskazują, że u bifidobakterii enzymem odpowiedzialnym za rozkład w/w cukrów jest  $\beta$ -fruktofuranosydaza. Wśród nielicznie scharakteryzowanych dotąd  $\beta$ -fruktofuranosydaz są takie, które wykazują wyższą aktywność wobec FOS, niż sacharozy [90-93] oraz takie, u których stwierdzono odwrotną zależność [94,95].

Według najnowszych doniesień literaturowych, interesujący podział bifidobakterii ze względu na ich zdolność w

kierunku degradowania fruktanów typu inuliny zaproponowali Falony i wsp. [72]. Testowane szczepy bifidobakterii podzielili na 4 główne klastry. Klaster A zawiera szczepy *B. bifidum* DSM 20082 i *B. bifidum* LMG 11583 oraz *B. breve* LMG 11040 i *B. breve* Yakult, które nie są zdolne do metabolizowania fruktanów typu inuliny. Dodatkowo, w genomie obydwu szczepów *B. bifidum* nie zidentyfikowano genu kodującego  $\beta$ -fruktofuranazydazę. Klaster B składa się głównie z bakterii, które wykazują preferencję w degradacji krótkich frakcji oligofruktozy i nie rosną w podłożu zawierającym inulinę jako źródło węgla. W chromosomalnym DNA wszystkich szczepów, za wyjątkiem *B. gallicum* LMG 11596, zidentyfikowano gen kodujący  $\beta$ -fruktofuranazydazę. Bakterie należące do klastra C charakteryzują się obecnością w genomie genu kodującego  $\beta$ -fruktofuranazydazę. Wykorzystują oligofruktozę szybciej niż fruktozę, natomiast inulinę rozcinają tylko częściowo. Falony i wsp. [72] stwierdzili, że degradacja długich frakcji oligofruktozy odbywa się na zewnątrz komórki, zaś krótkich wewnątrz komórki. Ostatni klaster D zawiera bifidobakterie, które metabolizują fruktozę i oligofruktozę, a także są zdolne do rozkładu inuliny. W DNA szczepów należących do tego klastra nie zidentyfikowano genu kodującego  $\beta$ -fruktofuranazydazę. Interesujące jest, że spośród badanych szczepów, 5 należących do gatunku *B. longum* zaklasyfikowano do trzech różnych klastrów, tj. B, C i D.

## PODSUMOWANIE

Bifidobakterie występują głównie w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt, gdzie pełnią ważną rolę w utrzymaniu dobrej kondycji organizmu gospodarza. Na ich wzrost i aktywność probiotyczną wpływają stymulująco cukry, które nie są fermentowane w górnej części przewodu pokarmowego i docierają do okrężnicy w stanie nienaruszonym, zwłaszcza fruktany typu inuliny. Z danych literaturowych wynika, że bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* wykazują różną zdolność hydrolizy inuliny czy FOS. Różnicowanie to obserwuje się nie tylko między gatunkami, ale również pośród szczepów tego samego gatunku. Badanie właściwości probiotycznych bifidobakterii, a także zdolność tej grupy mikroorganizmów do metabolizowania węglowodanów, szczególnie poznanie białek uczestniczących w tym procesie, jest niezmiernie istotne nie tylko dla charakterystyki tych bakterii, ale przede wszystkim w celu produkcji żywności funkcjonalnej oraz konstruowania nowych preparatów probiotycznych i synbiotycznych, służących poprawie zdrowia człowieka i zwierząt.

## PIŚMIENNICTWO

- Arunachalam KD (1999) Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr Res* 19: 1559-1597
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004) Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 205-223
- Lee JH, O'Sullivan DJ (2010) Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 378-416
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2007) From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 120: 2-12
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans ADL, Saarela M, de Vos WM (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67: 504-513
- Zinedine A, Faid M (2007) Isolation and characterization of strains of bifidobacteria with probiotic proprieties *in vitro*. *World J Dairy Food Sci* 2: 28-34
- Turrone F, van Sinderen D, Ventura M (2011) Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 149: 37-44
- Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, Cagnasso P, Bizzarri B, de' Angelis GL, Shanahan F, van Sinderen D, Ventura M (2009) Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 75: 1534-1545
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412
- Favier CF, de Vos WM, Akkermans ADL (2003) Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Aerobe* 9: 219-229
- Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM, Mills DA (2008) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18964-18969
- Fushinobu S (2010) Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 2374-2384
- Sela DA, Mills DA (2010) Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol* 18: 298-307
- Ziemer CJ, Gibson GR (1998) An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int Dairy J* 8: 473-479
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14422-14427
- Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, de Vos WM, Collins MD, Thiel R, Namsolleck P, Blaut M, Dore J (2005) Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 71: 4153-4155
- Parche S, Amon J, Jankovic I, Rezzonico E, Beleut M, Barutcu H, Schendel I, Eddy MP, Burkovski A, Arigoni F, Titgemeyer F (2007) Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 9-19
- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F (2005) Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29: 491-509
- Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, Hellman J, Karp M, Parini C (2008) Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 74: 4695-4702
- Kawasaki S, Mimura T, Satoh T, Takeda K, Niimura Y (2006) Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Appl Environ Microbiol* 72: 6854-6858
- Qian Y, Borowski WJ, Calhoun WD (2011) Intracellular granule formation in response to oxidative stress in *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 145: 320-325
- Van den Broek LAM, Voragen AGJ (2008) *Bifidobacterium* glucoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 9: 401-407
- De Vuyst L, Leroy F (2011) Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *Int J Food Microbiol* 149: 73-80
- Senok AC, Ismael AY, Botta GA (2005) Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect* 11: 958-966
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M (2007) Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Microbiol* 73: 179-185

26. Schrezenmeir J, de Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73: 361s-364s
27. Cummings JH, Macfarlane GT (1997) Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin Nutr* 16: 3-11
28. Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA (2003) Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Curr Issues Intest Microbiol* 4: 71-75
29. Scheppach W (1994) Effect of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 35: S35-S38
30. Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ (2007) Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol* 102: 1197-1208
31. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ (2006) Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72: 3593-3599
32. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M (2001) Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Brit J Nutr* 86: 291-300
33. Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* 62: 101-106
34. Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I (2005) The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res* 591: 276-289
35. Mussatto SI, Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr Polym* 68: 587-597
36. Roberfroid MB (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 71: 1682s-1687s
37. Scholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EGHM, Schrezenmeir J (2001) Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 73: 459s-464s
38. Cashman K (2003) Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol* 4: 21-32
39. Kim GB, Brochet M, Lee BH (2005) Cloning and characterization of a bile salt hydrolase (*bsh*) from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnol Lett* 27: 817-822
40. Ziarno M (2005) Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. *Biotechnologia* 2: 183-195
41. Begley M, Hill C, Gahan, CGM (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72: 1729-1738
42. Parvez S, Kim HY, Lee HC, Kim DS (2006) Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 455-459
43. Wang X, Gibson GR (1993) Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 75: 373-380
44. Fooks LJ, Gibson GR (2002) *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 67-75
45. Makras L, De Vuyst L (2006) The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J* 16: 1049-1057
46. Bielecka M, Biedrzycka E, Biedrzycka E, Smoragiewicz W, Smieszek M (1998) Interaction of *Bifidobacterium* and *Salmonella* during associated growth. *Int J Food Microbiol* 45: 151-155
47. Toure R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I (2003) Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 95: 1058-1069
48. Lahtinen SJ, Jalonen L, Ouwehand AC, Salminen SJ (2007) Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 117: 125-128
49. Yildirim Z, Winters DK, Johnson MG (1999) Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Appl Microbiol* 86: 45-54
50. Lee JH, Karamychev VN, Kozyavkin SA, Mills D, Pavlov AR, Pavlova NV, Polouchine NN, Richardson PM, Shakhova VV, Slesarev AI, Weimer B, O'Sullivan DJ (2008) Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* 9: 247
51. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (2000) Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47: 646-652
52. Cheikhoussef A, Pogori N, Chen W, Zhang H (2008) Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *Int J Food Microbiol* 125: 215-222
53. Stachowicz M, Laniewski P, Jagusztyn-Krynicka E (2010) Wpływ toksyn bakteryjnych na proces nowotworzenia. *Postepy Biochem* 56: 389-399
54. Lee DK, Jang S, Kim MJ, Kim JH, Chung MJ, Kim KJ, Ha NJ (2008) Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 8: 310
55. Niers LEM, Hoekstra MO, Timmerman HM, van Uden NO, de Graaft PMA, Smits HH, Kimpen JLL, Rijkers GT (2007) Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 149: 344-352
56. Lopez P, Gueimonde M, Margolles A, Suarez A (2010) Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*. *Int J Food Microbiol* 138: 157-165
57. Zhu J, Zhuang Y, Ben JJ, Qian LL, Huang HP, Bai H, Sha JH, He ZG, Chen Q (2011) Immunomodulatory effects of novel *bifidobacterium* and *lactobacillus* strains on murine macrophage cells. *Afr J Microbiol Res* 5: 8-15
58. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y (2007) Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 150: 531-538
59. Bahrami B, Macfarlane S, Macfarlane GT (2010) Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *J Appl Microbiol* 110: 353-363
60. Dong P, Yang Y, Wang WP (2010) The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Hum Dev* 86: 51-58
61. O'Mahony D, Murphy S, Boileau T, Park J, O'Brien F, Groeger D, Konieczna P, Ziegler M, Scully P, Shanahan F, Kiely B, O'Mahony L (2010) *Bifidobacterium animalis* AHC7 protects against pathogen-induced NF- $\kappa$ B activation *in vivo*. *BMC Immunol* 11: 63
62. Piotrowska A, Izykowska I, Podhorska-Okolow M, Zabel M, Dziegiel P (2008) Budowa białek z rodziny NF- $\kappa$ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postepy Hig Med Dosw* 62: 64-74
63. Kim JY, Choi YO, Ji GE (2008) Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1393-1400
64. Vesa TH, Marteau P, Korpela R (2000) Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 19: 165s-175s
65. Parracho H, McCartney AL, Gibson GR (2007) Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc Nutr Soc* 66: 405-411
66. Moller PL, Jorgensen F, Hansen OC, Madsen SM, Stougaard P (2001) Intra- and extracellular  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Appl Environ Microbiol* 67: 2276-2283
67. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Bornet F, Rambaud JC (1999) Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *J Nutr* 129: 113-116
68. Pan XD, Chen FQ, Wu TX, Tang HG, Zhao ZY (2009) Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *J Zhejiang Univ Sci B* 10: 258-263

69. Sharp R, Fishbain S, Macfarlane GT (2001) Effect of short-chain carbohydrates on human intestinal bifidobacteria and *Escherichia coli* *in vitro*. *J Med Microbiol* 50: 152-160
70. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourié B, Brouns F, Bornet FR (2004) The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr* 80: 1658-1664
71. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Bornet F (2006) The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J* 5: 8
72. Falony G, Lazidou K, Verschaeren A, Weckx S, Maes D, De Vuyst L (2009) *In vitro* kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Appl Environ Microbiol* 75: 454-461
73. Franck A (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr* 87: S287-S291
74. Roberfroid MB (2005) Introducing inulin-type fructans. *Brit J Nutr* 93: S13-S25
75. Vijayaraghavan K, Yamini D, Ambika V, Sowdamini NS (2009) Trends in inulinase production - a review. *Crit Rev Biotechnol* 29: 67-77
76. Kubik C, Piasecka K, Anyszka A, Bielecki S (2006) Polifruktany i fruktooligosacharydy (FOS) - występowanie, otrzymywanie i zastosowanie. *Biotechnologia* 2: 103-116
77. <http://www.sensus.nl/>
78. Ghazi I, Fernandez-Arrojo L, De Segura AG, Alcalde M, Plou FJ, Ballesteros A (2006) Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 54: 2964-2968
79. Ghazi I, Fernandez-Arrojo L, Garcia-Arellano H, Ferrer M, Ballesteros A, Plou FJ, (2007) Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *J Biotechnol* 128: 204-211
80. Roberfroid MB (1999) Caloric value of inulin and oligofructose. *J Nutr* 129: 1436s-1437s
81. Caceres E, Garcia ML, Toro J, Selgas MD (2004) The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. *Meat Sci* 68: 87-96
82. Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L (2004) Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl Environ Microbiol* 70: 1923-1930
83. Van der Meulen R, Makras L, Verbrugghe K, Adriany T, De Vuyst L (2006) *In vitro* kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 72: 1006-1012
84. Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, de Vuyst L (2006) Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB 536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl Environ Microbiol* 72: 7835-7841
85. <http://www.brenda-enzymes.org>
86. Hartemink R, Van Laere KMJ, Rombouts FM (1997) Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 83: 367-374
87. Hopkins MJ, Cummings JH, Macfarlane GT (1998) Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J Appl Microbiol* 85: 381-386
88. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D (2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol* 71: 6150-6158
89. Biedrzycka E, Bielecka M (2004) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Technol* 15: 170-175
90. Muramatsu K, Onodera S, Kikuchi M, Shiomi N (1993) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1681-1685
91. Imamura L, Hisamitsu K, Kobashi K (1994) Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull* 17: 596-602
92. Warchol M, Perrin S, Grill JP, Schneider F (2002) Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett Appl Microbiol* 35: 462-467
93. Janer C, Rohr LM, Pelaez C, Laloi M, Cleusix V, Requena T, Meile L (2004) Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst Appl Microbiol* 27: 279-285
94. Ehrmann MA, Korakli M, Vogel RF (2003) Identification of the gene for  $\beta$ -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM 10140<sup>T</sup> and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 46: 391-397
95. Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2005) Transcriptional regulation and characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 71: 3475-3482

## Bifidobacteria and inulin-type fructans which stimulate their growth

Marzena Jedrzejczak-Krzepkowska<sup>✉</sup>, Stanislaw Bielecki

Institute of Technical Biochemistry, Technical University of Lodz, 4/10 Stefanowskiego St., 90-924 Lodz, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: marzena.jedrzejczak-krzepkowska@p.lodz.pl

**Key words:** Bifidobacteria, inulin-type fructans, inulin, fructooligosaccharides (FOS), oligosaccharides

### ABSTRACT

Both Bifidobacteria and carbohydrates they metabolize have attracted attention of food and pharmaceutical industries for several decades. Extensive research on bifidobacteria is dictated by the growing knowledge about the role of these microorganisms in the environment which they dwell. This paper summarizes the current state of knowledge on bifidobacteria and inulin type fructans they ferment. The first part of the article contains description of bifidobacteria, including their occurrence and the documented, beneficial impact on human health. The characterization of inulin-type fructans, including their structure and occurrence, and enzymes which hydrolyze  $\beta$ -(2,1)-glycosidic bonds in fructans as well as different activities of bifidobacteria in degradation of these sugars are described in the second part.



# $\beta$ -fruktofuranazydaza – właściwości, struktura i zastosowanie

## STRESZCZENIE

$\beta$ -fruktofuranazydaza to enzym odszczepiający cząsteczki fruktozy od nie redukującego końca  $\beta$ -D-fruktofuranazydów, sacharydów powszechnie występujących w roślinach. Enzym ten w odpowiednich warunkach może także wykazywać właściwości syntetyzujące. Obecnie jest jedną z najdokładniej scharakteryzowanych biochemicznie hydrolaz. Co więcej, poznano również strukturę przestrzenną tego białka. Rozwiązanie konformacji  $\beta$ -fruktofuranazydazy, jak dotąd tylko z kilku mikroorganizmów, pozwoliło na częściowe wyjaśnienie specyficzności substratowej i poznanie mechanizmów katalizy enzymatycznej. Artykuł ten jest przeglądem aktualnej literatury na temat właściwości  $\beta$ -fruktofuranazydaz pochodzących z różnych źródeł, z uwzględnieniem ich struktury, mechanizmu działania, biosyntezy i zastosowania w przemyśle.

## WPROWADZENIE

Inwertaza czyli  $\beta$ -fruktofuranazydaza (fruktohydrolaza  $\beta$ -D-fruktofuranazydów, EC 3.2.1.26), nazywana też sacharazą, jest jednym z najwcześniej poznanych i opisanych enzymów hydrolitycznych. Jako pierwszy wyizolował ją w 1860 roku M. Bertholet z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Według nowej klasyfikacji, grupującej enzymy w oparciu o podobieństwo sekwencji aminokwasowych [2-4],  $\beta$ -fruktofuranazydaza zalicza się do GH32, obok innych fruktofuranazydaz, takich jak lewanaza (EC 3.2.1.65),  $\beta$ -fruktozydaza fruktanowa (EC 3.2.1.80) i inulinaza (EC 3.2.1.7) oraz transfruktozydaz, takich jak sacharaza:sacharaza 1- $\beta$ -D-fruktozylotransferaza (EC 2.4.1.99) czy 2,1- $\beta$ -D-fruktan:2,1- $\beta$ -D-fruktan 1- $\beta$ -D-fruktozylotransferaza (EC 2.4.1.100). Do wyjątków należy inwertaza zasadowa/obojętna pochodzenia roślinnego, przydzielona do GH100. Wszystkie glikozydazy należące do GH32 mają trzy zachowane w ewolucji motywy: NDPNG, RDP i EC. Rodzina GH32 razem z rodziną inulosacharaz (GH68) należy do klanu GHJ.

## $\beta$ -FRUKTOFURANOZYDAZA - WYSTĘPOWANIE I CHARAKTERYSTYKA

$\beta$ -fruktofuranazydaza jest wytwarzana przez liczne bakterie, drożdże, pleśnie oraz rośliny, co wiąże się m.in. z powszechnym wykorzystaniem sacharozы i pokrewnych cukrów jako zapasowych źródeł węgla i energii [5-9]. Organizmy eukariotyczne często syntetyzują nawet kilka izoform inwertazy, różniących się właściwościami kinetycznymi, lokalizacją subkomórkową, a także mechanizmem regulacji ich biosyntezy. Dotyczy to m.in. roślin, w przypadku których każda forma inwertazy jest kodowana przez inny gen, w przeciwieństwie do drożdży. Ze względu na rozpuszczalność, lokalizację subkomórkową, pI oraz optymalne pH działania izozymy inwertaz roślinnych dzieli się na trzy typy, tj. inwertazę wakuolarną, inwertazę ściany komórkowej oraz znajdującą się w cytozolu inwertazę obojętną. Dwie pierwsze grupy inwertaz są glikozylowane, zaś w oparciu o optymalne pH działania zaliczane są do inwertaz kwaśnych, natomiast trzeci typ do obojętnych lub zasadowych (optymalna aktywność jest wykazywana w zakresie pH 6,8÷8,0) [5,10].

Z kolei, większość opisanych dotąd inwertaz z *S. cerevisiae* występuje w komórce w dwóch formach, jako tzw. inwertaza wewnętrzna (ang. *internal*), umieszczona w cytozolu i inwertaza zewnętrzna (ang. *external*), znajdująca się w przestrzeni periplazmatycznej komórki [11,12]. Obie formy omawianego enzymu są kodowane przez ten sam gen *SUC2*. Białka te różnią się budową, forma zewnętrzna, w przeciwieństwie do cytoplazmatycznej, charakteryzuje się obecnością dodatkowej reszty seryny na aminowym końcu białka, a ponadto ulega glikozylacji podczas migracji przez siateczkę śródplazmatyczną do przestrzeni periplazmatycznej. Łańcuch cukrowy zbudowany jest głównie z cząsteczek mannozy i może stanowić nawet 50% całej masy cząsteczkowej enzymu [1,13,14]. Inwertaza zewnętrzna występuje najczęściej w postaci dimeru o

Marzena Jędrzejczak-Krzepkowska<sup>✉</sup>

Halina Kalinowska

Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

<sup>✉</sup>Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; tel.: (42) 631 33 54, e-mail: marzena.jedrzejczak-krzepkowska@p.lodz.pl

Artykuł otrzymano 4 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 16 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:**  $\beta$ -fruktofuranazydaza, inwertaza, hydroliza, transglikozylacja

**Wykaz skrótów:** BMP –  $\beta$ -merkaptopetanol; DTT – 1,4-ditiotretiol; FOS – fruktooligosacharydy; GH – rodzina hydrolaz glikozydowych; GOS – galaktooligosacharydy; pCMB – p-chlorortęciobenzoesan; pHMB – p-hydroksyrtęciobenzoesan; PTS (ang. *phosphotransferase system*) – system fosfotransferazowy

Tabela 1. Właściwości β-fruktofuranazy z różnych źródeł.

Źródło β-fruktofuranazy (piśmiennictwo)	K <sub>m</sub> (mM)		Aktywność		
	sacharoza	1-kestoza/ inulina/ rafinoza	hydrolytyczna sacharoza/ FOS/ inulina	trans-glikozyla- cyjna	Aktywatory
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> G1 [22]	11	1,1/8,0/nb	13,5/100/39,8	niewielka	-
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM No 7007 [23]	nb	nb/nb/nb	100/297+365/140	nb	nb
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 [16]	37,22±9,58	nb/nb/nb (24,23±7,43 dla Actilight 950P)	10/100/6	nb	-
<i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140 <sup>T</sup> [17]	10,3	nb/nb/nb	100/84+80/37	nb	-
<i>Bifidobacterium lactis</i> [24]	8,37	nb/nb/nb (0,12 dla Raftilose n=5)	6/100/10	nb	DTT, EDTA
<i>Bifidobacterium breve</i> UCC2003 [18]	2,5±2	nb/nb/nb	100/91+84/27	nb	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1100 [19]	6,66	nb/nb/nb	nb/nb/nb	nb	EDTA
<i>Thermotoga maritima</i> [6]	64	nb/19/15	+ /nb/+	-	-
<i>Thermotoga neapolitana</i> [8]	14	nb/nb/nb	+ /nb/+	-	-
<i>Leucosporidium antarcticum</i> [20]	nb	nb/nb/nb	+ /nb/nb	nb	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> [9]	60	nb/nb/nb	100/nb/-	-	Co <sup>2+</sup>
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> [27]	4,9	1,3±0,4/nb/ 1,3±0,6	+ /+ /nb	+	nb
<i>Aspergillus niger</i> ATCC20611 [26]	290	800/nb/200	+ /+ /nb	+	-
<i>Aspergillus niger</i> [28]	0,0625	nb/nb/nb	+ /nb/-	nb	-
<i>Aspergillus niger</i> IMI303386 [29]	nb	nb/nb/nb	+ /nb/nb	+	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , EDTA
<i>Aspergillus niger</i> [7]	268,1±18,1	nb/nb/nb	+ /+ /-	+	nb
<i>Aspergillus niveus</i> [30]	5,78	nb/1,74/5,74	+ /nb/+	nb	Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> (1mM)
<i>Aspergillus japonicus</i> [31]	nb	nb/nb/nb	+ /nb/nb	+	nb
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 2404 [32]	230	700/nb/nb	+ /+ /nb	+	-
<i>Aureobasidium</i> sp. ATCC 20524	470	nb/nb/nb	+ /nb/nb	+	nb
β-fruktofuranazydaza P-1	650	nb/nb/nb	+ /nb/nb	+	nb
β-fruktofuranazydaza P-2 [33]	227	nb/nb/nb	+ /nb/-	-	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , Co <sup>2+</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> [34]	227	nb/nb/nb	+ /nb/-	-	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , Co <sup>2+</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i> inwertaza ściany komórkowej [21,35,36]	0,35±0,05	1±0,1/nb/nb	100/35/3	nb	nb

a – warunki reakcji transglikozylacji; b – białko glikozylowane; ( ) masa cząsteczkowa podjednostki; aktywność hydrolytyczna wyrażona jako aktywność względna %; nb – nie badano

masie 270 kDa lub oligomeru, tj. tetrameru, heksametu, a nawet oktameru o masach odpowiednio 360, 560, 800 kDa [11,12,15]. Natomiast inwertaza wewnętrzna, w zależności od wartości pH, może być monomerem (pH 9,4), dimerem (pH 8,3), a nawet oktamerem (pH 4,9) [1]. Glikoproteinami zbudowanymi z kilku podjednostek jest również większość inwertaz pleśniowych, zaś inwertazy bakteryjne są przede wszystkim białkami monomerycznymi (Tab. 1).

Inwertaza, w zależności od pochodzenia, charakteryzuje się różnymi właściwościami biochemicznymi (Tab. 1). Białka te są stabilne w pH od 4 do nawet 10, w przedziale temperatur od 40 do 60°C. Najczęściej optymalne pH działania dla β-fruktofuranazydaz mieści się w zakresie 5,0±6,0, natomiast nieco niższe pH (4,5) jest charakterystyczne dla

enzymów z *Aureobasidium* i *Rhodotorula*. Większość mezofilnych inwertaz wykazuje najwyższą aktywność działania w zakresie temperatur od 50 do 60°C. Do wyjątków należą enzymy pochodzące z bakterii rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [16-19]. Z kolei, optymalna temperatura działania inwertazy z hipertermofilnych drobnoustrojów *T. maritima* [6] i *T. neapolitana* [8] wynosi co najmniej 85°C, zaś z psychrofilnych, endemicznych antarktycznych drożdży *Leucosporidium antarcticum* [20] jest bliska 30°C (Tab. 1).

Badania wpływu różnych związków chemicznych na działanie β-fruktofuranazydazy wykazały, że Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> i pCMB całkowicie inaktywują enzym, co wskazuje, że wolna grupa tiolowa jest niezbędna w centrum katalitycznym. Hipotezę tę potwierdza brak wpływu odczynnika

Inhibitory	pH		Temperatura (°C)		Masa cząsteczkowa (kDa)
	optymalne	stabilność	optymalna	stabilność	
Cu <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Hg <sup>+</sup> , pCMB	6,1	6,5+10	nb	< 45	74
nb	6,0+6,2	6+8	nb 55*	< 40	232 (75)
Hg <sup>+</sup> , pCMB	6,0	nb	37+50 37*	< 55	70
Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2</sup>	6,5	nb	40	nb	59,4
Cu <sup>2+</sup> pHMB, SDS	nb	nb	nb	nb	59,4
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>	6,0	nb	37	nb	nb
Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , BMP,	6,0	4,5+7,0	37	< 45	58b
Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mo <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	5,5	nb	90+95	< 80	~50
Cu <sup>2+</sup> , Ag <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	6,0	4,0+7,0	85	< 85	~47
Cd <sup>2+</sup>	4,55+4,75	4,3+4,6	30	<12	nb
Hg <sup>2+</sup>	6,0	5,0+7,0	50	< 50	95,5
nb	5,5	nb	45+55	nb	~165 (~85)
Hg <sup>2+</sup>	5,0+6,0	4,5+10,0	50+60	< 50	340 (~100)
Hg <sup>2+</sup> pCMB	5,0	nb	60	nb	95 (47)
Hg <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	5,5	4,0+8,0	50	< 55	120+130b
DTT, BMP	5,0	nb	37+40	nb	75
Cu <sup>2+</sup> (10mM), Hg <sup>2+</sup>	4,5	nb	60	< 60	141 (57)
nb	4,0 5,0+6,0a	nb	65 55+65a	nb	nb
-	5,0	6,0+10	50	< 45	430
Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , pCMB	4,5+5,5 4,5+6,0	4,0+9,0	50+55	< 50	318b 346b
-	4,5	2,6+5,5	nb	< 60	100 b (47)
nb	nb	nb	nb	nb	72

chelatuującego (EDTA) i redukującego (DTT) na aktywność enzymatyczną badanej hydrolazy (Tab. 1), a także, opisane w kilku przypadkach, działanie aktywujące tych związków chemicznych. Do aktywatorów inwertazy najczęściej należą jony Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup>. Inwertaza katalizuje odszczepianie reszty β-D-fruktofuranazy od nie redukującego końca β-D-fruktofuranazy, takich jak sacharoza, rafinoza, kestoza, nystoza, oligofruktoza czy inulina. Spośród wymienionych cukrów to sacharoza jest zwykle preferowanym substratem, natomiast pozostałe są hydrolizowane z dużo niższą efektywnością [5,9,15,21]. Do wyjątków zalicza się inwertaza z *T. maritima*, która wykazuje 4-krotnie wyższe powinowactwo do rafinozy niż sacharozy [6], a także większość scharakteryzowanych β-fruktofuranazy pochodzących z bifidobakterii – en-

zymy te mają wyższe uzdolnienia w kierunku hydrolizy FOS, niż sacharozy [16,22-24].

Interesującą właściwość wśród bifidobakteryjnych inwertaz wykazuje β-fruktofuranazydaza z *B. breve* UCC2003. Białko to, w przeciwieństwie do β-fruktofuranazydazy z *B. longum* DJ010A, charakteryzuje się zdolnością do hydrolizy wyłącznie wiązań β-(2,1)-glikozydowych pomiędzy fruktozą i glukozą. W wyniku przeprowadzonej reakcji z udziałem tego enzymu z substratami, takimi jak 1-kestoza, nystoza, czy 1<sup>F</sup>-fruktofuranazylnystoza, otrzymano glukozę oraz di-, tri- i tetrasacharydy [18]. Należy podkreślić, że hydrolazy te w analizie porównawczej sekwencji aminokwasowej wykazują 97% identyczności i 99% podobieństwa sekwencyjnego.

Ze względu na mechanizm działania inwertaza jest egzozym- $\beta$ -fruktofuranozydazą; wyjątek to inwertaza *T. neapolitana* [8], która hydrolizuje również wewnętrzne wiązania długołańcuchowego polimeru inuliny. Co ciekawe, duża grupa inwertaz oprócz aktywności hydrolitycznej, wykazuje również w odpowiednich warunkach (np. przy podwyższonym stężeniu substratu) aktywność transglikozylacyjną, czyli zdolność przenoszenia reszt  $\beta$ -D-fruktofuranozylowych na akceptory, którymi mogą być alkohole 1-rzędowe (metanol i etanol) i monosacharydy [7,15,25-27]. Do tej pory aktywność transglikozylacyjną wykazano tylko w przypadku inwertaz rodzajów *Aspergillus*, *Schwanniomyces* i *Aureobasidium* (Tab. 1).

## MECHANIZM DZIAŁANIA $\beta$ -FRUKTOFURANOZYDAZY

Biorąc pod uwagę stereochemię substratów i produktów reakcji, hydrolazy glikozydowe można zaklasyfikować jako enzymy inwertujące albo zachowujące (retencyjne) konfigurację na anomerycznym atomie węgla. W każdym z tych przypadków hydroliza wiązań glikozydowych przebiega zgodnie z mechanizmem katalizy kwasowo-zasadowej, w której biorą udział łańcuchy boczne dwóch reszt aminokwasowych, takich jak reszty kwasu asparaginowego (D) i kwasu glutaminowego (E). Grupa karboksylowa jednej z nich pełni funkcję donora protonu, zaś grupa karboksylowa drugiej z tych reszt działa jako nukleofil. W przypadku enzymów inwertujących stwierdzono, że odległość między grupami katalitycznymi w centrum aktywnym wynosi od 9 do 11 Å, co umożliwia wprowadzenie cząsteczki wody pomiędzy nukleofil i anomeryczny atom węgla, zaangażowany w hydrolizowane wiązanie glikozydowe. Enzymy inwertujące uwalniają produkt w wyniku jednoetapowego działania, zgodnie z tzw. mechanizmem pojedynczego podstawienia. Natomiast w enzymach zachowujących konfigurację na węglu anomerycznym odległość między resztami katalitycznymi (5,5 Å) jest znacznie mniejsza, zaś hydroliza wiązania glikozydowego (lub transglikozylacja) przebiega według tzw. mechanizmu podwójnego podstawienia [37-40].

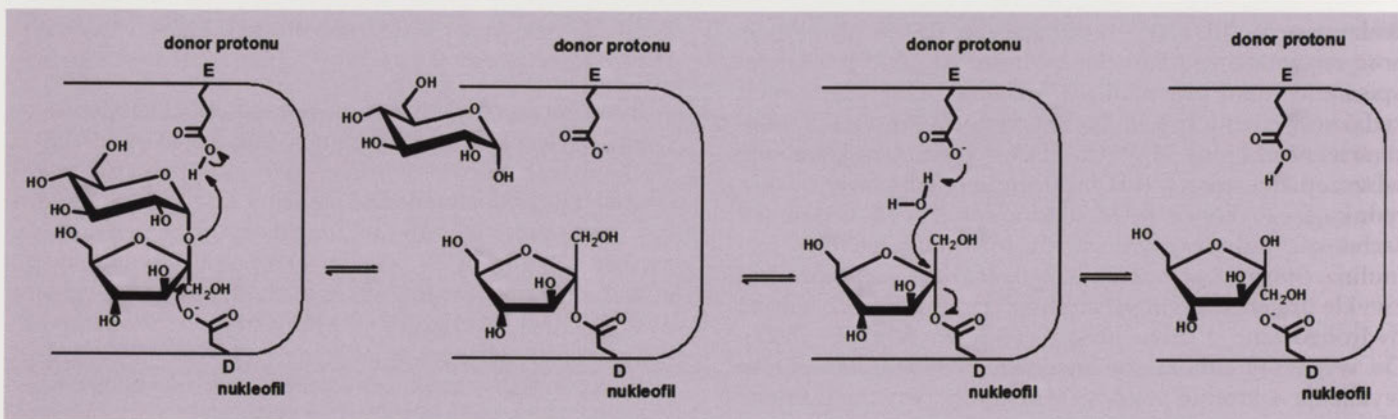
Inwertaza zalicza się do grupy enzymów zachowujących konfigurację na anomerycznym atomie węgla. W oparciu o przeprowadzone badania znakowania przez powinowactwo oraz ukierunkowaną mutację, zidentyfikowano wspo-

mniane powyżej, dwie najważniejsze reszty aminokwasowe, uczestniczące w hydrolizie wiązań glikozydowych, czyli reszty D i E. Grupa funkcyjna D z zachowanej w ewolucji sekwencji NDPNG działa jako nukleofil, natomiast reszta E z motywu EC pełni rolę kwasu/zasady (Ryc. 1) [15, 41-43].

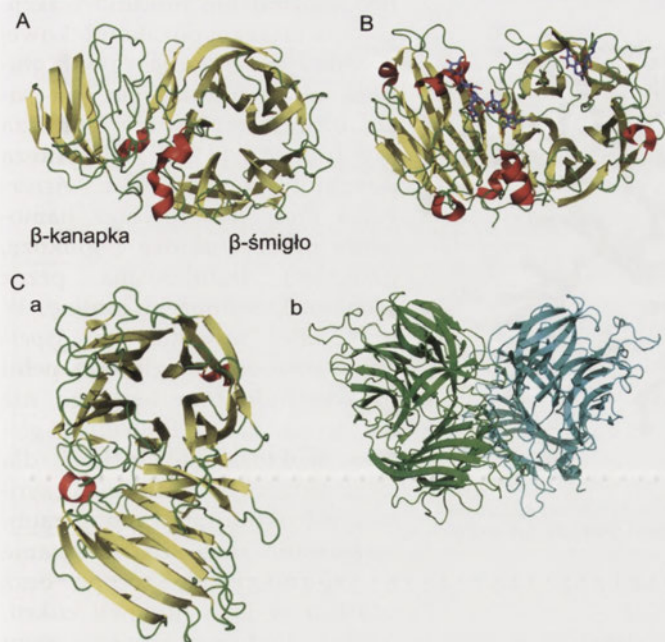
W przedstawionym na rycinie 1 mechanizmie katalitycznym grupa karboksylanowa D działa jako nukleofil atakujący C<sub>2</sub> reszty fruktozowej, zaś grupa karboksylowa E jest dawcą protonu dla tlenu glikozydowego sacharozy. W pierwszym etapie (glikozylacja) powstaje produkt pośredni, charakterystyczny dla mechanizmu podwójnego podstawienia. Produktem tym jest kowalencyjnie związany kompleks fruktozylo-enzymu, w którym anomeryczny węgiel reszty glikozydowej tworzy wiązanie z tlenem grupy karboksylanowej D. Równocześnie kieszeń katalityczną opuszcza  $\alpha$ -D-glukoza. W drugim etapie (deglikozylacji) grupa karboksylanowa E atakuje cząsteczkę wody (lub alkohole, bądź monosacharydy) jako nukleofil, co prowadzi do hydrolizy produktu pośredniego, powodującej uwolnienie fruktozy (lub przeniesienie jej na akceptor) i odtworzenie grup katalitycznych centrum aktywnego [15,44].

## STRUKTURA PRZESTRZENNA $\beta$ -FRUKTOFURANOZYDAZY

Pomimo trwających już od kilkadziesiąt lat badań krystalograficznych i przewidywania konformacji białek, pierwsza struktura inwertazy została zamieszczona w PDB dopiero w 2004 roku. Była to struktura  $\beta$ -fruktofuranozydazy pochodzącej z termofilnej bakterii *Thermotoga maritima*. Co więcej, była to pierwsza konformacja białka należącego do GH32. Do tej pory, w PDB zostało zdeponowanych zaledwie 5 struktur enzymów z tej rodziny, takich jak egzoinulinaza z *Aspergillus awamori*, 1-egzohydrolaza fruktanowa IIa z *Cichorium intybus*, inwertaza ściany komórkowej z *Arabidopsis thaliana* i inwertaza ze *Schwanniomyces occidentalis*. Struktura przestrzenna tych białek składa się z dwóch domen, tj. ze znajdującej się w N-końcowej części białka katalitycznej domeny  $\beta$ -śmigła, połączonej krótkim odcinkiem z mniejszą końcówką  $\beta$ -kanapki, zlokalizowaną na karboksylowym końcu. W strukturze drugorzędowej obu domen dominuje struktura  $\beta$ -harmonijki. Domenę C-końcową tworzą dwa sześciolańcuchowe, antyrównoległe względem siebie arkusze  $\beta$ , dając tzw. motyw kanapki. Według najnowszych



Rycina 1. Mechanizm katalityczny inwertazy, zmodyfikowano na podstawie [15,42].



**Rycina 2.** Struktura przestrzenna inwertazy: A) *T. maritima*; B) *A. thaliana* (na fioletowo zaznaczono łańcuchy cukrowe); C) *S. occidentalis* a) pojedyncza jednostka i b) dimer utworzony z dwóch jednostek poprzez oddziaływania polarne i hydrofobowe pomiędzy czterema domenami. Rycinę wykonano na podstawie danych zamieszczonych w białkowej bazie danych, kod PDB: 1uyj; 2ac1; 3kf5.

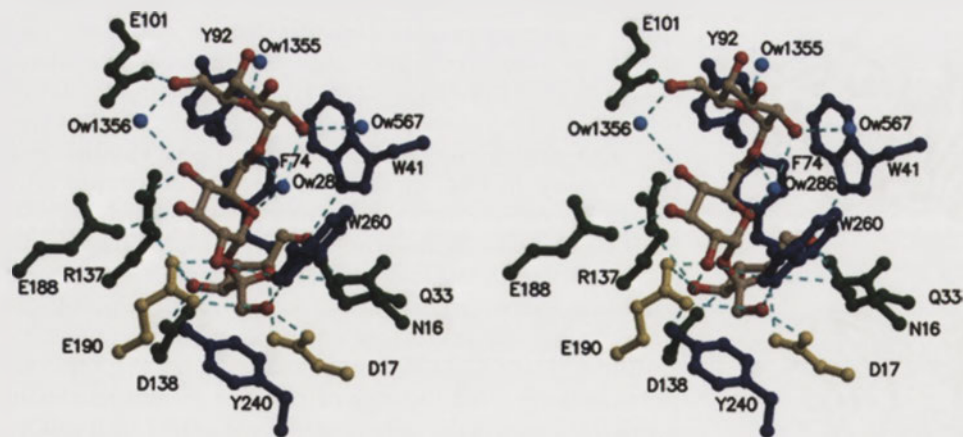
doniesień, domena ta wpływa na kształtowanie centrum katalitycznego, a także bezpośrednio uczestniczy w wiązaniu substratów [45]. W pięcioramiennej domenie β-śmigła każda z łopat ma formę czterołańcuchowego arkusza β o architekturze antyrównoległej. Wszystkie łańcuchy wewnętrzne łopat położone w pobliżu osi śmigła mają ten sam kierunek i są łańcuchami N-końcowymi, zaś łańcuchy C-końcowe znajdują się na zewnątrz. Co więcej, domena β-śmigła wykazuje strukturalne podobieństwo do domeny występującej w dwóch innych rodzinach hydrolaz glikozydowych, takich jak GH43, zawierającej enzymy inwertujące (np. α-L-arabinyazy) i GH68, obejmującej enzymy zachowujące konfigurację na anomearycznym atomie węgla (np. lewanazy) [46]. Białka z tych rodzin, jak stwierdzono poprzez analizę porównawczą, mają identyczne reszty aminokwasów katalitycznych i wykazują znaczną konserwatywność otaczających je sekwencji aminokwasowych, charakterystycznych dla rodziny GH32 [47,48]. Ponadto, wzajemne nałożenie struktur przestrzennych lewanazy, inwertazy i α-L-arabinyazy wykazało, że w centrum katalitycznym nie ma różnic w odległościach pomiędzy resztami bezpośrednio uczestniczącymi w katalizie. Jednak miejsce wiązania cukru w centrum katalitycznym lewanazy i inwertazy jest inne niż w przypadku α-L-arabinyazy, co prawdopodobnie ma większy wpływ na mechanizm katalityczny tych białek niż powszechnie wskazywana odległość pomiędzy resztami katalitycznymi [44,46]. Znane konformacje przestrzenne inwertaz przedstawiono na rycinie 2.

Alberto i wsp. [46,49] stwierdzili, że w katalitycznej domenie β-śmigła inwertazy z *T. maritima* w środkowej części znajduje się zagłębienie (o rozmiarach: 30Å głą-

bokości i 18Å szerokości) w formie leja otwierającego się w kierunku powierzchni cząsteczki. Na dnie tego zagłębienia występują trzy reszty aminokwasowe (dwie kwasu asparaginowego D17 i D138 oraz jedna glutaminowego E190), niezbędne do wiązania substratu i katalizy jego przemiany, określane jako triada katalityczna [44]. Reszty te tworzą silnie elektrojemny potencjał i należą do zachowanych w ewolucji sekwencji NDPNG, RDP i EC. Badania ukierunkowanej mutacji oraz analizy krystalograficzne, przeprowadzone przez inne grupy badawcze potwierdziły, że w/w trzy reszty aminokwasowe występują także w centrum aktywnym inwertazy roślinnej [21,35,42,43,50] oraz egzoinulinazy [51,52] i odgrywają ważną rolę w opisaną w poprzednim rozdziale katalizie. Reszta D17 prawdopodobnie działa jako nukleofil, zaś grupa funkcyjna E190 pełni rolę kwasu/zasady. Natomiast grupa karboksylowa D138 z motywu RDP uczestniczy pośrednio w reakcji i odgrywa ważną rolę w rozpoznaniu i wiązaniu substratów tworząc wiązania wodorowe z dwoma grupami hydroksylowymi fruktozy. Zaobserwowano, że reszta D138 inwertazy *T. maritima*, homologiczna do grupy funkcyjnej D149 w sekwencji aminokwasowej inwertazy ściany komórkowej *A. thaliana*, stabilizuje pierścień fruktozy [42]. Natomiast w przypadku egzoinulinazy zasugerowano, że reszta D z w/w motywu nie uczestniczy bezpośrednio w katalizie, ale prawdopodobnie wpływa na zasadowość pełniącej funkcję nukleofila reszty katalitycznej [35,51].

W procesie hydrolizy pośrednio udział biorą inne, znajdujące się w miejscu aktywnym, reszty aminokwasowe, np. reszta C z motywu EC. Wykazano, że grupa funkcyjna C pełni bardzo ważną funkcję w katalizie, ponieważ przeprowadzona ukierunkowana mutacja tej reszty aminokwasowej spowodowała znaczne obniżenie efektywności katalitycznej inwertazy drożdżowej [15]. Ponadto, jak ustalono na podstawie badań krystalograficznych, w przypadku inwertazy *T. maritima* [46], w/w reszta C tworzy wiązania wodorowe z występującymi w kieszeni katalitycznej resztami: D17 (pełni funkcję nukleofila) oraz D138. Rola grupy funkcyjnej C polega prawdopodobnie na stabilizacji stanu przejściowego, czy utrzymaniu odpowiedniego mikrośrodowiska w centrum aktywnym. Ponadto, kieszeń katalityczna zawiera wchodzące w skład zachowanych w ewolucji sekwencji aminokwasowych reszty aminokwasów, takie jak W260, W41, Q33, N16, W65 i F74. Przykładowy obraz kompleksu inwertazy *T. maritima* z rafinozą przedstawiono na rycinie 3 [49]. Grupy funkcyjne w/w reszt aminokwasowych wiążą substrat poprzez wiązania wodorowe, co sugeruje, że uczestniczą w rozpoznawaniu cukrów oraz wiązań glikozydowych. Pozostałe reszty aminokwasowe występujące w miejscu katalitycznym najprawdopodobniej odpowiadają za specyficzność substratową. Wykazano, że takimi resztami aminokwasowymi są: Y92, E101 oraz częściowo zachowane w ewolucji E188 i T208.

Podobną, stabilizującą rolę, zachowanych w ewolucji, reszt aminokwasowych sugerowano u egzoinulinazy *A. awamori* [51] oraz inwertazy ściany komórkowej *A. thaliana* [42]. W przypadku inwertazy *A. thaliana* uznano, że w wiązaniu i hydrolizie sacharozy, poza aminokwasami



Rycina 3. Stereograficzny obraz centrum katalitycznego inwertazy *T. maritima* w kompleksie z rafinozą; na rysunku zaznaczono: reszty katalityczne na żółto, reszty aminokwasów aromatycznych na granatowo, a pozostałe na zielono; natomiast wiązania wodorowe wyróżniono linią przerywaną na niebiesko;  $O_w$  – cząsteczka wody; rycina opublikowana za zgodą wydawcy [49].

z zachowanych w ewolucji motywów, uczestniczą także reszty W82, D239 i K242. Szczególnie interesującą resztą aminokwasową jest D239, której wymiana na A zmienia substratową specyficzność inwertazy na 1-egzohydrolazę fruktanową IIa, której preferowanym substratem staje się 1-kestoza [21]. Badania te potwierdziły, że wymiana jednej reszty aminokwasowej biorącej udział w katalizie może zmienić specyficzność enzymu. Dodatkowo, jak sugerowali autorzy, reszta D239 może odróżniać te dwa białka, ponieważ jest charakterystyczna w sekwencji aminokwasowej typowej inwertazy, a jej brak obserwuje się w sekwencji 1-egzohydrolazy fruktanowej.

Nałożenie znanych struktur białek z GH32 wykazało, że architektura centrum katalitycznego oraz struktura środka arkusza w domenie  $\beta$ -kanapki są identyczne. Natomiast, różnice w obu domenach dotyczą głównie długości pętli, zwłaszcza tych zlokalizowanych na powierzchni cząsteczki. Pętłe te są prawdopodobnie odpowiedzialne za specyficzność substratową, a także, jak to opisano w przypadku inwertazy *S. occidentalis*, uczestniczą w tworzeniu dimerycznej struktury białka [45]. Obserwowane różnice, z wyjątkiem inwertazy z *T. maritima* i *S. occidentalis*, dotyczyły również występowania i lokalizacji na powierzchni cząsteczki łańcuchów cukrowych. Inwertaza ściany komórkowej z *A. thaliana* charakteryzuje się obecnością cukrowego łańcucha w szczelinie pomiędzy domeną  $\beta$ -śmigła i  $\beta$ -kanapki (Ryc. 2). Obecność w tym miejscu łańcucha cukrowego może mieć wpływ na aktywność enzymatyczną, w tym na słabą zdolność hydrolizy długołańcuchowych substratów, np. inuliny [44].

### BIOSYNTETA $\beta$ -FRUKTOFURANOZYDAZY

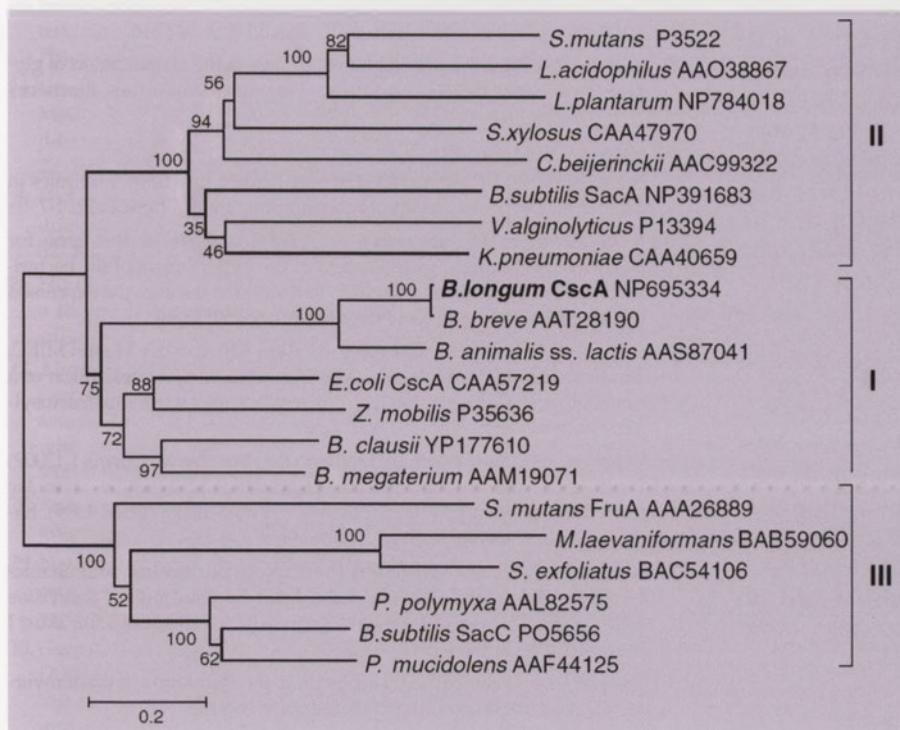
Biosynteza  $\beta$ -fruktofuranazydy zwykle ma charakter indukcyjny. Do nielicznych wyjątków należy np. forma cytoplazmatyczna inwertazy drożdżowej *S. cerevisiae* oraz inwertaza z *T. neapolitana*, które wykazują ekspresję konstytutywną [8,53,54]. Na ogół, biosynteza  $\beta$ -fruktofuranazydy wymaga dodania do pożywki hodowlanej specyficznego induktora, którym może

być substrat lub produkt reakcji. U inwertazy pozakomórkowej drożdży *S. cerevisiae* i *R. glutinis* takim induktorem jest sacharoza, a represorem glukoza czy fruktoza [53-55]. Biosynteza  $\beta$ -fruktofuranazydy z *Aspergillus niger* jest również hamowana przez fruktozę i glukozę, natomiast indukowana przez sacharozę, rafinozę i inulinę. W przypadku inwertazy z *Aspergillus japonicus*, to glukoza pełni funkcję induktora lepszego niż sacharoza, zaś u *Penicillium glabrum* fruktoza [56]. Z kolei dla bifidobakterii w indukcji biosyntezy  $\beta$ -fruktofuranazydy zaobserwowano duże zróżnicowanie w zależności od szczepu oraz użytego w jego hodowli cukru.

Wykazano, że najczęstszym induktorem ekspresji genu  $\beta$ -fruktofuranazydy są FOS, chociaż gdy używano zamiennie fruktozę [57], inulinę czy glukozę [58,59], to dla niektórych szczepów stwierdzono syntezę na porównywalnym, a nawet wyższym poziomie. Molekularne mechanizmy regulujące tak zróżnicowaną biosyntezę  $\beta$ -fruktofuranazydy u bifidobakterii pozostają nadal niewyjaśnione, a nawet kontrowersyjne ze względu na fragmentaryczną wiedzę o nich. Do tej pory scharakteryzowano operon *fos* z *Bifidobacterium breve* UCC2003 [18], jak również przeprowadzono badania transkrypcyjne genów klastra związanego z degradacją fruktanów typu inuliny z *B. longum* NCC2705 [60].

Według badaczy operon *fos* składa się z trzech genów strukturalnych – *fosA* (zidentyfikowany tylko w operonie *B. breve* UCC2003) oraz *fosB* i *fosC* [18]. W oparciu o wykonane analizy bioinformatyczne ustalono, że gen *fosA* koduje białko cytoplazmatyczne (złożone ze 173 reszt aminokwasowych), które wykazuje podobieństwo do białek rodziny COG 4283. Rodzinę tę tworzą niescharakteryzowane białka o nieznannej jak dotąd funkcji. Kolejny gen strukturalny operonu *fosB* koduje polipeptyd o długości 157 reszt aminokwasowych ( $M_w = 17$  kDa), którego struktura II-rzędowa jest wspólna dla białek należących do rodziny transporterów cukrowych. Sekwencja aminokwasowa tego polipeptydu wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji hipotetycznej permeazy sacharozy z *B. longum* NCC2705, *B. animalis* i znacznie niższe (na poziomie 32%) z *Escherichia coli* 0157:H7. Za genem *fosB* znajduje się gen *fosC* kodujący  $\beta$ -fruktofuranazydazę, której sekwencja aminokwasowa wykazuje podobieństwo do sekwencji  $\beta$ -fruktofuranazydy *B. longum* NCC2705, *B. longum* DJ010 i *Bifidobacterium animalis* na poziomie odpowiednio 94%, 91% i 69%. Za genem *fosC* występuje sekwencja nukleotydowa *glkA*, kodująca prawdopodobnie glukokinazę. Pomiedzy genem glukokinazy a *fosC* zlokalizowany jest przypuszczalnie terminator rho-zależny [18].

Przed operonem *fos* znajduje się sekwencja nukleotydowa *lacI*<sub>fos</sub> która prawdopodobnie koduje transkrypcyj-



Rycina 4. Zależność filogenetyczna hydrolaz sacharozowych, pochodzących z różnych mikroorganizmów; rycina opublikowana z zgodą wydawcy [60].

ny regulator operonu *fos*. Sekwencja aminokwasowa  $\text{LacI}_{\text{fos}}$  wykazuje znaczne podobieństwo do sekwencji aminokwasowej bakteryjnych regulatorów transkrypcyjnych rodziny GalR-LacI, szczególnie do zidentyfikowanych u szczepów *B. longum* NCC2705 i *B. longum* DJ010A. Ponadto, wykazuje ona identyczność na poziomie 46% z sekwencją aminokwasową represora operonu sacharozy *E. coli* (AC: P40715) i *Shigella flexneri* (AC: NP\_708235). W białku kodowanym przez  $\text{lacI}_{\text{fos}}$  zidentyfikowano w N-końcowej części motyw helisa-skret-helisa, mający zasadnicze znaczenie w wiązaniu DNA. Natomiast, C-końcowy rejon białka  $\text{LacI}_{\text{fos}}$  odpowiada za wiązanie induktora. Ryan i wsp. [18] sugerowali, że analogicznie do innych białek regulatorowych GalR-LacI, białko to, przy braku substratu (np. sacharoza, FOS), powoduje represję transkrypcji poprzez przyłączenie się do operatora, którego sekwencja zachodzi częściowo na sekwencję promotora operonu *fos*. Ponadto, z analizy RNA metodą Northern blot wynika, że gen  $\text{lacI}_{\text{fos}}$  nie ulega transkrypcji razem z genami strukturalnymi, co może świadczyć o tym, że sekwencja  $\text{lacI}_{\text{fos}}$ , zlokalizowana w pobliżu operonu *fos*, wpływa na jego regulację. Ponadto wykazano, że geny operonu *fos* *B. breve* UCC2003 podlegają transkrypcji w obecności sacharozy i Actilight 950P (krótkołańcuchowe FOS), zaś po dodaniu mieszaniny sacharozy z fruktozą, czy sacharozy z glukozą, obserwowano ich represję. Z kolei Kullin i wsp., przeprowadzili analizy transkryptomu szczepu *B. longum* NCC2705, na podstawie których stwierdzili, że gen kodujący  $\beta$ -fruktofuranazydazę (*cscA*) z *B. longum* NCC2705 podlegał represji w obecności wszystkich testowanych cukrów, takich jak rafinoza, sacharoza, glukoza, jak i Raftilose P95 oraz Raftiline GR [60]. Natomiast inna grupa badawcza stwierdziła u *B. longum* NCC2705, że Raftilose P95 indukuje transkrypcję genu kodującego permeazę

(*cscB*) i genu kodującego hydrolazę sacharozy (*cscA*) [61].

Analizy przeprowadzone przez Kullin i wsp. [60] wykazały bliskie pokrewieństwo  $\beta$ -fruktofuranazydaz z *B. longum* NP695334, *B. breve* AAT28190 i *B. animalis* subs. *lactis* AAS87041 (Ryc. 4). Białka te tworzą filogenetyczny klaster (grupa I) razem z inwertazami z *E. coli* CAA57219, *Zymomonas mobilis* P35636 oraz *Bacillus megaterium* AAM19071, a ponadto enzymy te współdziałają z permeazami sacharozy nie należącymi do PTS. Natomiast grupa II odpowiada wewnątrzkomórkowym fruktofuranazydazom, z których większość to fruktozo-6-fosforanazy. Enzymy z tej grupy współdziałają z białkami transportującymi sacharozę, należącymi do PTS. Grupa III białek, to fruktozydazy, które mogą zewnątrzkomórkowo rozkładać oligosacharydy [60].

#### ZASTOSOWANIE $\beta$ -FRUKTOFURANOZYDAZY

Inwertaza jest używana od dawna do produkcji cukru inwertowanego, wykorzystywanego w cukiernictwie [6,8,30,55] i sztucznego miodu [62]. Enzym ten zastosowano też do otrzymania fruktozy, używanej w przemyśle spożywczym chętniej niż sacharozy, ze względu na większą słodycz i mniejszą skłonność do krystalizacji podczas przechowywania. Podstawową zaletą enzymatycznej hydrolizy sacharozy, w porównaniu do kwasowej, jest to, że nie powstają barwne, pozbawione słodocy bezwodniki di-fruktozy [30,46]. Ponadto,  $\beta$ -fruktofuranazydaza jest wykorzystywana do syntezy prebiotycznych oligosacharydów, takich jak FOS czy laktosacharoza. Ten ostatni trisacharyd ( $\beta$ -D-Gal-(1,4)- $\alpha$ -D-Glc-(1,2)- $\beta$ -D-Fru) jest otrzymywany z laktozy i sacharozy w reakcji transfruktozylacji. Na rynku są dostępne dwa preparaty laktosacharozy: Nyuka-Origo i Newka-Oligo, których producentami są odpowiednio Ensuike Sugar Refining Co. oraz Hayashibara Soji Inc. [63,64]. Proponowane jest również użycie  $\beta$ -fruktofuranazydazy z *S. occidentalis* do biosyntezy prebiotycznych oligosacharydów z serii 6-kestozy [65]. Wykazano też, że preparaty enzymatyczne, zawierające  $\beta$ -fruktofuranazydazę oraz celulazy i hemicelulazy mogą wspomagać trawienie żywności zawierającej oligosacharydy [66]. Prowadzone są także badania nad zastosowaniem inwertazy w produkcji biosensorów używanych do wykrywania obecności jonów metali ciężkich oraz sacharozy w produktach spożywczych [67].

W ostatnich latach, duże zainteresowanie budzą probiotyki i prebiotyki, korzystnie wpływające na organizm ludzi i zwierząt. Często stosowane są kombinacje probiotyków i prebiotyków, czyli preparaty synbiotyczne, w których prebiotyczny składnik selektywnie stabilizuje komponent probiotyczny. Przykładem takiego prepara-

tu jest produkt zawierający oligofruktozę i stymulowane przez nią probiotyczne szczepy bifidobakterii [68]. Rozwój synbiotycznych produktów może zwiększyć skuteczność oddziaływania szczepów probiotycznych, które są wrażliwe na warunki panujące w górnej części przewodu pokarmowego, takie jak kwaśne środowisko żołądka czy sole żółci. Dodatek prebiotyku może chronić komórki przed niekorzystnymi czynnikami, zanim dotrą one do okrężnicy. Na przykład, w badaniach *in vitro*, wykazano że FOS poprawiły przeżywalność bifidobakterii w hodowli zawierającej w podłożu sole żółci [57].

Pożyteczne działanie synbiotyku sprawdzano w badaniach modelowych na szczurach [69]. Zwierzęta karmiono zaprojektowanym synbiotykiem, złożonym z FOS i jednego z wcześniej wyselekcjonowanych szczepów bifidobakterii, takich jak *B. longum* KN29.1, *B. longum* KNA1 lub *B. animalis* KSp4. Skuteczność synbiotyku trudno ocenić, ponieważ nie sprawdzono przeżywalności bakterii w warunkach przewodu pokarmowego, jednakże zaobserwowano wyższą liczebność populacji bifidobakterii po użyciu prebiotyku czy synbiotyku, niż po zastosowaniu samego probiotyku.

Badania produktów synbiotycznych wykazały, że zastosowanie FOS, GOS, jak również skrobi odpornej (ang. *resistant starch*) już na etapie otrzymywania mlecznych produktów fermentowanych przyczyniło się do wzrostu liczby komórek bifidobakterii obecnych w produkcie, jak również zwiększyło ich żywotność w czasie przechowywania [70]. W tym kontekście logiczne wydaje się wykorzystanie  $\beta$ -fruktofuranazy z bifidobakterii do biosyntezy FOS. Pozwoliłoby to otrzymać preparat synbiotyczny w jednoetapowym procesie, a co istotne, zostałby użyty odpowiednio dobrany prebiotyk, który stymulowałby wzrost i aktywność biologiczną danego szczepu. Ustalono, że szczep *Bifidobacterium bifidum* NIMB 41171 hodowany w podłożu zawierającym GOS, które sam zsyntetyzował, lepiej rósł i produkował więcej krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, niż w podłożu zawierającym komercyjnie dostępne GOS [71].

## PODSUMOWANIE

$\beta$ -fruktofuranazyda ze względu na hydrolityczne i syntetyczne właściwości biochemiczne znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym, a także farmaceutycznym. Największe znaczenie komercyjne mają  $\beta$ -fruktofuranazy pochodzące z drożdży i pleśni. Obecnie prowadzone są badania nad charakterystyką i wyizolowaniem tego enzymu z innych źródeł, m.in. z bifidobakterii czy *T. neapolitana*, co powinno zwiększyć możliwość jego wykorzystania. Zrozumienie mechanizmów działania oraz poznanie mechanizmów regulacji procesów biosyntezy może pomóc zwiększyć wydajność produkcji  $\beta$  – fruktofuranazy o właściwościach zoptymalizowanych pod kątem zastosowań praktycznych, takich jak biosynteza prebiotyków o ściśle określonej budowie.

## PIŚMIENNICTWO

- Williams RS, Trumble RJ, Maccoll R, Trimble RB, Maley F (1985) Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. *J Biol Chem* 260: 3334-3341
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309-316
- Henrissat B, Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293: 781-788
- <http://www.cazy.org>
- Sturm A (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121: 1-7
- Liebl W, Brem D, Gotschlich A (1998) Analysis of the gene for  $\beta$ -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 55-64
- Goosen C, Yuan XL, van Munster JM, Ram AFJ, van der Maarel MJE, Dijkhuizen L (2007) Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryot Cell* 6: 674-681
- Dipasquale L, Gambacorta A, Siciliano RA, Mazzeo MF, Lama L (2009) Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359). *Extremophiles* 13: 345-354
- Rashad M, Nooman MU (2009) Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. *Aust J Basic Appl Sci* 3: 1910-1919
- Roitsch T, Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* 9: 606-613
- Gascon S, Neumann NP, Lampen JO (1968) Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J Biol Chem* 243: 1573-1577
- Chu FK, Takase K, Guarino D, Maley F (1985) Diverse properties of external and internal forms of yeast invertase derived from the same gene. *Biochemistry* 24: 6125-6132
- Schulke N, Schmid FX (1988) The stability of yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation. *J Biol Chem* 263: 8827-8831
- Moreno S, Sanchez Y, Rodriguez L (1990) Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. A comparative analysis with the invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 267: 697-702
- Reddy A, Maley F (1996) Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J Biol Chem* 271: 13953-13958
- Warchol M, Perrin S, Grill JP, Schneider F (2002) Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett Appl Microbiol* 35: 462-467
- Ehrmann MA, Korakli M, Vogel RF (2003) Identification of the gene for  $\beta$ -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM 10140<sup>1</sup> and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 46: 391-397
- Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2005) Transcriptional regulation and characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 71: 3475-3482
- de Gines SC, Maldonado MC, de Valdez GF (2000) Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. *Curr Microbiol* 40: 181-184
- Turkiewicz M, Pazgier M, Donachie SP, Kalinowska H (2005) Invertase and  $\alpha$ -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Pol Polar Res* 26: 125-136
- Le Roy K, Lammens W, Verhaest M, De Coninck B, Rabijns A, Van Laere A, Van den Ende W (2007) Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: a single amino acid (Asp-239) substitution transforms arabidopsis cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. *Plant Physiol* 145: 616-625
- Muramatsu K, Onodera S, Kikuchi M, Shiomi N (1993) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1681-1685



23. Imamura L, Hisamitsu K, Kobashi K (1994) Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull* 17: 596-602
24. Janer C, Rohr LM, Pelaez C, Laloï M, Cleusix V, Requena T, Meile L (2004) Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst Appl Microbiol* 27: 279-285
25. Hidaka H, Hirayama M, Sumi N (1988) A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric Biol Chem* 52: 1181-1187
26. Hirayama M, Sumi N, Hidaka H (1989) Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric Biol Chem* 53: 667-673
27. Alvaro-Benito M, de Abreu M, Fernandez-Arrojo L, Plou FJ, Jimenez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernandez-Lobato M (2007) Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J Biotechnol* 132: 75-81
28. Rubio MC, Maldonado MC (1995) Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr Microbiol* 31: 80-83
29. Nguyen QD, Rezessy-Szabo JM, Bhat MK, Hoschke A (2005) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem* 40: 2461-2466
30. Guimaraes LHS, Somera AF, Terenzi HF, Polizeli MDT, Jorge JA (2009) Production of  $\beta$ -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochem* 44: 237-241
31. Chen WC, Liu CH (1996) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *Enzyme Microb Technol* 18: 153-160
32. Yoshikawa J, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T (2007) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. *J Biosci Bioeng* 103: 491-493
33. Hayashi S, Nonoguchi M, Takasaki Y, Ueno H, Imada K (1991) Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. *J Ind Microbiol* 7: 251-256
34. Rubio MC, Runco R, Navarro AR (2002) Invertase from a strain of *Rhizotorula glutinis*. *Phytochemistry* 61: 605-609
35. Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, de Coninck B, de Ranter CJ, Van Laere A, Van den Ende W, Rabijns A (2006) X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62: 1555-1563
36. de Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van den Ende W (2005) *Arabidopsis* AtwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ* 28: 432-443
37. Sinnott ML (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* 90: 1171-1202
38. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853-859
39. Withers SG (2001) Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym* 44: 325-337
40. McCarter JD, Withers SG (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* 4: 885-892
41. Reddy VA, Maley F (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 265: 10817-10820
42. Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W (2008) Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *J Mol Biol* 377: 378-385
43. Goetz M, Roitsch T (2000) Identification of amino acids essential for enzymatic activity of plant invertases. *J Plant Physiol* 157: 581-585
44. Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J Exp Bot* 60: 727-740
45. Alvaro-Benito M, Polo A, Gonzalez B, Fernandez-Lobato M, Sanz-Aparicio J (2010) Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J Biol Chem* 285: 13930-13941
46. Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M (2004) The three-dimensional structure of invertase ( $\beta$ -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem* 279: 18903-18910
47. Naumoff DG (2001)  $\beta$ -fructosidase superfamily: homology with some  $\alpha$ -L-arabinases and  $\beta$ -D-xylosidases. *Proteins* 42: 66-76
48. Pons T, Naumoff DG, Martinez-Fleites C, Hernandez L (2004) Three acidic residues are at the active site of a  $\beta$ -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. *Proteins* 54: 424-432
49. Alberto F, Jordi E, Henrissat B, Czjzek M (2006) Crystal structure of inactivated *Thermotoga maritima* invertase in complex with the trisaccharide substrate raffinose. *Biochem J* 395: 457-462
50. Matrai J, Lammens W, Jonckheer A, Le Roy K, Rabijns A, Van den Ende W, De Maeyer M (2008) An alternate sucrose binding mode in the E203Q *Arabidopsis* invertase mutant: an X-ray crystallography and docking study. *Proteins* 71: 552-564
51. Nagem RAP, Rojas AL, Golubev AM, Korneeva OS, Eneyskaya EV, Kulminskaya AA, Neustroev KN, Polikarpov I (2004) Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Biol* 344: 471-480
52. Verhaest M, Van den Ende W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A (2005) X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant J* 41: 400-411
53. Dynesen J, Smits HP, Olsson L, Nielsen J (1998) Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 579-582
54. Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2: 202-207
55. Vitolo M, Duranti MA, Pellegrin MB (1995) Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. *J Ind Microbiol* 15: 75-79
56. Rubio MC, Navarro AR (2006) Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol* 39: 601-606
57. Perrin S, Grill JP, Schneider F (2000) Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 88: 968-974
58. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D (2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol* 71: 6150-6158
59. Amaretti A, Tamburini E, Bernardi T, Pompei A, Zanoni S, Vaccari G, Matteuzzi D, Rossi M (2006) Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 654-662
60. Kullin B, Abratt VR, Reid SJ (2006) A functional analysis of the *Bifidobacterium longum* cscA and scrP genes in sucrose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 975-981
61. Parche S, Amon J, Jankovic I, Rezzonico E, Beleut M, Barutcu H, Schendel I, Eddy MP, Burkovski A, Arigoni F, Titgemeyer F (2007) Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 9-19
62. Isik S, Alkan S, Toppare L, Cianga I, Yagci Y (2003) Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices. *Eur Polym J* 39: 2375-2381
63. Crittenden RG, Playne MJ (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 7: 353-361
64. Mussatto SI, Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr Polym* 68: 587-597

65. Fernandez-Lobato M, Alvaro-Benito M, de Abreu Felipe M, Fernandez-Arrojo L, Plou Gasca FJ (2009) Novel fructofuranosidase activity for obtaining the prebiotic oligosaccharide 6-kestose. United States Patent Application Publication, Patent No. US2009/0148907 A1
66. Rohde RRJ, Schuler EF, Handel RA (1995) Enzyme food supplement composition containing  $\beta$ -fructofuranosidase, cellulase and hemicellulase. United States Patent, Patent No5445957
67. Hawrylak B, Wolska-Mitaszko B (2007) Inwertazy roślinne – funkcja fizjologiczna, regulacja aktywności oraz wykorzystanie w biotechnologii. *Biotechnologia* 2: 63-80
68. Schrezenmeir J, de Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73: 361s-364s
69. Bielecka M, Biedrzycka E, Majkowska A (2002) Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res Int* 35: 125-131
70. Saulnier DMA (2007) Synbiotics: making the most of probiotics and prebiotics by their combinations? *Food Sci Tech Bull Funct Foods* 4: 9-19
71. Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR (2005) Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 412-416

## $\beta$ -fructofuranosidase – properties, structure and applications

Marzena Jędrzejczak-Krzepkowska<sup>✉</sup>, Halina Kalinowska, Stanisław Bielecki

Institute of Technical Biochemistry, Technical University of Lodz, 4/10 Stefanowskiego St., 90-924 Lodz, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: marzena.jedrzejczak-krzepkowska@p.lodz.pl

**Key words:**  $\beta$ -fructofuranosidase, invertase, hydrolysis, transglycosylation

### ABSTRACT

$\beta$ -fructofuranosidase is the enzyme which releases terminal non-reducing  $\beta$ -D-fructofuranoside residues in  $\beta$ -D-fructofuranosides – saccharides commonly found in plants. Under appropriate conditions this enzyme may also catalyze the reaction of synthesis. Now,  $\beta$ -fructofuranosidase is one of best biochemically characterized enzymes. Also the 3D structure of this protein has been determined. Resolution of the conformation of  $\beta$  fructofuranosidase – so far only from a few microorganisms - has allowed for the partial explanation of its substrate specificity and understanding of mechanisms of enzymatic catalysis. This article presents a review of current reports on properties of  $\beta$ -fructofuranosidases derived from various sources with focus on their structure, mechanism of action, biosynthesis and industrial applications.

# Rola połączeń typu Gap w komórkach tkanki kostnej

## STRESZCZENIE

Połączenia typu Gap to transbłonowe kanały, które łączą błony sąsiadujących ze sobą komórek i uczestniczą w bezpośrednim przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami. Międzykomórkowa komunikacja z udziałem tego typu kanałów zapewnia prawidłowe funkcjonowanie tkanek i narządów. Tworzenie połączeń typu Gap oraz synteza białek koneksynowych, budujących pojedyncze półkanały podlegają regulacji przez hormony, czynniki wzrostu oraz cząsteczki sygnalizacyjne. Kanały typu Gap występujące pomiędzy osteoblastami, osteocytami i osteoklastami, odgrywają kluczową rolę w procesie obrotu kostnego, a zatem w przebudowie i regeneracji tkanki kostnej. Pośredniczą również w regulacji procesu proliferacji, różnicowania i dojrzewania osteoblastów oraz tworzenia i aktywności osteoklastów. Niniejsza praca ukazuje obecny stan wiedzy na temat roli międzykomórkowych połączeń typu Gap w komórkach kości, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zaangażowanie koneksyny 43 w regulację procesu kościotworzenia.

## WPROWADZENIE

Zjawisko międzykomórkowej komunikacji zapewnia istnienie różnorodnych procesów fizjologicznych, takich jak: wzrost, proliferacja i różnicowanie, homeostaza w obrębie komórek danej tkanki, apoptoza, odpowiedź immunologiczna, jak również patologicznych, np. proces nowotworzenia [1-4]. Komunikacja pomiędzy komórkami polega między innymi na tworzeniu różnego rodzaju połączeń (kanałów) w przylegających do siebie błonach sąsiadujących komórek. Jednym z takich połączeń jest, tzw. połączenie komunikacyjne typu Gap (GJIC, ang. *Gap Junctional Intercellular Communication*) utworzone z grupy białek zwanych koneksynami. Kanałami GJIC odbywa się szybkie przekazywanie sygnału elektrycznego oraz transport z komórki do komórki jonów (np.:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), małych cząsteczek o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa (np.: cykliczne AMP, trójfosforan inozytolu) oraz cząsteczek sygnałowych (np. przekaźniki drugiego rzędu) [1]. Połączenia te zaangażowane są w przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami, kontrolę wzrostu organizmów podczas embriogenezy oraz przebudowę tkanek i narządów. Zaburzenia funkcji GJIC mogą być przyczyną następujących schorzeń: zaćmy, utraty słuchu, chorób skóry, niewydolności serca, nowotworów i neuropatii. Wykazano, że w chorobach dotyczących układu krążenia (zaburzenia pracy mięśnia sercowego), odpornościowego i pokarmowego ulega zmianie liczba i rozmieszczenie w komórkach kanałów GJIC [5-7].

W kontroli przebudowy tkanki kostnej bardzo ważną rolę odgrywa oddziaływanie i wzajemny kontakt pomiędzy trzema typami komórek: osteoblastami (komórki tworzące kość), osteocytami (komórki leżące w jamkach kostnych) i osteoklastami (komórki odpowiadające za resorpcję kości). W tkance kostnej zjawisko komunikacji międzykomórkowej ma szczególne znaczenie, gdyż docierające do komórek kości zewnątrzkomórkowe sygnały (np. mechaniczne) są odbierane i przekazywane do komórek o ściśle określonej lokalizacji (osteoblasty bądź osteoklasty). Przekazywanie takich sygnałów jest związane z istnieniem rozbudowanej sieci połączeń międzykomórkowych występujących pomiędzy osteocytami oraz pomiędzy osteocytami a osteoblastami [8]. Niezmiernie istotny jest również udział połączeń komunikacyjnych w powstawaniu dojrzałych osteoklastów z ich prekursorów oraz regulacji ich aktywności i procesu resorpcji kości [9].

## WYSTĘPOWANIE I BUDOWA POŁĄCZEŃ TYPU Gap

Wymiana jonów pomiędzy komórkami za pośrednictwem kanałów o niskiej oporności elektrycznej GJIC ma fundamentalne znaczenie dla funkcji komórek pobudliwych, takich jak: neurony, miocyty serca czy komórki mięśni gładkich. Połączenia typu Gap zostały odkryte w układzie nerwowym (tzw. połączenia typu nexus) oraz mięśniu sercowym (połączenia szczelinowe) jako kanały trans-

Edyta Wróbel<sup>✉</sup>

Joanna Leszczyńska

Jacek Przybylski

Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

<sup>✉</sup>Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: edyta.wrobel@wum.edu.pl

Artykuł otrzymano 16 lutego 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 10 maja 2011 r.

**Słowa kluczowe:** połączenia typu Gap, koneksyny, osteoblasty, osteoklasty, różnicowanie, tkanka kostna

**Wykaz skrótów:** ALP – fosfataza zasadowa; AMP – adenozymonofosforan; ATP – adenozyntrojfosforan; BMP2 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*) – morfogenetyczne białko kości 2; Cx – koneksyna;  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  – aktywna forma witaminy  $\text{D}_3$ ; GJIC (ang. *Gap Junctional Intercellular Communication*) – połączenia komunikacyjne typu Gap; PGE2 – prostaglandyna E2; PTH – parathormon

**Podziękowania:** Pragniemy podziękować dr hab. Małgorzacie Lewandowskiej-Szumień za cenne wskazówki i uwagi dotyczące niniejszego manuskryptu. Praca powstała w trakcie realizacji grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N302157037 (2009-2011).

misji sygnału elektrycznego w synapsach elektrycznych lub w obrębie sąsiadujących miocytów [10,11]. Ich obecność umożliwia ujednoczenie sygnału elektrycznego lub mechanicznego w skoordynowanej grupie komórek tworzących tkankę. Występowanie połączeń komunikacyjnych typu Gap nie jest jednak ograniczone tylko do komórek pobudliwych. GJIC są obecne prawie we wszystkich komórkach dojrziałych tkanek oraz podczas ich morfogenezy [12].

W warunkach *in vitro* połączenia typu Gap powstają w ciągu kilku minut i równie szybko ulegają rozpadowi. Mechanizmy regulujące liczbę tworzących się kanałów i ich aktywność związane są z regulacją ekspresji genów dla poszczególnych izoform białek koneksynowych i z procesem ich fosforylacji. Warunkowane są one także zmianami pH oraz obecnością wolnych rodników [13]. GJIC mogą występować pomiędzy komórkami budującymi daną tkankę (np.: osteoblast – osteocyt, komórka śródbłonna - komórka śródbłonna) lub komórkami należącymi do różnych tkanek (np. osteoblast – komórka śródbłonna) [8,14,15]. Dzięki badaniom histocytochemicznym i zastosowaniu mikroskopii elektronowej uzyskano morfologiczny obraz potwierdzający obecność połączeń typu Gap, *in vivo* w fibroblastach okostnej, osteoblastach i osteocytach [16]. Interesujące wydaje się być odkrycie połączeń typu Gap o owalnej strukturze znajdujących się na terenie cytoplazmy komórek [16], chociaż znaczenie i funkcja tych struktur nie jest poznana.

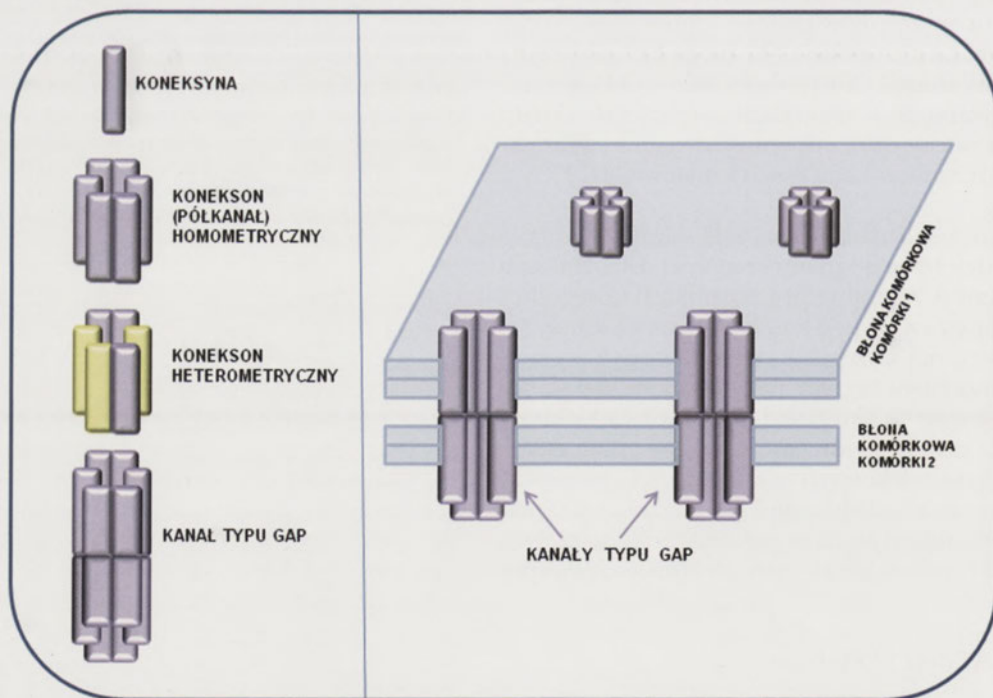
## BIAŁKA KONEKSYNOWE

Nadrodzina białek koneksynowych budujących połączenia typu Gap kodowana jest przez ponad 20 genów,

które charakteryzują się u kręgowców wysokim stopniem zachowania ich struktury w ewolucji [17]. Są to białka polimorficzne, z których najdokładniej badana jest koneksyna 43 (Cx43). Cx43 w komórkach tkanki kostnej posiada 4 izoformy: nieufosforylowaną (NP) i trzy ufosforylowane (P1, P2, P3) [18]. Izoforma P2 dominuje w osteoblastach, mimo że po około trzech godzinach w hodowli *in vitro* przechodzi w formę NP, a następnie powraca znowu do formy P2 [19]. Koneksyny syntetyzowane są w siateczce śródplazmatycznej, gdzie zachodzi ich oligomeryzacja w struktury zwane koneksonami lub półkanałami. Każdy konekson składa się z sześciu identycznych lub różnych jednostek koneksynowych. Zsyntetyzowane półkanały transportowane są do błony komórkowej, w obrębie której agregują tworząc transbłonowy kanał łączący dwie sąsiadujące ze sobą komórki [20]. W zależności od zestawienia białek koneksynowych półkanały dzielimy na homometryczne (koneksyny jednego rodzaju np. Cx36) lub heterometryczne (przynajmniej dwie różne koneksyny np.: Cx36 i Cx45) (Ryc. 1). Rutkowski i wsp. wyróżniają cztery różne typy kanałów koneksynowych: homometryczno-homotypowe, zbudowane z dwóch identycznych koneksonów; homometryczno-heterotypowe, w których jeden z półkanałów zbudowany jest z jednego rodzaju białka koneksynowego, a drugi z innej koneksyny; heterometryczno-homotypowe, w których każdy z półkanałów utworzony jest z dwóch koneksyn i heterometryczno-heterotypowe, charakteryzujące się najbardziej zróżnicowanym składem białkowym. Synteza cząsteczek koneksyn zachodzi w komórkach wtędy, gdy niezbędne jest tworzenie połączeń międzykomórkowych. Kanały koneksonów mogą się zamykać bądź otwierać, dzięki zmianie konformacji cząsteczek koneksyn.

Połączenia te nie są strukturami statycznymi, jednak ich otwieranie i zamykanie odbywa się w sposób kontrolowany [21,22].

Cząsteczka koneksyny zbudowana jest z czterech transbłonowych domen hydrofobowych (TM1-TM4), dwóch małych pętli zewnątrzkomórkowych (E1, E2), jednej pętli wewnątrzkomórkowej (CL) oraz zlokalizowanych w cytoplazmie zakończeń karboksylowych i aminowych. Z C-końcową domeną oraz pętlą cytoplazmatyczną cząsteczki koneksyny 43 oddziałują: białka budujące połączenia ściśle (ZO-1, ZO-2, okludyna, kładyna), białka połączeń przylegających ( $\beta$ -katenina), białka procesu potocytozy (kaweolina) oraz białka



Rycina 1. Struktura półkanałów (koneksonów) oraz połączeń typu Gap. Półkanały utworzone są z sześciu identycznych lub różnych cząsteczek koneksyn. Koneksyny zbudowane z jednego rodzaju koneksyn np. Cx43 nazywamy homometrycznymi, zaś z dwóch różnych (np.: Cx43 i Cx45) heterometrycznymi. Koneksyny przylegających do siebie komórek tworzą transbłonowy kanał typu Gap.

cytoszkieletu (tubulina, spektryna). Oddziaływanie koneksyn z innymi białkami umożliwia powstanie złożonego kompleksu, który zapewnia skoordynowaną, dostosowaną do potrzeb komunikację międzykomórkową oraz udział białek koneksynowych w przekazywaniu różnego rodzaju sygnałów [22,23].

Rodzaj koneksyn wchodzących w skład poszczególnych GJIC decyduje o typie kanału i wpływa na jego właściwości biofizyczne, m.in. jego przepuszczalność. Obecność w koneksionie cząsteczki Cx43 umożliwia transport stosunkowo dużych cząsteczek sygnałowych (o masie cząsteczkowej <1,2 kDa), z preferencją dla cząsteczek o ładunku ujemnym. Natomiast koneksyna 45 formuje połączenia o mniejszej wielkości porów, przez które zachodzi dyfuzja cząsteczek dodatnio naładowanych (<0,3 kDa). Półkanał koneksynowy może być aktywny nawet jeśli nie utworzy pary i pozostanie w błonie komórkowej wolnym koneksionem. Staje się on wtedy półkanałem o dużej przepuszczalności [8].

W tkance kostnej zachodzi synteza trzech różnych koneksyn: Cx43, Cx45 i Cx46. Koneksyna 43 jest obecna we wszystkich typach komórek kości, w tym: w komórkach szpiku człowieka, osteoblastach kości beleczkowej, pierwotnych osteocytach, komórkach kości zuchwy i więzadeł przyzębia oraz w komórkach linii osteoblastycznej MC3T3-E1 i osteocytarnej MLO-Y4, a także w chondrocytach [24-28]. Synteza Cx45 zachodzi w liniach komórek osteoblastycznych UMR-102 i hFOB 1.19 oraz osteocytarnej linii MLO-Y4, choć w znacznie mniejszym stopniu niż Cx43 [25,29,30]. Wykazano, że koneksyna 45 obecna w komórkach szpiku kostnego, nie występuje w osteoblastach, osteocytach i osteoklastach zębodołowej tkanki kostnej [31]. Natomiast synteza Cx46 zachodzi podobnie jak Cx45 w komórkach linii osteoblastycznych (np. ROS17/2.8), chociaż rola koneksyny 46 w komórkach osteogennych pozostaje nieznana [32].

#### **ROLA POŁĄCZEŃ TYPU Gap W KOMÓRKACH TKANKI KOSTNEJ**

Połączenia typu Gap pośredniczą w prawidłowym funkcjonowaniu komórek kości, regulując ich proliferację, różnicowanie [8,33,34] oraz proces przebudowy tkanki kostnej [35,36]. Zjawisko międzykomórkowej komunikacji na powierzchni kości zachodzi pomiędzy osteoblastami a wypustkami osteocytów (połączenia typu Gap) oraz w przylegających do siebie błonach osteocytów (połączenia adhezyjne). Osteocyty przekazują sygnały mechaniczne osteoblastom, a także innym typom komórek kości, wpływając jednocześnie na regulację ich biologicznych funkcji [37]. Badania z wykorzystaniem modelu hodowli 3D fragmentu kości beleczkowej *in vitro* dotyczące procesu mechanicznej odporności kości, przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmu przesyłania sygnałów z osteocytów do osteoblastów. Wykazano, że zastosowanie dynamicznych obciążeń fragmentu 3D kości beleczkowej, pomimo niskiego poziomu przepływu pożywki hodowlanej zawierającej substancje odżywcze wpływa na przeżycie osteoblastów, jak również osteocytów zamkniętych w jamkach mineralizowanej kości, dzie-

ki obecności pomiędzy tymi komórkami połączeń typu Gap. Półkanały regulują uwalnianie adenozynotrójfosforanu (ATP) i prostaglandyny E2 (PGE2) w reakcji na stymulację mechaniczną tkanki kostnej [32] oraz biorą udział w odpowiedzi komórek kości na czynniki farmakologiczne [38]. Badania *in vitro* dostarczają danych wskazujących na rolę koneksyny 43 jako receptora zaangażowanego w odpowiedź komórki na stymulację mechaniczną. Półkanały utworzone przez podjednostki Cx43 pozostają aktywne w linii osteocytarnej wtedy, gdy pośredniczą w międzykomórkowym transporcie PGE2 i ATP [39].

Zahamowanie syntezy PGE2 w komórkach kości i jednocześnie zablokowanie GJIC, znacznie osłabia lub całkowicie znosi skutki wywołane zastosowaniem obciążeń mechanicznych. Wnioskuje się zatem, iż zaangażowanie połączeń typu Gap oraz obecność PGE2 ma kluczowe znaczenie dla mechanicznej odporności kości. Zjawisko międzykomórkowej komunikacji przyczynia się do utrzymania fragmentu żywej tkanki kostnej (tworzenie i zmiany sprężystości tkanki kostnej) w warunkach hodowli *in vitro*. Zastosowany w tej pracy model wspólnej hodowli *in vitro* dwóch typów komórek we wspólnym sposobie przyczynia się do pokazania stanu wiedzy na temat połączeń typu Gap jako czujników mechanicznych w osteocytach i w przekazywaniu przez nie sygnału regulującego funkcjonowanie i zdolności mechaniczne osteoblastów zapewniające spójność całego układu kostnego organizmu [40].

Niewielka liczba prac dotyczy problemu fizjologicznych konsekwencji reakcji osteocytów na sygnały zewnętrzne, które następnie przekazywane są do osteoblastów. Wynika to z trudności metodycznych badań *in vitro* hodowli osteocytów, jako komórek zlokalizowanych w mineralizowanej macierzy kości. Jednak dostępność nowych technik molekularnych, w tym rekombinacji genów stwarza coraz więcej możliwości badania funkcji GJIC w komórkach tkanki kostnej, także w warunkach *in vivo* [8,41]. Ostatnio opublikowane dane Lim i wsp. wskazują na rolę microRNA przechodzącego połączeniami typu Gap pomiędzy szpikiem a komórkami raka piersi, podczas przechodzenia nowotworu w fazę spoczynkową [42]. Odkrycie to może w przyszłości stanowić skuteczną formę leczenia nowotworów. Obecnie eksperymenty z tego zakresu znajdują się na etapie I fazy badań klinicznych.

Połączenia typu Gap pośredniczą w utrzymaniu i zapewnieniu międzykomórkowej współpracy metabolicznej polegającej na wyrównywaniu gradientów substancji odżywczych lub cząsteczek sygnałowych i enzymów w obrębie komórek tkanki [43]. GJIC mogą tłumić skutki mutacji somatycznych. W przypadku utraty przez jedną komórkę kluczowych enzymów metabolicznych czy białek budujących kanały jonowe, niezbędne cząsteczki zostają przekazane drogą połączeń komunikacyjnych z sąsiednich komórek [44]. Międzykomórkowa komunikacja z udziałem GJIC pomiędzy osteocytami regulowana jest m.in. przez różne czynniki anaboliczne np.: parathormon (PTH), morfogenetyczne białko kości 2 (BMP2, ang. *Bone Morphogenetic Protein 2*) oraz PEG2. PTH stymuluje

ekspresję genu kodującego Cx43 w osteoblastach i osteocytach, w zależności od stadium zróżnicowania komórek osteoblastycznych [45]. Zahamowanie komunikacji międzykomórkowej przez blokowanie GJIC wpływa na osłabienie stymulującego działania PTH na proces mineralizacji zachodzący w osteoblastach podczas ich różnicowania [46]. W hodowlach komórek osteoblastycznych wielu linii komórkowych traktowanych PGE2 obserwowano podwyższenie poziomu syntezy białek koneksynowych [47]. Wykazano również, że zastosowanie stabilnego analogu peptydów antyarytmicznych, rotigapeptydu, wpływa na wzrost liczby GJIC w osteoblastach człowieka [48]. W przeciwieństwie jednak do PTH i PGE2, transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF $\beta$ ), osteogenina i BMP2 odpowiadają za zmniejszenie zdolności tworzenia połączeń typu Gap w błonach osteogennych komórek linii MC3T3-E1 [49].

Należy również wspomnieć, iż niskie pH w komórkach MC3T3-E1 hamuje komunikację międzykomórkową oraz powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji genu kodującego Cx43 [50], co w zasadniczy sposób wpływa na różnicowanie i prawidłowe funkcjonowanie komórek osteogennych. Wykazano, że podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP wywołuje wzrost liczby tworzonych w błonach osteoblastów kanałów Gap oraz powoduje wzrost syntezy znacznika procesu kościotworzenia, osteokalcyny [51]. Liczne inne czynniki, w tym białka macierzy pozakomórkowej (kolagen typu I, fibronektyna, witronektyna) [52], cząsteczki sygnalizacyjne ERK/P13K [53], odgrywają kluczową funkcję w regulacji formowania i prawidłowej funkcji GJIC w kontaktujących się ze sobą komórkach kości.

Ukierunkowane zahamowanie ekspresji genu dla poszczególnych koneksyn, przy użyciu specyficznych antysensownych oligonukleotydów umożliwia określenie biologicznych funkcji poszczególnych białek koneksynowych *in vivo* [54,55]. Myszy pozbawione genu *Gja1* (myszy *Gja1*<sup>-/-</sup>) kodującego koneksynę 43 wykazują opóźnienie kostnienia szkieletu obwodowego i osiowego [56]. Ponadto brak syntezy Cx43 powoduje zmiany w różnicowaniu osteoblastów i w transkrypcji genów dla znaczników komórek kości [34], w szczególności kolagenu typu I ( $\alpha_1(I)$ ), osteokalcyny i sialoprotein [57]. Natomiast nadekspresja *Gja1* w komórkach wykazujących niski poziom białka Cx43, skutkuje wzrostem transkrypcji genów dla kolagenu typu I i osteokalcyny.

W celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu udziału Cx43 w regulacji biologicznych funkcji osteoblastów przeprowadzono badania, w których testowano przepuszczalność heterometrycznych kanałów zbudowanych z Cx43/Cx45, z dominacją cząsteczek koneksyny 45 w danym koneksonie. Doświadczenia te doprowadziły do zidentyfikowania elementu promotora DNA dla Cx43, odpowiadającego za wpływ tego białka na regulację transkrypcji genów kodujących znaczniki procesu osteogenezy:  $\alpha_1(I)$  kolagenu i osteokalcyny. Aktywacja procesu transkrypcji zachodzi poprzez wiązanie się specyficznych czynników transkrypcyjnych Sp1/Sp3 z DNA. Stwierdzono również, że koneksyna 43 jako składnik po-

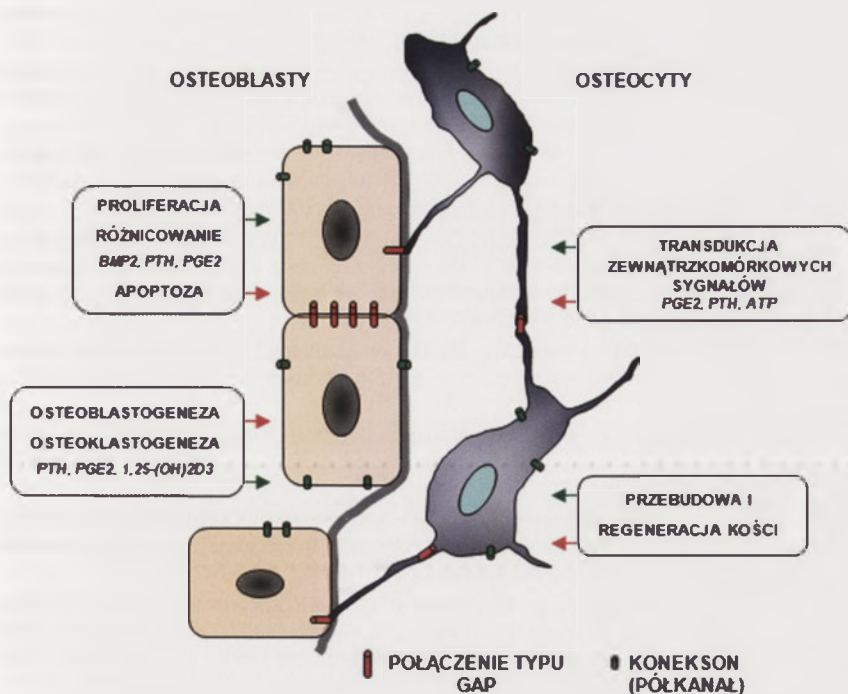
łączeń typu Gap moduluje ekspresję genów w osteoblastach, zakłócając określone ścieżki transdukcji sygnału, które mogą być aktywowane za pośrednictwem bodźców zewnątrzkomórkowych [56].

#### POŁĄCZENIA TYPU Gap W RÓŻNICOWANIU OSTEOLASTÓW

Połączenia typu Gap odgrywają istotną rolę zarówno podczas rozwoju kości *in vivo* [56], jak również w procesie różnicowania osteoblastów i utrzymania ich dojrzałego fenotypu w warunkach *in vitro*. U myszy z wyłączonym genem dla koneksyny 43 obserwowano osłabienie tworzenia kości na podłożu łącznotkankowym, co sugeruje istnienie zakłóceń w procesie różnicowania i dojrzewania osteoblastów [57]. Dowiedziono także, że odpowiedź na PTH charakteryzująca dojrzałe osteoblasty jest zmniejszona w osteoblastycznych komórkach linii ROS 17/2.8, w których kanały typu Gap są nieaktywne. Inne doniesienia wskazują, że w osteoblastach z wygaszonym genem kodującym Cx43 występuje zmniejszona liczba połączeń GJIC, obniżona aktywność fosfatazy zasadowej oraz brak zdolności do tworzenia ognisk mineralizacji [57]. Wyniki te potwierdzono blokując kanały typu Gap w komórkach linii hFOB 1.19 [29].

Inhibitory GJIC osłabiają stymulujący wpływ koneksyny 43 na różnicowanie komórek macierzystych kości, co wiąże się z obniżeniem poziomu ekspresji genów dla znaczników różnicowania osteoblastów takich jak: fosfataza zasadowa, osteokalcyna czy kolagen typu I oraz zmniejszeniem poziomu mineralizacji nowo tworzonej kości [46,58]. Wyciszenie ekspresji genu kodującego Cx43 powoduje wyraźny spadek aktywności fosfatazy zasadowej w komórkach linii MC3T3-E1, co w późniejszym stadium ich różnicowania wpływa również na zahamowanie procesu mineralizacji [59]. Natomiast nadprodukcja koneksyny 43 indukuje proliferację i różnicowanie komórek osteogennych [60]. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stopnia zróżnicowania osteoblastów zwiększa się poziom ekspresji mRNA dla Cx43 [29]. Potwierdzają to wyniki badań prowadzonych na komórkach linii MC3T3-E1 przez Schillera i wsp. [45].

Stymulowanie procesu dojrzewania komórek osteogennych z udziałem GJIC wiąże się bezpośrednio z transportem przez te kanały cząsteczek sygnalizacyjnych aktywowanych przez odpowiednie czynniki wzrostu czy hormony. Wykazano, iż pomiędzy komórkami śródbłonna i komórkami progenitorowymi kości występują heterometryczne połączenia typu Gap [61]. Sygnały przekazywane z komórek śródbłonna prawdopodobnie warunkują regulację i kontrolę procesu różnicowania komórek osteogennych. W zależności od typu komórek osteogennych, półkanały mogą być zbudowane z koneksyny 43 lub 45. Rodzaj koneksyny wpływa na odmienną przepuszczalność danego kanału. Cx43 budująca kanały w błonie osteoblastycznych komórek linii ROS17/2.8 pośredniczy w międzykomórkowym transporcie między innymi jonów i większych cząsteczek, podczas gdy Cx45 obecna w komórkach linii UMR106 umożliwia transport jedynie jonów [30]. Zjawisko to wskazuje na niezmiernie



Rycina 2. Rola komunikacji międzykomórkowej z udziałem połączeń typu Gap w komórkach tkanki kostnej (wg [8], z modyfikacjami). Połączenia typu Gap są uniwersalnymi kanałami odpowiadającymi za przekazywanie sygnałów regulujących proliferację, różnicowanie oraz apoptozę. Kanały te pośredniczą także w utrzymaniu właściwej homeostazy tkankowej warunkującej przebudowę i regenerację kości, zaś na poziomie komórkowym prawidłową osteoblastogenezę i osteoklastogenezę. Aktywacja połączeń typu Gap w komórkach kości podlega regulacji przez hormony (PTH, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) oraz czynniki anaboliczne (BMP2, PGE2).

ważną rolę poszczególnych koneksyn w regulacji międzykomórkowej komunikacji oraz wyboru ścieżki przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami.

### POŁĄCZENIA TYPU Gap W RÓŻNICOWANIU OSTEOKLASTÓW

W procesie obrotu kostnego główną rolę odgrywają osteoblasty uczestniczące w tworzeniu i odbudowie tkanki kostnej oraz wielojądrzaste osteoklasty, które odpowiadają za zjawisko degradacji i resorpcji kości. W zdrowym organizmie zjawisko obrotu kostnego jest procesem naturalnym, prowadzącym do odnowy tkanki kostnej. Prekursorami osteoklastów są hematopoetyczne komórki linii monocytarno-makrofagalnej, które różnicują a następnie łącząc się tworzą dojrzałą w pełni aktywną wielojądrzastą komórkę. Sugeruje się, że kanały GJIC odgrywają kluczową rolę w procesie tworzenia dojrzałych osteoklastów z komórek prekursorowych [9,62]. W osteoklastach podobnie jak w pozostałych komórkach kości półkanały zbudowane są głównie z koneksyny 43. W licznych badaniach dotyczących udziału połączeń komunikacyjnych w procesie resorpcji kości zastosowano różnego rodzaju inhibitory połączeń typu Gap. Wykazano, iż użycie inhibitorów takich jak: kwas 18 $\alpha$ -glicyretynowy czy oleamid, wpływa na zmniejszenie liczby zresorbowanych miejsc na płytach kostnych w hodowlach *in vitro* pobudzanych przez PTH i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (aktywna forma witaminy D<sub>3</sub>) [36]. Ponieważ powszechnie stosowany heptanol może działać nieswoiście na hamowanie połączeń komunikacyjnych, Ilvesaro i wsp. dla porównania zastosowali syn-

tetyczny peptyd Gap 27 – cząsteczkę posiadającą homologiczną sekwencję do sekwencji pętli zewnątrzkomórkowej koneksyn (sekwencja reszt aminokwasowych SRPTEKTIFII) [63]. Inhibitor ten hamował działanie półkanałów zbudowanych z Cx32, Cx40 lub Cx43. Mechanizm działania heptanolu nie jest dokładnie poznany. W badaniach tych również obserwowano zmniejszenie się obszaru resorpcji i liczby miejsc (dołków) resorpcyjnych w hodowlach osteoklastów prowadzonych na skrawkach kości. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na osłabienie aktywności osteoklastów hodowanych w obecności Gap 27 [63]. Powyższe wyniki dowodzą, że połączenia typu Gap odgrywają zasadnicze znaczenie w procesie powstawania, przeżycia i prawidłowego funkcjonowania osteoklastów, a co za tym idzie, także w procesie właściwej przebudowy kości. Dlatego też, zasadne jest prowadzenie dalszych badań w zakresie udziału komunikacji międzykomórkowej podczas procesu osteoklastogenezы.

### PODSUMOWANIE

Międzykomórkowe połączenia typu Gap odgrywają kluczową rolę w koordynacji biologicznych funkcji prawie wszystkich typów komórek, w tym osteogennych. Tworzenie i aktywacja tych kanałów związana jest zarówno z prawidłowym funkcjonowaniem, jak i ze zmianami patologicznymi w obrębie układu szkieletowego. Morfogenezа, modelowanie oraz proces przebudowy tkanki kostnej nieodzownie wiążą się z komunikacją komórek osteogennych odbywającą się poprzez transblonowe kanały typu Gap. Szczególną uwagę zwraca fakt, że białka koneksynowe (wśród nich najważniejsza Cx43) budujące koneksyny podlegają regulacji podczas różnorodnych procesów komórkowych, wpływając jednocześnie na zmianę ścieżek przekazywania zewnątrzkomórkowych sygnałów czy transkrypcję specyficznych tkankowo genów. Należy podkreślić, że istnieje wiele doświadczalnych dowodów, które potwierdzają, iż połączenia GJIC i półkanały zapewniają przekazywanie sygnałów pomiędzy wszystkimi komórkami kości oraz odgrywają ważną funkcję regulatorową podczas proliferacji, różnicowania oraz apoptozy, czyli kolejnych faz przebudowy tkanki kostnej. Kanały te przewodzą sygnały generowane przez czynniki wzrostu, hormony i bodźce mechaniczne pomiędzy komórkami oraz komórkami a środowiskiem zewnątrzkomórkowym (Ryc. 2). Niezmiernie interesujące wydaje się dokładniejsze zbadanie roli półkanałów w warunkach *in vivo* oraz kanałów obecnych w błonach osteocytów. Dlatego też, dalsze badania prowadzone w zakresie funkcji GJIC, w komórkach tkanki kostnej przyczynią się z pewnością do lepszego zrozumienia komórkowych mechanizmów związanych ze zjawiskiem obrotu kostnego, a więc przebudową i regeneracją kości.

1. Jiang JX, Gu S (2005) Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 1711: 208-214
2. Neijssen J, Pang B, Neefjes J (2007) Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 207-218
3. Liu Y, Zhang X, Li ZJ, Chen XH (2010) Up-regulation of Cx43 expression and GJIC function in acute leukemia bone marrow stromal cells post-chemotherapy. *Leuk Res* 34: 631-640
4. Chabowski A, Sulkowska M, Chrzanoska A, Chyczewska E, Famulski W, Kasacka I, Sulkowski S, Chyczewski L (2002) Połączenia gap i ich udział w apoptozie i kancerogenezie. *Post Biol Kom* 28: 277-291
5. Chadjichristos CE, Derouette JP, Kwak BR (2006) Connexins in atherosclerosis. *Adv Cardiol* 42: 255-267
6. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S (2008) Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80: 9-19
7. Saez JC, Branes MC, Corvalan LA, Eugenin EA, Gonzalez H, Martinez AD, Palisson F (2000) Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. *Braz J Med Biol Res* 33: 447-455
8. Civitelli R (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473: 188-192
9. Schilling AF, Filke S, Lange T, Gebauer M, Brink S, Baranowsky A, Zustin J, Amling M (2008) Gap junctional communication in human osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med* 12: 2497-2504
10. Furshpan EJ, Potter DD (1957) Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature* 180: 342-343
11. Weidmann S (1952) The electrical constants of Purkinje fibres. *J Physiol* 118: 348-360
12. Levin M (2007) Gap junctional communication in morphogenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 186-206
13. Kanczuga-Koda L (2004) Gap junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 58: 158-165
14. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9: 910-918
15. Guillotin B, Bareille R, Bourget C, Bordenave L, Amedee J (2008) Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* 42: 1080-1091
16. Shapiro F (1997) Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions. *Calcif Tissue Int* 61: 285-293
17. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-737
18. Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, Kazlauskas A, Boynton AL (1999) Disruption of gap junctional communication by the platelet-derived growth factor is mediated *via* multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 10489-10496
19. Musil LS, Goodenough DA (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115: 1357-1374
20. Leithe E, Kjenseth A, Bruun J, Simes S, Rivedal E (2010) Inhibition of connexin43 gap junction channels by the endocrine disruptor ioxynil. *Toxicol Appl Pharmacol* 247: 10-17
21. Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U (2006) Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 24: 1675-1686
22. Rutkowski R, Kosztyła-Hojna B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Sulkowski S, Rutkowski K (2008) Structure and physiological function of connexin proteins. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62: 632-641
23. Hunter AW, Gourdie RG (2008) The second PDZ domain of zonula occludens-1 is dispensable for targeting to connexin 43 gap junctions. *Cell Commun Adhes* 15: 55-63
24. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH (1993) Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest* 91: 1888-1896
25. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX (2001) Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J Bone Miner Res* 16: 249-259
26. Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM, Lewis JE (1997) Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament (PDL) cells during experimental tooth movement. *J Dent Res* 76: 1357-1366
27. Yamaguchi DT, Ma D, Lee A, Huang J, Gruber HE (1994) Isolation and characterization of gap junctions in the osteoblastic MC3T3-E1 cell line. *J Bone Miner Res* 9: 791-803
28. Chi SS, Rattner JB, Matyas JR (2004) Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* 205: 363-370
29. Donahue HJ, Li Z, Zhou Z, Yellowley CE (2000) Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C315-322
30. Steinberg TH, Civitelli R, Geist ST, Robertson AJ, Hick E, Veenstra RD, Wang HZ, Warlow PM, Westphale EM, Laing JG, Beyer EC (1994) Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J* 13: 744-750
31. Gluhak-Heinrich J, Gu S, Pavlin D, Jiang JX (2006) Mechanical loading stimulates expression of connexin 43 in alveolar bone cells in the tooth movement model. *Cell Commun Adhes* 13: 115-125
32. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2005) Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16: 3100-3106
33. Ishihara Y, Kamioka H, Honjo T, Ueda H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T (2008) Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin 43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. *J Bone Miner Res* 23: 350-360
34. Li Z, Zhou Z, Saunders MM, Donahue HJ (2006) Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1248-1255
35. Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473: 201-209
36. Ransjo M, Sahli J, Lie A (2003) Expression of connexin 43 mRNA in microisolated murine osteoclasts and regulation of bone resorption *in vitro* by gap junction inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1179-1185
37. Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S (2007) Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci* 12: 1450-1462
38. Plotkin LI, Aguirre JJ, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T (2005) Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis *via* distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 280: 7317-7325
39. Genetos DC, Geist DJ, Liu D, Donahue HJ, Duncan RL (2005) Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* 20: 41-49
40. Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldberg RE, Lu HH, Guo XE (2009) A trabecular bone explant model of osteocyte-osteoblast co-culture for bone mechanobiology. *Cell Mol Bioeng* 2: 405-415
41. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ (2007) Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity *via* gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C545-552
42. Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Taborga M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res* 71: 1550-1560



43. Stumpel F, Ott T, Willecke K, Jungermann K (1998) Connexin 32 gap junctions enhance stimulation of glucose output by glucagon and noradrenaline in mouse liver. *Hepatology* 28: 1616-1620
44. Goodenough DA, Paul DL (2009) Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a002576: 1-19
45. Schiller PC, Roos BA, Howard GA (1997) Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype. *J Bone Miner Res* 12: 2005-2013
46. Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA (2001) Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28: 362-369
47. Civitelli R, Ziambaras K, Warlow PM, Lecanda F, Nelson T, Harley J, Atal N, Beyer EC, Steinberg TH (1998) Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 68: 8-21
48. Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Meier E, Hansen SS, Jensen JE, Sorensen OH, Petersen JS (2005) The antiarrhythmic peptide analog rotigaptide (ZP123) stimulates gap junction intercellular communication in human osteoblasts and prevents decrease in femoral trabecular bone strength in ovariectomized rats. *Endocrinology* 146: 4745-4754
49. Rudkin GH, Yamaguchi DT, Ishida K, Peterson WJ, Bahadosingh F, Thye D, Miller TA (1996) Transforming growth factor-beta, osteogenin, and bone morphogenetic protein-2 inhibit intercellular communication and alter cell proliferation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Physiol* 168: 433-441
50. Yamaguchi DT, Ma D (2003) Mechanism of pH regulation of connexin 43 expression in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 736-739
51. Romanello M, Moro L, Pirulli D, Crovella S, D'Andrea P (2001) Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1138-1144
52. Lacouture ME, Schaffer JL, Klickstein LB (2002) A comparison of type I collagen, fibronectin, and vitronectin in supporting adhesion of mechanically strained osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17: 481-492
53. Alford AI, Jacobs CR, Donahue HJ (2003) Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled. *Bone* 33: 64-70
54. Law LY, Zhang WV, Stott NS, Becker DL, Green CR (2006) *In vitro* optimization of antisense oligodeoxynucleotide design: an example using the connexin gene family. *J Biomol Tech* 17: 270-282
55. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83: 1359-1400
56. Stains JP, Civitelli R (2005) Gap junctions in skeletal development and function. *Biochim Biophys Acta* 1719: 69-81
57. Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R (1998) Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9: 2249-2258
58. Li Z, Zhou Z, Yellowley CE, Donahue HJ (1999) Inhibiting gap junctional intercellular communication alters expression of differentiation markers in osteoblastic cells. *Bone* 25: 661-666
59. Upham BL, Suzuki J, Chen G, Wang Y, McCabe LR, Chang CC, Krutovskikh VA, Yamasaki H, Trosko JE (2003) Reduced gap junctional intercellular communication and altered biological effects in mouse osteoblast and rat liver oval cell lines transfected with dominant-negative connexin 43. *Mol Carcinog* 37: 192-201
60. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, Schirrmacher K (2001) Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 264: 397-407
61. Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J (2002) Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C775-785
62. Ilvesaro J, Tuukkanen J (2003) Gap-junctional regulation of osteoclast function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13: 133-146
63. Ilvesaro J, Tavi P, Tuukkanen J (2001) Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity. *BMC Musculoskelet Disord* 2:10: 1-6

## Role of Gap junctions in bone tissue

Edyta Wróbel<sup>✉</sup>, Joanna Leszczyńska, Jacek Przybylski

Department of Biophysics and Human Physiology, Medical University of Warsaw, 5 Chałubińskiego St., 02-004 Warszawa, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: edyta.wrobel@wum.edu.pl

**Key words:** Gap junctions, connexins, osteoblasts, osteoclasts, differentiation, bone tissue

### ABSTRACT

Gap junctions are transmembrane channels, that connect the membranes of adjacent cells and are involved in the direct signal transmission between the cells. The intercellular communication involving this type of channels provides the proper functioning of tissues and organs. Gap junctions formation and synthesis of connexins is regulated by hormones, growth factors and signaling molecules. Gap junctions, located between osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes, play a key role in the process of bone turnover, and therefore in the modeling and bone tissue regeneration. They also mediate the regulation of proliferation, differentiation and maturation of osteoblasts, as well as formation and activity of osteoclasts. This paper presents the current state of knowledge on the role of intercellular connections via Gap junctions in bone cells, with particular emphasis on the involvement of connexin 43, in the regulation of osteogenesis.

# W poszukiwaniu miejsc wiązania regulatorów transkrypcji – technika immunoprecypitacji chromatyny (ChIP)

Małgorzata Kus-Liśkiewicz<sup>1</sup>

Wiesława Widlak<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centrum Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych, Zakład Biotechnologii, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski, Werynia koło Kolbuszowej

<sup>2</sup>Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Gliwice

<sup>3</sup>Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; tel.: (32) 278 96 69, e-mail: wwidlak@io.gliwice.pl

Artykuł otrzymano 10 lutego 2011 r.

Artykuł zaakceptowano 29 kwietnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** oddziaływania białek z DNA, immunoprecypitacja chromatyny, mikromacierze, maszynowe sekwencjonowanie równoległe

**Wykaz skrótów:** ChIP – immunoprecypitacja chromatyny; ChIP-chip – immunoprecypitacja chromatyny połączona z analizą na mikromacierzach; NChIP – immunoprecypitacja chromatyny nieutralowanej; ChIP-seq – immunoprecypitacja chromatyny połączona z sekwencjonowaniem równoległym; XChIP – immunoprecypitacja chromatyny utraconej

**Podziękowanie:** Praca jest finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N301 002439 oraz współfinansowana z programu stypendialnego w ramach projektu „Podkarpacki Fundusz Stypendialny dla doktorantów”, Europejski Fundusz Społeczny, UE.

## STRESZCZENIE

Oddziaływania białek z DNA mają kluczowe znaczenie dla procesów zachodzących w komórce. Bez nich nie byłoby możliwe upakowanie DNA w jądrze komórkowym, jego replikacja, rekombinacja, naprawa czy transkrypcja. Jedną z metod badania tych oddziaływań jest immunoprecypitacja chromatyny (ChIP, ang. *Chromatin Immunoprecipitation*), umożliwiająca wykrycie z jakim fragmentem DNA wiąże się *in vivo* badane białko (np. czynnik transkrypcyjny). Kolejne etapy ChIP to utrwalenie istniejących oddziaływań białek z DNA (o ile jest to konieczne), fragmentacja DNA, precypitacja powstałych kompleksów z wykorzystaniem swoistego przeciwciała oraz oczyszczenie i analiza otrzymanego DNA. Możliwości analizy uzyskanego DNA decydują o użyteczności metody ChIP. Pojedyncze sekwencje DNA wykrywane są zazwyczaj metodą PCR. Szersze spektrum oddziaływań badanego białka z DNA można wykryć łącząc ChIP z analizą na mikromacierzach (ChIP-chip) lub z sekwencjonowaniem (ChIP-seq). W kombinacji z tymi technikami ChIP staje się coraz powszechniej stosowanym narzędziem umożliwiającym badanie genomu na szeroką skalę.

## ODDZIAŁYWANIA BIAŁEK Z DNA I METODY ICH BADANIA

Całość DNA zawartego w jądrze komórkowym wraz z towarzyszącymi mu białkami i RNA tworzy chromatynę. Chromatyna stanowi nie tylko platformę zorganizowania DNA, ale również jest strukturą dynamiczną, która w zależności od fazy cyklu komórki kondensuje i dekondensuje. Chromatyna odgrywa zasadniczą rolę w procesie transkrypcji, replikacji, naprawy i rekombinacji. To białka obecne w chromatynie umożliwiają wypełnianie jej podstawowych funkcji: upakowanie DNA w małej objętości, by zmieściło się w jądrze, zapakowanie DNA w chromosomach przed podziałem i sprawowanie kontroli nad ekspresją i replikacją DNA. Szczególnie istotny dla fenotypu komórki jest sposób ekspresji materiału genetycznego, zależny przede wszystkim od wiązania z DNA polimeraz, czynników transkrypcyjnych (zarówno podstawowych, jak i bardziej swoistych), czynników remodelujących chromatynę oraz wielu innych białek. Badania oddziaływań białek z DNA mają więc kluczowe znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania komórki.

Istnieje wiele metod badania oddziaływań białek z DNA. Są to techniki umożliwiające badanie bądź pojedynczych sekwencji, bądź przeprowadzone na szerszą skalę; techniki badania oddziaływań zachodzących *in vitro*, w próbówce, bądź *in vivo*, w komórce, a więc bardziej wiarygodne. Głównymi metodami badania oddziaływań *in vitro* są techniki bazujące na uzyskaniu kompleksów białek z DNA oraz ich elektroforezie: test opóźnionej migracji w żelu (EMSA, ang. *Electrophoretical Mobility Shift Assay*, tzw. *band shift*) [1] oraz tzw. *footprinting* [2]. Mimo niewątpliwiej użyteczności tych metod nie dają one pewnej odpowiedzi na pytanie, czy w komórce faktycznie zachodzą oddziaływania obserwowane w próbówce. Metoda *footprinting* ma swój wariant umożliwiający badanie oddziaływań *in vivo* [3]. Oddziaływania białko-DNA zachodzące *in vivo* mogą być również badane poprzez wyszukiwanie miejsc nadwrażliwych na działanie DNazy (ang. *DNase hypersensitive sites*). Są to krótkie rejony w chromatynie, gdzie DNA jest trawione przez DNazę I w pierwszej kolejności. W miejscu nadwrażliwym struktura nukleosomalna nie jest zorganizowana w zwykły sposób, co skutkuje 100-krotnym wzrostem wrażliwości na atak enzymatyczny w porównaniu do reszty chromatyny. Miejsca nadwrażliwe obecne są w każdym aktywnym genie, a bardzo często jest ich kilka. Najczęściej znajdują się jedynie w komórkach, w których dany gen ulega ekspresji. Pojawiają się przed rozpoczęciem transkrypcji jako skutek wiązania czynników transkrypcyjnych [4]. Tradycyjną metodą detekcji miejsc trawionych DNazą jest Southern blot umożliwiający badanie sekwencji w obrębie pojedynczego genu, a więc na niewielką skalę. W ostatnich latach pojawiła się jednak możliwość badania lokalizacji miejsc nadwrażliwych na działanie DNazy na szeroką skalę, nawet w całym genomie równocześnie, z zastosowaniem mikromacierzy (tzw. DNase-chip) [5] lub sekwencjonowania równoległego (DNase-seq) [6]. W obecnej chwili najbardziej użyteczną i stosowaną coraz częściej metodą badania oddziaływań białko-DNA zachodzących *in vivo* jest

immunoprecypitacja chromatyny (ChIP). Dodatkowo, łącząc tą technikę z wieloma innymi stosowanymi w biologii molekularnej można zwiększyć jej użyteczność i wszechstronność [7].

## IMMUNOPRECYPITACJA CHROMATYNY (ChIP)

Od strony metodycznej istnieją dwie odmiany ChIP różniące się przede wszystkim sposobem przygotowania chromatyny. W pierwszej, nazywanej czasami XChIP (ang. *cross-linked ChIP*), do badań wykorzystuje się usieciowaną (utrwaloną) chromatynę fragmentowaną zazwyczaj poprzez sonikację. W drugiej, nazywanej NChIP (ang. *native ChIP*), precypitację wykonuje się na chromatynie nieutrwalonej, czyli natywnej, trawionej nukleazami [7-10]. Istnieją także kombinacje obu wariantów: po delikatnym traktowaniu czynnikami sieciującymi można trawić chromatynę nukleazami. Obie odmiany mają swoje zalety i wady (Tab. 1). Immunoprecypitację chromatyny natywnej wykonuje się wyłącznie badając oddziaływania białek silnie związanych z DNA, takich jak histony i ich modyfikowane izoformy. Większość przeciwciał przeciwko modyfikowanym histonom powstaje z wykorzystaniem syntetycznych peptydów jako antygenów, rozpoznają więc one natywne formy białek. Stąd też wynika większa wydajność odmiany NChIP. Natomiast w czasie utrwalania materiału może dochodzić do maskowania epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała, co wiąże się ze spadkiem efektywności immunoprecypitacji. Oddziaływania białek luźniej związanych z DNA (np. czynników transkrypcyjnych) muszą być jednak badane po utrwaleniu komórek, co odbywa się kosztem wydajności immunoprecypitacji. Najczęściej stosowaną odmianą immunoprecypitacji chromatyny jest XChIP. Kolejne etapy to utrwalenie komórek oraz fragmentacja DNA, immunoprecypitacja za pomocą swoistego przeciwciała, oczyszczenie DNA oraz jego analiza (Ryc. 1). Pierwszym etapem ChIP jest sieciowanie białek z DNA (ang. *cross-linking*). Przy pomocy czynników chemicznych lub fizycznych stabilizowany jest istniejący w danym momencie układ przestrzenny makromolekuł w komórce (a więc zachowane są oddziaływania białko-DNA). Najczęściej stosowanym czynnikiem utrwalającym strukturę jest formaldehyd (formalina), powodujący sieciowanie przede wszystkim białek poprzez łączenie sąsiadujących ze sobą aminowych grup reszty lizyny. Zakłada się, że formaldehyd powoduje również usieciowanie kompleksów RNA-białko i DNA-białko, chociaż natura tych oddziaływań *in vivo* nie jest dokładnie znana. Zaletą formaldehydu jest tworzenie wiązań, które można zlikwidować poprzez inkubację w wyższej tem-

peraturze (65°C przez 4–6 h) [11]. Formaldehyd, mimo swoich zalet ma kilka znaczących wad. Zbyt długa inkubacja komórek w jego obecności prowadzi do denaturacji białek, jak również utrudnia późniejszą fragmentację, z czym wiąże się spadek efektywności immunoprecypitacji. Formaldehyd może również powodować maskowanie epitopów białkowych uniemożliwiając tym samym specyficzne wiązanie przeciwciał. Użycie formaldehydu narzuca niejako wybór sonikacji jako głównej metody fragmentacji chromatyny, a wyklucza możliwość fragmentacji enzymatycznej (choć w przypadku niektórych komórek zalecane jest utrwalanie formaldehydem oraz zastosowanie trawienia enzymatycznego lub obu metod fragmentacji równocześnie).

Alternatywą dla formaldehydu są inne czynniki chemiczne bądź fizyczne. Błękit metylenowy lub oranż akrydyny stosowane są głównie wtedy, gdy planowana jest fragmentacja chromatyny poprzez trawienie nukleazami lub enzymami restrykcyjnymi. Natomiast cisplatyna jest użyteczna w badaniach oddziaływań białek macierzy jądrowej z DNA, ponieważ w pierwszej kolejności sieciuje te właśnie białka z DNA. Wadą cisplatyny jest jednak jej kancerogenność. Jednym z sieciujących czynników fizycznych jest promieniowanie UV. W porównaniu z czynnikami chemicznymi, UV powoduje mniejsze zniekształcenia struktur chemicznych, może jednak uszkadzać DNA i białka (uszkodzeń DNA nie obserwuje się po zastosowaniu formaldehydu). W niektórych przypadkach, w celu efektywniejszego usieciowania białek, stosuje się kombinację dwóch czynników [12]. Bez względu na rodzaj używanego czynnika, warunki sieciowania należy ustalić empirycznie [7].

Po utrwaleniu materiału i lizie komórek kolejnym etapem jest fragmentacja chromatyny, co uzyskuje się za pomocą sonikacji (czyli działania ultradźwiękami) lub trawienia enzymatycznego. Czynniki wpływające na efektywność sonikacji to między innymi stopień usieciowania materiału, objętość próbki, głębokość zanurzenia sondy sonikatora, moc sonikatora, czy czas trwania sonikacji, a nawet kształt probówki. Dla wydajności sonikacji niezwykle istotne jest, by nie dopuścić do tworzenia piany w preparacie, co może być utrudnione ze względu na obecność siarczanu dodecylu sodu (SDS) w buforze. Standardowo sonikowaną próbkę umieszcza się w lodzie oraz stosuje kilka-kilkanaście cykli sonikacji z przerwami na ochłodzenie preparatu. Można również dodawać kulki szklane do preparatu w celu podniesienia efektywności sonikacji. Alternatywą do sonikacji jest fragmentacja DNA za pośred-

Tabela 1. Porównanie immunoprecypitacji chromatyny typu NChIP i XChIP [7,8].

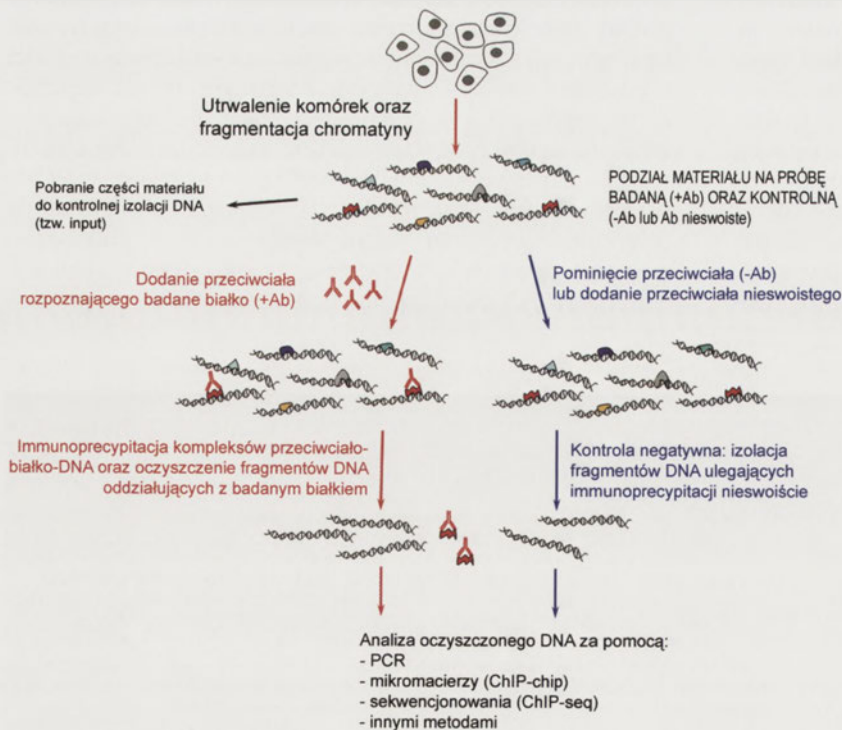
	Technika NChIP	Technika XChIP
Zalety	używana do badań białek silnie związanych z DNA (głównie histonów); przeciwciała wykazują większą specyficzność do białek natywnych, stąd lepsza wydajność metody; nie jest wymagane dodatkowe powielenie uzyskanego końcowo DNA	używana głównie do badania oddziaływań białek luźno związanych z DNA (np. czynników transkrypcyjnych); może być stosowana we wszystkich typach komórek i tkanek (również w tych, z których trudno wyizolować natywną chromatynę); możliwości reorganizacji chromatyny minimalne
Wady	zbyt wysokie stężenie enzymów może prowadzić do nadmiernego cięcia chromatyny; możliwe są reorganizacje nukleosomów w czasie trawienia; nie wszystkie białka po trawieniu enzymatycznym DNA znajdują się we frakcji rozpuszczalnej; technika na ogół nieprzydatna do badania białek niehistonowych	zbyt długa inkubacja z formaldehydem może zakłócić efektywność sonikacji; po stosowaniu formaldehydu nie jest na ogół możliwe trawienie enzymatyczne; po sonikacji uzyskuje się fragmenty DNA o bardzo zróżnicowanej długości; formaldehyd może prowadzić do maskowania epitopów, co obniża wydajność precypitacji; niewielka ilość uzyskanego końcowo DNA wymaga amplifikacji; może dojść do utrwalenia przypadkowych oddziaływań białek z DNA, co prowadzi do uzyskania wyniku fałszywie pozytywnego; formaldehyd jest środkiem kancerogennym i używając go należy zachować ostrożność

nictwem nukleaz. Na ogół nie stosuje się trawienia enzymatycznego po utrwaleniu formaldehydem z powodu zaburzeń efektywności cięcia. Warunki sieciowania, głównie czas i temperatura, ale również typ komórek, na których wykonuje się badania, decydują o efektywności fragmentacji chromatyny, dlatego należy empirycznie dobrać odpowiednie jej warunki. Jakość i wielkość uzyskanych fragmentów chromatyny należy każdorazowo sprawdzić za pomocą elektroforezy agarozowej, po izolacji DNA z niewielkiej części próbki (który jest traktowany jako tzw. input, wykorzystywany dodatkowo jako kontrola pozytywna przy analizach uzyskanego po ChIP materiału za pomocą PCR). Ważne jest uzyskanie fragmentów DNA o odpowiedniej długości. Zalecana jest fragmentacja do cząstek o przeciętnej długości 200–500 pz, przy czym dopuszczalna jest obecność fragmentów od 100 pz do 1000 pz, a nawet do 4000 pz [7]. Długość uzyskanych fragmentów chromatyny rzutuje na końcowy wynik: im krótsze fragmenty, tym bardziej precyzyjnie można określić miejsce wiązania białka do DNA.

Kluczowym etapem ChIP jest precypitacja chromatyny z użyciem swoistego przeciwciała, stąd nazwa immunoprecypitacja. Warunkiem decydującym o efektywności ChIP jest wybór odpowiedniego przeciwciała. Nie zawsze określone, swoiste przeciwciała używane w innych technikach jest jednocześnie odpowiednie do ChIP. Można jednak założyć, że przeciwciała rozpoznające badane białko w preparatach utrwalanych formaliną (immunohistochemicznie) będzie również odpowiednie do XChIP. Możliwe jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (o wysokiej specyficzności) oraz poliklonalnych (rozpoznają kilka epitopów badanego białka, przez co zwiększa się efektywność wiązania) [7,13]. Rekomendowane jest oczyszczenie przeciwciała na zasadzie powinowactwa do peptydu antygenowego, dzięki czemu redukuje się możliwość niespecyficznych oddziaływań w reakcji immunoprecypitacji. Najczęściej stosuje się przeciwciała bezpośrednio rozpoznające badane białko. Można również do badanego białka wpro-

wadzić znacznik (stanowiący epitop niewystępujący naturalnie w komórkach), który będzie rozpoznawany przez swoiste przeciwciała. Ważne jest ustalenie optymalnej ilości używanego przeciwciała (co najlepiej zrobić poprzez przeprowadzenie reakcji ChIP na małą skalę) w przeliczeniu na wyjściową ilość komórek, lub lepiej – na ilość chromatyny w pojedynczej reakcji ChIP. Najczęściej wykorzystywanymi w technice ChIP przeciwciałami są przeciwciała poliklonalne, a immunosorbentem używanym do wyizolowania powstałych kompleksów przeciwciało-białko-DNA, agarozą opłaszczoną białkiem G lub A (białka bakteryjne o dużym powinowactwie do immunoglobulin). Substytutem agarozy-A/G wykorzystywanym w wielu laboratoriach są kulki magnetyczne pokryte białkiem A, które inkubuje się z kompleksami przeciwciało-białko-DNA i izoluje za pomocą magnesów [7,14]. Inna strategia immunoprecypitacji zakłada związanie przeciwciała z kulkami magnetycznymi lub bezpośrednio z agarozą w pierwszej kolejności, a następnie inkubację z pofragmentowaną chromatyną [15]. Po płukaniu immunoprecypitatu likwiduje się wiązania utworzone przez formaldehyd, usuwa białka i oczyszcza DNA w celu poddania dalszej analizie [16]. Wydajność ChIP jest zazwyczaj niska. Przykładowo z miliona komórek można uzyskać około 20 µg chromatyny, a po immunoprecypitacji jedynie około 10 ng DNA. Dlatego też na ogół wymagana jest dodatkowa amplifikacja uzyskanego DNA.

Wiarygodność ChIP jest uzależniona od wielu czynników. Sieciowanie z użyciem formaldehydu może być nie zawsze kompletne i powtarzalne w kolejnych doświadczeniach. Wyprecypitowana ilość antygenów może być więc różna w kolejnych powtórzeniach, a dodatkowo etap przepłukiwania immunosorbenta narażony jest na wymycie znacznej części któregoś czynnika, co wpływa na wynik końcowy [7]. Czas sieciowania, warunki sonikacji i ilość stosowanego przeciwciała należy ustalić empirycznie w zależności od typu badanych komórek. Równoległe z immunoprecypitacją przeciwciałem

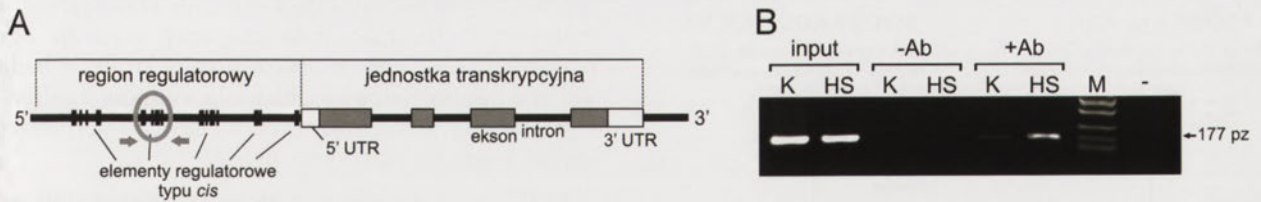


Rycina 1. Ogólny schemat klasycznej immunoprecypitacji chromatyny (ChIP).

swoistym dla badanego białka należy na identycznym materiale wykonać wszystkie etapy procedury pomijając dodanie przeciwciała (-Ab) lub z zastosowaniem przeciwciała nieswoistego (np. całkowitej puli IgG z surowicy lub z przeciwciałem podobnej klasy jak przeciwciała swoiste, lecz rozpoznającym białko nie wiążące się z DNA lub nie występujące w komórce) (Ryc. 1). Próba taka stanowi kontrolę negatywną, izolowane są fragmenty DNA ulegające immunoprecypitacji nieswoiście. O wiązaniu białka do DNA w obrębie konkretnej sekwencji wnioskować można jedynie porównując wynik uzyskany po immunoprecypitacji przeciwciałem swoistym z wynikiem uzyskanym w kontroli negatywnej.

## SPOSOBY ANALIZY DNA OTRZYMANEGO PO ChIP

O przydatności ChIP decyduje sposób analizy otrzymanego DNA. Analiza ta ma na celu identyfikację wyizolowanych fragmentów DNA, a więc identyfikację miejsc wiązania badanego białka. Do detekcji pojedynczych sekwencji może być zastosowany PCR lub



**Rycina 2.** Detekcja pojedynczych sekwencji uzyskanych po ChIP za pomocą PCR. **A** – ogólny schemat genu: szarymi strzałkami blokowymi zaznaczono położenie starterów do detekcji wiązania czynnika transkrypcyjnego w obrębie elementu regulatorowego (zaznaczonego szarym owalem). **B** – przykład analizy metodą PCR DNA otrzymanego po ChIP obrazujący wiązanie czynnika transkrypcyjnego HSF1 (ang. *heat shock transcription factor 1*) do promotora genu *Hsph1* w spermatocytach myszy. Input – DNA izolowany bezpośrednio po sonikacji; K – wiązanie w temperaturze fizjologicznej; HS – wiązanie w warunkach szoku termicznego: 5–20 min w temperaturze 43°C; +Ab – immunoprecypitacja przeciwciałem anti-HSF1; -Ab – kontrola negatywna z pominięciem przeciwciała; M – marker wielkości DNA; minus – kontrola negatywna PCR (bez matrycy).

ilościowy PCR oraz techniki hybrydyzacyjne typu slot-blot. Do identyfikacji większej ilości sekwencji konieczne jest zastosowanie mikromacierzy (ChIP-chip), klonowanie uzyskanego DNA połączone z sekwencjonowaniem (ang. *ChIP cloning*) lub bezpośrednie sekwencjonowanie (ChIP-seq). Niezależnie od zastosowanej metody detekcji, ChIP należy traktować raczej jako jakościową, a nie ilościową metodę badania oddziaływań białek z DNA.

#### DETEKCYA POJEDYNCZYCH SEKWENCJI

Najprostszym i najczęściej stosowanym sposobem analizy DNA otrzymanego w wyniku immunoprecypitacji jest analiza metodą PCR (również ilościowy PCR). Można ją jednak zastosować jedynie wtedy, gdy do sprawdzenia jest konkretna sekwencja. Badając wiązanie czynnika transkrypcyjnego w obrębie promotora konkretnego genu należy zlokalizować miejsce startu transkrypcji oraz promotor, wyszukać elementy regulatorowe typu *cis* oraz zaprojektować swoiste startery obejmujące sekwencję o największej zgodności ze znaną sekwencją rozpoznawaną przez badane białko (Ryc. 2). Z uwagi na to, że immunoprecypitację wykonuje się na chromatynie poszatkowanej na mniejsze kawałki, amplifikowany w PCR fragment nie powinien być zbyt długi. Detekcja znanych sekwencji za pomocą PCR jest też niezbędnym, wstępnym etapem analiz na szerszą skalę. Wykonując odpowiednie kontrole pozytywne i negatywne można w prosty sposób sprawdzić skuteczność ChIP przed przystąpieniem do bardziej kosztownych i pracochłonnych etapów analizy.

Do detekcji pojedynczych sekwencji może być również stosowana hybrydyzacja na membranach nylonowych, przy czym DNA uzyskany po ChIP może być związany z membraną i hybrydowany ze znakowaną sondą o znanej sekwencji, lub może służyć jako znakowana sonda do hybrydyzacji z DNA o znanej sekwencji związanym z membraną.

#### ANALIZA PO ChIP ZA POMOCĄ MIKROMACIERZY

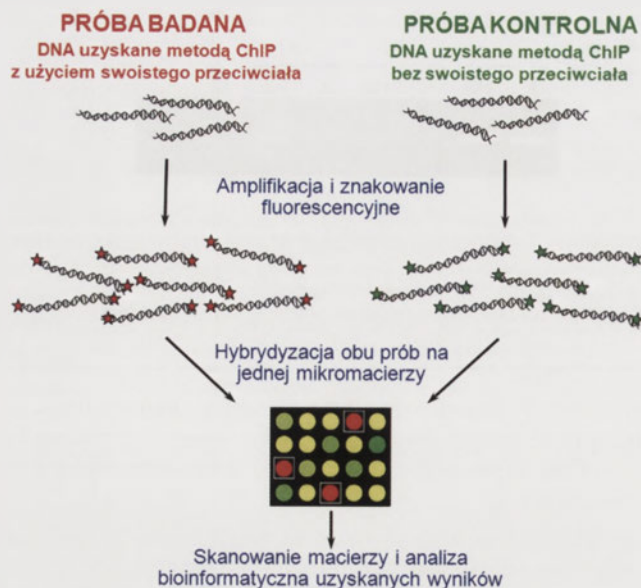
Do globalnej analizy miejsc oddziaływania badanego białka z DNA można zastosować technikę ChIP-chip, czyli połączenie immunoprecypitacji chromatyny z techniką analizy na mikromacierzach (ang. *chromatin immunoprecipitation combined with chip array*). ChIP-chip umożliwia określenie w pojedynczym doświadczeniu zmian w wiązaniu badanego białka (np. czynnika transkrypcyjnego) do DNA w odpowiedzi na czynniki środowiskowe w całym genomie rów-

nocześnie. W zasadzie jedynym ograniczeniem techniki jest dostępność na rynku macierzy dla badanego organizmu lub możliwość zaprojektowania i wyprodukowania własnej mikromacierzy.

Ogólnie mikromacierz (ang. *chip, microarray*) definiuje się jako zminiaturyzowane narzędzie służące do globalnej analizy oddziaływań czynników biologicznych bądź chemicznych. Odpowiednie sondy przytwierdzone są w uporządkowany, ściśle zdefiniowany sposób, w wierszach i kolumnach, do płytek o powierzchni kilku centymetrów kwadratowych. Na gotową mikromacierz nanoszony jest badany materiał, najczęściej wyznakowany, np. fluorescencyjnie. Wzajemne oddziaływania sondy z badanym materiałem ocenia się wówczas na podstawie obecności fluorescencji (po usunięciu niezwiązanego materiału).

W mikromacierzach opartych na hybrydyzacji kwasów nukleinowych sondami przytwierdzonymi do płytki są fragmenty DNA o znanej sekwencji (na ogół oligonukleotydy) [17]. Na pojedynczej mikromacierzy mogą być analizowane równocześnie dwie próbki, badana i kontrolna, wyznakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (Ryc. 3). Wyraźny wzrost sygnału fluorescencyjnego w jednej z prób oznacza obecność znacznie większej ilości określonego fragmentu DNA w porównaniu do próby stanowiącej kontrolę, co należy interpretować jako wiązanie badanego białka do chromatyny (konkretnego jej fragmentu).

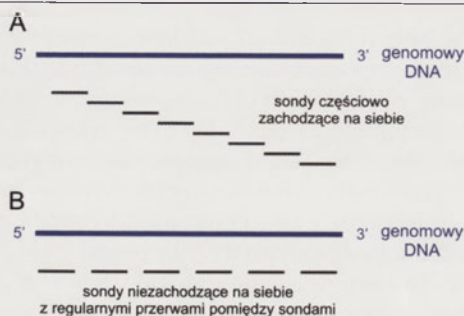
ChIP-chip wykonuje się również na mikromacierzach przeznaczonych do hybrydyzacji z jedną próbką (np. mikromacierze firmy Affymetrix), w których każdą badaną próbkę znakuje się identycznym barwnikiem i hybryduje z inną macierzą. Wykorzystuje się tzw. mikromacierze dachówkowe (ang. *tiling arrays*), w których sondy znajdujące się na płytce komplementarne są do określonych fragmentów genomu, a nawet całych chromosomów, pokrywając genom w sposób ciągły (Ryc. 4a) lub z niewielkimi przerwami (Ryc. 4b). Liczba sond na płytce może wynosić od 10 tysięcy do 6 milionów. Oferowane przez Affymetrix mikromacierze promotorowe zawierają na jednej płytce ponad 4,6 miliona sond komplementarnych do ponad 25,5–28 tysięcy rejonów promotorowych genów (w zależności od gatunku). Każdy rejon promotorowy pokryty jest na przestrzeni około 6–7,5 kb powyżej i 2,5 kb poniżej miejsca startu transkrypcji niezachodzącymi na siebie sondami o długości 25 nt każda rozmieszczonymi z przerwami 10 nt. Natomiast pokrycie



**Rycina 3.** Schemat procedury ChIP-chip z zastosowaniem znakowania dwukolorowego przed hybrydyzacją na jednej mikromacierzy. Przedstawiono niewielki fragment mikromacierzy zaznaczając białymi kwadratami pozycje sond, w których obserwuje się przewagę sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z próby badanej (wyznakowanej na czerwono). Kolor żółty świadczy o równomiernym związaniu obu barwników, zielony – o przewadze próby kontrolnej.

całego genomu (ang. *genome tiling arrays*) wymagało zastosowania około 45 milionów sond oligonukleotydowych i umieszczenia ich na 7 płytkach (ponad 6,5 miliona sond na jednej płytce). Do ChIP-chip wykorzystane mogą być również macierze z sondami zachodzącymi na siebie (np. ENCODE Arrays firmy Affymetrix) zaprojektowane głównie do badań mających na celu stworzenie encyklopedii elementów funkcjonalnych ludzkiego genomu (projekt ENCODE: [www.nhgri.nih.gov/10005107](http://www.nhgri.nih.gov/10005107)).

Niezależnie od typu zastosowanej mikromacierzy ilość DNA uzyskanego po ChIP jest zwykle zbyt mała, by wystarczyła do analizy. W celu zwiększenia ilości DNA można zastosować łączenie materiału z kilku doświadczeń ChIP, co jest strategią najprostszą lecz niekoniecznie najtańszą [18]. Uzyskane DNA można również poddać amplifikacji za pomocą PCR wykorzystując zdegenerowane, przypadkowe startery (amplifikacja liniowa) [19]. W kolejnym etapie materiał jest fragmentowany do wielkości około 60 pz, znakowany, denaturowany i hybrydowany na mikromacierzy [20,21]. Po skanowaniu mikromacierzy oraz normalizacji danych rozpoczyna się żmudny proces analizy bioinforma-



**Rycina 4.** Typy mikromacierzy dachówkowych (ang. *tiling arrays*) A – mikromacierze pokrywające cały genom sondami częściowo zachodzącymi na siebie (lub niezachodzącymi), B – mikromacierze pokrywające prawie cały genom sondami niezachodzącymi na siebie z regularnymi przerwami pomiędzy sondami.

tycznej. W porównaniu do klasycznie stosowanych metod badawczych technika mikromacierzy generuje ogromną liczbę danych. Istotnym etapem całej strategii badawczej jest więc dobór odpowiednich algorytmów analizy bioinformatycznej umożliwiających właściwą interpretację biologiczną uzyskanych wyników.

ChIP-chip ma swoje ograniczenia. Stosując mikromacierze promotorowe nie uzyskuje się kompletnych danych o wiązaniu badanego białka do DNA, jako że nie wszystkie miejsca wiązania zlokalizowane są w otoczeniu miejsca inicjacji transkrypcji. Informację kompletną można uzyskać wykorzystując mikromacierze genomowe, co jednak znacznie zwiększa koszty doświadczenia (jeden genom to kilka płytek) i komplikuje analizę bioinformatyczną. Wciąż nie ma ustalonych standardów takich analiz, a bazy danych służące przypisaniu konkretnej pozycji na chromosomie do właściwego genu są niekompletne.

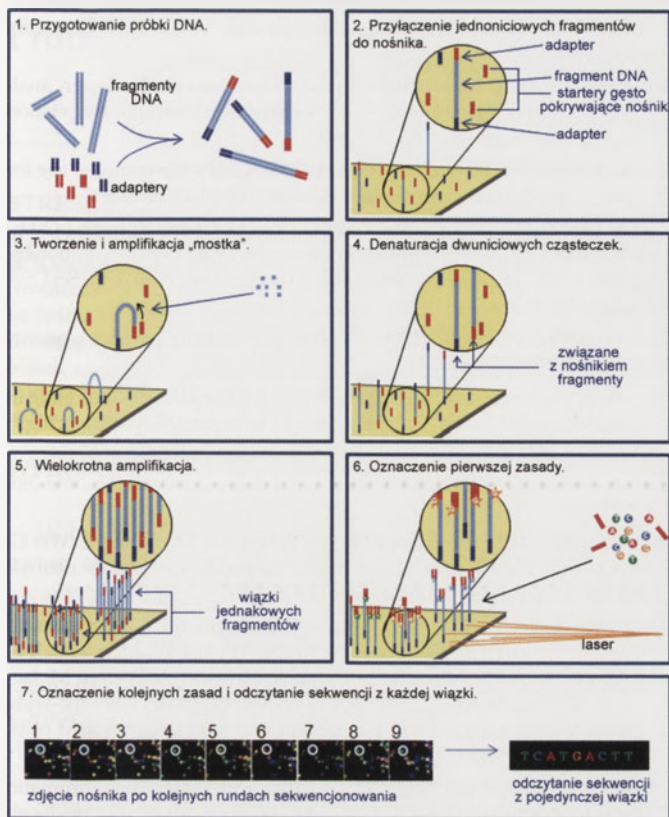
#### ANALIZA PO ChIP ZA POMOCĄ SEKWENCJONOWANIA

Sekwencjonowanie DNA uzyskanego po immunoprecypitacji chromatyny pozwala zidentyfikować wszystkie sekwencje, z którymi oddziałuje badane białko, również takie, których brak na mikromacierzach promotorowych. Początkowo taki sposób analizy wymagał klonowania uzyskanego DNA w wektorze plazmidowym, a następnie odrębnego sekwencjonowania insertu w każdym klonie [22]. Obecnie procedura jest znacznie uproszczona dzięki rozwojowi tzw. maszynowego sekwencjonowania równoległego (ang. *massively parallel sequencing*) [23] (na rycinie 5 przedstawiono schemat takiego sekwencjonowania w systemie Solexa/Illumina). W porównaniu z sekwencjonowaniem konwencjonalnym metodą Sangera [24], sekwencjonowanie równoległe jest znacznie szybsze: zsekwencjonowanie 25 milionów zasad (co odpowiada wielkości genomu niektórych grzybów) można wykonać w jednej maszynie w ciągu 4h, a etap przygotowania próbki zajmuje zaledwie 3 dni [25]. Sekwencjonując metodą tradycyjną na przygotowanie biblioteki genomowej trzeba poświęcić ponad dwa tygodnie, a jedna maszyna jest w stanie zsekwencjonować zaledwie 1 milion zasad w ciągu 24 godzin.

Sekwencjonowanie równoległe (np. na sekwencjonatorach Roche/454, SOLiD Applied Biosystems lub Illumina/Solexa) jest coraz tańsze, tak więc ChIP-chip jest coraz częściej zastępowany przez ChIP-seq [26,27] (porównanie obu metod przedstawiono w tabeli 2). Wykonanie ChIP-seq wymaga mniejszego nakładu pracy niż ChIP-chip. W przeciwieństwie do ChIP-chip, gdzie uzyskuje się odczyt z każdej sondy obecnej na płytce mikromacierzowej i konieczne jest określenie poziomu tła, w ChIP-seq nie ma problemu z normalizacją danych. Natomiast niezbędne są dodatkowe działania mające na celu dopasowanie zsekwencjonowanych fragmentów DNA do odpowiadających im regionów w genomie. Zwiększając liczbę odczytów można w sposób bardzo precyzyjny zmapować miejsca wiązania badanego białka do DNA.

#### UWAGI KOŃCOWE

ChIP jest coraz popularniejszym narzędziem wykorzystywanym do badania struktury chromatyny i zmian towa-



Rycina 5. Uproszczony schemat maszynowego sekwencjonowania równoległego w systemie Illumina/Solexa (na podstawie [32]). 1 – Przyłączenie specjalnych adapterów do uzyskanych, oczyszczonych fragmentów DNA z wypełnionymi końcami i ich amplifikacja za pomocą PCR (niewielka ilość cykli); 2 – Denaturacja i przyłączenie jednego z końców jednoniciowych fragmentów DNA do powierzchni nośnika (płytki lub kulki); 3 – Spontaniczne tworzenie „mostków” z komplementarnym adapterem obecnym na powierzchni nośnika oraz amplifikacja; 4 – Denaturacja „mostka”: uzyskanie jednoniciowych fragmentów; 5 – Wielokrotne powtarzanie tworzenia „mostków” i amplifikacja *in situ* prowadzące do uzyskania wiązki jednakowych fragmentów (w ilości do 1000 kopii); 6 – Pierwsza runda sekwencjonowania (dodanie polimerazy, startera i znakowanych różnymi fluoroforami nukleotydów, modyfikowanych w celu zablokowania syntezy, co skutkuje dodaniem tylko jednego nukleotydu do każdego fragmentu DNA); 7 – Odczyt każdego kolejnego nukleotydu za pomocą lasera (zdjęcie całego nośnika w mikroskopie fluorescencyjnym po każdym kolejnym cyklu syntezy). Po każdym odczycie oligonukleotyd jest odblokowany i rozpoczyna się kolejna runda syntezy. Po zakończeniu procesu sekwencję DNA w każdej wiązce ustala się analizując kolejne obrazy z mikroskopu.

rzyszających procesom zachodzącym w chromatynie, w tym transkrypcji. Metoda łatwo może być dostosowana do badań w różnych typach komórek, czy różnych organizmach, a dostęp do komercyjnych przeciwciał stwarza możliwość badania *in vivo* oddziaływań białko-DNA na szeroka ska-

łę. Technika ma oczywiście pewne ograniczenia, o których wspomniano powyżej. Dodatkowo nie może być wykorzystana do detekcji wiązania kilku białek w obrębie jednej sekwencji [10]. Metoda ta jest jednak wciąż udoskonalana i tworzone są różne jej odmiany. Zwykle wykonanie immunoprecypitacji chromatyny zajmuje 4 do 5 dni i potrzebne jest co najmniej  $10^6$ – $10^7$  komórek. Obecnie możliwe jest wykonanie ChIP nawet ze 100–1000 komórek w ciągu jednego dnia (ang. *micro ChIP*, *fast ChIP*) [28,29]. Możliwe jest także badanie oddziaływań RNA z białkami (RNA-IP, RIP) [30].

Warto wspomnieć, że istnieje metoda alternatywna dla ChIP, tzw. DamID (ang. *DNA adenine methyltransferase identification*), umożliwiająca detekcję miejsca wiązania białka do DNA, gdy nie dysponuje się swoistym przeciwciałem. Wymaga ona jednak wymuszenia syntezy w komórce badanego białka jako białka fuzyjnego z metylazą Dam (bakteryjna metylotransferaza DNA). Po związaniu białka fuzyjnego z DNA metylaza Dam przyłącza grupę metylową do adeniny w znajdujących się w pobliżu sekwencjach GATC [31]. Zastosowanie enzymu restrykcyjnego trawiącego wyłącznie zmetylowane sekwencje GATC umożliwia detekcję miejsc wiązania białka fuzyjnego. Metylacja adeniny pozostaje w sekwencji nawet po zwolnieniu białka z DNA. DamID wykrywa więc wszystkie miejsca wiązania białka, zarówno aktualne, jak i te z przeszłości.

Kluczem do zrozumienia sieci oddziaływań w komórce jest przeanalizowanie możliwie jak największej ilości danych. Połączenie informacji o miejscach wiązania białek do DNA oraz o modyfikacjach histonów (uzyskanych za pomocą ChIP) z informacją o poziomie ekspresji genów (uzyskanej za pomocą globalnej analizy ekspresji genów na mikromacierzach) daje możliwość odtworzenia sieci regulatorowych istniejących w komórce i w połączeniu z innymi analizami eksperymentalnymi (np. DNase-chip lub DNase-seq) i bioinformatycznymi (np. wyszukiwaniem elementów regulatorowych *cis*) jest podstawą rozwoju tzw. biologii systemów. Wszystkie powyższe, prowadzone na szeroką skalę analizy generują ogromną ilość danych. Zrozumienie zasad funkcjonowania genomu nie będzie więc możliwe bez ścisłej współpracy biologów molekularnych z bioinformatykami.

## PIŚMIENICTWO

- Jiang D, Jarrett HW, Haskins WE (2009) Methods for proteomic analysis of transcription factors. *J Chromatogr A* 1216: 6881-6889
- Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, Fox KR (2007) Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods* 42: 128-140

Tabela 2. Porównanie ChIP-chip z ChIP-seq.

	ChIP-seq	ChIP-chip
Ilość początkowa materiału	niewielka: już od 10 ng	4 μg
Elastyczność	szeroka: analiza wszystkich organizmów o znanym genomie	ograniczona: uzależniona od oferowanych na rynku typów macierzy lub możliwości zaprojektowania i wyprodukowania własnej
Rozdzielczość	± 50 pz	± 500–1000 pz
Czułość	możliwość kontrolowania: zwiększając liczbę odczytów można zwiększyć czułość	niska: oparta na hybrydyzacji, determinowana wielkością uzyskanych fragmentów DNA
Hybrydyzacja krzyżowa	brak: każdy fragment DNA jest osobno sekwencjonowany	duża dla fragmentów o zbliżonej sekwencji
Analiza bioinformatyczna danych	nie wymaga normalizacji	wymaga normalizacji

3. Dimitrova D, Giacca M, Falaschi A (1994) A modified protocol for *in vivo* footprinting by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 22: 532-533
4. Gross DS, Garrard WT (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 57: 159-197
5. Crawford GE, Davis S, Scacheri PC, Renaud G, Halawi MJ, Erdos MR, Green R, Meltzer PS, Wolfsberg TG, Collins FS (2006) DNase-chip: a high-resolution method to identify DNase I hypersensitive sites using tiled microarrays. *Nat Methods* 3: 503-509
6. Crawford GE, Holt IE, Whittle J, Webb BD, Tai D, Davis S, Margulies EH, Chen Y, Bernat JA, Ginsburg D, Zhou D, Luo S, Vasicek TJ, Daly MJ, Wolfsberg TG, Collins FS (2006) Genome-wide mapping of DNase hypersensitive sites using massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res* 16: 123-131
7. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R (2004) Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 37: 961-969
8. O'Neill LP, Turner BM (2003) Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods* 31: 76-82
9. Ferreira R, Naguibneva I, Mathieu M, Ait-Si-Ali S, Robin P, Pritchard LL, Harel-Bellan A (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2: 794-799
10. Johnson KD, Bresnick EH (2002) Dissecting long-range transcriptional mechanisms by chromatin immunoprecipitation. *Methods* 26: 27-36
11. Dedon PC, Soultis JA, Allis CD, Gorovsky MA (1991) A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal Biochem* 197: 83-90
12. Kurdistani SK, Grunstein M (2003) *In vivo* protein-protein and protein-DNA crosslinking for genomewide binding microarray. *Methods* 31: 90-95
13. Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M (2007) Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3: 11
14. Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR (2003) Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31: 67-75
15. <http://myers.hudsonalpha.org/documents/Myers%20Lab%20ChIP-seq%20Protocol%20v041610.pdf>
16. Kuo MH, Allis CD (1999) *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19: 425-433
17. Zmienko A HL, Góralski M, Figlerowicz M (2008) Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej. *Biotechnologia* 4: 39-53
18. O'Geen H, Nicolet CM, Blahnik K, Green R, Farnham PJ (2006) Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques* 41: 577-580
19. Liu CL, Schreiber SL, Bernstein BE (2003) Development and validation of a T7 based linear amplification for genomic DNA. *BMC Genomics* 4: 19
20. Buck MJ, Lieb JD (2004) ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83: 349-360
21. Wu J, Smith LT, Plass C, Huang TH (2006) ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. *Cancer Res* 66 14: 6899-902
22. Lee HR, Zhang W, Langdon T, Jin W, Yan H, Cheng Z, Jiang J (2005) Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11793-11798
23. Rogers YH, Venter JC (2005) Genomics: massively parallel sequencing. *Nature* 437: 326-327
24. Sanger F, Coulson AR, Barrell BG, Smith AJ, Roe BA (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* 143: 161-178
25. Mardis ER (2006) Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol* 7: 112
26. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837
27. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: 553-560
28. Dahl JA, Collas P (2007) Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25: 1037-1046
29. Dahl JA, Collas P (2009) MicroChIP: chromatin immunoprecipitation for small cell numbers. *Methods Mol Biol* 567: 59-74
30. Iyer VR (2004) Exploring the post-transcriptional RNA world with DNA microarrays. *Trends Biotechnol* 22: 498-500
31. van Steensel B, Henikoff S (2000) Identification of *in vivo* DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nat Biotechnol* 18: 424-428
32. Hoffman BG, Jones SJ (2009) Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *J Endocrinol* 201: 1-13

## Finding targets of transcriptional regulators – chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

Małgorzata Kus-Liśkiewicz<sup>1</sup>, Wiesława Widlak<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Department, Branch Campus of the Faculty of Biotechnology, Rzeszów University, Kolbuszowa 36-100, 26 Sokolowska St., Poland

<sup>2</sup>Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, 15 Wybrzeże Armii Krajowej, 44-101 Gliwice, Poland

✉ e-mail: [wwidlak@io.gliwice.pl](mailto:wwidlak@io.gliwice.pl)

**Key words:** protein-DNA interaction, chromatin immunoprecipitation, microarray, massively parallel sequencing

### ABSTRACT

The protein-DNA interactions play a crucial role in many cellular processes such as DNA replication, recombination, repair, or gene transcription. Here we describe a chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique, a tool for identifying DNA regions, which are *in vivo* associated with protein of interest. The main steps of ChIP are: fixation, chromatin fragmentation, immunoprecipitation with a specific antibody, and analysis of the immunoprecipitated DNA. Different analytical tools combined with ChIP (ChIP-chip, ChIP-seq) enable researchers to map protein binding in a truly genome-wide manner with high resolution.



## STRESZCZENIE

Każdemu genowi przypisany jest indywidualny program ekspresji. Duża część informacji, która uściśla ten program, pochodzi z rdzeniowej sekwencji promotora. W niniejszym opracowaniu opisano, jak różne elementy regulatorowe promotorów organizowane są w funkcjonalne jednostki. Przedstawiono podstawowe czynniki transkrypcyjne i receptory jądrowe współdziałające z rdzeniowymi elementami regulatorowymi. Omówiono potranslacyjne modyfikacje białek regulatorowych i ich wpływ na powstawanie i funkcję polimerazowych kompleksów inicjacyjnych. Omówiono, niektóre metody doświadczalne stosowane dla wskazania funkcjonalnych oddziaływań pomiędzy elementami regulatorowymi i ich partnerami białkowymi.

## WPROWADZENIE

W badaniach nad regulacją transkrypcji dokonano ogromnego postępu. Pomimo to zakres wiedzy w niektórych jej aspektach jest zaskakująco niewielki, jeśli zważymy, że dopiero ostatnio zaczęto identyfikować czynniki sterujące rozmieszczeniem nukleosomów na DNA [1], a więc decydujące o spakowaniu informacji tak, aby dostęp do niej był później ułatwiony. Nie wiemy na skutek działania jakiego mechanizmu rozmieszczenie nukleosomów jest odmienne w wielu typach komórek chociaż rozumiemy, że priorytety dostępu do pakietów informacji, a więc ekspresji genów, związane ze specjalizacją komórek muszą być różne.

Sekwencje regulatorowe DNA i czynniki transkrypcyjne decydujące o ekspresji genów tworzą olbrzymią sieć informatyczną. W tym względzie szczególna rola przypada sekwencjom położonym w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc startu transkrypcji. Zadziwiają one złożonością budowy, a ich związki z nadrzędnymi czynnikami kontroli aktywności genów znajdują się w centrum zainteresowań wielu laboratoriów. W niniejszym opracowaniu staraliśmy się przedstawić ten wycinek wiedzy uważając, że jest ciekawy, a być może stanie się inspirujący dla tych, którzy na podstawie tysięcy opublikowanych szczegółowych informacji chcieliby wkroczyć na drogę zmierzającą do wyciągania wniosków natury ogólnej, dotyczących mechanizmów kontroli ekspresji genów, na różnych szczeblach rozwoju i organizacji komórek.

## PROMOTORY GENÓW

Istnieją dwie główne strategie inicjacji transkrypcji, inicjacja z jednego miejsca startu (ang. *focused transcription*), obejmującego jeden lub kilka nukleotydów oraz inicjacja z kilku tzw. słabych miejsc transkrypcji, położonych w regionie obejmującym od około 50 do 100 pz (ang. *dispersed transcription*). Inicjacja z jednego miejsca startu dominuje w ekspresji genów prostszych organizmów, podczas gdy inicjację z kilku słabych miejsc transkrypcji obserwuje się u około 70% genów kręgowców. Geny konstytutywnie wyrażane mają zazwyczaj promotory rozproszone (ang. *dispersed promoters*), zlokalizowane przeważnie na wyspach CpG, a geny niekonstytutywnie wyrażane charakteryzuje inicjacja z jednego miejsca transkrypcji. Niektóre geny posiadają promotory o właściwościach mieszanych, zawierających kilka miejsc inicjacji transkrypcji, aczkolwiek z jednym silnym miejscem [2]. Większość badań z udziałem polimerazy RNA II (RNAP II) dotyczy transkrypcji z jednego miejsca, pomimo że promotory te tzw. *focused promoters* stanowią mniejszość promotorów kręgowców. Dzieje się tak z powodu dużego znaczenia biologicznego genów pozostających pod kontrolą wspomnianego typu promotorów.


## RDZENIOWE ELEMENTY REGULATOROWE

Sekwencja DNA niezbędna dla wiernej transkrypcji obejmuje zazwyczaj kilkadziesiąt par zasad (pz) w sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji (tsp). Nosi ona nazwę promotora rdzeniowego (ang. *core promoter*). U promotorów eukariotycz-

**Anna Niewiadomska-Cimicka**

**Marian Kochman** 

Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Wydziałowy Zakład Biochemii, Wrocław

 Politechnika Wroclawska, Wydziałowy Zakład Biochemii, ul. Gdańska 7/9, 50-344 Wrocław; tel.: (71) 320 63 32; e-mail: marian.kochman@pwr.wroc.pl

Artykuł otrzymano 29 kwietnia 2011 r.  
Artykuł zaakceptowano 11 sierpnia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** czynniki transkrypcyjne, TAF, elementy regulatorowe, receptory jądrowe, regulacja transkrypcji

**Wykaz skrótów:** BRE<sup>a</sup> – element w kierunku 5' w odniesieniu do kasety TATA; BRE<sup>d</sup> – element w kierunku 3' w odniesieniu do kasety TATA; CTD – domena C-końcowa; DCE, DPE, MTE, XCPE1 – elementy promotorowe w kierunku 3' od miejsca startu transkrypcji; EcR – receptor 20-OH ekdyzonu; GTF – podstawowy czynnik transkrypcyjny; NR – receptor jądrowy; PIC – transkrypcyjny kompleks preinicjacyjny; RE – element regulatorowy; RNAP – polimeraza RNA; TAF – czynniki towarzyszące TBP, wchodzące w skład kompleksu TFIID; TBP – białko wiążące kasetę TATA; TF – czynnik transkrypcyjny; tsp – miejsce startu transkrypcji

**Podziękowania:** Autorzy dziękują dr. inż. Markowi Orłowskiemu z PWR za stymulującą dyskusję podczas pisania tego artykułu. Praca była w części finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr umowy 3018/B/P01/2009/37.

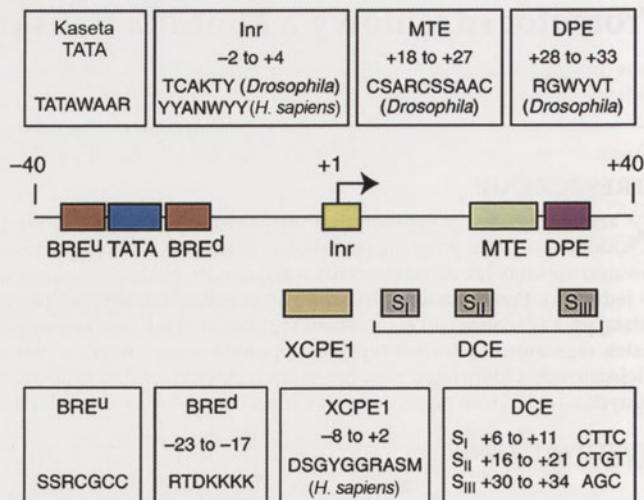
nych, w których transkrypcja zachodzi z jednego miejsca, zidentyfikowano dziewięć rdzeniowych elementów funkcjonalnych: BRE<sup>u</sup> [3], kasetę TATA [4], BRE<sup>d</sup> [5], XCPE1 [6], Inr [7-10], motyw TCT [11], MTE [12], DPE [13], DCE [14]. Są one niezbędne do powstania kompleksu preinicjacyjnego (Ryc. 1).

W promotorach rozproszonych zazwyczaj nie ma BRE, kasety TATA, DPE i MTE [15]. Należy nadmienić, że żaden z powyższych elementów nie jest uniwersalny i może występować jedynie w pewnej grupie promotorów. Co więcej, obecność w rdzeniowym obszarze promotora sekwencji odpowiadającej dowolnemu z wymienionych elementów nie gwarantuje jeszcze jego funkcji, ponieważ bardzo ważną rolę pełni przestrzenne rozmieszczenie elementów regulatorowych. Na podkreślenie zasługuje również to, że istnieją promotory pozbawione wszystkich wyżej wymienionych elementów [16].

**Kaseta TATA** (ang. *TATA box*) jest pierwszym opisanym eukariotycznym elementem regulatorowym promotora rdzeniowego [4], położonym około 25-30 pz po stronie 5' od miejsca startu transkrypcji. Element jest ewolucyjnie zachowany od promotorów bakteryjnych po promotory ludzkie. Sekwencja zgodna elementu zarówno dla promotorów ludzkich jak i owadów jest następująca: TATAWAAR [18]. Objaśnienie zapisu sekwencji podano na rycinie 1. Początkowo przypuszczano, że kasetę TATA jest sekwencją rozpoznawaną przez podstawowy czynnik transkrypcyjny TFIID [19]. Dalsze badania wykazały, że TFIID w komórkach człowieka i owadów jest multikompleksem białkowym [20], w skład którego wchodzi białko wiążące kasetę TATA (ang. *TATA box binding protein*, TBP) [21].

**Element Inr** (ang. *initiator*), funkcjonalnie podobny do kasety TATA [10], jest najczęściej pojawiającym się motywem strukturalnym w promotorach rdzeniowych [22]. Jest to motyw bogaty w reszty pirymidynowe o sekwencji najwyższej zgodności: YY(+1)ANWYY (promotory ludzkie) oraz TCAKTY (promotory owadzie), który zazwyczaj otacza tsp. Metody obliczeniowe sugerują dla ssaczego Inr konsensus YR, gdzie R (A/G) odpowiada nukleotydom +1 (tsp). Tą olbrzymią rozbieżność między specyficznością sekwencji Inr u owadów i ssaków tłumaczy się ewolucyjnie wykształconym, szerszym zakresem rozpoznawczym tsp przez czynniki transkrypcyjne ssaków [23]. Element Inr kieruje inicjacją transkrypcji samodzielnie lub w połączeniu z kasetą TATA, albo innymi elementami rdzeniowymi [18]. Inr wykazuje na przykład synergiczne oddziaływanie z kasetą TATA, gdy oba elementy dzieli odległość około 25-30 pz. W przypadku odległości większej niż 30 pz kasetę TATA i Inr działają niezależnie. Natomiast po zmniejszeniu odległości między elementami do 15-20 pz zjawisko synergizmu było zachowane. Niemniej jednak w promotorach zależnych od kasety TATA i Inr, Inr nie wpływa na położenie miejsca startu transkrypcji, które w tym przypadku jest determinowane umiejscowieniem kasety TATA [24]. Element Inr jest rozpoznawany przez białka TAF1 i TAF2 kompleksu TFIID [25]. Wykazano, że kompleks TBP/TAF1 (TAFII150)/TAF2 (TAFII250) jest wystarczający do inicjacji transkrypcji przy udziale Inr [26].

Ostatnio w promotorach genów białek rybosomalnych u *Drosophila* wykazano obecność rdzeniowego motywu strukturalnego TCT (YCTTTY), obejmującego miejsce startu

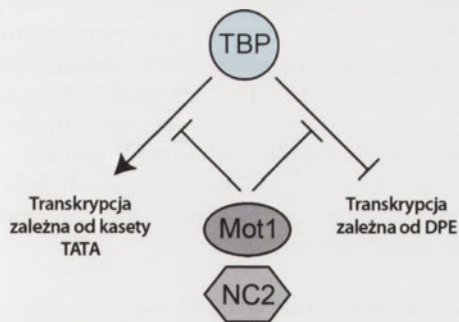


**Rycina 1.** Elementy regulatorowe promotorów rdzeniowych. BRE<sup>u</sup> [3], Kaseta TATA [4], BRE<sup>d</sup> [5], XCPE1 [6], Inr [7-10], MTE [12], DPE [17], DCE [14]. W ramkach umieszczono sekwencje zgodne oraz położenie elementów w promotorze rdzeniowym. R – A lub G; Y – C lub T; S – G lub C; W – A lub T; K – G lub T; M – A lub C, B – C, G lub T; D – A, G lub T; H – A, C lub T; V – A, C lub G, N – dowolny nukleotyd. Liczby wyrażają położenie elementów w odniesieniu do tsp. Nie istnieje uniwersalny zestaw elementów w promotorze rdzeniowym. Każdy promotor posiada indywidualną kompozycję elementów regulatorowych, których występowanie waha się w granicach od 1 do kilkudziesięciu procent. Opracowano na podstawie [2].

transkrypcji [11]. Mimo dużego podobieństwa sekwencji do Inr, motyw TCT nie wiąże TFIID i nie jest zdolny do funkcjonalnego zastąpienia tego elementu [11].

**DPE** (ang. *downstream promoter element*) ma sekwencję zgodną RGWYVT w położeniu od +28 do +32 względem tsp w promotorach owadów [27]. Występuje w promotorach zarówno posiadających, jak i pozbawionych kasety TATA. DPE funkcjonuje wspólnie z Inr, którego położenie względem DPE jest kluczowe dla optymalnego poziomu transkrypcji [28]. Element DPE jest rozpoznawany przez białka TAF 6 (TAFII60) i TAF 9 (TAFII40) czynnika TFIID. Ponadto wykazano, że transkrypcję zależną od DPE aktywuje czynnik NC2 (DR1-Drap1) (ang. *negative cofactor 2*) [29]. Stwierdzono także, że czynnik NC2 powodował represję transkrypcji zależnej od kasety TATA [29-31]. Transkrypcja zależna od kasety TATA vs DPE tworzy układ, w którym TBP aktywuje transkrypcję zależną od kasety TATA, a hamuje zależną od DPE (Ryc. 2). Z kolei czynniki NC2 i Mot1 (ATP-aza usuwająca TBP z DNA) blokują funkcję TBP, hamują transkrypcję zależną od kasety TATA i aktywują transkrypcję zależną od DPE [30]. Regulacja ekspresji genów zależy nie tylko od różnorodności elementów wzmacniających czy też wyciszających, ale także od złożoności struktur promotora rdzeniowego [32]. Można to zaobserwować na przykład we wzajemnej komunikacji wzmacniacz –promotor. Jak wspomniano, niektóre aktywatory preferencyjnie oddziałują z promotorami zależnymi od kasety TATA, podczas gdy inne aktywują te zależne od DPE. Przykładowo, czynniki aktywujące AE1 i IAB5 *Drosophila* preferencyjnie aktywują promotor rdzeniowy zależny od kasety TATA genu *even-skipped* w przeciwieństwie do genu *white*, pozbawionego kasety TATA i zależnego od DPE [33].

Także analiza genów *Hox Drosophila* rzuciła nowe światło na selektywną rolę promotora rdzeniowego w regulacji



Rycina 2. Podwójna rola TBP w regulacji transkrypcji. Oddziaływanie Mot1 i NC2 z TBP wpływa hamująco na transkrypcję zależną od kasyety TATA, a jednocześnie promująco na transkrypcję zależną od DPE. Opracowano na podstawie [30].

cji transkrypcji [34]. Prawie wszystkie geny z grupy *Hox* są pozbawione kasyety TATA, a zawierają DPE. Sugerowało to, że istnieją specyficzne w stosunku do DPE regulatory transkrypcji. Na tej podstawie zidentyfikowano czynnik transkrypcyjny *Caudal*, będący kluczowym regulatorem genów *Hox*. Ponadto aktywacja genów *Antennapedia P2* oraz *Sex combs reduced* przez czynnik *Caudal* zależy od obecności DPE w ich promotorach rdzeniowych. Dalsze badania wykazały, jak złożona jest regulacja ekspresji przez czynnik *Caudal*. Mianowicie motyw BRE<sup>u</sup> hamuje zdolność czynnika *Caudal* do aktywacji transkrypcji przez oddziaływanie z kasetą TATA, ale nie z DPE. Jak zilustrowano na rycinie 3, istnieją trzy poziomy aktywacji z udziałem czynnika *Caudal*: silna aktywacja poprzez DPE (w obecności lub nieobecności BRE<sup>u</sup>), słabsza aktywacja poprzez kasetę TATA w nieobecności BRE<sup>u</sup> oraz słaba lub brak aktywacji przez kasetę TATA współistniejącą z BRE<sup>u</sup>. Reasumując, badania nad czynnikiem *Caudal* i genami *Hox* wykazują wysoką specyficzność i różnicowanie motywów rdzeniowych promotorów oraz ich centralne położenie w sieci procesów biologicznych.

MTE (ang. *motif ten element*) jest elementem zidentyfikowanym metodami obliczeniowymi oraz biochemicznymi, zlokalizowanym po stronie 3' od tsp w pozycji od +18 do +29 [12]. MTE występuje zarówno w promotorach ludzkich, jak i owadach. U owadów jego sekwencja zgodna to CSARCSSA-AC. Metody obliczeniowe dotyczące analizy promotorów ssaków wykazały, że MTE nie jest powszechny w promotorach tej gromady [22]. Można przypuszczać, że MTE, podobnie jak Inr czy DPE posiada mniej restrykcyjną sekwencję najwyższej zgodności w promotorach ssaków w porównaniu z promotorami *Drosophila*. Warto także wspomnieć, że analiza promotorów ssaczych wykazała obecność motywu „GCG” w pozycji +20 względem tsp, który „zachodzi” na sekwencję MTE oraz motywu „GCG echo” w pozycji +30, „zachodzącej” na motyw DPE [35]. Nie jest wykluczone, że wspomniane motywy są ssaczymi odpowiednikami owadzych MTE i DPE. Podobnie jak DPE, MTE funkcjonuje w połączeniu z Inr. Również w tym przypadku odległość między elementami jest kluczowa dla zachowania transkrypcji. Ponadto element jest zdolny funkcjonalnie zrekompensować utratę aktywności promotora, związaną z mutacją kasyety TATA lub DPE. Co więcej, MTE wraz z kasetą TATA i DPE wykazuje działanie synergiczne, prowadząc do zwiększenia siły promotora [12]. Próba lepszego poznania struktury części promotorowej, położonej po stronie 3' od tsp, doprowadziła do wytypowania funkcjonalnych subobszarów MTE (od +18 do +22, od +27 do +29) oraz DPE

(od +27 do +29, od +30 do +33) [36]. Zidentyfikowano także strukturalny motyw „pomostowy” (ang. *bridge element*), stanowiący niejako element hybrydowy, zawierający subobszary MTE i DPE (od +18 do +22 i od +30 do +33) [36].

Element DCE (ang. *downstream core element*) pierwotnie zidentyfikowano w promotorze ludzkiej  $\beta$ -globuliny, a następnie w promotorze AdML [14,37]. Podobnie jak DPE jest elementem położonym po stronie 3' od tsp. Elementy DPE oraz DCE nie są tożsame. DCE składa się z trzech podelementów: CTC (podelement SI), CTGT (podelement SII), AGC (podelement SIII), ułożonych w sposób nieciągły w pozycjach odpowiednio: od +6 do +11, od +16 do +21, od +30 do +34. DCE oddziałuje z białkiem TAF1 kompleksu TFIID, co wskazuje, że czynnik TFIID pełni fundamentalną rolę w oddziaływaniach z elementami położonymi także po stronie 3' od tsp [9].

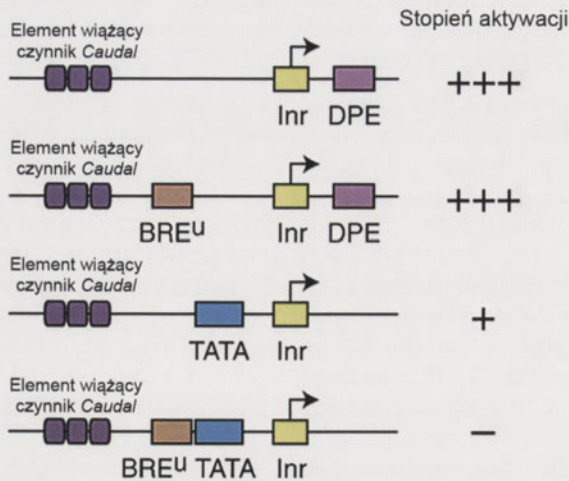
BRE<sup>u</sup> (ang. *upstream TFIIB recognition element*) jest elementem o sekwencji najwyższej zgodności SSRCGCC, rozpoznawanym przez podstawowy czynnik transkrypcji TFIIB [3]. Jest umiejscowiony w promotorach bezpośrednio po stronie 5' od kasyety TATA, aczkolwiek jest niezależny od TBP. Oddziaływanie TFIIB-BRE<sup>u</sup> sprzyja formowaniu kompleksu preinicjacyjnego (PIC) na kasecie TATA [3].

BRE<sup>d</sup> (ang. *downstream TFIIB recognition element*), o sekwencji najwyższej zgodności RTDKKKK, jest położony bezpośrednio po stronie 3' od kasyety TATA, a jego funkcja zależy od obecności TBP [5]. Niemniej jednak analizy numeryczne promotorów wykazały, że zarówno BRE<sup>u</sup> jak i BRE<sup>d</sup> występują również w promotorach nieposiadających elementu strukturalnego TATA [5,38].

XCPE1 (ang. *X core promoter element 1*) jest położony w pozycji od -8 do +2 względem tsp [6]. Jego sekwencja najwyższej zgodności to DSGYGGRASM. Statystycznie element występuje w około 1% ludzkich promotorów rdzeniowych, głównie pozbawionych kasyety TATA. Jako samodzielny element XCPE1 ma niewielką aktywność transkrypcyjną, która wzrasta wskutek jego oddziaływania ze specyficznymi aktywatorami białkowymi takimi jak NRF1, NF-1 i Sp1 [6,39].

Wyspy CpG występują przeważnie w promotorach bez kasyety TATA lub DPE i biorą udział w inicjacji transkrypcji, zachodzącej z kilku słabych, rozproszonych (obszar około 100 pz) miejsc startu [40]. Wyspy CpG zawierają kasyety GC (5'-GGGCGG-3') wiązane przez czynnik transkrypcyjny Sp1 [41]. Wiązanie Sp1 do kasyety GC zapobiega metylacji DNA w tym obszarze [41]. Ponadto Sp1 oddziałuje z podstawowymi czynnikami transkrypcji, uczestnicząc w jej inicjacji [42]. Na przykład wykazano, że czynnik TFIID związany z Inr był niezbędny do aktywacji transkrypcji przez Sp1 [42].

Badania elementów rdzeniowych doprowadziły do zaprojektowania sztucznego superpromotora SCPI (ang. *super core promoter 1*), który zawierał jednocześnie kasetę TATA, Inr, MTE i DPE [43]. SCP 1 jest najsilniejszym znanym promotorem rdzeniowym. Jego wysoką aktywność, także w połączeniu z elementami wzmacniającymi, potwierdzono w testach *in vitro* oraz w kulturach komórkowych. Badania te dowodzą, jak silnie ekspresja genów regulowana jest na poziomie promotora rdzeniowego.



Rycina 3. Czynniki transkrypcyjny *Caudal*, specyficzny aktywator DPE. *Caudal* preferencyjnie aktywuje transkrypcję z promotorów rdzeniowych, zawierających DPE w porównaniu z kasetą TATA. Obecność motywu BRE<sup>u</sup> po stronie 5' od kasety TATA dodatkowo ogranicza zdolność czynnika *Caudal* do aktywacji transkrypcji w promotorze zależnym od motywu TATA. BRE<sup>u</sup> nie wpływa natomiast na zdolność *Caudal* do aktywacji transkrypcji zależnej od DPE. Ponadto kasetę TATA nie zmienia zdolności czynnika *Caudal* do aktywacji transkrypcji za pośrednictwem DPE (danych nie przedstawiono na schemacie). Opracowano na podstawie [34].

#### ANALIZA NUMERYCZNA ELEMENTÓW RDZENIOWYCH

Istnieją analizy statystyczne określające częstotliwość występowania poszczególnych elementów regulatorowych w promotorach eukariotycznych. Analizy dotyczą głównie kasety TATA, elementu Inr, DPE, BRE<sup>u</sup> oraz MTE. Wyniki tych analiz nie są w pełni zbieżne, ponieważ zależą od liczby i doboru promotorów [20]. Analiza 1031 ludzkich promotorów wykazała obecność 28% promotorów zawierających kasetę TATA i Inr, 4% z kasetą TATA, lecz pozbawionych Inr, 56% posiadających jedynie Inr bez kasety TATA oraz 12% bez motywu strukturalnego TATA i elementu Inr [44]. Kolejna analiza promotorowych baz danych EPD (ang. *Eucaryotic Promoter Database*) i DBTSS (ang. *Database of Human Transcriptional Start Sites*) wykazała, że mniej niż 22% promotorów posiada kasetę TATA, wśród tych promotorów 62% ma Inr, 24% DPE, 12% BRE<sup>u</sup>. Wśród pozostałych 78% (bez kasety TATA) 45% zawiera Inr, 25% DPE i 28% posiada BRE<sup>u</sup> [38]. Powyższe analizy wykazują, że kasetę TATA nie występuje w promotorach tak powszechnie jak niejednokrotnie przypuszczano. Do promotorów pozbawionych kasety TATA należą często promotory ludzkich genów konstytutywnych, onkogenów, czynników wzrostu oraz czynników transkrypcyjnych [45].

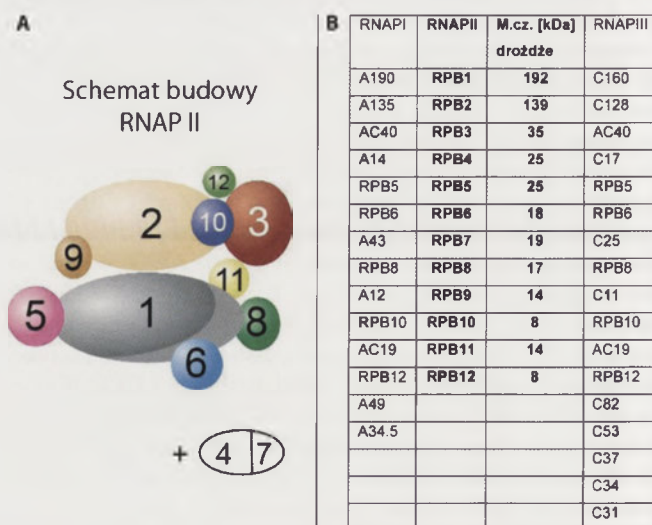
Według jednej z ostatnich analiz numerycznych, obejmującej 3393 promotory *Drosophila* 40% zawiera kasetę TATA, co piąty promotor ma motyw strukturalny DPE, a większość promotorów, bo aż 66% posiada element Inr. Motyw MTE pojawił się w 10% analizowanych promotorów. Ustalono także, że jedynie w 24% promotorów obecne są synergiczne kombinacje (potwierdzone funkcjonalnie oraz teoretycznie) elementów rdzeniowych TATA – Inr, Inr – DPE, Inr – MTE, DPE – MTE, TATA – DPE, TATA – MTE, TATA – BRE. Jednocześnie wykazano, że aż 25% promotorów nie miało żadnego znanego elementu rdzeniowego [22]. Jeszcze bardziej obszerna analiza numeryczna, obejmująca 10 914 promotorów *Drosophi-*

*la*, wykazała jedynie 4,7% promotorów z motywem TATA, a motyw DPE znaleziono w przypadku 2,1 promotorów. Analiza wykazała procentową przewagę Inr, wynoszącą 14% w puli analizowanych promotorów [46]. Jak widać, dane dotyczące występowania rdzeniowych motywów strukturalnych promotorów są niekiedy bardzo rozbieżne. Wynika to zapewne z trudności określenia warunków brzegowych definiujących poszczególne elementy oraz złożoności mechanizmów transkrypcji przy udziale polimerazy RNA.

#### POLIMERAZA RNAP II (RNAP II)

Znane są cztery izoformy RNAP u wyższych *Eucaryota*: I, II, III, spIV (ang. *single polypeptide*) [47]. RNAP I uczestniczy w transkrypcji dwóch form rybosomalnego RNA, 18S i 28S. RNAP II reguluje transkrypcję wszystkich matrycowych RNA (mRNA), natomiast RNAP III bierze udział w syntezie 5S rRNA i tRNA. Ponadto niewrażliwa na działanie  $\alpha$ -amanityny spRNAP IV, zbudowana z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, bierze udział w transkrypcji mRNA, oddziałując z promotorami pozbawionymi sekwencji regulatorowych, w tym elementów rdzeniowych [48]. Funkcja tych polimeraz koreluje z lokalizacją enzymów, RNAP I w jąderku, a II, III i IV w nukleoplazmie [48]. RNAP I, II, III mają budowę podjednostkową [49] (Ryc. 4).

Polimeraza RNA II jest odpowiedzialna za transkrypcję wszystkich genów kodujących białka. Zarówno u człowieka, jak i u drożdży zbudowana jest z 12 podjednostek: RPB1–RPB12 [52] (Ryc. 4). Podjednostki polimerazy są silnie zachowane w ewolucji pod względem sekwencji, budowy i funkcji. Wiadomo, że 7 podjednostek ludzkiej RNAP II jest w stanie całkowicie (RPB6, RPB8, RPB10, RPB12) lub częściowo (RPB4, RPB7, RPB9) zastąpić funkcjonalnie odpowiedniki drożdżowe [47]. Ponadto podjednostki RPB5, RPB6, RPB8, RPB10, RPB12 występują także w RNAP I, III, natomiast RPB1, RPB2, RPB3, RPB11 posiadają ich homologiczne odpowiedniki. Jedynie podjednostki RPB4, RPB7, RPB9 oraz domena C-końcowa,



Rycina 4. Budowa podjednostkowa RNAP II. Opracowano na podstawie [49-51]. A. Schemat budowy RNAP II. Liczby 1-12 odpowiadają podjednostkom RNAP II: RPB 1-12. Podjednostki RPB 4 i 7 tworzą heterodimer przyłączany do RNAP II w stosunku stechiometrycznym równym 0,5. B. Podjednostki RNAP I, RNAP II, RNAP III. W kolumnach zebrano nazwy podjednostek wchodzących w skład odpowiednio RNAP I, RNAP II, RNAP III. Podano masy cząsteczkowe podjednostek RNAP II z drożdży.

CTD (ang. *C-terminal domain*) podjednostki RPB1 są specyficzne dla RNAP II. Dwie z 12 podjednostek drożdżowej RNAP II RPB4 i RPB7 tworzą heterodimer, który wiąże się do polimerazy w stosunku stechiometrycznym, wynoszącym 0,5 [47].

Główna aktywność RNAP II w transkrypcji i procesowaniu RNA jest zlokalizowana w CTD jej największej podjednostki RPB1. CTD ludzkiej RNAP II ma 52 tandemowo powtórzone sekwencje heptapeptydu Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, 42 powtórzenia u *Drosophila* oraz 26-29 powtórzeń u drożdży [50]. Jest to rejon nieustrukturyzowany, podatny na proteolizę. Ponadto CTD jest celem modyfikacji potranslacyjnych, warunkujących aktywność RNAP II. Należą do nich fosforylacja, glikozylacja oraz ubikwitylacja.

#### FOSFORYLACJA RNAP

W zależności od stopnia ufosforylowania oraz obecności CTD wyróżnia się trzy formy RNAP II: IIA, IIO, IIB. Nieufosforylowana forma IIA uczestniczy w powstawaniu kompleksu preinicjacyjnego (PIC) i inicjacji transkrypcji. Forma IIO, w której CTD jest wysoce ufosforylowana, bierze udział w elongacji i terminacji. Forma IIB, mimo że pozbawiona CTD, ma aktywność transkrypcyjną dla m.in. promotora *HSP70* z *Drosophila* [53] oraz promotora AdML2 [54]. W komórkach człowieka istnieje kilka różnych kinaz zaangażowanych w fosforylację CTD, włączając CDK7 (ang. *cyclin-dependent kinase 7*) zintegrowaną z TFIIF, CDK8 pochodzącą z kompleksu mediatora, CDK9 z czynnika elongacyjnego P-TEFb (ang. *positive transcription elongation factor b*).

#### GLIKOZYLACJA RNAP

Kolejną, obok fosforylacji, modyfikacją CTD podjednostki RPB1 jest glikozylacja, polegająca na kowalencyjnym związaniu monosacharydu, N-acetyloglukozoaminy, z grupami hydroksylowymi reszt bocznych seryny lub treoniny zlokalizowanych w heptapeptydowych powtórzeniach CTD RNAP II [55]. Glikozylacja dotyczy jedynie nieufosforylowanej formy IIA RNAP II [56]. Jest prawdopodobne, że glikozylacja powoduje blokadę steryczną dostępności CTD dla kinazy i w ten sposób reguluje aktywność RNAP II [47].

#### UBIKWITYLACJA RNAP

Ubikwitylacja jest trzecią potranslacyjną modyfikacją, charakterystyczną dla RNAP II. Przykładem ligazy ubikwityny E3 jest enzym z drożdży o nazwie Rsp5. Jest on jedyną ligazą E3 ubikwitylującą RNAP II. Do ubikwitylacji dochodzi wskutek oddziaływania CTD (sekwencja Pro-Ser-Tyr z powtórzeń heptapeptydu: -Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-) z domeną WW (38-40 reszt aa z dwiema zachowanymi w ewolucji resztami Trp) Rsp5 [57]. Mimo, że to oddziaływanie warunkuje zajście ubikwitylacji, sama ubikwitylacja zachodzi poza CTD, na reszcie Lys 695 RPB1 [58]. Poziom ubikwitylacji RNAP II jest niski podczas normalnego wzrostu komórek i wzrasta w momencie narażenia komórek na stres wywołany pojawieniem się czynników uszkodzających DNA, takich jak promieniowanie UV, związki chemioterapeutyczne. Wówczas dochodzi do zatrzymania RNAP II w miejscu uszkodzenia DNA. Włączeniu ulegają mechanizmy naprawcze DNA np. NER (ang. *nucleotide excision repair*), a podjednost-

ka RPB1 RNAP II podlega poliubikwitylacji. Wykazano, że w 15 minucie po ekspozycji komórek HeLa na promieniowanie UV następowała ubikwitylacja RPB1, która utrzymywała się do 12 godzin [59]. Ubikwitylowana RPB1 ulega degradacji w wyniku działania proteasomu 26S. Z zastosowaniem immunoprecypitacji chromatyny wykazano, że proteasom 26S jest przyłączany do RNAP II w wyniku uszkodzenia DNA promieniowaniem UV [60]. W przeciwieństwie do glikozylacji RNAP II hamowanej fosforylacją CTD, ubikwitylacja RNAP II zależy od uprzedniej fosforylacji CTD. Wykazano także, że inhibitor H8 kinazy CTD (blokowanie fosforylacji reszty Ser 5 przez Cdk7 i reszty Ser 2 przez Cdk9), dodany do ekstraktu jądrowego z HeLa powodował, obok hamowania fosforylacji, także supresję poliubikwitylacji RNAP II [61].

Jest interesującym, że dotąd nie zbadano wpływu innej kowalencyjnej modyfikacji RNAP II, jaką może być sumoilacja. Ubikwitynylacja i sumoilacja są spokrewnionymi mechanizmami, prowadzącymi do kowalencyjnego znakowania cząsteczek białkowych ubikwityną lub SUMO. Dojrzałe białka SUMO składają się z około 100 reszt aminokwasowych. Wpływ sumoilacji na transkrypcję genów wynika z modyfikacji reszt Lys czynników transkrypcyjnych, które zmieniają swoje powinowactwo do partnerów białkowych i/lub DNA [62]. Procesy te mogą ze sobą konkurować, np. sumoilacja inhibitora czynnika  $\kappa$ B  $\alpha$  blokuje jego degradację inicjowaną ubikwitylacją. Chociaż poranslacyjna modyfikacja SUMO może wywierać zróżnicowany efekt na transkrypcję, a także na lokalizację wewnątrzkomórkową czynników transkrypcyjnych, to zazwyczaj prowadzi do hamowania transkrypcji, a jej ostateczny efekt zależy od kontekstu, w jakim występuje dany promotor [62]. Sumoilacji podlega między innymi deacetylaza histonowa, co zwiększa jej aktywność. Co więcej deacetylazy mogą aktywować proces sumoilacji innych regulatorowych białek.

#### PODSTAWOWE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE (TF)

U *Eucaryota* promotory rdzeniowe służą jako platforma, na której powstaje kompleks preinicjacyjny (PIC). Polimerazy wykazują brak zdolności rozpoznawania specyficznego miejsca startu transkrypcji indywidualnie dla każdego genu. Aby doszło do rozpoznania promotora i inicjacji transkrypcji, polimerazy wymagają obecności tzw. podstawowych czynników transkrypcyjnych (GTF, ang. *general transcription factors*). Dla RNAP II są to: TFIIA, -B, -D, -E, -F i -H, zidentyfikowane zarówno u drożdży jak i u ssaków [63]. Nazwa TF pochodzi od *transcription factor*, II oznacza transkrypcję z udziałem RNAP II, a litery A, B, D, E, F, H oznaczają frakcję, z której niegdyś wyizolowano poszczególne czynniki. Podstawowe właściwości tych czynników zebrano w tabeli 1.

Istnieją dwa główne modele opisujące sposób składania PIC na promotorze. Według pierwszego modelu podstawowe czynniki transkrypcyjne są przyłączane kolejno, czynniki po czynniku (ang. *stepwise assembly*) [64]. Kompleks białkowy TFIID jako pierwszy rozpoznaje element regulatorowy promotora, np. kasetę TATA. W następnym etapie dochodzi do związania czynników TFIIA, TFIIB, które stabilizują wiązanie TFIID do promotora i powodują wiązanie kolejnych białek: RNAP II i TFIIF. Po utworzeniu kompleksu TFIID/

Tabela 1. Budowa podjednostkowa oraz funkcje podstawowych czynników transkrypcji. Opracowano na podstawie [63].

Czynnik transkrypcyjny	Skład białkowy	M.cz. (kDa)	Funkcja
TFIIA	p35 (α)	37	antyrepresor;
	p19 (β)	19	stabilizacja kompleksu TBP-TATA;
	p12 (γ)	13	koaktywator
TFIIB	p33	35	selekcja miejsca startu transkrypcji; stabilizacja kompleksu TBP-TATA; rekrutacja RNAP II-TFIIF
TFIID	TBP	38	czynnik wiążący promotor rdzeniowy; koaktywator;
	TAFs (TAF1-TAF14)	250-18	kinaza białkowa; acetylotransferaza histonów
TFIIE	p56 (α)	56	rekrutacja TFIIF; ułatwienie formowania kompleksu inicjacyjnego;
	p34 (β)	34	udział w opuszczaniu promotora przez RNAP II
TFIIF	RAP30	26	wiązanie RNAP II; ułatwienie rekrutacji RNAP II do promotora; rekrutacja TFIIE i
	RAP74	58	TFIIF; udział w selekcji miejsca startu transkrypcji; zwiększenie wydajności elongacji
TFIIH	p89/XPB	89	aktywność ATPazy w inicjacji transkrypcji i opuszczaniu promotora przez RNAP II;
	p80/XPD	80	
	p62	62	
	p52	52	
	p44	44	
	p40/CDK7	40	
	p38/Cyklina H	37	
	p34	34	
	p32/MAT1	32	
P8/TFB5	8	aktywność helikazy przy otwieraniu promotora;	
			aktywność naprawcza DNA;
			aktywność kinazy w fosforylacji CTD RNAP II;
			aktywność ligazy E3 ubikwityny

TFIIA/TFIIB/RNAP II/TFIIF/promotor, przyłączeniu ulegają kolejno TFIIE i TFIIF [65].

Drugim modelem obrazującym powstawanie PIC jest model holoenzymu RNAP II. Zakłada on, że większość czynników transkrypcyjnych tworzy kompleksy między sobą jeszcze przed związaniem do promotora. Stwierdzono bowiem, że skład białkowy holoenzymu RNAP II różnił się w zależności od materiału wyjściowego oraz metody jego izolowania [66]. Wykazano, że holoenzym RNAP II człowieka zawierał RNAP II, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIF, GCN5 (acetylotransferaza histonów), kompleks rearanżujący chromatynę SWI/SNF oraz mediator. Holoenzym nie zawierał TFIID oraz TFIIA. We-

dług tego modelu związanie TFIID do promotora ułatwia przyłączenie holoenzymu RNAP II [66]. Po związaniu czynników transkrypcyjnych do promotora dochodzi do lokalnego oddzielenia komplementarnych nici DNA, powstania otwartego kompleksu inicjacyjnego i syntezy mRNA. Biorąc pod uwagę ilość i różnorodność promotorów w genomie, jest prawdopodobne, że oba mechanizmy tworzenia PIC występują w komórce. Budowa moduła aparatu transkrypcyjnego pozwala komórkom na składnie aparatu transkrypcyjnego wieloetapowo bądź w jednym etapie. Funkcję podstawowych czynników transkrypcyjnych w tworzeniu PIC omówiono w kolejnych podrozdziałach.

Tabela 2. Wybrane właściwości TAF. Opracowano na podstawie [25,27,66,68-76].

TAF	M.cz. (kDa)	Właściwości
TAF1 (TAFII250)	250	oddziaływanie z Inr i DCE; acetylacja i fosforylacja histonów H2B, H3,H4
TAF2 (TAFII150)	150	oddziaływanie z Inr
TAF3 (TAFII140)	140	domena histonowa, negatywny regulator aktywacji transkrypcji przez p53
TAF4 (TAFII135)	135	domena histonowa; stabilność kompleksu TFIID; regulacja transkrypcji genów z promotorami bez kasety TATA; oddziaływanie z aktywatorami (np. Sp1)
TAF5 (TAFII100)	100	„rusztowanie” w formowaniu kompleksu TFIID; powtórzenia motywu WD-40
TAF6 (TAFII80)	80	domena histonowa; stabilność kompleksu TFIID oddziaływanie z DPE
TAF7 (TAFII55)	55	oddziaływanie z licznymi aktywatorami transkrypcji (np. Sp1, YY1, HIV-1 Tat)
TAF8	43	funkcja strukturalna – integracja TAF10 w TFIID
TAF9 (TAFII31)	31	domena histonowa; stabilność kompleksu TFIID; oddziaływanie z DPE
TAF10 (TAFII30)	30	domena histonowa; pozytywny regulator aktywacji transkrypcji przez receptor estrogenowy
TAF 11 (TAFII28)	28	domena histonowa; stabilizacja kompleksu TFIIA-TBP-DNA; oddziaływanie z receptorem witaminy D
TAF12 (TAFII20)	20	domena histonowa; stabilność kompleksu TFIID
TAF13 (TAFII18)	18	domena histonowa
BTAF1 (TAF 170)	170	redukcja niespecyficznego oddziaływania TBP-kaseta TATA (aktywność ATPazy); tworzenie wraz z TBP kompleksu B-TFIID, zdolnego do inicjacji transkrypcji zależnej od RNAP II

\*w nawiasach podano uprzednią nomenklaturę TAF u *H. sapiens*.

**Tabela 3.** Nomenklatura czynników TAF, zaangażowanych w transkrypcję zależną od RNAP II. Opracowano na podstawie [47].

Nowa nazwa	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i> Nowa nazwa	Poprzednia nazwa
TAF1	TAFII 250	TAFII 230	Taf145 / 130	taf-1	taf-1
TAF2	TAFII 150	TAFII 150	Taf150	taf-2	taf-2
TAF3	TAFII 140	TAFII 155	Taf47	taf-3	C11G6.1
TAF4	TAFII 130/135	TAFII 110	Taf48	taf-4	taf-5
TAF4b	TAFII 105				
TAF5	TAFII 100	TAFII 80	Taf90	taf-5	taf-4
TAF5b					
TAF5L	PAF65 $\alpha$	Cannonball			
TAF6	TAFII 80	TAFII 60	Taf60	taf-6.1	taf-3.1
TAF6L	PAF65 $\alpha$			taf-6.2	taf-3.2
TAF7	TAFII 55		Taf67	taf-7.1	taf-8.1
TAF7L	TAF2Q			taf-7.2	taf-8.2
TAF8	TAF 8	Prodos	Taf65	taf-8	
TAF9	TAFII 32/ 31	TAFII 40	Taf17	taf-9	taf-10
TAF9L	TAFII 31L				
TAF10	TAFII 30	TAFII 24	Taf25	taf-10	taf-11
TAF10b		TAFII 16			
TAF 11	TAFII 28	TAFII 30a	Taf40	taf-11.1	taf-7.1
TAF11L				taf-11.2	taf-7.2
TAF 12	TAFII 20/ 15	TAFII 30a	Taf61 / 68	taf-12	taf-9
TAF 13	TAFII 18		Taf19	taf-13	taf-6
TAF14			Taf30/ANC1		
TAF 15	TAFII 68				
BTAF1	TAFII 170	Hel89B	Mot1	btaf-1	

#### TFIID

TFIID jest pierwszym podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się do promotora rdzeniowego. Stanowi rodzaj rusztowania dla wiązania kolejnych składników PIC. Jest kompleksem zbudowanym z wielu białek o łącznej masie cząsteczkowej rzędu 750 kDa [67]. Składa się z TBP oraz kilkunastu białek oddziałujących z TBP, tzw. TAF (ang. *TBP-associated factors*) o masie cząsteczkowej od 15 do 250 kDa. W komórkach człowieka wyróżnia się co najmniej 14 TAF [67]. Wybrane właściwości TAF przedstawiono w tabeli 2. Sekwencje większości TAF są zachowane w ewolucji wśród wielu gatunków zwierząt. Ich indywidualne nazwy ujednociono w 2002 r. [77] (Tab. 3).

Do najważniejszych funkcji TFIID należy: oddziaływanie z elementami rdzeniowymi promotorów: kasetą TATA, Inr, DPE, DCE. TFIID bierze bezpośredni udział w modyfikacjach potranslacyjnych chromatyny oraz czynników transkrypcyjnych i pełni funkcję regulatorową współdziałając zarówno z białkami aktywatorowymi, jak i supresorowymi.

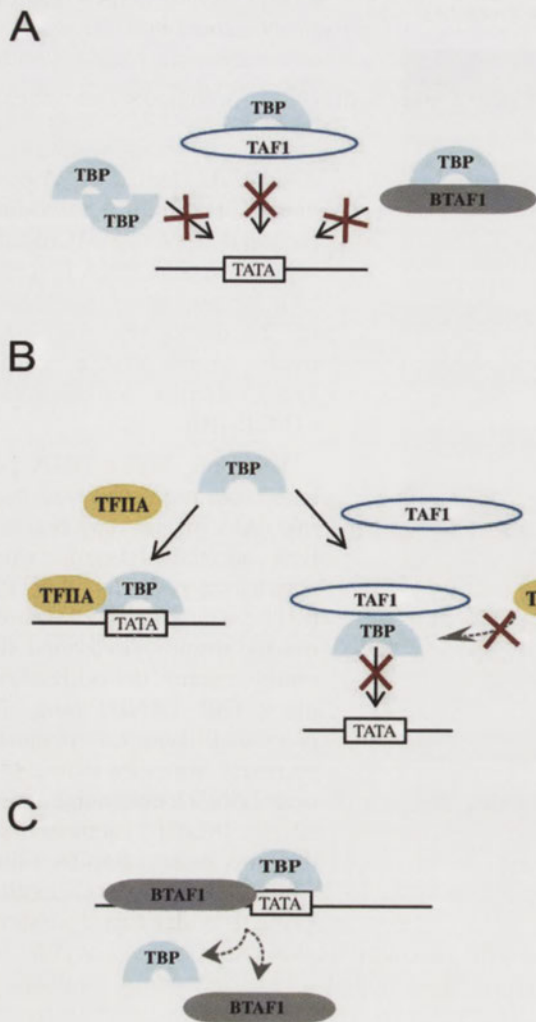
Czynniki transkrypcyjne TFIID uczestniczą w wiązaniu elementów rdzeniowych. Rozpoznawanie kasety TATA jest, jak dotąd, najlepiej zbadanym etapem inicjacji transkrypcji zależnej od tego elementu. TFIID oddziałuje z kasetą TATA poprzez TBP, które wiąże się do niej w postaci monomerycznej z  $K_d$  rzędu  $3 \times 10^{-10}$  M [78]. TBP posiada również niespecyficzne powinowactwo ( $K_d = 5 \times 10^{-6}$  M) w stosunku do sekwencji zawierających niepromotorowe reszty AT, co prowadzi do powstawania nieproduktywnych kompleksów transkrypcyjnych. Istnieje kilka mechanizmów o charakterze pozytywnym jak

i negatywnym zapewniających specyficzną oddziaływań między sekwencją kasety TATA a TBP i zapobiegających niespecyficznemu oddziaływaniu TBP z „przypadkowymi” sekwencjami AT. Przykładem jest tworzenie przez TBP struktury homodimerycznej ( $K_d = 4 \times 10^{-9}$  M), niezdolnej do wiązania DNA [79] (Ryc. 5A). W tworzeniu homodimeru TBP u drożdży biorą udział reszty Asn69, Wal71, Wal122, Thr124, Asn159, Wal161, Wal213 i Thr215 [80].

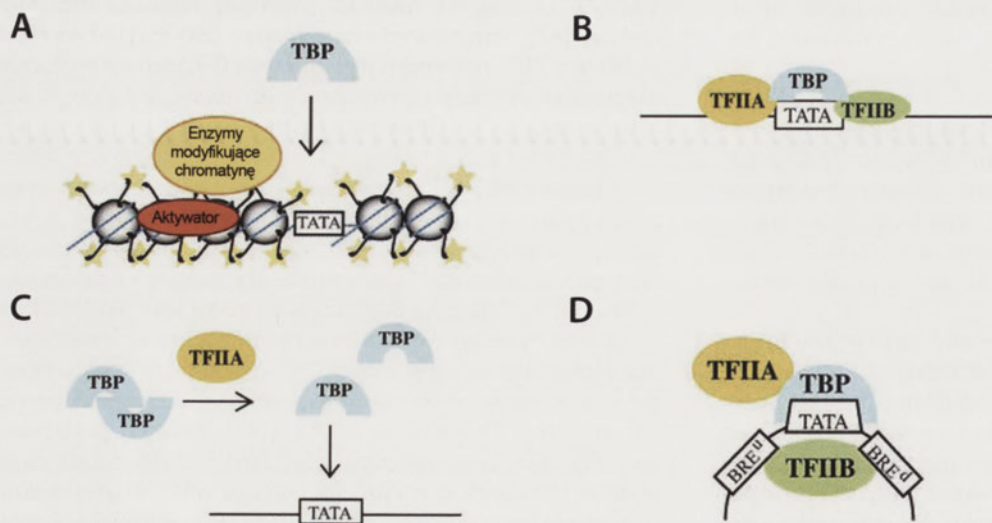
Wiązanie TBP z DNA podlega także regulacji przez czynnik TAF1 (negatywny regulator tych oddziaływań), będący największą podjednostką TFIID [81] (Ryc. 5B). TAF1 z *Drosophila* ma na aminowym końcu dwa rejony zdolne do oddziaływania z TBP, TAND1 (ang. *TAF N-terminal domain 1*) obejmujący reszty aminokwasowe 11-77 oraz TAND2, obejmujący reszty 82-156 [82,83]. Ujemnie naładowane reszty Asp29, Glu31, Glu51, Glu70 i Asp73 regionu TAND1 oddziałują z dodatnio

naładowanymi resztami lizyłowymi i arginyłowymi TBP, które również biorą udział w oddziaływaniu z mniejszym rowkiem kasety TATA, tym samym blokując rozpoznawanie sekwencji kasety przez TBP (Ryc. 5B). Sekwencja TAND2 może również wiązać się z tymi samymi dodatnio naładowanymi resztami TBP, ograniczając wiązanie TFIIA do TBP [83] (Ryc. 5B). Kolejnym czynnikiem ograniczającym niespecyficzne oddziaływanie TBP z sekwencją kasety TATA jest czynnik BTAF1, znany również pod nazwą TAFII170 lub TAF172 (*H. sapiens*), Mot1 (*S. cerevisiae*), helikaza 89B (*Drosophila*) [47]. Aminowy koniec (reszty 290-381) BTAF1 oddziałuje z TBP, natomiast jego domena C-końcowa wykazuje aktywność ATPazy, prowadzącą do dysocjacji kompleksu TBP/kaseta TATA (Ryc. 5C).

Oddziaływanie TBP z kasetą TATA podlega także procesowi pozytywnej regulacji. Mianowicie czynniki kowalencyjnie modyfikujące i reanżujące chromatynę zwiększają dostępność sekwencji promotora dla TBP, w obszarze kasety TATA (Ryc. 6A). Na przykład kompleks SWI/SNF w sposób zależny od ATP rearanżuje chromatynę, a następnie acetyltransferaza histonowa GCN5 przeprowadza acetylację w miejscu występowania kasety TATA, zwiększając powinowactwo TBP do kasety TATA [47]. Również podstawowe czynniki transkrypcyjne jak TFIIA i TFIIB determinują stabilność kompleksu TBP/TATA (Ryc. 6B). TFIIA indukuje dysocjację homodimerycznej postaci TBP, ułatwiając formie monomerycznej wiązanie do kasety TATA (Ryc. 6C) [47]. Natomiast TFIIB zwiększa powinowactwo (2,5-krotnie) TBP do kasety TATA oraz powoduje zmniejszenie szybkości



**Rycina 5.** Negatywna regulacja tworzenia kompleksu TBP-TATA. **A.** Hamowanie tworzenia kompleksu TBP-TATA przez homodimeryzację TBP oraz oddziaływanie TBP z TAF1 i BTAF1. **B.** Konkrowanie TAF1 z TFIIA o wiązanie do TBP. **C.** Wpływ BTAF1 na zależną od ATP dysocjację kompleksu TBP-TATA. Opracowano na podstawie [47].



**Rycina 6.** Pozytywna regulacja wiązania TBP z kasetą TATA. **A.** Ekspozycja kasy TATA wskutek modyfikacji chromatyny. **B.** Stabilizacja wiązania TBP do kasy TATA przez TFIIA i TFIIB. **C.** Promowanie dysocjacji homodimeru TBP przez TFIIA. **D.** Stabilizacja kompleksu TBP-TATA przez elementy BRE<sup>u</sup> i BRE<sup>d</sup>. Opracowano na podstawie [47].

odłączania (2,3-krotne) TBP z rdzeniowego regionu promotora [84]. Oddziaływanie TFIIB z sekwencjami BRE<sup>u</sup> i BRE<sup>d</sup> dodatkowo stabilizuje kompleks TBP/TATA (Ryc. 6D).

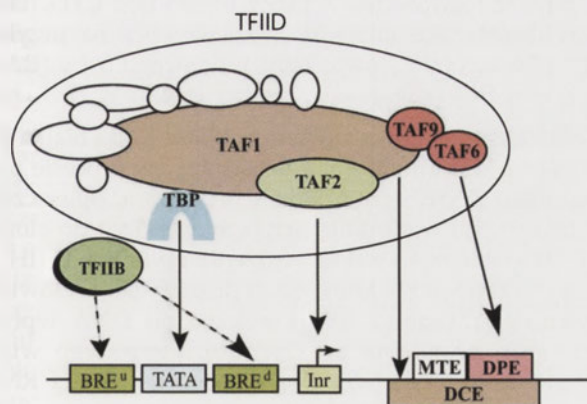
Obecność TAF w kompleksie TFIID zwiększa spektrum regulatorowych sekwencji rdzeniowych rozpoznawanych przez TFIID. Wykazano bowiem, że TFIID oddziałuje z Inr przez TAF1/TAF2, z DPE przez TAF6/TAF9, a z DCE przez TAF1 [14] (Ryc. 7). Niewiele jednak wiemy, jaka jest architektura funkcjonalnych kompleksów tworzonych na promotorach rdzeniowych sterowanych przez inne elementy niż kasetę TATA. Nie wiemy też, jak czasowo-przestrzenna regulacja ekspresji poszczególnych czynników transkrypcyjnych w komórce wpływa na ekspresję genów.

Czynniki TFIID uczestniczą w modyfikacjach potranslacyjnych chromatyny oraz innych czynników transkrypcyjnych. Podjednostka TAF1 kompleksu TFIID ma aktywność acetylasy histonów H3 i H4. Tej aktywności podlegają obszary zawierające jedynie promotory niektórych genów, na przykład genów białek głównego układu zgodności tkankowej I klasy MHC I (ang. *major histocompatibility complex I*). Hipoacetylacja histonu H3 wywołana inaktywacją TAF1 w komórkach chomika linii ts13 zachodziła jedynie w obszarze, w którym znajdował się promotor cykliny D1, natomiast nie zachodziła w obszarze promotora *c-fos* [47]. Poza histonami, TAF1 acetyluje również GTF, na przykład podjednostkę β (p34) podstawowego czynnika TFIIE [85].

U *Drosophila* opisano aktywność kinazową TAF1, powodującą fosforylację reszty Ser 33 histonu H2B w obszarze promotora genu *giant* odpowiedzialnego za segmentację u larw, wywołującą aktywację ekspresji tego genu. TAF1 fosforyluje także reszty serylowe podjednostki RAP74 czynnika TFIIF. Przypuszcza się, że może to być sposób przekazywania sygnału pomiędzy poszczególnymi GTF w inicjacji transkrypcji. TAF1 fosforyluje również reszty seryny 316, 321, 280 i 281 czynnika TFIIA, wskutek czego TFIIA asocjuje z TBP przyczyniając się do zmniejszenia puli niefunkcjonalnych dimerów TBP [47].

TAF pełnią także funkcję w przekazywaniu sygnału do aktywatorów transkrypcji do promotorów rdzeniowych. Na przykład TAF4 *Drosophila* oddziałuje z domeną aktywatorową czynnika Sp1, natomiast TAF7 oddziałuje z jego domeną wiążącą DNA. Obserwacja, że różne domeny jednego czynnika transkrypcyjnego oddziałują z różnymi TAF świadczy, że TFIID może regulować funkcje aktywatorów przez wzmocnienie wiązania aktywatora z określoną sekwencją promotora. Aminowy koniec TAF7 oddziałuje także z następującymi aktywatorami transkrypcji: YY1, USF, E1A, HIV-1 Tat [47].

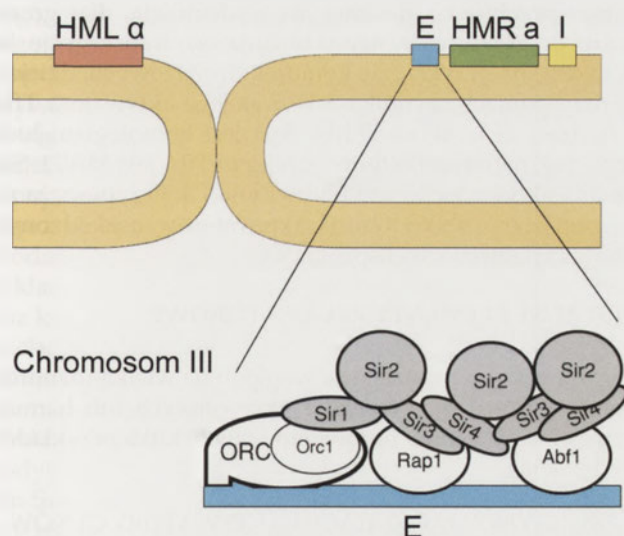




**Rycina 7.** Udział czynników białkowych TAF wchodzących w skład TFIID i TFIIB w rozpoznawaniu elementów promotora rdzeniowego. Przedstawiono schematycznie czynniki transkrypcyjne TFIID oraz TFIIB oddziałujące z elementami rdzeniowymi promotorów (BRE<sup>u</sup>, kasetą TATA, BRE<sup>d</sup>, Inr, DCE, MTE, DPE). W przypadku TFIID podano nazwy jego podjednostek: TBP, TAF1, TAF2, TAF6, TAF9, oddziałujących bezpośrednio z elementami rdzeniowymi (wskazanymi za pomocą strzałek). Dla jasności na rycinie pominięto nazwy pozostałych 8 składników kompleksu TFIID nie oddziałujących bezpośrednio z elementami promotora rdzeniowego. Opracowano na podstawie [47].

## TFIIA

TFIIA z komórek człowieka zbudowany jest z trzech podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o masach cząsteczkowych odpowiednio 35 kDa, 19 kDa, 12 kDa. Białko jest kodowane przez dwa geny, *TFIIA $\alpha\beta$*  oraz *TFIIA $\gamma$* . *TFIIA $\alpha\beta$*  koduje białko prekursorowe o masie 55 kDa, ulegające proteolizie, prowadzącej do powstania podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  u wyższych *Eucaryota*. Homologicznym białkiem drożdżowym *TFIIA $\alpha\beta$*  jest *Toa1*, a *TFIIA $\gamma$*  jest *Toa2*. TFIIA uczestniczy w transkrypcji jedynie wybranych genów. Na przykład w drożdżowych mutantach *toa2* obserwowano zahamowanie transkrypcji genów kodujących cykliny *CLB1*, *CLB2*, *CLN1*, *CTS1* (94-99%), decydujące



**Rycina 8.** Przykład kompleksu Sir na elemencie wyciszającym HMR-E chromosomu III *S. cerevisiae*. Elementy wyciszające E i I znajdują się w regionach wyciszonych kaset koniugacyjnych chromosomu III w loci HMR (ang. *Hidden MAT Right*) i HML (ang. *Hidden MAT Left*). Elementy te, wiążąc czynniki Rap1, Abf1, kompleks białek inicjujących replikację (ang. *origin recognition complex*, ORC) oraz białka Sir 1-4 (ang. *Silencing information regulators*), decydują o zmianie typu płciowo drożdży z  $\alpha$  na  $\alpha$  i odwrotnie. Opracowano na podstawie [112-114].

o przebiegu cyklu komórkowego i jedynie częściowe zahamowanie (około 65%) transkrypcji genów konstytutywnych *PMA1* (ATPazy H<sup>+</sup> błony komórkowej) i *ENO2* (enolazy).

Bezpośredni kontakt TBP z TFIIA stabilizuje jego wiązanie do kasety TATA (Ryc. 6B). Ponadto ludzka forma TFIIA, prowadzi do aktywacji transkrypcji poprzez wiązanie z wieloma aktywatorami. Przykładem jest Zta (aktywator lizy wirusa EBV), czynniki Sp1, Gal4-VP16 i NTF1. Oddziaływanie TFIIA z białkami aktywatorowymi stymuluje składanie kompleksu aktywator/TFIID/TFIIA/DNA, wspierając tym samym krytyczny proces rozpoznawania promotora rdzeniowego. Oddziaływanie TFIIA z białkami aktywatorowymi, na przykład fuzyjnym białkiem Gal4-VP16, stymuluje także udział TFIIIE oraz TFIIIF w rozpleceniu DNA promotora w okolicy tsp podczas tworzenia otwartego kompleksu transkrypcyjnego.

## TFIIB

Po związaniu z TFIID (ewentualnie TFIIA), kolejnym przyłączanym do PIC podstawowym czynnikiem transkrypcji jest TFIIB. Sekwencja TFIIB jest zachowana w ewolucji. TFIIB człowieka ma masę cząsteczkową 33 kDa, a u *Drosophila* odpowiada mu homologiczne białko dTFIIB (85% identyeczności) o masie 38 kDa. Związanie czynnika prowadzi do powstania kompleksu TFIID (TBP)/TFIIB/DNA i prawidłowego umiejscowienia tego kompleksu w stosunku do miejsca startu transkrypcji [66]. Udział drożdżowego TFIIB w selekcji miejsca startu transkrypcji oraz jej inicjacji opisano m.in. dla genów *CYC1*, *ADH1* [47]. Poza funkcją stabilizacyjną wspomnianego kompleksu, TFIIB pełni funkcję w przyłączeniu RNAP II i TFIIIF do promotora, oddziałując z podjednostkami RPB1 i RPB2 RNAP II oraz z RAP30, podjednostką podstawowego czynnika transkrypcji TFIIIF [66]. Ponadto TFIIB specyficznie oddziałuje z BRE<sup>u</sup>, stabilizując kompleks TBP/TFIIB/DNA na kasecie TATA i stymulując transkrypcję [84].

Co ciekawe, BRE<sup>u</sup> może działać także jako element supresorowy. Oddziaływanie TFIID z BRE<sup>u</sup> promotora AdML powodowało zahamowanie transkrypcji. Natomiast pod wpływem fuzyjnego białka aktywatorowego Gal4-VP16 dochodziło do osłabienia oddziaływania TFIIB z supresorowym elementem BRE<sup>u</sup> i aktywacji transkrypcji. Pełny mechanizm tej aktywacji nie jest znany [86]. Specyficzne, zależne od TBP, oddziaływanie TFIIB zaobserwowano także z elementem BRE<sup>d</sup> promotora adenowirusa E4 [5]. W tym przypadku oddziaływanie TFIIB z elementem BRE<sup>d</sup> wspomnianego promotora wpływało pozytywnie na poziom transkrypcji. Inne eksperymenty wykazały, że BRE<sup>d</sup> wpływał także hamująco na poziom aktywacji transkrypcji pod wpływem Gal4-VP16. Zjawisko to zaobserwowano dla promotorów AdML oraz promotora ludzkiej kinazy białkowej hRIPK3 (ang. *receptor-interacting serine-threonine kinase 3*).

## TFIIIF

TFIIIF wyizolowano z grasicy cielęcej oraz z ludzkich i mysich linii komórkowych, jako heterokompleks złożony z dwóch podjednostek RAP30 oraz dwóch podjednostek RAP74 (ang. *RNA polymerase II – associated proteins*). TFIIIF jest białkiem wielofunkcyjnym w procesie składania PIC. Czynnikiem ten bezpośrednio oddziałuje z RNAP II. Wykazano na przy-

kładzie białka drożdżowego, że podjednostka RAP74 oddziałuje z podjednostkami RPB4/RPB7 oraz z podjednostką RPB9 RNAP II. Ponadto stwierdzono, że podjednostka RAP30 ludzkiego TFIIF oddziałuje z podjednostką RPB5 RNAP II. Z tych i innych informacji wyciągnięto wnioski, że oddziaływanie TFIIF z RNAP II ułatwia przyłączenie polimerazy do związanego z promotorem kompleksu TFIID/TFIIB. TFIIF zwiększa specyficzność RNAP II, zapobiegając wiązaniu polimerazy do przypadkowej, niepromotorowej sekwencji DNA [66]. Wspólnie z TFIIB oraz RNAP II uczestniczy w selekcji tsp. Oprócz zwiększenia specyficzności RNAP II względem promotora, TFIIF wzmacnia także powinowactwo RNAP II do kompleksu TBP/TFIIB/promotor. Powstały kompleks TBP/TFIIB/RNAPII/TFIIF zapobiega działaniu represorów transkrypcji. Stwierdzono bowiem, na przykładzie represora E2 wirusa HPV, że wpływał on supresorowo na promotor E6, gdy w układzie był obecny kompleks TFIID (TBP)/TFIIB/RNAP II/promotor, a brakowało TFIIF, natomiast dodanie TFIIF znosiło efekt supresorowy E2. Po utworzeniu kompleksu TBP/TFIIB/RNAP II/TFIIF, TFIIF bierze udział w rekrutacji kolejnych GTF: TFIIE i TFIIH [66]. Co ciekawe, TFIIF ułatwia też opuszczenie miejsca startu transkrypcji przez RNAP II i tym samym zwiększa wydajność elongacji transkrypcji.

#### TFIIE

Po utworzeniu kompleksu TFIID/TFIIB/RNAP II/TFIIF następnym etapem w tworzeniu PIC jest przyłączenie TFIIE. TFIIE jest heterotetramerem, złożonym z dwóch podjednostek  $\alpha$  (56 kDa) i  $\beta$  (34 kDa). Koniec N TFIIE $\alpha$  odpowiada za oddziaływanie RNAP II, stymulację fosforylacji CTD przez TFIIH, a także za przejście z etapu inicjacji do etapu elongacji. Domena C-końcowa natomiast bierze udział w przyłączaniu TFIIH do PIC. TFIIE stymuluje aktywność ATPazy, kinazy CTD i helikazy DNA czynnika TFIIH (patrz niżej), prowadząc do powstania kompleksu gotowego do inicjacji transkrypcji. Odpowiada on za rozplecenie DNA w obszarze promotora oraz za przejście do etapu elongacji transkrypcji. TFIIE jest przyłączany do PIC przy udziale aktywatorów transkrypcyjnych na przykład białka *Krueppel*, czy też białek homeodomenowych *Antennapedia* i *Abdominal-B* [47].

#### TFIIH

Czynnik TFIIH (nazywany także BTF2) jest przyłączany do PIC przy współudziale TFIIE [87]. Posiada on trzy różne aktywności enzymatyczne kluczowe dla transkrypcji: kinazy CTD, zależnej od ATP helikazy, ATPazy zależnej od DNA. TFIIH uczestniczy zarówno w transkrypcji, jak i naprawie uszkodzonego DNA [47]. Jest kompleksem zbudowanym z 10 podjednostek: p89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, P38/Cyklina H, p34 i p32/MAT1, P8/TFB5. Pod względem funkcjonalnym TFIIH można podzielić na dwa kompleksy: kinazy CAK (ang. *cyclin-activating kinase*) i kompleks rdzeniowy. Oba kompleksy łączą helikaza XPD, pełniąc także funkcję strukturalną.

CAK, złożony z CDK7, cyklina H, MAT1 odpowiada za fosforylację reszty seryny 5 CTD RNAP II. Fosforylacja fragmentu CTD indukuje przejście z etapu inicjacji transkrypcji do etapu elongacji. Potwierdza to obserwacja, że podczas składania PIC RNAP II występuje w formie IIA (hipofos-

forylowanej), natomiast opuszcza promotor jako forma IIO (hiperfosforylowana). Oprócz fosforylacji CTD, TFIIH fosforyluje również aktywatory transkrypcji na przykład białko p53, receptor kwasu *trans* retinowego  $\alpha$  i  $\gamma$  (RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ ) oraz PC4 (ang. *positive cofactor 4*) [47].

Kompleks rdzeniowy zawiera helikazę XPB i białka p62, p52, p44 i p34. Kompleks ten uczestniczy w procesie przemieszczenia RNAP II względem promotora, opuszczenia jego sekwencji i warunkuje przejście z inicjacji do elongacji. TFB5 stabilizuje strukturę rdzenia czynnika TFIIH, co wykazano zarówno w komórkach drożdży jak i człowieka. Aktywność ATPazowa TFIIH zależna od DNA wpływa na otwarcie promotora oraz syntezę pierwszego wiązania fosfodiestrowego [88]. Pod nieobecność TFIIH RNAP II przerywa elongację w pobliżu promotora, co prowadzi do powstania niedokończonych transkryptów (ang. *abortive transcription*). TFIIH w obecności ATP zmniejsza tę tendencję, co wskazuje na jego bezpośrednie zaangażowanie w opuszczanie promotora przez RNAP II [89].

Kompleks TFIIH zawiera dwie helikazy, XPB oraz XPD, które rozwijają DNA odpowiednio w kierunku  $3' \rightarrow 5'$  i  $5' \rightarrow 3'$  i uczestniczą w procesach naprawczych DNA [47]. Proces naprawczy polega m.in. na wycięciu uszkodzonej sekwencji i zastąpieniu jej sekwencją prawidłową na podstawie sekwencji nici komplementarnej. Proces ten określa się jako NER (ang. *nucleotide excision repair*). Stwierdzono, że mikroinjekcja TFIIH do ludzkich komórek mutantów XPD i XPB powodowała „naprawę” fenotypu pozbawionego funkcji naprawczych. Inne z kolei badania wykazały, że w procesie naprawczym DNA biorą udział także podjednostki TFIIH: p62, p52 i p44. Zaobserwowano, że geny aktywne transkrypcyjnie ulegają preferencyjnie mechanizmowi naprawczym. Wszystkie te obserwacje popierają tezę, że TFIIH uczestniczy zarówno w transkrypcji, jak i naprawie uszkodzonego DNA [47].

Ponieważ proces naprawy uszkodzonych genów nie zawsze przebiega z dostateczną wydajnością, dlatego dochodzi do aktywacji systemu blokującego transkrypcję. Jak wykazano na przykładzie komórek drożdżowych, dzieje to się przy pomocy czynnika Ssl1 oraz jego aktywatora Tfb1, wchodzących w skład TFIIH. Ssl1 jest homologiem ludzkiego p44, natomiast odpowiednikiem Tfb1 jest MAT1. Ssl1 posiada aktywność ligazy ubikwityny E3. Przypuszcza się, że specyficzna ubikwitynlacja aktywatorów uszkodzonych genów zapobiega ich ekspresji [90].

#### DYSTALNE ELEMENTY REGULATOROWE

W niniejszym rozdziale ze względu na wielką różnorodność funkcjonalną czynników aktywujących lub hamujących ekspresję genów omówiono jedynie kilka przykładów ich działania.

#### ELEMENTY WZMACNIAJĄCE I AKTYWATORY GENÓW

Elementy wzmacniające (ang. *enhancers*) wiążą regulatory transkrypcji, którymi mogą być nie tylko czynniki aktywujące transkrypcję, ale też ich represory [91]. Poszczególne elementy wzmacniające, zorganizowane w większe regiony i obejmujące zbiór regulatorów transkrypcji, tworzą *en-*

*hanceosom*. Utworzenie *enhanceosomu* umożliwia obniżenie stężenia aktywatorów w komórce, przy zachowaniu szerokiego spektrum regulacji transkrypcji. Zlokalizowane są one nawet w odległości rzędu kbp od tsp [92] i obejmują odcinki około 200-1000 pz, aczkolwiek najlepiej opisany *enhanceosom* interferonu beta zawiera jedynie 65 pz. Zazwyczaj zorganizowane są one w klasterzy miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne o różnym powinowactwie. W wyniku specyficznych oddziaływań: białko–ligandy–DNA komunikują się z otoczeniem wewnątrzkomórkowym, przez co mogą je analizować, a następnie wpływać na ekspresję genów. Wraz z przyłączonymi białkami tworzą więc nadrzędny, w odniesieniu do promotorów indywidualnych genów, system regulatorowy. Dzięki funkcjonowaniu w oparciu o kooperatywne oddziaływanie składników, już niewielkie zmiany ich stężenia prowadzą do sygnału „tak” lub „nie”. *Enhanceosomy* działają także na zasadzie dość fleksyjnie rozmieszczonych, niezależnych miejsc wiążących powodując, że zmiany aktywności transkrypcyjnej uzależnionych od nich genów przebiegają stopniowo. Mechanizm analizy i przetwarzania informacji przez poszczególne *enhanceosomy* jest nieznan.

Kluczowymi elementami ich budowy są specyficzne aktywatory. Wiążą się one do elementów wzmacniających, a także do sekwencji UAS (ang. *Upstream Activated Sequences*) [92] położonych w sąsiedztwie tsp. Są specyficzne w stosunku do genów lub rodzin genów i „dopasowują” poziom ich ekspresji do warunków fizjologicznych komórek. Z drugiej strony wiele genów w genomie ulega aktywacji wskutek działania tych samych aktywatorów. Stwarza to możliwość koordynowania mechanizmów kontroli całych zestawów genów. Aktywatory mają budowę modułową z domeną wiążącą DNA oraz domeną aktywacyjną.

Przykładem białek aktywatorowych są białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*), które przenoszą sygnały od czynnika wzrostu, czynnika NF- $\kappa$ B, a także od receptorów jądrowych hormonów [93,94]. Białka STAT mogą ulegać fosforylacji przez kinazę receptora tyrozylowego lub kinazę JAK (ang. *Janus kinase*), co wywołuje ich dimeryzację i import do jądra komórkowego, a następnie aktywację transkrypcji wielu genów. Również NF- $\kappa$ B pozostaje w cytoplazmie nieaktywny wskutek zasocjowania z podjednostką inhibitorową I $\kappa$ B. Dopiero fosforylacja i następująca po niej proteoliza I $\kappa$ B pozwala aktywatorowi NF- $\kappa$ B przyjąć formę aktywną i zmienić lokalizację na jądrową. W odmienny sposób działają receptory jądrowe hormonów (II klasy), na przykład receptory hormonów tarczycy (TR) oraz kwasu 9-*cis*-retinowego (RXR), które pozostają w stałej asocjacji z genami docelowymi i wymagają jedynie wiązania hormonu (liganda), aby uaktywnić proces transkrypcji.

Aktywatory transkrypcji współdziałają z kompleksami modyfikującymi chromatynę np. rearanżującym kompleksem Swi/Snf i acetylującym SAGA. Stwierdzono, że acetylazy histonów są składnikami wielu koaktywatorów transkrypcji. Przykładem znaczenia aktywatorów w mobilizacji kompleksów modyfikujących chromatynę są badania *in vivo* nad aktywacją drożdżowego genu *HO*. We wspomnianym przypadku aktywator transkrypcji Swi5 wiąże kompleksy Swi/Snf oraz SAGA. Następnie przyłączany jest kolejny aktywator SBF i aparat inicjujący transkrypcję [95].

Jest wiele dowodów świadczących o tym, że aktywatory transkrypcji regulują proces przyłączania do promotorów podstawowego aparatu transkrypcyjnego RNAP II [50]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano bezpośrednio wiązanie między domeną aktywacyjną a składnikami aparatu transkrypcyjnego. Ponadto aktywatory zwiększają procesywność RNAP II, co zaobserwowano w przypadku Tat, aktywatora transkrypcji HIV-1 [96]. Co więcej, istnieją aktywatory zwiększające szybkość elongacji łańcucha mRNA w wyniku działania RNAP II, najprawdopodobniej wpływając na szybkość uwalniania promotora i procesywność RNAP II. Niektóre aktywatory zwiększają liczbę cykli transkrypcji przez ułatwianie procesu reinicjacji [50], stabilizując kompleks transkrypcyjny po opuszczeniu promotora [97].

## NADRODZINA RECEPTORÓW JĄDROWYCH (NR)

Nadrodzina NR obejmuje szeroką grupę białek. Zazwyczaj zaliczane są do aktywatorów genów, aczkolwiek ich funkcje zależą od wielu czynników. Ich potranslacyjne modyfikacje [98], wiązanie ligandów, a także współdziałanie pomiędzy NR i microRNA [99] są odpowiedzialne za czasowo-przestrzenną regulację ekspresji genów. Do nadrodziny NR należą receptory, które wiążą hormony sterydowe i ich pochodne (kwasy żółciowe), kwasy tłuszczowe i ich metabolity (prostaglandyny, fosfatydylocholinę), pochodne aminokwasów (tyroidowe hormony), farnesolu, kwasu retinowego oraz tzw. sieroce, dla których ligandy nie są znane. Kontrolują rozwój, różnicowanie oraz metaboliczną homeostazę organizmu. Z punktu widzenia ewolucyjnego tworzą 6 podrodziny powstałych w wyniku duplikacji genów [100], natomiast pod względem organizacji NR i zdolności do dimeryzacji wyróżnia się 3 klasy [101]. Klasa I wiązana jest w postaci homodimerów do RE o strukturze palindromowej lub odwróconych palindromów, oddzielonych od siebie trójnukleotydowymi odstępnikami. W ich skład wchodzi klasyczne receptory sterydowe kręgowców (estrogenowe, androgenowe, progesteronowe, mineralokortykoidy i glukokortykoidowe). Bez liganda, za wyjątkiem receptora estrogenowego, zlokalizowane są zazwyczaj w cytozolu, w kompleksie z białkami szoku cieplnego. Wiązanie liganda powoduje dysocjację kompleksu, przemieszczenie receptora do jądra, związanie do RE, a następnie aktywację docelowych genów. Receptory klasy II wiążą się do heksanukleotydowych, bezpośrednio powtórzonych (DR) elementów, przedzielonych 1–5 nt odstępnikami, tworząc hetrodimery z receptorem retinoidowym (RXR). Ta grupa obejmuje endokrynalne receptory (tyroidowe, kwasu retinowego). Obecne są głównie w jądrze i występują w kompleksie z odpowiednim represorem. Po aktywacji ligandem tracą represor i wchodzi w skład kompleksu transkrypcyjnego uruchamiając ekspresję genów. Do klasy II należą też niektóre receptory sieroce. Ogólnie grupa ta jest „czujnikiem” stanu metabolicznego komórki. Białka te wiążą z niskim powinowactwem metabolity, których stężenie jest względnie wysokie i z dużym powinowactwem te, których stężenie w komórce jest niskie. Klasa III obejmuje m.in. receptory spokrewnione z estrogenowymi (np.: czynnik steroidogeniczny 1 i tzw. Rev-Erb). Wiążą się one w postaci monomerów lub dimerów do heksanukleotydowych DR. Grupa ta składa się głównie z receptorów sierocy.

Wspólną cechą nadrodziny NR jest nieustrukturyzowana domena regulatorowa zlokalizowana na aminowym końcu oraz ustrukturyzowana domena wiążąca DNA (DBD), złożona z około 66 reszt. Na aminowym końcu domeny DBD znajdują się główne elementy rozpoznające RE: palec cynkowy oraz *P-box* wchodzący w skład pierwszej  $\alpha$ -helisy. Dalej znajduje się *D-box*, palec cynkowy i druga  $\alpha$ -helisa, prawie prostopadle skierowana do pierwszej stabilizując strukturę DBD. *D-box* uczestniczy w dimeryzacji. Kolejnym elementem jest nieustrukturyzowany fragment zawiasowy pełniący funkcję w oddziaływaniu z kofaktorami. Zawiera on elementy kierujące białko do jądra. Jego sumoilaacja zmienia skład kompleksu transkrypcyjnego, wpływając na losy NR i transkrypcję wielu genów [102]. Na karboksylowym końcu NR znajduje się ustrukturyzowana domena wiążąca ligand (LBD) złożona z 11-13  $\alpha$ -helis i 1-3  $\beta$ -wstążek. Struktury 3D DBD i LBD zostały poznane dla wielu NR. Właściwości poszczególnych domen zebrano w tabeli 4.

NR steroidowych hormonów owadów, którymi zajmujemy się w naszym zespole badawczym, mają podobną budowę. Na przykład receptor ekdyzonowy (EcRB1) z *Drosophila melanogaster*, zbudowany z 878 reszt aa, zawiera na aminowym końcu tzw. fragment nieustrukturyzowany AB, rozpoznający maszynę transkrypcyjną, następnie ustrukturyzowaną, chociaż fleksyjną domenę C wiążącą DNA (DBD), element zawiasowy D, a dalej ustrukturyzowaną domenę E wiążącą ligand i na karboksylowym końcu olbrzymi fragment F (200 aa) nieustrukturyzowany, którego rola jest niejasna [103]. Jego partner, Usp (sierocy receptor) o podobnej organizacji modułów strukturalnych nie posiada fragmentu F. Funkcjonalny receptor ekdysteroidowy złożony jest z EcR i USP, przy czym USP wiąże się z połową 5', a EcR z połową 3' pseudopalinodromowej sekwencji RE z jednonukleotydowym odstępkiem [104]. EcR, wiążąc się do elementu odpowiedzi na 20E w promotorze genu *lsp27*, aktywuje transkrypcję również w sposób niezależny od USP [105]. Receptory EcR i USP, w komórkach ssących COS-7, CHO-K1 i HeLa mają różną lokalizację: jądrową dla USP oraz lokalizację zarówno cytoplazmatyczną jak i jądrową EcR. Co więcej, jednoczesna obecność w komórce obu receptorów wywoływała ich kolokalizację w jądrze komórkowym, dowodząc, że USP indukuje jądrowe położenie EcR [106]. Mechanizmy rządzące porządkowaniem się nieustrukturyzowanych fragmentów w wyniku wiązania odpowied-

nich partnerów, wewnątrzcząsteczkowego komunikowania się domen i przekazywania informacji na maszynę transkrypcyjną są obecnie badane. Miejsce wiązania NR na dsDNA jest zazwyczaj odległe od tsp. Na przykład jedno z funkcjonalnych miejsc wiązania USP na promotorze genu *jhbp* jest w odległości około 1000 pz od tsp [107]. Stąd dość powszechny jest pogląd, że łańcuch DNA ulega odpowiedniemu odkształceniu podczas transkrypcji regulowanej NR. Szczegółowy mechanizm, w którym na odległym od tsp fragmencie DNA powstaje kompleks preinicjacyjny z białkami receptora jądrowego, a który oddysocjowuje od RE i rozpoznaje promotor rdzeniowy, jest nadal niepoznany.

#### ELEMENTY HAMUJĄCE I REPRESORY GENÓW

Do elementów DNA hamujących transkrypcję należą elementy URS (ang. *Upstream Repressing Sequences*) oraz elementy wyciszające (ang. *silencers*). Elementy URS są wiązane przez represory, których mechanizm działania jest różnorodny. Obejmuje on ingerencję w wiązanie aktywatorów, zapobieganie rekrutacji aparatu transkrypcyjnego przez aktywatory oraz modyfikację struktury chromatyny. Nie zawsze wiadomo, czy represor występuje w postaci kompleksu z innymi białkami i został jedynie „złożony” na elemencie wyciszającym, czy też jest produktem genu uruchomionego przez element wyciszający. Represory dzielą się na specyficzne oraz niespecyficzne genowo. Niespecyficzne represory funkcjonują w wyniku oddziaływania m.in. z TBP [50]. Na przykład Mot1 hamuje transkrypcję genów II klasy (ulegających transkrypcji w wyniku działania RNAP II), powodując dysocjację kompleksu DNA/TBP w sposób zależny od ATP [108]. Innym negatywnym regulatorem jest NC2 (znany także pod nazwą Dr1/DRAP1), który, wiążąc się do TBP, blokuje oddziaływanie między TBP a TFIIA i TFIIB uniemożliwiając wejście czynników w transkrypcyjny kompleks inicjacyjny [30].

Wiele genowo-specyficznych represorów działa przez wiązanie do aktywatorów, bądź też przez konkurowanie o miejsce wiązania aktywatora do DNA. Na przykład białko opiekuńcze Hsp90, wiążąc aktywator transkrypcyjny – czynnik szoku cieplnego 1 (ang. *heat shock factor 1*, HSF1), zapobiega homotrimeryzacji HSF1 wymaganej do wiązania specyficznego elementu szoku cieplnego i aktywacji transkrypcji [109]. Kolejnym przykładem białka represorowego jest białko Gal80, wpływające na transkrypcję wskutek wią-

Tabela 4. Właściwości domen wchodzących w skład receptorów jądrowych. Opracowano na podstawie [101].

Domena końca N (NTD)	Domena wiążąca DNA (DBD)	Rejon zawiasowy	Domena bliska karboksylowego końca, wiążąca ligand (LBD)
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ wysoce nieustrukturyzowana</li> <li>■ niezależna od liganda</li> <li>■ funkcja aktywacyjna (AF1)</li> <li>■ oddziaływanie z kofaktorami</li> <li>■ główne miejsce modyfikacji potranslacyjnych</li> <li>■ zapewnienie stabilności receptora</li> <li>■ allosteryczna</li> <li>■ modulacja struktury</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ struktura 3D wysoce zachowana</li> <li>■ wysoce ustrukturyzowana</li> <li>■ wiązanie DNA</li> <li>■ funkcja dimeryzacyjna (słaba)</li> <li>■ miejsce modyfikacji potranslacyjnych</li> <li>■ modulacja struktury w wyniku oddziaływań allosterycznych</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ struktura niezachowana</li> <li>■ nieustrukturyzowana</li> <li>■ o dużej plastyczności</li> <li>■ sygnał eksportu jądrowego (NES)</li> <li>■ sygnał lokalizacji jądrowej (NLS)</li> <li>■ miejsce modyfikacji potranslacyjnych</li> <li>■ oddziaływanie z kofaktorami</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ struktura zachowana</li> <li>■ wysoce ustrukturyzowana</li> <li>■ zależna od liganda funkcja aktywacyjna (AF2)</li> <li>■ funkcja dimeryzacyjna (silna)</li> <li>■ oddziaływanie z kofaktorami</li> <li>■ allosteryczna modulacja struktury</li> <li>■ sygnał lokalizacji jądrowej (NLS)</li> <li>■ miejsce modyfikacji potranslacyjnych</li> </ul>

zania domeny aktywacyjnej czynnika Gal4 [50]. Przykładem białka represorowego konkurującego z aktywatorem (ATF/CREB) o miejsce wiążące na DNA, jest represor Acr1 [110]. Do genowo-specyficznych represorów należą także kofaktory takie jak Ssn6-Tup1, które rekrutowane do promotorów przez specyficzne czynniki wiążące DNA, hamują transkrypcję wskutek oddziaływania z podstawowym aparatem transkrypcyjnym bądź chromatyną [111].

Elementy wyciszające to elementy promotora hamujące transkrypcję w sposób niezależny od ich orientacji i położenia [50]. Do elementów wyciszających zalicza się elementy E i I, znajdujące się w regionach wyciszonych kaset koniugacyjnych chromosomu III *S. cerevisiae* - loci HMR (ang. *Hidden MAT Right*) i HML (ang. *Hidden MAT Left*) (Ryc. 8). Decydują one o zmianie typu płciowego drożdży ( $\alpha$  lub  $a$ ). Elementy E i I zawierają miejsca wiązania czynników Rap1, Abf1 oraz kompleks białek inicjujących replikację DNA (ang. *origin recognition complex*, ORC) i są kluczowe w wyciszaniu transkrypcji przez białka Sir (ang. *Silencing information regulators*) [112-114].

Jak wynika z powyższego dziewięć dotychczas rozpoznanych rdzeniowych elementów regulatorowych wraz z dystalnymi elementami *cis* i *trans* sprawia, że poszczególne promotory realizują specyficzny w czasie i przestrzeni program transkrypcji genów. Jego poznanie w dużej mierze zależy od strategii przyjętych metod eksperymentalnych i zrozumienia ich ograniczeń.

## FUNKCJONALNE ELEMENTY REGULATOROWE – WSKAZÓWKI METODYCZNE

### KWASY DEZOKSYRYBONUKLEINOWE

Metody stosowane w biologii molekularnej są przedmiotem wielu opracowań i je pominiemy. Pytaniem, przed jakim staje badacz zaczynający doświadczenia jest to, jaka powinna być optymalna strategia identyfikacji sekwencji regulatorowych. Odpowiedź nie jest jednoznaczna. Wynikać będzie z subiektywnych preferencji i doświadczenia badacza. Ogólnie rzecz biorąc, poszukiwanie przebiegać winno od analizy numerycznej sekwencji genu (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>), która wskaże znane elementy o potencjalnej funkcji. Pierwszym doświadczalnym krokiem zmierzającym do wykazania ich funkcjonalności mogą być testy EMSA z użyciem znakowanych sond (~30 pz), zawierających potencjalne sekwencje regulatorowe. W wyniku specyficznego oddziaływania sondy z białkiem powstaje kompleks o ruchliwości elektroforetycznej mniejszej od wolnej sondy. Zawartość ilościowa kompleksu i wiedza na temat ilości dodanej sondy, umożliwia oszacowanie  $K_d$  kompleksu. Innym podejściem jest opisywany w podręcznikach *footprinting*, który umożliwia zgrubne wskazanie odcinka DNA obsadzonego przez białko regulatorowe. Technika ta ma tę zaletę, że umożliwia odkrycie nieznanymi elementami regulatorowymi, czego przykładem może być znalezienie w naszym laboratorium nowego elementu wiążącego receptor ekdysteroidowy [107]. Godną polecenia metodą wskazania RE jest wykorzystanie tzw. latarni molekularnych [115]. Polega ona na detekcji odtworzenia sekwencji regulatorowej w wyniku łączenia dwóch odcinków ds DNA pod wpływem białka rozpoznającego pełną sekwencję. Fragmenty te zazna-

zione fluorescencyjną parą donor-akceptor, w wyniku FRET, w miarę zbliżania się do siebie zmieniają właściwości spektroskopowe. Latarnie molekularne zostały wykorzystane przez nas do analizy kąta deformacji cząsteczek DNA pod wpływem receptorów jądrowych [116].

Aby jednak wskazać dokładnie, które zasady w cząsteczce DNA biorą udział w specyficznym wiązaniu białka należy skorzystać z analizy mutacyjnej. Natomiast dla wskazania grup funkcyjnych zasad uczestniczących w specyficznym rozpoznawaniu reszt aminokasowych można posłużyć się wysokorozdzielczym *footprintingiem* i/lub analizą NMR [117]. Warto podkreślić, że otrzymane tą drogą informacje nie dają odpowiedzi, czy element DNA specyficznie oddziałujący z wybranym białkiem pełni jakąkolwiek rzeczywistą funkcję w regulacji transkrypcji badanego genu w konkretnej tkance (komórce). Kolejnym krokiem są testy transkrypcyjne. Przeprowadzane *in vitro* umożliwiają kontrolowanie składu czynników transkrypcyjnych i wskazanie ich indywidualnej roli w procesie transkrypcji badanego genu. Są one niekiedy krytykowane za zbytne odejście od warunków natywnych. Stąd stało się dość powszechne prowadzenie doświadczeń *in vivo* na liniach komórkowych transfekowanych plazmidami zawierającymi dwa geny reporterowe, lucyferazy z krewetki i ze świetlika. Pierwszy pozostaje pod kontrolą badanej sekwencji regulatorowej, a drugi natomiast pod kontrolą wzorcowej sekwencji promotrowej. W ten sposób analiza ekspresji dwóch genów reporterowych zapewnia wewnętrzną standaryzację aktywności transkrypcyjnej. Metoda eliminuje także niedoskonałości eksperymentalne, wynikające na przykład z różnej wydajności transfekcji komórek. Należy jednak wciąż pamiętać, że funkcja znalezionych RE ściśle zależy od kontekstu otaczających je czynników transkrypcyjnych. Przykładem jest zaobserwowanie m.in. w naszym laboratorium odmiernej wrażliwości promotora genu *jhbP* na działanie hormonu juvenilnego (JH) w komórkach High Five i Sf9 [118].

### BIAŁKA

Możemy wyróżnić czynniki transkrypcyjne, które wchodzą w skład kompleksów transkrypcyjnych, lecz nie rozpoznają DNA oraz te, które bezpośrednio oddziałują z RE. Specjalistyczny protokół analizy NR może być w tym względzie pomocny [119]. Naczelnym zadaniem dla zrozumienia mechanizmu kontroli ekspresji genów jest poznanie supramolekularnej budowy kompleksów transkrypcyjnych. Często zdarza się, że znajdujemy odcinek regulatorowy DNA. Wówczas podanie sekwencji białka pełniącego funkcję supresora (aktywatora) na tym fragmencie jest pierwszoplanowym zadaniem. Jeśli nie mamy żadnych przesłanek dla jego wytypowania, możemy posłużyć się tzw. metodą jednohybrydową, której opis podawany jest przez producenta odczynników. Dzięki niej znaleźliśmy na odcinku rdzeniowym promotora *jhbP* białko o nazwie WDS o funkcji supresorowej [118].

Do wykrywania wewnątrzkomórkowych oddziaływań pomiędzy białkami używana jest często metoda dwuhybrydowa, której zasady opisane są w podręcznikach. Wskaźnikiem oddziaływania jest ilość powstałego transkryptu (białka) reporterowego. Ostatnio opracowano układ oparty o nadprodukcję dwóch białek fuzyjnych (ofiary i przynęty),

które tworząc między sobą kompleks odtwarzają dołączonymi, komplementarnymi fragmentami centrum katalitycznej lucyferazy [120]. Emitowane fotony umożliwiają monitorowanie oddziaływań w czasie oraz wyznaczenia  $K_d$ . Metoda pozwala na jednoczesne śledzenie oddziaływań między kilkoma białkami przy różnych długościach fali.

Poważną wadą tych metod jest zwykle niekontrolowana nadekspresja genów kodujących białka fuzyjne. W takich warunkach mogą powstać kompleksy praktycznie niewystępujące przy rzeczywistych stężeniach czynników transkrypcyjnych w komórce, a więc niefunkcjonalne, pomimo pozytywnego wyniku testu dwuhybridowego, lucyferazowego czy fluorescencyjnego. W ostatnich latach opracowano kilka znaczących zmian pozwalających na uzyskiwanie bardziej wiarygodnych wyników. Na uwagę zasługuje praca opisująca wykorzystanie zmian konformacyjnych światłoczułego białka roślinnego do konstrukcji m.in. molekularnego przełącznika transkrypcji genów [121]. Jej atutem jest niemal natychmiastowa inicjacja transkrypcji wskutek naświetlenia oraz możliwość wyłączenia transkrypcji po zaprzestaniu naświetlania (~10 minut), a także możliwość wykonywania kolejnych po sobie cykli włączenia i wyłączenia ekspresji badanego genu. Według naszej wiedzy takimi możliwościami *in vivo* nie dysponowała dotąd żadna z metod kontroli ekspresji genów.

Opracowano też nowe metody dające wgląd w budowę i skład supramolekularnych kompleksów regulujących transkrypcję genów w warunkach nieomal identycznych do tych, jakie występują w komórkach niepoddanych manipulacji genetycznej. Na szczególną uwagę zasługuje metoda oparta o tzw. chromatografię powinowactwa tandemowego [122]. Po raz pierwszy zastosowana na wielką skalę umożliwiła opisanie składu ponad 230 supramolekularnych kompleksów występujących w komórkach drożdżowym, z czego część była zupełnie nieznaną [123]. Metoda ta, początkowo opracowana dla komórek drożdży, wykorzystuje rekombinację homologiczną dla wymiany informacji genetycznej. Polega ona na zastąpieniu sekwencji badanego białka jego nową sekwencją, różniącą się od poprzedniej o dwie następujące po sobie sekwencje - "plakietki" na końcu aminowym lub karboksylowym. Wykorzystywane są one przy jego izolacji i dają się kolejno usuwać w trakcie oczyszczania. W ten sposób ekspresja genu badanego białka jest pod kontrolą oryginalnego, natywnego promotora w oryginalnej komórce. Selektywne wyodrębnienie powstałego białka następuje w dwóch etapach chromatografii powinowactwa na złożach rozpoznających „plakietki”. Ponieważ izolację przeprowadza się w warunkach niemal identycznych do tych, jakie występują w komórce, stąd białko zostaje otrzymane w postaci olbrzymiego kompleksu, którego skład wynika z własnych, a nienarzuconych mechanizmów regulatorowych. Obecnie zasada chromatografii powinowactwa tandemowego została zaadoptowana do innych organizmów. Uzyskane kompleksy, analizowane współczesnymi narzędziami proteomiki z MS włącznie, są źródłem bezcennych informacji. Pozwalają na analizę sekwencji zdarzeń, jakie towarzyszą organizacji kompleksu transkrypcyjnego oraz zrozumienia mechanizmu komunikacji międzycząsteczkowej. Ostatnio opracowano układ u *Drosophila*, posiadający wielki potencjał badawczy umożliwiający dokonanie

tkankowo celowanej wymiany funkcjonalnych fragmentów DNA „*enhancerów*” remodelujących wzór ekspresji genów i, co najważniejsze, może być on przekazany następnemu pokoleniu [124].

Szczupłość miejsca nie pozwala na pełny opis metod stosowanych do analizy promotorów genów, natomiast wybrane przykłady wydają się interesujące i można je polecić.

## PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły olbrzymi napływ informacji o czynnikach transkrypcyjnych, elementach regulatorowych i roli, jaką pełnią one w transkrypcji genów. Jednak część tych informacji stała się trudna do zrozumienia, gdyż te same obiekty zostały objęte różnymi nazwami lub wiedza o nich była ze sobą sprzeczna. W niniejszym opracowaniu staraliśmy się wiedzę tę uporządkować i usystematyzować, zwracając szczególną uwagę na rdzeniowe części promotorów oraz ich współpracę z dystalnymi elementami i ligandami. Aby nasze opracowanie było pełniejsze przedstawiliśmy nie tylko nagromadzone fakty, ale odnieśliśmy się do niektórych metod doświadczalnych i ograniczeń, jakie im towarzyszą.

Należy podkreślić, iż mimo identyfikacji wielu czynników białkowych, roli niekodującego RNA i innych elementów odpowiedzialnych za różnicowanie i rozwój komórek, wiedza dotycząca mechanizmu sterującego promotorami genów daleka jest od satysfakcjonującej. Szczególnie ważne jest poznanie systemu, który dokonuje analizy sygnałów płynących z otoczenia i, w oparciu o uzyskane informacje, podejmuje decyzje o funkcji poszczególnych genów. Rdzeniowe części promotorów stanowią jeden z elementów tego układu. Należy spodziewać się, że w przyszłości zostaną w pełni poznane systemy kontroli informacji zawartych w DNA.

## PIŚMIENNICTWO

1. Zhang Z, Wippo CJ, Wal M, Ward E, Korber P, Pugh BF (2011) A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science* 332: 977-980
2. Juven-Gershon T, Kadonaga JT (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339: 225-229
3. Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH (1998) New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* 12: 34-44
4. Sassone-Corsi P, Corden J, Keding C, Chambon P (1981) Promotion of specific *in vitro* transcription by excised „TATA” box sequences inserted in a foreign nucleotide environment. *Nucleic Acids Res.* 9: 3941-3958
5. Deng W, Roberts SG (2005) A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* 19: 2418-2423
6. Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH, Takada S (2007) The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol* 27: 1844-1858
7. Corden J, Wasyluk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Keding C, Chambon P (1980) Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209: 1406-1414
8. Hultmark D, Klemenz R, Gehring WJ (1986) Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. *Cell* 44: 429-438

9. Purnell BA, Emanuel PA, Gilmour DS (1994) TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev* 8: 830-842
10. Smale ST, Baltimore D (1989) The „initiator“ as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113
11. Parry TJ, Theisen JW, Hsu JY, Wang YL, Corcoran DL, Eustice M, Ohler U, Kadonaga JT (2010) The TCT motif, a key component of an RNA polymerase II transcription system for the translational machinery. *Genes Dev* 24: 2013-2018
12. Lim CY, Santoso B, Boulay T, Dong E, Ohler U, Kadonaga JT (2004) The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18: 1606-1617
13. Burke TW, Kadonaga JT (1996) *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10: 711-724
14. Lee DH, Gershenzon N, Gupta M, Ioshikhes IP, Reinberg D, Lewis BA (2005) Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1. *Mol Cell Biol* 25: 9674-9686
15. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8: 424-436
16. George AA, Sharma M, Singh BN, Sahoo NC, Rao KV (2006) Transcription regulation from a TATA and INR-less promoter: spatial segregation of promoter function. *EMBO J* 25: 811-821
17. Burke TW, Willy PJ, Kutach AK, Butler JE, Kadonaga JT (1998) The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 75-82
18. Smale ST, Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72: 449-479
19. Parker CS, Topol J (1984) A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp 70 gene. *Cell* 37: 273-283
20. Nakajima N, Horikoshi M, Roeder RG (1988) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol* 8: 4028-4040
21. Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66: 563-576
22. Gershenzon NI, Trifonov EN, Ioshikhes IP (2006) The features of *Drosophila* core promoters revealed by statistical analysis. *BMC Genomics* 7: 161
23. Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT (2008) The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 20: 253-259
24. O'Shea-Greenfield A, Smale ST (1992) Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* 267: 6450
25. Chalkley GE, Verrijzer CP (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J* 18: 4835-4845
26. Verrijzer CP, Chen JL, Yokomori K, Tjian R (1995) Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* 81: 1115-1125
27. Burke TW, Kadonaga JT (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 11: 3020-3031
28. Kutach AK, Kadonaga JT (2000) The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20: 4754-4764
29. Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* 290: 982-985
30. Hsu JY, Juven-Gershon T, Marr MT 2nd, Wright KJ, Tjian R, Kadonaga JT (2008) TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes Dev* 22: 2353-2358
31. Goppelt A, Stelzer G, Lottspeich F, Meisterernst M (1996) A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J* 15: 3105-3116
32. Smale ST (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev* 15: 2503-2508
33. Kadonaga JT (2002) The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med* 34: 259-264
34. Juven-Gershon T, Hsu JY, Kadonaga JT (2008) Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor. *Genes Dev* 22: 2823-2830
35. Frith MC, Valen E, Krogh A, Hayashizaki Y, Carninci P, Sandelin A (2008) A code for transcription initiation in mammalian genomes. *Genome Res* 18: 1-12
36. Theisen JW, Lim CY, Kadonaga JT (2010) Three key subregions contribute to the function of the downstream RNA polymerase II core promoter. *Mol Cell Biol* 30: 3471-3479
37. Lewis BA, Kim TK, Orkin SH (2000) A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7172-7177
38. Gershenzon NI, Ioshikhes IP (2005) Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics* 21: 1295-1300
39. Czyz M (2001) Czynniki transkrypcyjny Sp1. *Postepy Biochem* 47: 10-18
40. Butler JE, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16: 2583-2592
41. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994) Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-438
42. Smale ST, Schmidt MC, Berk AJ, Baltimore D (1990) Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4509-4513
43. Juven-Gershon T, Cheng S, Kadonaga JT (2006) Rational design of a super core promoter that enhances gene expression. *Nat Methods* 3: 917-922
44. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Nakamura Y, Suyama A, Sakaki Y, Morishita S, Okubo K, Sugano S (2001) Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11: 677-684
45. Zhang MQ (1998) Identification of human gene core promoters in silico. *Genome Res* 8: 319-326
46. FitzGerald PC, Sturgill D, Shyakhtenko A, Oliver B, Vinson C (2006) Comparative genomics of *Drosophila* and human core promoters. *Genome Biol* 7: R53
47. Thomas MC, Chiang CM (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41: 105-178
48. Kravchenko JE, Rogozin IB, Koonin EV, Chumakov PM (2005) Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin. *Nature* 436: 735-739
49. Werner F (2007) Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Mol Microbiol* 65: 1395-1404
50. Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34: 77-137
51. Cramer P (2002) Multisubunit RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 12: 89-97
52. Young RA (1991) RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 60: 689-715
53. Zehring WA, Greenleaf AL (1990) The carboxyl-terminal repeat domain of RNA polymerase II is not required for transcription factor Sp1 to function *in vitro*. *J Biol Chem* 265: 8351-8353

54. Kim WY, Dahmus ME (1989) The major late promoter of adenovirus-2 is accurately transcribed by RNA polymerases IIO, IIA, and IIB. *J Biol Chem* 264: 3169-3176
55. Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268: 10416-10424
56. Comer FI, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW (2001) Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine. *Anal Biochem* 293: 169-177
57. Chang A, Cheang S, Espanel X, Sudol M (2000) Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275: 20562-20571
58. Somesh BP, Reid J, Liu WF, Sogaard TM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* 121: 913-923
59. Bregman DB, Halaban R, van Gool AJ, Henning KA, Friedberg EC, Warren SL (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11586-11590
60. Gillette TG, Gonzalez F, Delahodde A, Johnston SA, Kodadek T (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5904-5909
61. Mitsui A, Sharp PA (1999) Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6054-6059
62. Gill G (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15: 536-541
63. Conaway RC, Conaway JW (1997) General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56: 327-346
64. Buratowski S, Hahn S, Guarente L, Sharp PA (1989) Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56: 549-561
65. Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*: 2657-2683
66. Reinberg D, Orphanides G, Ebricht R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H, Cortes P, Drapkin R, Flores O, Ha I, Inostroza JA, Kim S, Kim TK, Kumar P, Lagrange T, LeRoy G, Lu H, Ma DM, Maldonado E, Merino A, Mermelstein F, Olave I, Sheldon M, Shiekhattar R, Zawel L (1998) The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 63: 83-103
67. Albright SR, Tjian R (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242: 1-13
68. Cler E, Papai G, Schultz P, Davidson I (2009) Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell Mol Life Sci* 66: 2123-2134
69. Gangloff YG, Sanders SL, Romier C, Kirschner D, Weil PA, Tora L, Davidson I (2001) Histone folds mediate selective heterodimerization of yeast TAF(II)25 with TFIID components yTAF(II)47 and yTAF(II)65 and with SAGA component ySPT7. *Mol Cell Biol* 21: 1841-1853
70. Wright KJ, Marr MT, 2nd, Tjian R (2006) TAF4 nucleates a core sub-complex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12347-12352
71. Bhattacharya S, Takada S, Jacobson RH (2007) Structural analysis and dimerization potential of the human TAF5 subunit of TFIID. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1189-1194
72. Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tora L (1994) Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79: 107-117
73. Robinson MM, Yatherajam G, Ranallo RT, Bric A, Paule MR, Stargell LA (2005) Mapping and functional characterization of the TAF11 interaction with TFIIA. *Mol Cell Biol* 25: 945-957
74. Mengus G, Gangloff YG, Carre L, Lavigne AC, Davidson I (2000) The human transcription factor IID subunit human TATA-binding protein-associated factor 28 interacts in a ligand-reversible manner with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 275: 10064-10071
75. Demeny MA, Soutoglou E, Nagy Z, Scheer E, Janoshazi A, Richardot M, Argentini M, Kessler P, Tora L (2007) Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS One* 2: e316
76. Mengus G, May M, Jacq X, Staub A, Tora L, Chambon P, Davidson I (1995) Cloning and characterization of hTAFII18, hTAFII20 and hTAFII28: three subunits of the human transcription factor TFIID. *EMBO J* 14: 1520-1531
77. Tora L (2002) A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 16: 673-675
78. Coleman RA, Pugh BF (1995) Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA. *J Biol Chem* 270: 13850-13859
79. Coleman RA, Taggart AK, Benjamin LR, Pugh BF (1995) Dimerization of the TATA binding protein. *J Biol Chem* 270: 13842-13849
80. Kou H, Irvin JD, Huisinga KL, Mitra M, Pugh BF (2003) Structural and functional analysis of mutations along the crystallographic dimer interface of the yeast TATA binding protein. *Mol Cell Biol* 23: 3186-3201
81. Kokubo T, Takada R, Yamashita S, Gong DW, Roeder RG, Horikoshi M, Nakatani Y (1993) Identification of TFIID components required for transcriptional activation by upstream stimulatory factor. *J Biol Chem* 268: 17554-17558
82. Liu D, Ishima R, Tong KI, Bagby S, Kokubo T, Muhandiram DR, Kay LE, Nakatani Y, Ikura M (1998) Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell* 94: 573-583
83. Kokubo T, Swanson MJ, Nishikawa JI, Hinnebusch AG, Nakatani Y (1998) The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 18: 1003-1012
84. Wolner BS, Gralla JD (2001) TATA-flanking sequences influence the rate and stability of TATA-binding protein and TFIIB binding. *J Biol Chem* 276: 6260-6266
85. Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7: 689-692
86. Evans R, Fairley JA, Roberts SG (2001) Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev* 15: 2945-2949
87. Gerard M, Fischer L, Moncollin V, Chipoulet JM, Chambon P, Egly JM (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J Biol Chem* 266: 20940-20945
88. Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J* 15: 1666-1677
89. Kugel JF, Goodrich JA (1998) Promoter escape limits the rate of RNA polymerase II transcription and is enhanced by TFIIE, TFIIH, and ATP on negatively supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9232-9237
90. Takagi Y, Masuda CA, Chang WH, Komori H, Wang D, Hunter T, Joazeiro CA, Kornberg RD (2005) Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell* 18: 237-243
91. Arnosti DN, Kulkarni MM (2005) Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J Cell Biochem* 94: 890-898
92. Blackwood EM, Kadonaga JT (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281: 60-63
93. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839
94. Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260
95. Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97: 299-311
96. Garber ME, Jones KA (1999) HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol* 11: 460-465



97. Hahn S (1998) Activation and the role of reinitiation in the control of transcription by RNA polymerase II. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 181-188
98. Wang C, Tian L, Popov VM, Pestell RG (2011) Acetylation and nuclear receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 123: 91-100
99. Eendebak RJ, Lucassen PJ, Fitzsimons CP (2011) Nuclear receptors and microRNAs: Who regulates the regulators in neural stem cells? *FEBS Lett* 585: 717-722
100. Escriva H, Bertrand S, Laudet V (2004) The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40: 11-26
101. Aagaard MM, Siersbaek R, Mandrup S (2010) Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1812: 824-835
102. Treuter E, Venteclef N (2011) Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta* 1812: 909-918
103. Orłowski M, Szyszka M, Kowalska A, Grad I, Zoglowek A, Rymarczyk G, Dobryszczycki P, Krowarsch D, Rastinejad F, Kochman M, Ozyhar (2004) Plasticity of the ecdysone receptor DNA binding domain. *Mol Endocrinol* 18: 2166-2184
104. Niedziela-Majka A, Kochman M, Ozyhar A (2000) Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the hsp27 gene promoter. *Eur J Biochem* 267: 507-519
105. Dela Cruz F, Mak P (1997) *Drosophila* ecdysone receptor functions as a constitutive activator in yeast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62: 353-359
106. Nieva C, Gwozdz T, Dutko-Gwozdz J, Wiedenmann J, Spindler-Barth M, Wieczorek E, Dobrucki J, Duś D, Henrich V, Ozyhar A, Spindler KD (2005) Ultraspiracle promotes the nuclear localization of ecdysteroid receptor in mammalian cells. *Biol Chem* 386: 463-470
107. Sok AJ, Andruszewska G, Niewiadomska-Cimicka A, Grad I, Rymarczyk G, Pajdzik D, Orłowski M, Schmidt MT, Grajek W, Ozyhar A, Kochman M (2008) Regulatory elements in the juvenile hormone binding protein gene from *Galleria mellonella* -topography of binding sites for Usp and EcRDBD. *Biochim Biophys Acta* 1779: 390-401
108. Auble DT, Wang D, Post KW, Hahn S (1997) Molecular analysis of the SNF2/SWI2 protein family member MOT1, an ATP-driven enzyme that dissociates TATA-binding protein from DNA. *Mol Cell Biol* 17: 4842-4851
109. Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N (1998) HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 18: 4949-4960
110. Vincent AC, Struhl K (1992) ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol Cell Biol* 12: 5394-5405
111. Carlson M (1997) Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 1-23
112. Guarente L (1999) Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet* 23: 281-285
113. Rehman MA, Yankulov K (2009) The dual role of autonomously replicating sequences as origins of replication and as silencers. *Curr Genet* 55: 357-363
114. Zou Y, Yu Q, Chiu YH, Bi X (2006) Position effect on the directionality of silencer function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174: 203-213
115. Heyduk T, Heyduk E (2002) Molecular beacons for detecting DNA binding proteins. *Nat Biotechnol* 20: 171-176
116. Dobryszczycki P, Grad I, Krusinski T, Michaluk P, Sawicka D, Kowalska A, Orłowski M, Jakób M, Rymarczyk G, Kochman M, Ozyhar A (2006) The DNA-binding domain of the ultraspiracle drives deformation of the response element whereas the DNA-binding domain of the ecdysone receptor is responsible for a slight additional change of the preformed structure. *Biochemistry* 45: 668-675
117. Storek MJ, Ernst A, Verdine GL (2002) High-resolution footprinting of sequence-specific protein-DNA contacts. *Nat Biotechnol* 20: 183-186
118. Niewiadomska-Cimicka A, Schmidt M, Ozyhar A, Jones D, Jones G, Kochman M (2011) Juvenile hormone binding protein core promoter is TATA-driven with a suppressory element. *Biochim Biophys Acta* 1809: 226-235
119. McEwan LJ (2009) The nuclear receptor superfamily. *UK Humana Press*
120. Villalobos V, Naik S, Bruinsma M, Dothager RS, Pan MH, Samrakandi M, Moss B, Elhammali A, Piwnicka-Worms D (2010) Dual-color click beetle luciferase heteroprotein fragment complementation assays. *Chem Biol* 17: 1018-1029
121. Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL (2010) Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods* 7: 973-975
122. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218-229
123. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-147
124. Gohl DM, Silies MA, Gao XJ, Bhalerao S, Luongo FJ, Lin CC, Potter CJ, Clandinin TR (2011) A versatile *in vivo* system for directed dissection of gene expression patterns. *Nat Methods* 8: 231-237

## Eucaryotic regulation of transcription – a role of core promoter

Anna Niewiadomska-Cimicka, Marian Kochman 

Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Technology, 27 Wybrzeże Wyspiańskiego, 50-370 Wrocław, Poland

 e-mail: marian.kochman@pwr.wroc.pl

**Key words:** transcriptional factors, TAF, regulatory elements, nuclear receptors, transcription

### ABSTRACT

Each gene possesses its individual program of expression. A large part of information defining this program is stored in the core promoter sequence. In this review the diversity of core promoter regulatory elements and their organization into functional units is described. The basic transcription factors and nuclear receptors which cooperate with the core promoter elements are reviewed. The effect of post-translational modification of regulatory proteins on the assembly and function of polymerase initiation complexes is presented. Selected experimental approaches applied for finding functional interactions between regulatory elements and their protein partners are discussed.

Stanisław Kowalczyk

Anna Hetmann

Mariusz Czarnota

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 42, e-mail: ahettmann@umk.pl

Artykuł otrzymano 16 listopada 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 19 stycznia 2011 r.

**Słowa kluczowe:** monomeryczne białka G, transport pęcherzykowy, cytoszkielet

**Wykaz skrótów:** GAP (ang. *GTPase-Activating Protein*) – białko stymulujące aktywność GTPazową białek G; GDF (ang. *GDI Displacement Factor*) – białko wiążące GDI; GDI (ang. *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) – białko hamujące spontaniczną dysocjację GDP oraz uwalniające z błony białko G; GEF (ang. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) – białko wymieniające nukleotydy guanylowe w centrum aktywnym białka G; ICR1/RIP1 (ang. *Interactor of Constitutive Active Rop1/Rop Interactive Partner1*) – białko adaptorowe wiążące białko Sec3 egzocysty z Rop-GTP; PRONE (ang. *Plant-specific Rop Nucleotide Exchanger*) – białko RopGEF wymieniające nukleotydy guanylowe; RCC1 (ang. *Regulator of Chromosome Condensation1*) – białko pełniące funkcję RanGEF; RIC (ang. *Rop-Interactive CRIB-containing proteins*) – rodzina białek adaptorowych pośredniczących w regulowanej przez białka Rop reorganizacji cytoszkieletu; Rop (ang. *Rho of plant*) – roślinne białka podobne do Rho

## STRESZCZENIE

Nadrodzina monomerycznych, małych białek wiążących GTP, w rzodkiewniku (*Arabidopsis thaliana*) kodowanych przez 93 geny, klasyfikowana jest do czterech rodzin: Arf/Sar, Rab, Rop/Rac i Ran. Wszystkie małe białka G funkcjonują jako molekularne przełączniki aktywowane przez GTP i inaktywowane na skutek hydrolizy związanego GTP do GDP i ortofosforanu. Cykliczne przemiany GTP/GDP regulowane są przez trzy klasy białek, a mianowicie: białka wymieniające nukleotydy guanylowe (GEF), białka aktywujące GTPazę (GAP) oraz białka hamujące dysocjację nukleotydu guanylowego (GDI). Białka z rodziny Arf uczestniczą w regulacji transportu błonowego oraz organizacji cytoszkieletu. Białka Arf1 i Sar1 biorą udział w oplaszczaniu pęcherzyków transportujących białkami koatomerowymi COPI i COPII. Białka Rab kierują ruchem pęcherzyków pomiędzy błonami zlokalizowanymi w różnych przedziałach subkomórkowych. Białka Rop/Rac funkcjonują jako elementy pośredniczące pomiędzy błonowymi receptorowymi kinazami serynowo/treoninowymi odbierającymi sygnały ze środowiska zewnątrzkomórkowego a wewnątrzkomórkowymi białkami efektorowymi, którymi są niektóre enzymy, a także białka adaptorowe regulujące organizację cytoszkieletu oraz uczestniczące w cumowaniu pęcherzyków egzocytarnych do błony plazmatycznej. Białka Ran biorą udział w transporcie makrocząstek pomiędzy cytoplazmą a jądrem. Kierunek transportu zapewnia gradient Ran-GDP/Ran-GTP tworzony po obu stronach osłonki jądrowej przez nierównomiernie rozmieszczone białka regulatorowe GEF i GAP.

## WPROWADZENIE

W opublikowanych w ostatnich latach w Postęпах Biochemii pracach przeglądowych poświęconych błonowym receptorom podkreślano brak w roślinach klasycznych tyrozynowych kinaz białkowych, a także zwracano uwagę na niemal marginalny udział w przesyłaniu sygnałów w komórkach roślinnych receptorów sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G typu GPCR [1,2]. Funkcje obu typów receptorów zostały w roślinach przypuszczalnie przejęte przez liczną rodzinę receptorów błonowych o charakterze serynowo/treoninowych kinaz białkowych oraz niewielką grupę receptorów z aktywnością kinaz histydynowo/asparaginianowych [1,3]. W komórkach drożdży i ssaków, funkcje elementów przekaźnikowych pośredniczących w przenoszeniu informacji pomiędzy receptorami błonowymi a wewnątrzkomórkowymi białkami efektorowymi pełni m. in. monomeryczne białka G z dwóch rodzin, a mianowicie Ras i Rho [4-7]. Rośliny, w odróżnieniu od drożdży i ssaków, nie mają białek Ras, a rodzinę białek Rho reprezentuje swoista dla roślin rodzina białek Rop (ang. *Rho of plant*) łączących funkcję białek Ras i Rho [8]. Wyniki stosunkowo nielicznych jeszcze badań pokazują, iż białka Rop oprócz funkcji regulacyjnych w organizacji cytoszkieletu, odgrywają również rolę elementów przekaźnikowych przenoszących sygnały z, co najmniej, niektórych receptorowych serynowo/treoninowych kinaz białkowych na białka efektorowe [8].

Rosnąca w ostatnich latach liczba prac poświęconych endocytarnej internalizacji, recyklingowi oraz wewnątrzkomórkowej relokacji receptorów błonowych [9,10], w tym także badań dotyczących udziału w sygnalizacji komórkowej endosomów [11,12], w roślinach np. w szlaku brasinosteroidowym [13], obliguje do bardziej uważnego śledzenia bieżących publikacji dotyczących monomerycznych białek G. Dzisiaj już wiadomo, że małe białka G z trzech rodzin, a mianowicie Arf/Sar, Rab i Rho (w roślinach Rop) uczestniczą w regulacji niemal wszystkich etapów transportu pęcherzykowego. Białka te funkcjonują w formowaniu w poszczególnych przedziałach komórkowych pęcherzyków transportujących, uczestniczą w sortowaniu transportowanych białek (cargo), wpływają na wybór jednego z wielu możliwych szlaków wewnątrzkomórkowej relokacji pęcherzyków, pośredniczą w wiązaniu pęcherzyków do białek motorycznych przemieszczających pęcherzyki wzdłuż filamentów aktynowych i mikrotubul oraz uczestniczą w cumowaniu, dokowaniu i fuzji pęcherzyków z docelową błoną. Mając na uwadze powyższe fakty, staje się oczywiste, iż poprawna interpretacja wyników badań dotyczących wewnątrzkomór-

kowej relokacji receptorów błonowych, a także wyników najnowszych doświadczeń poświęconych ukierunkowanej relokacji białek transportujących jony [14], czy, co szczególnie interesujące w przypadku roślin, również białek transportujących auksyny [15,16], okazuje się niemożliwa bez uwzględnienia poznawanych obecnie mechanizmów regulacyjnych, w których nadrzędną rolę odgrywają małe białka G. Celem niniejszej pracy było podsumowanie wyników dotychczasowych badań poświęconych funkcjonowaniu monomerycznych białek G w roślinach, ze szczególnym zwróceniem uwagi na rodzinę białek Rop.

## OGÓLNA BUDOWA ORAZ REGULACJA MONOMERYCZNYCH BIAŁEK G

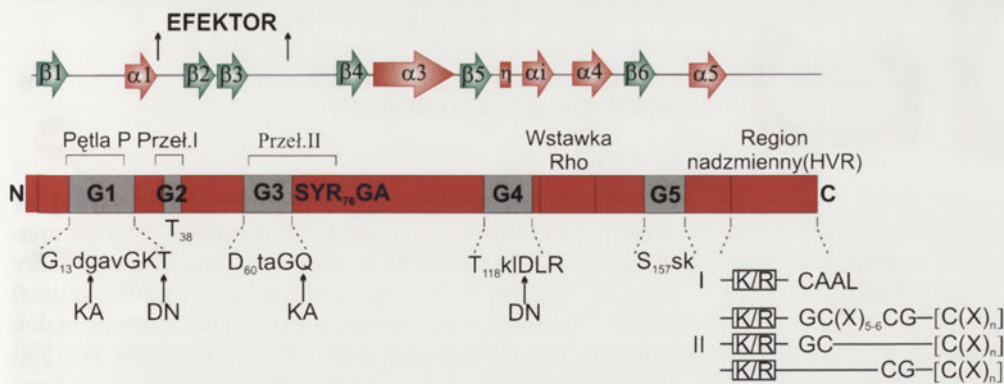
Nadrodzina małych, monomerycznych białek G, licząca u człowieka 174, u wywilżni (muszki owocowej) 90, a w komórkach drożdży 30 białek, dzielona jest na pięć rodzin: Ras, Arf/Sar, Rab, Rho i Ran [4,17]. Genom rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) zawiera 93 geny kodujące monomeryczne białka G, w tym 21 genów *ARF/SAR*, 57 *RAB*, 11 *ROP/RAC* i 4 geny *RAN* [18,19]. W ryżu zidentyfikowano 111 genów, w tym 43 *ARF/SAR*, 47 *RAB*, 17 *ROP/RAC* i 4 geny *RAN* [19]. Genomy *Medicago truncatula* i *Lotus japonicus* zawierają odpowiednio, co najmniej 127 i 67 genów monomerycznych białek G [20]. Wszystkie małe białka G o masie cząsteczkowej 20–40 kDa i 30–55% identyczności struktury pierwszorzędowej mają pięć zachowanych w ewolucji motywów, oznaczonych jako kasety G1-G5, które razem z pętlą P biorą udział w wiązaniu nukleotydu guanylowego i uczestniczą w hydrolizie związanego GTP [4,8,17,21,22]. Na rycinie 1 przedstawiono schemat budowy białka Rop9/Rac7 *A. thaliana*, które oprócz elementów wspólnych dla wszystkich małych białek G (pięć motywów G, dwa giętkie przełączniki -I i -II, domena efektorowa) ma jeszcze motywy charakterystyczne dla Rop (motyw -SYRGA-, wstawka Rho), a w części C-końcowej region nadzmienny HVR (patrz podrozdział poświęcony białkom Rop/Rac). Motyw G1 oddziałuje z resztami fosforanowymi - $\alpha$  i - $\beta$  nukleotydu guanylowego, reszta treoniny w G2 (T37 w Rop9/Rac7) i motyw G3 wiążą resztę fosforanową - $\gamma$  GTP oraz jon  $Mg^{2+}$ . Reszta glutaminy w G3 (Q64 w Rop9/Rac7), pozycjonująca czą-

steczkę wody w nukleofilowym ataku na GTP, odgrywa kluczową rolę w aktywności GTPazowej białek G. Motyw G4 i najmniej zachowany w ewolucji motyw G5 uczestniczą w wiązaniu pierścienia guaninowego. Największe zróżnicowanie struktury pierwszorzędowej białek G występuje w regionach N- i C-końcowych. Białka Arf/Sar na N-końcu mają amfipatyczną helisę  $\alpha$ , w obrębie której w Arf położona jest reszta glicyny ulegająca mirystylacji. Białka Rab i Rop/Rac w części C-końcowej mają szereg charakterystycznych sekwencji umożliwiających przyłączenie reszt lipidowych (farnezylu, geranylgeranylu, kwasu palmitynowego, reszty metylowej) kotwiczących białka w błonie.

W dotychczasowych poszukiwaniach funkcji poszczególnych małych białek G z różnych rodzin, niezwykle użyteczne okazały się dwa typy mutacji substytucyjnych, określane jako tzw. konstytutywnie-aktywne (KA) i dominująco-negatywne (DN) [8,22]. Konstytutywnie aktywne białko G, pozbawione aktywności GTPazowej, ma zwykle zastąpioną resztę glicyny w G1 (G15 w Rop9) resztą waliny bądź resztę glutaminy w G3 (Q64 w Rop9) przez reszty leucyny lub kwasu glutaminowego (Ryc. 1). Białko z mutacją dominująco-negatywną ma zamienioną resztę treoniny w G1 (T20 w Rop9) na resztę asparaginy lub resztę kwasu asparaginowego w G4 (D121 w Rop9) na resztę alaniny. Mutacje dominująco-negatywne, na skutek obniżonego powinowactwa względem GTP, stabilizują nieaktywną formę białka G, które pozostaje w heterodimerze z GEF [8].

Wszystkie monomeryczne białka G funkcjonują jako molekularne przełączniki podlegające cyklicznym przemianom pomiędzy nieaktywną formą noszącą związany GDP, a formą aktywną z przyłączonym GTP. Aktywacja białka G-GDP polega na oddysocjowaniu GDP, a następnie na związaniu, występującego w cytoplazmie w wyższym stężeniu, GTP. Towarzyszące wymianie nukleotydów zmiany konformacyjne w domenie efektorowej umożliwiają oddziaływanie aktywnych białek G-GTP z różnego typu białkami efektorowymi.

Wszystkie małe białka G regulowane są przez białka GEF (ang. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) i GAP (ang. *GTPase-Activating Protein*), a białka G,



Rycina 1. Schemat budowy monomerycznych białek G na przykładzie Rop9 *A. thaliana*. Pokazano typowe dla małych białek G motywy G1-G5 z częściowo (małe litery) i w pełni ewolucyjnie zachowanymi (duże litery) aminokwasami, a ponadto, a ponadto pętlę P, dwa giętkie regiony oznaczone jako przełączniki -I i -II oraz charakterystyczny dla białek Rop motyw -SYRGA- i wstawkę Rho, a także region nadzmienny (HVR) z charakterystycznymi dla Rop motywami zawierającymi reszty cysteiny ulegające prenylacji bądź acylacji. Na schemacie pokazano także miejsca mutacji konstytutywnie-aktywnych (KA) i dominująco-negatywnych (DN). Na podstawie prac [4,8,17,19,22].

kotóre w formie aktywnej pozostają zakotwiczone w błonie (z wyjątkiem Arf/Sar), są dodatkowo regulowane przez białka GDI (ang. *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*) [23-25]. Białko GEF, swoiście oddziałujące z odpowiednim białkiem G, katalizuje wymianę związanego z białkiem GDP na GTP, natomiast efektem oddziaływania białka GAP z właściwym dla niego białkiem G jest wzrost aktywności GTPazowej, skutkującej inaktywacją białka G. Białko GDI zapobiega aktywacji białka G poprzez hamowanie sponta-

nicznej dysocjacji GDP, a ponadto usuwa z błony swoiście oddziałujące z nim białko G.

Stosunkowo liczne wyniki analiz krystalograficznych białek G, w tym również białek pozostających w formie heterodimerów z odpowiednim białkiem regulatorowym, ujawniły szereg zmian strukturalnych w białkach G będących efektem fizycznych oddziaływań pomiędzy białkami tworzącymi przejściowy heterodimer. Na rycinie 2A pokazano zmiany w centrum wiążącym nukleotydy białka Rop4 *A. thaliana* wymuszone przez oddziałujące RopGEF8 [23,24]. Wyniki analiz pokazały, iż RopGEF powoduje w białku Rop4 wyraźną deformację centrum wiążącego nukleotydy guanylowe położonego pomiędzy pętlą P a przełącznikami -I i -II. Deformacja obejmuje m. in. przesunięcie przełącznika -II, w obrębie którego przemieszczeniu ulegają reszty kwasu glutaminowego (E) i alaniny (A). Relokacja glutaminianu wymusza w pętli P zmianę położenia reszty lizyny (K) oddziałującej z resztą fosforanową GDP, natomiast przemieszczająca się reszta alaniny wypycha z centrum jon  $Mg^{2+}$  (Ryc. 2A). Ostatecznie, efektem fizycznego oddziaływania pomiędzy GEF a białkiem G jest dysocjacja GDP i jonu  $Mg^{2+}$  z centrum wiążącego nukleotydy [24]. W miejsce uwolnionego GDP wchodzi występujący w cytosolu w około 10-krotnie wyższym stężeniu GTP, który wiążąc się z białkiem G wymusza rozpad heterodimeru GEF/białko G.

Monomeryczne białka G nazywane są również GTPazami, mimo że ich wewnętrzna aktywność hydrolityczna względem GTP pozostaje na niemal śladowym poziomie. Jednakże szybkość hydrolizy GTP znacząco różni w he-

terodimerze z odpowiednim białkiem GAP, w którym, na skutek zmiany orientacji cząsteczki wody w centrum katalitycznym białka G, łatwiejszy staje się atak nukleofilowy na resztę fosforanową  $-\gamma$  w GTP [23]. Na rycinie 2B pokazano zmiany w centrum katalitycznym białek Rop, Rho i Arf/Sar towarzyszące oddziaływaniom z odpowiednimi białkami GAP. Kluczową rolę w GAP odgrywa w tym wypadku reszta argininy (R) neutralizująca ujemny ładunek fosforanu  $-\gamma$  oraz pozycjonująca resztę glutaminy (Q) w centrum katalitycznym Rop/Rho bądź resztę histydyny w Arf/Sar, aminokwasów koordynujących atakującą cząsteczkę wody [23]. Stabilizowanie w heterodimerze RhoGAP/Rho-GTP stanu przejściowego skutkuje około 1000-krotnym wzrostem szybkości hydrolizy GTP do GDP i fosforanu.

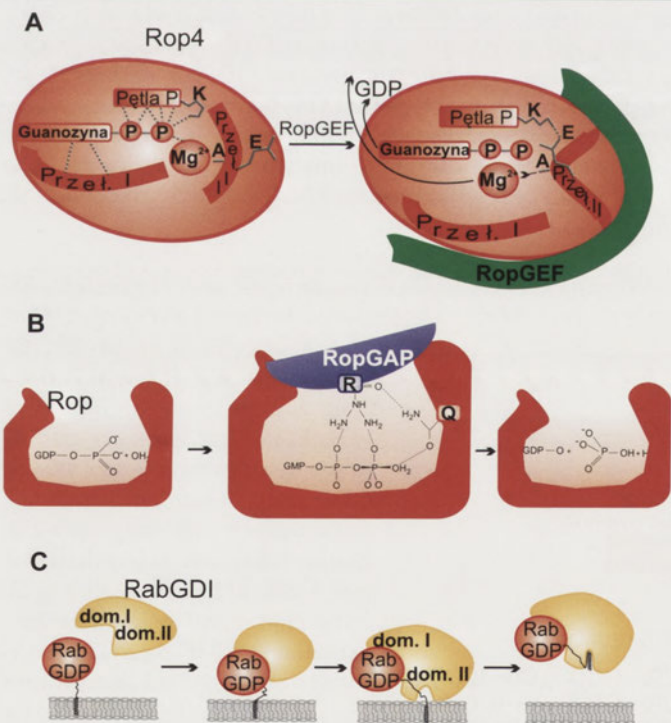
Aktywność białek Rab oraz Rop/Rac, a u zwierząt także Ras i Rho, regulowana jest dodatkowo przez białka GDI usuwające z błony odpowiednie, nieaktywne białka G, umożliwiając tym samym ich ponowną aktywację i wiązanie z inną błoną. Na rycinie 2C pokazano mechanizm eliminowania z błony Rab-GDP. Swoiste oddziaływanie RabGDI z Rab-GDP indukuje w domenie -II GDI zmiany konformacyjne prowadzące do utworzenia hydrofobowej kieszeni, w której chowane są reszty lipidowe związane z C-końcowym motywem Rab [25]. Dysocjacja heterodimeru GDI/białko G-GDP wymaga obecności dodatkowego białka GDF (ang. *GDI Displacement Factor*) oddziałującego z GDI. Uwolnione w ten sposób Rab-GDP może być ponownie aktywowane przez odpowiednie RabGEF. W komórkach drożdży i ssaków znaleziono rodzinę małych, błonowych białek Yip/PRA1 wiążących GDI. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 19 genów homologicznych z *PRA1*, których produkty ko-lokalizowano z białkami Rab [26].

W tym miejscu warto podkreślić, iż poszczególne białka regulatorowe, swoiście oddziałujące z odpowiednimi małymi białkami G, są w większości białkami wielodomenowymi podlegającymi nie tylko różnym modyfikacjom potranslacyjnym, ale także w różny sposób oddziałujące z innymi białkami, lipidami oraz przekaźnikami drugiego rzędu [23]. W ten sposób aktywność, co najmniej, niektórych białek regulatorowych może być modyfikowana przez różne czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, decydujące o tym czy dane białko G ma pozostawać w formie „wylęczonej”, czy powinno zostać „włączone” [8,17,19,23].

## FUNKCJE MAŁYCH BIAŁEK G Z POSZCZEGÓLNYCH RODZIN

### BIAŁKA Arf/Sar

Rodzina białek Arf (ang. *ADP-ribosylation factor*) w *A. thaliana* kodowana jest przez 21 genów, w tym dwanaście genów podrodziny *ARF*, sześć *ARL* (ang. *Arf-Like*) i trzy geny podrodziny *SAR* (ang. *Secretion-Associated Ras-related*) [18,19]. Aktywność Arf reguluje osiem tzw. dużych białek ArfGEF i piętnaście białek ArfGAP (AGD) [27,28]. Wszystkie białka rodziny Arf w części N-końcowej mają amfipatyczną helisę  $\alpha$  z niepolarnymi resztami aminokwasów po jednej i polarnymi po drugiej stronie. W nieaktywnym i pozostającym w cytoplazmie białku Arf-GDP, N-końcowa helisa ułożona jest w hydrofobowej kieszeni blisko powierzchni białka [29]. Odgięcie helisy na zewnątrz, towarzyszące



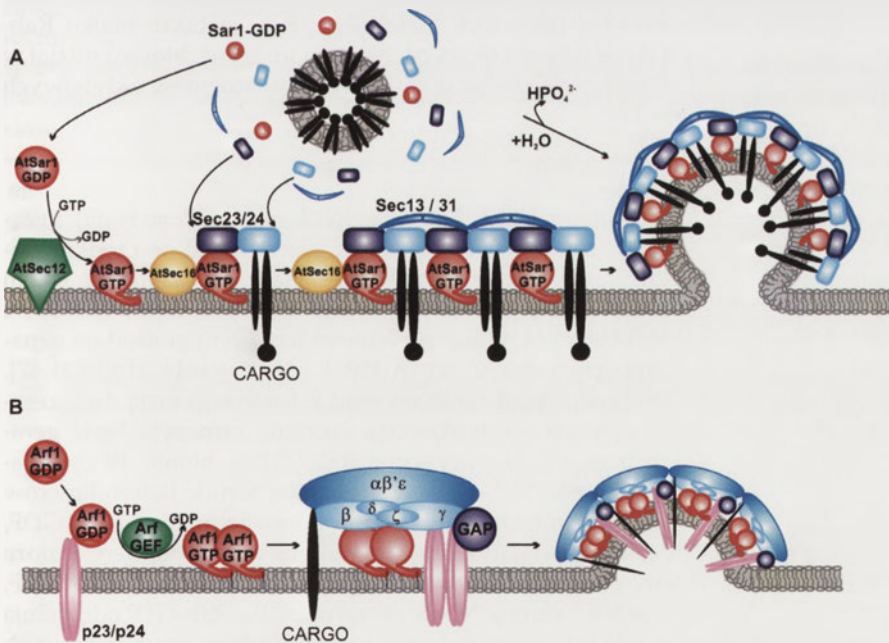
Rycina 2. Regulacja małych białek G przez: A – białka GEF, które oddziałując z białkami G deformują centrum wiążące nukleotydy guanylowe w sposób, który sprzyja uwalnianiu z centrum GDP; B – białka GAP, zmieniające orientację cząsteczki wody w centrum wiążącym nukleotydy guanylowe, a w efekcie stymulujące aktywność GTPazową białek G; C – białka GDI, hamujące spontaniczną dysocjację GDP oraz usuwające małe białka G z błony. Szczegóły opisano w tekście. Na podstawie prac [22-25].

aktywacji białka G, pozwala zakotwiczyć Arf-GTP w błonie, w bezpośredniej bliskości jej powierzchni. W kotwiczeniu białek podrodziny Arf uczestniczą dodatkowo reszta kwasu mirstynowego, dołączona do N-końcowej reszty glicyny. Uwalnianie białek Arf-GDP/Sar-GDP z błony nie wymaga udziału białek GDI, gdyż hydroliza związanego GTP przywraca konformację nieaktywnego białka z przyciętą do wewnątrz amfipatyczną helisą kotwiczącą białko w błonie.

Białka Arf/Sar funkcjonują w organizacji cytoszkieletu, uczestnicząc w regulacji aktywności enzymów modyfikujących fosfolipidy, a ponadto biorą udział w procesach formowania pęcherzyków transportujących [28,30-32]. W badaniach prowadzonych na drożdżach i zwierzętach, a w ostatnich latach również na roślinach, wykazano, że Arf/Sar inicjują pączkowanie pęcherzyków błonowych uczestnicząc w wiązaniu do błony białek adaptorowych i białek opłaszczających, a po odpączkowaniu pęcherzyka, regulują uwalnianie związanych z nim uprzednio białek [28,30-33]. Białko Sar1 zapoczątkowuje wiązanie do błony siateczki śródplazmatycznej białek opłaszczających COPII, zaś w błonach cis-Golgiego białko Arf1 pośredniczy w opłaszczaniu pęcherzyków kompleksami COPI, natomiast w siateczce trans-Golgiego (TGN/EE) i błonie plazmatycznej, białka Arf biorą udział w wiązaniu białek adaptorowych i klatrynowych [28,30-33]. Wyniki doświadczeń prowadzonych w ostatnim czasie na roślinach pokazały, iż pomimo wielu istotnych różnic w budowie siateczki śródplazmatycznej (RE), aparatu Golgiego (AG) czy wczesnych endosomów (EE), sugerujących odmienne mechanizmy transportu pęcherzykowego [33,34], to jednak zasadnicze etapy procesu formowania pęcherzyków błonowych, a także mechanizmy

sortowania białek przeznaczonych do transportu (carga) wykazują ewolucyjną zachowawczość [28,30-33].

W komórkach drożdży i człowieka, w transporcie anterogratywnym z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego, miejsce formowania pęcherzyka w obrębie ERES (ang. *ER Exit Site*) wyznacza błonowe białko Sec16, którego rola nie została jeszcze do końca poznana (Ryc. 3A) [35,36], a funkcja dwóch homologicznych białek Sec16 w *A. thaliana* w ogóle nie była jeszcze badana [33,37]. Formowanie pęcherzyka w ERES poprzedzone jest aktywacją pozostających w cytoplazmie Sar1-GDP przez związane z błoną RE białka Sec12 pełniące funkcję Sar1GEF (Ryc. 3A). Zmiany konformacyjne w Sar1, pozostające w związku z wymianą nukleotydów guanylowych, pozwalają zakotwiczyć Sar1-GTP w błonie, inicjując w ten sposób wiązanie z błoną RE najpierw heterodimeru Sec23/Sec24, a następnie tworzącego zewnętrzną powłokę pęcherzyka COPII heterotetrameru Sec13/Sec31 (Ryc. 3A). Białka Sec24 wiążą swoiście białka transportowane (carga), którymi mogą być białka błonowe bądź białka rozpuszczalne, wiązane do Sec24 za pośrednictwem błonowych białek adaptorowych (receptorów) [31,38] (Ryc. 3A). Istota sortowania białek cargo w trakcie formowania pęcherzyka transportującego sprowadza się zatem do swoistego rozpoznania przez Sec24 specyficznej sekwencji (sygnału eksportu) położonej w cytoplazmatycznej części transportowanego białka. W dotychczasowych badaniach poświęconych sortowaniu białek cargo w roślinach udało się zidentyfikować kilka charakterystycznych sygnałów eksportu, w tym m. in. stosunkowo często występującego motywu kwaśnego (D/E)x(D/E), a także kilka motywów zasadowych (Rxx/xxR, RKR, KxRxK) [31].



Rycina 3. Proponowana rola białek Sar1 i Arf1 w formowaniu oraz opłaszczaniu pączkujących pęcherzyków transportujących białkami COPII (A) i COPI (B). Aktywne białka Sar1-GTP, kotwicząc za pośrednictwem N-końcowej amfipatycznej helisy  $\alpha$  w błonie siateczki śródplazmatycznej (RE), wiążą do błony pączkującego pęcherzyka dimery Sec23/24 oddziałujące z tetramerami Sec13/31 tworzącymi zewnętrzną powłokę pęcherzyka COPII (A); Aktywne białka Arf1-GTP, zakotwiczone w błonie cis-Golgiego, tworzą razem z tetramerami p23/p24 platformy wiążące kompleksy białek koatomerowych COPI (B); W obu przypadkach hydroliza GTP związanego z białkami G zapoczątkowuje uwalnianie z odpączkowanego pęcherzyka białek opłaszczających. Aktywność GTPazową w COPII stymulują białka Sec23, zaś w COPI oddziałujące z białkiem  $\gamma$  COPI białka Arf1GAP. Białka transportowane (carga) w COPII wiązane są do białek Sec24, zaś w COPI do białek  $\alpha$  i  $\beta$ . Szczegóły opisano w tekście. Na podstawie prac [28,30,31,33,35,36,39,41].

W heterodimerze wiązonym przez Sar1-GTP białko Sec23 pełni funkcję Sar1GAP stymulującego hydrolizę związanego z Sar1 GTP. Wyniki niektórych doświadczeń sugerują, iż cykl przemian Sar1-GTP/Sar1-GDP zachodzący na etapie formowania pęcherzyka, odgrywa istotną rolę w zagęszczaniu cargo w pączkującym pęcherzyku COPII [35]. W odpączkowanym pęcherzyku COPII, aktywowana przez białka Sec23 hydroliza GTP prowadzi do uwolnienia z błony białek Sar1-GDP, a w efekcie do dysocjacji pozostałych białek opłaszczających (Ryc. 3A). Powstający w ten sposób „goły” pęcherzyk zostanie zacumowany do błony cis-Golgiego za pośrednictwem specjalnych białek wiązanych do odpączkowanego pęcherzyka za pośrednictwem białek Rab-GTP (patrz następny podrozdział).

W tym miejscu warto podkreślić, iż podnoszone jeszcze niedawno wątpliwości dotyczące transportu pęcherzyków COPII w roślinach, zostały już niemal całkowicie rozwiązane m. in. dzięki nowym technikom badawczym, w tym również technice tomografii komputerowej.

rowej [34]. Obecnie dyskutowane są jeszcze pewne niejasności dotyczące domeny ERES oraz obserwowanych tzw. struktur rusztowaniowych lokalizowanych w pobliżu pączkujących pęcherzyków COPII [34]. Jednakże pomijając powyższe niejasności, dzisiaj można już definitywnie stwierdzić, iż kodowane przez genom *A. thaliana* trzy białka Sar, dwa białka Sec12, siedem białek Sec23, trzy białka Sec24 i po dwa białka Sec13 i Sec31 biorą udział, podobnie jak w komórkach drożdży i zwierząt, w inicjowaniu formowania pęcherzyka, w opłaszczaniu pączkującego pęcherzyka białkami COPII oraz w uwalnianiu z odpączkowanego pęcherzyka białek opłaszczających.

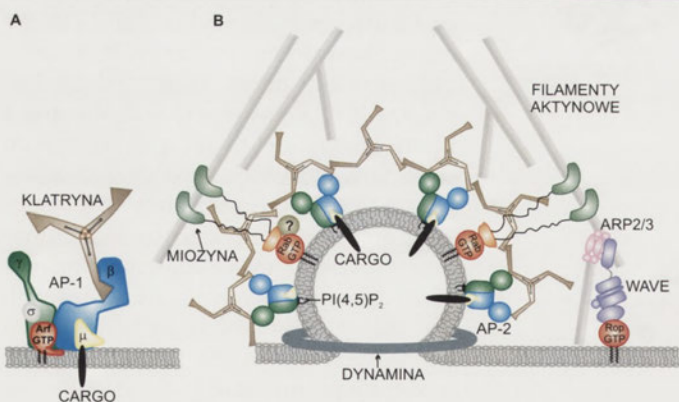
Transport retrogratyny białek pomiędzy cysternami aparatu Golgiego a siateczką śródplazmatyczną odbywa się za pośrednictwem pęcherzyków COPI. W tym wypadku opłaszczanie pączkujących w błonie cis-Golgiego pęcherzyków białkami COPI rozpoczyna się od wiązania przez heterodimeryczne białko p23/p24 nieaktywnego i pozostającego w cytosolu białka Arf1-GDP (Ryc. 3B) [28,30,39,40]. Towarzyszące wymianie nukleotydów zmiany konformacyjne umożliwiają zakotwiczenie Arf1-GTP w błonie cis-Golgiego za pośrednictwem N-końcowej amfipatycznej helisy  $\alpha$  z dołączoną resztą kwasu mirystynowego. Powstająca forma dimeryczna Arf1-GTP/Arf1-GTP, razem z heterotetramerem p23/p24, tworzą platformę wiążącą kompleks białek koatomerowych utworzony przez siedem białek COPI (Ryc. 3B). Cztery białka kompleksu ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\zeta$ ) stanowią podkompleks F, zaś pozostałe trzy białka ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\epsilon$ ) tworzą podkompleks B. Cargo wiązane jest do podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , natomiast z  $\gamma$ -COP oddziałuje ArfGAP (Ryc. 3B) aktywujące hydrolytyczny rozpad GTP zapoczątkowujący uwalnianie z błony białek Arf1-GDP, a razem z nimi pozostałych białek kompleksu opłaszczającego COPI [39,41].

Rola białek Arf w formowaniu pęcherzyków klatrynowych w błonach siateczki trans-Golgiego (TGN), w roślinach tożsamy z wczesnymi endosomami (EE), oraz pęcherzyków endocytarnych w błonie plazmatycznej, jest jeszcze słabo poznana. Wiadomo, że kotwiczące w błonie TGN/

EE Arf-GTP wiążą białka adaptorowe AP-1, AP-3 lub AP-4 (Ryc. 4A) [28,30,32,37,42-44]. Wiadomo również, iż w roślinach, podobnie jak u zwierząt, występują wszystkie cztery typy kompleksów adaptorowych AP, a ponadto monomeryczne białka adaptorowe – epsyny R1 i R2 oraz białka z grupy ANTH podobne do AP180 [28,32,42]. Na razie nie wiadomo, czy inne, badane u zwierząt białka adaptorowe oddziałujące z Arf i klatryną, występują także w roślinach, natomiast wiadomo, że genom *A. thaliana* nie zawiera genu GGA kodującego monomeryczne białko adaptorowe obecne w drożdżach i u zwierząt [10,28,42]. Kompleksy AP wszystkich czterech typów zbudowane są z czterech różnych białek – dwóch większych podjednostek  $\gamma$  i  $\beta$  oddziałujących z klatryną, jednej mniejszej podjednostki  $\mu$  wiążącej cargo (w AP-2 za pośrednictwem motywu dileucynowego -EDxxxL-LI- lub motywu tyrozynowego -Yxx $\Phi$ -;  $\Phi$  – aminokwas z hydrofobowym łańcuchem bocznym) i jednej bardzo małej podjednostki  $\sigma$  (Ryc. 4A) [9,10,28,30,37,42,43]. Należy jednakże podkreślić, iż w formujących się pęcherzykach endocytarnych rola Arf-GTP w wiązaniu AP-2 do błony plazmatycznej nie jest do końca jasna. Co prawda, w pojedynczych doniesieniach wskazywano na udział Arf6-GTP w wiązaniu AP-2 [45], jednakże wyniki innych badań dowodzą, iż rola Arf6-GTP sprowadza się do aktywacji kinazy fosforylującej fosfatydyloinozytolo-4-fosforan do fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu, PI(4,5)P<sub>2</sub>. Skądinąd wiadomo, że PI(4,5)<sub>2</sub> uczestniczy w wiązaniu z błoną plazmatyczną kompleksów adaptorowych AP-2. Na rycinie 4B przedstawiającej formujący się w błonie plazmatycznej endocytarny pęcherzyk klatrynowy, oprócz kompleksów adaptorowych AP-2 wiążących cargo oraz klatrynę, pokazano także, funkcjonujące w reorganizacji cytoskieletu aktynowego, białko Rop-GTP, współdziałające z kompleksami WAVE-Arp2/3 (patrz podrozdział dotyczący białek Rop/Rac), a także białko Rab-GTP wiążące z błoną pęcherzyka miozynę, biorącą udział w transporcie pęcherzyków wzdłuż filamentów aktynowych [43,46].

#### BIAŁKA Rab

Rodzina białek Rab (ang. *Ras homologue from brain*), licząca w drożdżach 11 białek, u człowieka 70, w rzodkiewniku 57, a w ryżu 47 białek, dzielona jest u ssaków na osiem podrodzin opisywanych liczbami (Rab11, 2, 18, 1, 8, 5, 7 i 6), którym w *A. thaliana* odpowiada osiem podrodzin oznaczonych literami od AtRabA do AtRabH [18,19,21,47]. Wszystkie białka Rab w części C-końcowej mają dwie reszty cysteiny modyfikowane resztami farnezyliu bądź geranylgeranyliu kotwiczącymi Rab-GTP w błonie. W cytoplazmie białka Rab-GDP występują w formie heterodimerów z białkami GDI. W obecności odpowiedniego białka GEF, białko Rab-GDP zostaje uwolnione z heterodimeru i może być ponownie aktywowane przez właściwe białko RabGEF. Zakotwiczone w błonie aktywne białka Rab-GTP oddziałują z zaskakująco liczną grupą białek efektorowych pełniących różnorodne funkcje. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż poszczególne białka Rab, zlokalizowane w różnych błonach, a nawet w odrębnych domenach tej samej błony, oddziałują z różnymi białkami efektorowymi. W opublikowanej niedawno w *Postęпах Biochemii* pracy przeglądowej przedstawiono budowę i funkcję kilkunastu poznanych dotych-



**Rycina 4.** Wiązanie kompleksu adaptorowego AP-1 do błony siateczki trans-Golgiego (A) oraz kompleksu AP-2 do błony plazmatycznej (B). Kompleksy adaptorowe AP-1, AP-3 i AP-4 wiązane są do błony siateczki trans-Golgiego za pośrednictwem Arf-GTP. W błonie plazmatycznej, Arf-GTP aktywuje syntezę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu PI(4,5)P<sub>2</sub> wiążącego AP-2 do błony. Na schemacie pączkującego pęcherzyka endocytarnego (B) pokazano także białko Rop-GTP, które za pośrednictwem WAVE aktywuje kompleks Arp2/3 funkcjonujący w reorganizacji cytoskieletu aktynowego oraz białko Rab-GTP, wiążące do błony pęcherzyka endocytarnego miozynę uczestniczącą w przemieszczaniu pęcherzyka wzdłuż filamentów aktynowych. Na podstawie prac [28,30,32,41-43].

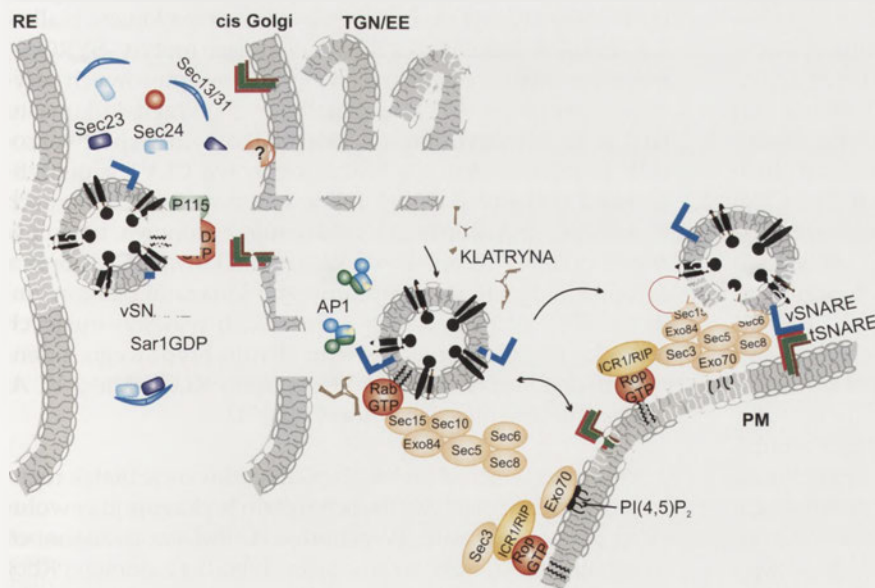
czas białek efektorowych oddziałujących na powierzchni błony endosomu z Rab5 [48].

W dotychczasowych badaniach, zwłaszcza w doświadczeniach prowadzonych na drożdżach i ssakach, wykazano, iż białka Rab odgrywają kluczową rolę w regulacji niemal wszystkich procesów związanych z transportem pęcherzykowym, poczynając już od etapu formowania pęcherzyka, a na fuzji z docelową błoną kończąc [49]. Jednakże z uwagi na stosunkowo niewielki, jak na razie, poziom zaawansowania badań związanych z białkami Rab w roślinach, w dalszej części podrozdziału zostaną krótko przedstawione tylko wybrane wyniki dotyczące roli białek Rab w kierowaniu do błony cis-Golgiego pęcherzyków odpączkowanych z siateczki śródplazmatycznej, a dalej w szlaku egzocytarnym, pęcherzyków klatrynowych pochodzących z siateczki trans-Golgiego kierowanych do błony plazmatycznej. Celowo pominięto m. in. badania poświęcone roli Rab w sortowaniu cargo, a także wyniki świadczące o udziale Rab w wiązaniu do transportowanych pęcherzyków odpowiednich białek motorycznych (miozyny, kinezyny, dyneiny) uczestniczących w transporcie pęcherzyków wzdłuż filamentów aktynowych i mikrotubul [49,50].

Kluczową rolę w kierowaniu odpączkowanego i pozbawionego białek opłaszczających pęcherzyka do określonego przedziału komórkowego, jak również w jego cumowaniu do odpowiedniej błony, poprzedzającym bardziej trwałe dokowanie, a na koniec fuzję pęcherzyka z docelową błoną, odgrywają białka efektorowe wiązane do błony pęcherzyka za pośrednictwem Rab-GTP. Poznane dotychczas białka efektorowe wiążące migrujące pęcherzyki do błony zlokalizowanej w odpowiednim przedziale subkomórkowym obejmują dwie klasy białek cumujących (ang. *tethering factor*) [51,52]. W szlaku egzocytarnym komórek drożdży i wyższych eukariontów, w tym również roślin, pierwszą klasę tworzą monomeryczne białka (Uso1/p115, GM130,

giantyna) z domenami tworzącymi struktury superhelikalne, które w formie homodimerów wiązane są z błoną poprzez odpowiednie Rab-GTP [53,54]. Do drugiej klasy białek cumujących należą oligomeryczne kompleksy, takie jak: egzocysta, COG, HOPS, GARP, Dsfl, TRAPPI, TRAPPII, także wiązane z błoną za pośrednictwem Rab-GTP. Niektóre z poznanych kompleksów cumujących (TRAPPI, TRAPPII) odgrywają również rolę RabGEF, tworząc z innymi białkami cumującymi funkcjonalną kaskadę białek kierujących ruchem pęcherzyków [51,54].

W dotychczasowych, niezbyt jeszcze licznych badaniach prowadzonych na roślinach, uwaga badaczy skupiała się głównie na wewnątrzkomórkowej lokalizacji poszczególnych białek Rab [47,55], aczkolwiek wyniki pojedynczych prac pokazują, iż, co najmniej, niektóre z poznanych u drożdży i ssaków białek cumujących mają odpowiedniki w roślinach [33,53,56]. Otóż okazało się, że w roślinach RabD2/Rab1, zakotwiczone w błonie pęcherzyka odpączkowanego z RE i pozbawionego białek opłaszczających COPII, wiąże białko p115 będące ortologiem Uso1p drożdży i p115 ssaków (Ryc. 5) [56]. Co prawda, w genomie *A. thaliana* nie znaleziono sekwencji homologicznej z GM130 ssaków, kodującej białko związane z błoną cis-Golgiego, które, jak się uważa, wiąże zakotwiczone w błonie pęcherzyka białko p115. Swoiste oddziaływanie pomiędzy tymi dwoma białkami umożliwia unieruchomienie pęcherzyka blisko powierzchni błony cis-Golgiego pozwalające dalej na jego dokowanie z udziałem białek SNARE. Na razie nie wiadomo jakie białko pełni w roślinach funkcję GM130, podobnie jak nie wiadomo jakie białka cumujące, oraz które z 57 białek Rab uczestniczą w transporcie pęcherzyków pomiędzy kolejnymi cysternami aparatu Golgiego. Inaczej jest w przypadku szlaku egzocytarnego kierującego pęcherzyki klatrynowe z siateczki trans-Golgiego (TGN/EE) do błony plazmatycznej. Tutaj wiadomo, że pęcherzyki pączkujące z TGN, pozbawione białek adaptorowych i klatrynowych, wiążą Rab z podrodziny RabE/Rab8, zaś w cumowaniu pęcherzyka do błony plazmatycznej bierze udział ośmiopodjednostkowy kompleks egzocysty (Ryc. 5) [57,58]. Sześć (Sec15, Sec10, Exo84, Sec8, Sec6, Sec5), spośród ośmiu białek egzocysty, wiąże się za pośrednictwem białka Sec15 do zakotwiczonego w pęcherzyku RabE-GTP, natomiast pozostałe dwa białka kompleksu (Exo70 i Sec3) wiązane są do błony plazmatycznej. Białko Exo70 oddziałuje z PI(4,5)P<sub>2</sub>, natomiast Sec3 wiązane jest za pośrednictwem białka adaptorowego ICR1/RIP1 do zakotwiczonego w błonie plazmatycznej Rop-GTP (Ryc. 5) [57,58]. W tym miejscu wartym podkreślenia jest fakt, iż w rzodkiewniku i brzoje podjednostka Exo70 kodowana jest przez 33, a w ryżu przez 41 genów [58]. Pozostałe białka tworzące egzocystę kodowane są przez mniejszą liczbę genów, bowiem Exo84 koduje 3–6 genów, Sec15 2-3 geny, a pozostałe białka kodują pojedyncze lub podwójne geny [58].



Rycina 5. Rola białek Rab w cumowaniu do błony cis-Golgiego pęcherzyków transportujących pochodzących z błony siateczki śródplazmatycznej oraz pęcherzyków egzocytarnych pochodzących z błony siateczki trans-Golgiego cumowanych za pośrednictwem kompleksu egzocysty do błony plazmatycznej. Szczegóły opisano w tekście. Na podstawie prac [47,51-53,55-59].

W konkluzji, warto zatem podkreślić, iż białka cumujące, związane za pośrednictwem określonych białek Rab do odpowiedniej błony, zapewniają dotarcie pęcherzyka do właściwej błony docelowej, gdzie dzięki współdziałaniu z odpowiednimi białkami SNARE, pęcherzyk zostaje bardziej trwale związany z błoną. Dzisiaj już wiadomo, że w dokowaniu pęcherzyków transportujących w różnych błonach docelowych z białkami SNARE współdziałają także białka cumujące, aczkolwiek mechanizm kooperacji, zarówno w trakcie dokowania, jak również późniejszego, skomplikowanego i nie do końca poznanego procesu fuzji pęcherzyka z błoną, nie jest znany. Wiadomo natomiast, że genom *A. thaliana* zawiera 18 genów podklasy *Qa-SNARE*, 12 *Qb-SNARE* i 12 *Qc-SNARE* kodujących białka typu t-SNARE oraz 15 genów *R*, których produkty v-SNARE związane są z błoną pęcherzyków transportujących. W kompleksie trans-SNARE, helisy  $\alpha$  poszczególnych białek *Qa*, *Qb* i *Qc-SNARE* tworzą „pęczek” helis wiążący czwartą helisę pochodzącą z zakotwiczonego w pęcherzyku białka v-SNARE, dokując w ten sposób pęcherzyk tuż przy powierzchni błony [30,59].

#### BIAŁKA Rop/Rac

Rodzina Rop (ang. *Rho of plant*) w *A. thaliana* liczy jedenaście białek (AtRop1 do AtRop11) w 70-98% identycznych pod względem struktury pierwszorzędowej [18,19,21]. Genom ryżu zawiera siedem genów *ROP*, kukurydzy dziewięć, a u mszaka *Physcomitrella patens* zidentyfikowano cztery geny [60,61]. Białka Rop, zaliczane początkowo do podrodziny Rac (rodzina białek Rho), klasyfikowane są na podstawie struktury regionu nadzmiennego HVR (ang. *Hypervariable Region*) do dwóch grup (Ryc. 1) [62]. Grupę I reprezentuje osiem białek, od AtRop1 do AtRop8, zaś pozostałe AtRop9 do 11 zaliczono do II grupy. Białka z I grupy w HVR mają motyw zasadowy -K/R- oraz C-końcowy motyw CAAL, w którym reszta cysteiny ulega prenylacji, a po proteolitycznym odcięciu trzech końcowych reszt aminokwasowych XXL, jest dodatkowo metylowana. Białka z II grupy, oprócz motywu zasadowego -K/R-, mają motywy -GC-, -CG- z dwiema lub trzema resztami cysteiny ulegającymi acylacji [8,62]. Jednakże wyniki najnowszych doświadczeń pokazują, iż lipidowej modyfikacji ulegają nie tylko reszty cysteiny w domenie HVR, ale także zachowane w ewolucji reszty cysteiny położone w motywach G1 i G5 (C21 i C156 w AtRop6) [63]. Towarzysząca aktywacji AtRop6 acylacja reszt cysteinowych w zachowanych w ewolucji motywach pozostaje, wg autorów, w ścisłym związku z kotwiczeniem aktywnego białka w obrębie mikrodomen błonowych DRM (ang. *Detergent-Resistance Membrane*) nazywanych tratwami lipidowymi.

Wszystkie białka Rop mają złożoną z 8–10 reszt aminokwasowych helikalną wstawkę  $\alpha$  (ang. *insert helix*), określaną jako wstawka Rho, uczestniczącą w oddziaływaniach z RopGEF, a przypuszczalnie także z niektórymi białkami efektorowymi (Ryc. 1) [8,22,62]. W części środkowej Rop położony jest motyw -SYRGA- z zachowaną w ewolucji resztą argininy, którego sekwencja oraz usytuowanie w trzeciorzędowej strukturze sugerują, iż reszta seryny jest potencjalnym miejscem fosforylacji [8,22].

Poszukiwania białek RopGEF w *A. thaliana* napotykały początkowo na pewne trudności wynikające z faktu, iż genomy roślin nie zawierają sekwencji homologicznych z poznanymi wcześniej w drożdżach i u zwierząt ponad siedemdziesięcioma sekwencjami RhoGEF. Większość poznanych tu sekwencji RhoGEF zaliczana jest do dwóch rodzin, Dbl (ang. *Diffuse B-cell lymphoma*) i CZH (ang. *CDM-Zizimin-Homology*), nazywanej również Dock [64]. Białka RhoGEF z rodziny Dbl mają, zbudowaną z około 180 reszt aminokwasowych, katalityczną domenę DH (ang. *Dbl Homology*) oraz nieco krótszą domenę PH (ang. *Pleckstrin Homology*) oddziałującą z fosfatydyloinozitolami. Białka z rodziny Dock charakteryzują dwie zachowane w ewolucji domeny DHR I i II (ang. *Dock Homology Region*) [64].

Przed ośmiu laty, w genomie *A. thaliana* zidentyfikowano pojedynczy gen *SPIKE1* (*SPK1*) kodujący białko podobne do Dock, którego udział w wymianie nukleotydów guanylowych związanych z Rop udało się potwierdzić dopiero w ostatnim czasie [65]. Równolegle, w badaniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego, zidentyfikowano nową, swoistą dla roślin rodzinę RopGEF [66]. Okazało się, że czternaście sekwencji *A. thaliana* przechowywanych w bazach pod nazwą *DUF315* (ang. *Domain of Unknown Function 315*) koduje białka, które w części środkowej mają zbudowaną z około 300 reszt aminokwasowych domenę określaną jako PRONE (ang. *Plant-specific Rop Nucleotide Exchanger*) [66,67]. Rodzina białek RopGEF(PRONE) okazała się tożsama z poznaną w badaniach polarnego wzrostu łagiewki pyłkowej rodziną białek KPP (ang. *Kinase Partner Protein*) oddziałujących z domeną cytoplazmatyczną receptorowych serynowo/treoninowych kinaz białkowych [68]. Sugestie wynikające z powyższych badań mają niewątpliwie ważne znaczenie, szczególnie w kontekście wyników sugerujących, iż krótki odcinek C-końcowy AtRopGEF12(PRONE) pełni funkcję autoinhibitorową, regulowaną na drodze odwracalnej fosforylacji [69]. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, iż nie tylko białka RopGEF(PRONE) wydają się być regulowane przez kinazy białkowe, ale także same białka Rop zawierające motyw -SYRGA-, mogą być białkami substratowymi dla receptorowych serynowo/treoninowych kinaz białkowych. Przed kilkunastu laty, w izolowanym kompleksie białkowym współtworzonym przez receptorową kinazę białkową CLV1, zidentyfikowano także białko Rop [1], zaś w nowszych badaniach wykazano, iż AtRop4-GTP oddziałuje z błoną, bogatą w reszty cysteiny receptorową kinazą białkową NCRK oraz z cytoplazmatycznymi receptorowymi kinazami białkowymi RLCK [70]. W innych doświadczeniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego zidentyfikowano siedem, spośród czternastu RLCK klasy VI *A. thaliana*, oddziałujących z Rop-GTP [71].

W odróżnieniu od białek RopGEF, sekwencje białek regulatorowych pozostałych dwóch rodzin wykazują już ewolucyjną zachowawczość. W genomie *A. thaliana* poznano, co najmniej, dziesięć genów kodujących białka z domeną RhoGAP klasyfikowanych do trzech podrodziny, a mianowicie: sześć białek RopGAP, trzy białka podrodziny REN i jedno białko podobne do RopGAP [8,61]. Domena RhoGAP zawiera strukturę „palca argininowego”, z zachowaną w ewo-



lucji resztą argininy oddziałującą z resztą glutaminy w centrum katalitycznym Rop (Ryc. 2B). Sześć białek RhoGAP, oprócz domeny RhoGAP, ma jeszcze zbudowany z 16 reszt aminokwasowych motyw CRIB (ang. *Cdc42/Rac-Interactive Binding*) występujący w niektórych zwierzęcych białkach efektorowych oddziałujących z białkami podrodziny Rac i Cdc42 (Ryc. 6) [61]. Białka z podrodziny REN, oprócz domeny RhoGAP, mają domenę plekstrynową oddziałującą z fosfolipidami.

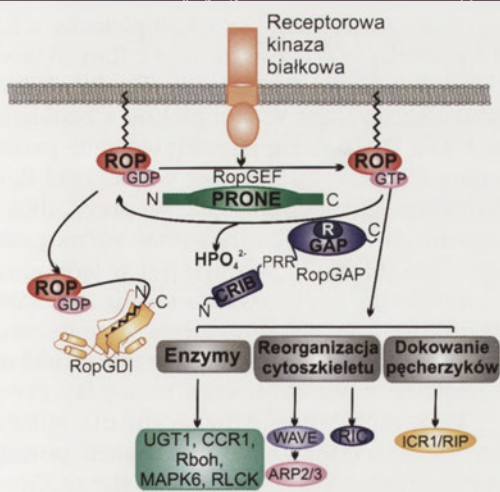
Trzy geny *RopGDI* zidentyfikowane w genomie *A. thaliana* kodują białka w 29-37% identyczne z RhoGDI ssaków [8,61,72]. Wszystkie białka GDI mają stosunkowo dużą domenę C-kończową podobną do immunoglobulin, obejmującą krótką helisę  $\alpha$  i dwie wstęgi  $\beta$  tworzące hydrofobową kieszeń, w której chowany jest łańcuch lipidowy białek Rop (Ryc. 6). Stosunkowo krótki odcinek z dwiema helisami  $\alpha$ , położony w części N-kończowej GDI, tworzy ramię regulacyjne oddziałujące z Rop i przeciwdziałające spontanicznej wymianie nukleotydów.

Poznane dotychczas białka efektorowe białek Rop, szczególnie białka identyfikowane w badaniach poświęconych regulacji kształtu komórek epidermalnych liści, czy badaniach dotyczących regulacji polarnego wzrostu łagiewki pyłkowej oraz komórek włosnikowych, funkcjonują, podobnie jak białka Rho drożdży i zwierząt, w regulacji cytoszkieletu [73]. Z drugiej jednak strony, rośnie liczba wyników pokazujących, iż rola białek Rop jest bardziej zróżnicowana, bowiem białkami efektorowymi Rop okazały się także niektóre enzymy [8,74-78]. Na przykład z Rop1-GTP oddziałuje glukozylotransferaza UGT1 (ang. *UDP-Glucose Transferase1*), podjednostka syntazy kalozy wykorzystującej UDP-glukozę do syntezy tego polisacharydu [8,74,77]. Udział Rop1 w regulacji syntezy kalozy sugeruje, iż białka Rop biorą udział m. in. w budowaniu przegrody pierwotnej w trakcie cytokinezy, czy w odpowiedziach obronnych na atak patogenów czy zranienie tkanki. W ryżu zidentyfikowano aktywowaną przez Rac1-GTP reduktazę cyna-

moylo-CoA (OsCCR1; ang. *Cinnamoyl-CoA Reductase1*), enzym funkcjonujący w biosyntezie ligniny [74-78]. W przemianach monolignoli do ligniny niezbędny jest nadtlenny wodoru, którego źródłem są m. in. aniony ponadtlenkowe produkowane przez oksydazę NADPH. W roślinach oksydazami NADPH są błonowe białka gp91<sup>phox</sup>, w *A. thaliana* kodowane przez dziesięć genów *Rboh* (ang. *Respiratory burst oxidase homolog*). Roślinne oksydazy NADPH w części N-kończowej mają zbudowany z około 300 reszt aminokwasowych cytoplazmatyczny fragment, z dwoma motywami *EF-hand* wiążącymi  $Ca^{2+}$ , z którym oddziałuje również Rop oraz kinaza CDPK fosforylująca położone w tym samym odcinku dwie reszty seryny [74-78]. W ryżu zidentyfikowano oddziałujące z OsRac1 białko adaptorowe RACK1, które wiąże się z odcinkiem N-kończowym oksydazy NADPH, a ponadto oddziałuje z kompleksem białek funkcjonujących w tzw. odporności aktywowanej przez efekторы [79]. Produkcja aktywnych form tlenu, podobnie jak biosynteza ligniny, odgrywa ważną rolę m. in. w reakcjach odpornościowych roślin. W szlakach sygnałowych aktywujących odporność podstawową roślin funkcjonują kaskady kinaz MAP. Okazało się, iż w ryżu z OsMAPK6 oddziałuje OsRac1-GTP, które jest również niezbędne w indukowanej przez elicytor aktywacji ekspresji OsMAPK6 [80]. Na razie nie jest znana rola oddziałujących z Rop cytoplazmatycznych kinaz białkowych RLCK, podobnie jak niewyjaśniony pozostaje udział AtRop5 w aktywacji kinazy fosfatydyloinozytolo-4-monofosforanowej syntetyzującej PI(4,5)P<sub>2</sub> [70,71,76].

Z aktywnym Rop1-GTP oddziałuje ICR1/RIP1 (ang. *Interactor of Constitutive Active Rop1/Rop Interactive Partner1*), białko z rodziny liczącej w *A. thaliana* pięć białek, nie mających odpowiedników w drożdżach i u zwierząt [81-83]. Białka należące do tej rodziny pełnią przypuszczalnie funkcję białek adaptorowych i regulatorowych. W komórkach epidermalnych liści i komórkach włosnikowych, ICR1 w formie homooligomerów pośredniczy pomiędzy AtRop-GTP a białkiem Sec3 egzocysty (Ryc. 5) [81,82]. W rosnącej łagiewce pyłkowej, białko RIP1 wiąże się razem z Rop1 do błony plazmatycznej w części apikalnej łagiewki [83].

Najwięcej informacji na temat roli białek Rop pochodzi jednak z badań dotyczących organizacji cytoszkieletu, zwłaszcza niezwykle dynamicznie zmieniającego się w roślinach cytoszkieletu aktywnego [62]. Obecnie już wiadomo, że w polimeryzacji aktywny biorą udział, co najmniej, trzy klasy białek, a mianowicie: forminy, kompleksy Arp2/3 regulowane przez wielobiałkowe kompleksy WASP/WAVE oraz poznawane obecnie białka Spire, Cobl i Lmod, tworzące trzecią klasę [84,85]. Forminy, w *A. thaliana* kodowane przez 21 genów, katalizują powstawanie liniowych, nierozgałęzionych filamentów aktynowych, poprzez stabilizowanie spontanicznie tworzących się dimerów i trimerów G aktywny [84,86]. Kompleksy Arp2/3, zbudowane z siedmiu podjednostek, biorą udział w polimeryzacji i rozgałęzianiu filamentów aktynowych [87,88]. Nazwa całego kompleksu pochodzi od nazwy dwóch, podobnych do aktywny podjednostek Arp2 i Arp3, oddziałujących z filamentami aktynowymi. W regulacji kompleksu Arp2/3 bierze udział zbudowany z pięciu białek kompleks WAVE (ang. *WASP family Verprolin-homologous protein*) (Ryc. 4) [89,90]. Białko WAVE heteropentameru oddziału-



Rycina 6. Schemat regulacji białek Rop przez białko RopGEF(PRONE), aktywowane przez błonowe receptorowe kinazy białkowe, oraz przez białko RopGAP, inaktywujące białka Rop, a także przez RopGDI, usuwające Rop z błony. Regulowane przez Rop-GTP białka efektorowe obejmują: enzymy, kompleksy WAVE/Arp2/3 i białka RIC, uczestniczące w reorganizacji cytoszkieletu, a także białka ICR/RIP, pośredniczące w cumowaniu pęcherzyków egzocytarnych do błony plazmatycznej. Szczegóły opisano w tekście. Na podstawie prac [62,68,69,74-78,81-83,89,91-94].

je za pośrednictwem domeny WCA (ang. *WASP homology domain, Connector, Acidic motif*) z kompleksem Arp2/3, natomiast poprzez białko Sra, wiąże się z zakotwiczonym w błonie Rop-GTP [88-90]. Tak więc, aktywowany przez białko Rop-GTP kompleks WAVE, wiąże monomery G aktyny oraz wymusza w kompleksie Arp2/3 zmiany konformacyjne, które sprzyjają wiązaniu do filamentu aktynowego podjednostek Arp2 i Arp3 [89,90]. Na razie nie wiadomo czy w roślinach występują również białka z trzeciej klasy (Spire, Cobl, Lmod), które za pośrednictwem domeny podobnej do N-WASP wiążą monomery G aktyny i uczestniczą w regulacji polimeryzacji F aktyny.

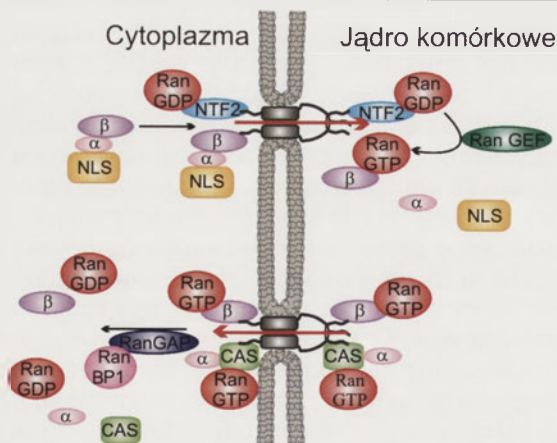
Odrębną rodzinę białek efektorowych, funkcjonujących także w reorganizacji cytoszkieletu, stanowią białka RIC (ang. *Rop-Interactive CRIB-containing proteins*). Rodzina RIC w *A. thaliana* obejmuje jedenaście małych, zbudowanych z 116-224 reszt aminokwasowych, białek z motywem CRIB (ang. *Cdc42/Rac-Interactive Binding*), zidentyfikowanych techniką drożdżowego systemu dwuhybridowego [91]. Dotychczasowe wyniki badań poświęconych regulacji polarnego wzrostu łagiewki pyłkowej oraz interesujących doświadczeń dotyczących regulacji kształtu komórki, wydają się weryfikować przypuszczenia, iż białka RIC stanowią nową rodzinę białek adaptorowych biorących udział w reorganizacji cytoszkieletu. W prowadzonych doświadczeniach wykazano, iż oddziałujące z Rop1 białka RIC4 i RIC3 funkcjonują w regulacji polarnego wzrostu łagiewki pyłkowej w dwóch różnych szlakach sygnałowych [92]. Aktywacja RIC4 promuje w części apikalnej łagiewki organizację filamentów F aktyny, podczas gdy aktywacja RIC3 stymuluje zależną od  $Ca^{2+}$  dezorganizację filamentów aktynowych [92]. W regulacji kształtu, przypominających puzzle komórek epidermalnych liści *A. thaliana*, białka RIC pośredniczą w reorganizacji filamentów aktynowych oraz mikrotubul. W rosnących „płatach” komórek epidermalnych, białka Rop2 i Rop4, organizują za pośrednictwem RIC4 filamety aktynowe w sposób, który promuje zlokalizowany wzrost „płatów”. W miejscu powstawania „wcięć”, białka Rop2, Rop4 i Rop6 regulują, za pośrednictwem RIC1, organizację mikrotubul, sprzyjając w ten sposób powstawaniu przewężzeń [93,94]. Zagadnienia dotyczące roli białek Rop, białek

regulatorowych RopGEF, RopGAP i RopGDI, a także poznanych już białek efektorowych, w ustalaniu oraz zachowywaniu polarności komórek, zostały omówione bardziej szczegółowo w opublikowanych w ostatnim czasie pracach przeglądowych [95,96].

## BIAŁKA Ran

Najmniej liczną rodzinę monomerycznych białek G tworzą białka Ran (ang. *Ras-related nuclear protein*), w rzodkiewniku i ryżu kodowane przez cztery geny, w drożdżach przez dwa, a u człowieka tylko przez jeden gen [4,17-19,21]. Przyjmuje się, że trzy niemal identyczne białka AtRan A. *thaliana* uczestniczą w transporcie makrocząsteczek (białek, RNA) pomiędzy cytoplazmą a jądrem, natomiast odbiegające, zarówno pod względem wielkości, jak również struktury pierwszorzędowej, AtRan4, pełni przypuszczalnie inną funkcję. Dzisiaj już wiadomo, że białka Ran zaangażowane są także w organizację wrzeciona kariokinetycznego, biorą udział w odtwarzaniu osłonki jądrowej, uczestniczą w regulacji jądrowego kompleksu porowego oraz w replikacji DNA [97,98].

Białkami efektorowymi Ran-GTP, biorącymi udział w transporcie makrocząsteczek pomiędzy cytoplazmą a jądrem, są karioferyny [99]. Obejmują one importyny, białka uczestniczące w transporcie białek z cytoplazmy do jądra oraz eksportyny, białka funkcjonujące w eksporcie RNA i białek z jądra do cytoplazmy. Importyna  $\beta$  oddziałuje z importyną  $\alpha$  rozpoznającą w transportowanym białku motyw NLS, a także wiąże cały kompleks do nukleoporyn, białek budujących kompleks porowy (Ryc. 7) [99-101]. Wiązanie białek do kompleksu porowego zapoczątkowuje skomplikowany proces przenikania kompleksu karioferyn z cargo do wnętrza jądra. W nukleoplazmie, do importyny  $\beta$  wiąże się białko Ran-GTP, uwalniając tym samym z kompleksu importynę  $\alpha$  oraz transportowane białko. W powrocie importyny  $\beta$  do cytoplazmy uczestniczy Ran-GTP, natomiast importyna  $\alpha$  przenika przez kompleks porowy w połączeniu z białkiem adaptorowym CAS i Ran-GTP. W cytoplazmie, karioferyny uwalniane są z kompleksów z Ran-GTP w wyniku hydrolizy GTP związanego z Ran, aktywowanej przez RanGAP i białko pomocnicze RanBP. Nieaktywne Ran-GDP wnika do jądra w kompleksie z białkiem receptorowym NTF2 [102], gdzie jest aktywowane przez odpowiednie RanGEF (Ryc. 7). Jak więc widać, cykl Ran-GTP/Ran-GDP przebiega podobnie jak w przypadku innych monomerycznych białek G, z tą jednak różnicą, że białko aktywujące RanGEF zlokalizowane jest w jądrze, zaś RanGAP w cytoplazmie. Asymetryczna lokalizacja białek regulatorowych powoduje nierównomierne rozmieszczenie aktywnych i nieaktywnych białek Ran, co umożliwia ukierunkowaną relokację makrocząsteczek pomiędzy cytoplazmą a jądrem. W komórkach ssaków, wymiana nukleotydów związanych z Ran odbywa się z udziałem powiązanego z chromatyną białka RCC1 (ang. *Regulator of Chromosome Condensation1*) pełniącego funkcję RanGEF. W genomie *A. thaliana* nie znaleziono sekwencji homologicznej z RCC1, co może sugerować, że w roślinach, nie tylko w transporcie makrocząsteczek, ale również w innych procesach (organizacja wrzeciona kariokinetycznego, odtwarzanie osłonki jądrowej i jądrowego kompleksu porowego, replikacja DNA),



Rycina 7. Cykl Ran-GTP/Ran-GDP kierujący transportem karioferyn pomiędzy cytoplazmą a jądrem oraz regulujący przemieszczanie białka transportowanego (cargo) z cytoplazmy do jądra. Asymetryczna lokalizacja białek regulatorowych (RanGEF w jądrze, RanGAP w cytoplazmie), powodująca nierównomierne rozmieszczenie Ran-GDP i Ran-GTP, umożliwia ukierunkowany transport makrocząsteczek pomiędzy cytoplazmą a jądrem [98,99,101].

przypuszczalnie także regulowanych przez Ran, uczestniczącą w nieznanej jeszcze białka regulatorowe [97].

## PIŚMIENNICTWO

1. Jakubowska A, Ostrowski M, Kowalczyk S (2007) Kinazy receptorowe roślin. *Postepy Biochem* 53: 133-142
2. Kowalczyk S, Hetmann A (2008) Receptory sprzężone z białkami G, heterotrimeryczne białka G i białka efektorowe roślin. *Postepy Biochem* 54: 412-422
3. Kowalczyk S, Hetmann A (2003) Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Postepy Biochem* 49: 298-318
4. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118: 843-846
5. Eisenberg S, Henis YI (2008) Interactions of Ras proteins with the plasma membrane and their roles in signaling. *Cell Sign* 20: 31-39
6. Fuentes G, Valencia A (2009) Ras classical effectors: new tales from *in silico* complexes. *Trends Biochem Sci* 34: 533-539
7. Schiller MR (2006) Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases-GEFs what's the link. *Cell Sign* 18: 1834-1843
8. Berken A, Wittinghofer A (2008) Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem* 46: 380-393
9. Irani NG, Russinova E (2009) Receptor endocytosis and signaling in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 653-659
10. Hsu VW, Prekeris R (2010) Transport at the recycling endosome. *Curr Opin Cell Biol* 22: 528-534
11. Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M (2009) Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp Cell Res* 315: 1601-1609
12. Sorkin A, von Zastrow M (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 609-622
13. Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* 21: 1598-1602
14. Fujii K, Miwa K, Fujiwara T (2009) The intracellular transport of transporters: membrane trafficking of mineral transporters. *Curr Opin Plant Biol* 12: 699-704
15. Grunewald W, Friml J (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J* 29: 2700-2714
16. Kowalczyk S, Starzyńska E (2009) Ukierunkowana relokalizacja białek transportujących auksyny a odpowiedzi tropowe roślin. *Post Biol Kom* 36: 723-744
17. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208
18. Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1191-1208
19. Jiang S-Y, Ramachandran S (2006) Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. *Physiol Genomics* 24: 235-251
20. Yuksel B, Memon AR (2008) Comparative phylogenetic analysis of small GTP-binding genes of model legume plants and assessment of their roles in root nodules. *J Exp Bot* 59: 3831-3844
21. Ma Q-H (2007) Small GTP-binding proteins and their functions in plants. *J Plant Growth Regul* 26: 369-388
22. Sörmo CG, Leiros I, Brembu T, Winge P, Os V, Bones AM (2006) The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* RAC7/ROP9: The first RAS superfamily GTPase from the plant kingdom. *Phytochemistry* 67: 2332-2340
23. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129: 865-877
24. Thomas C, Fricke I, Scrima A, Berken A, Wittinghofer A (2007) Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. *Mol Cell* 25: 141-149
25. Goody RS, Rak A, Alexandrov K (2005) The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci* 62: 1657-1670
26. Kamei CLA, Boruc J, Vandepoele K, Van den Daele H, Maes S, Russinova E, Inzé D, De Veylder L (2008) The *PRA1* gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147: 1735-1749
27. Anders N, Jürgens G (2008) Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci* 65: 3433-3445
28. Hwang I, Robinson DG (2009) Transport vesicle formation in plants cells. *Curr Opin Plant Biol* 12: 660-669
29. Gillingham AK, Munro S (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 579-611
30. Bassham DC, Brandizzi F, Otegui MS, Sanderfoot AA (2008) The secretory system of *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 1-29
31. Marti L, Fornaciari S, Renna L, Stefano G, Brandizzi F (2010) COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci* 15: 522-528
32. Paul MJ, Frigerio L (2007) Coated vesicles in plant cells. *Sem Cell Dev Biol* 18: 471-478
33. Hawes C, Osterrieder A, Hummel E, Sparkes I (2008) The plant ER-Golgi interface. *Traffic* 9: 1571-1580
34. Staehelin LA, Kang B-H (2008) Nanoscale architecture of endoplasmic reticulum export sites and of Golgi membranes as determined by electron tomography. *Plant Physiol* 147: 1454-1468
35. Miller EA, Barlowe C (2010) Regulation of coat assembly - sorting things out at the ER. *Curr Opin Cell Biol* 22: 447-453
36. Budnik A, Stephens DJ (2009) ER exit sites - localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett* 583: 3796-3803
37. Robinson DG, Herranz M-C, Bubeck J, Pepperkok R, Ritzenthaler C (2007) Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit Rev Plant Sci* 26: 199-225
38. Faso C, Chen Y-N, Tamura K, Held M, Zemelis S, Marti L, Saravanan RS, Hummel E, Kung L, Miller E, Hawes C, Brandizzi F (2009) A missense mutation in the *Arabidopsis* COPII coat protein Sec24A induces the formation of clusters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant Cell* 21: 3655-3671
39. Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D (2009) The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Lett* 583: 2701-2709
40. Kamińska J, Hoffman-Sommer M, Płachta M (2010) Białka z rodziny p24 - regulatory transportu pęcherzykowego. *Postepy Biochem* 56: 75-82
41. Kahn RA (2009) Toward a model for Arf GTPases as regulators of traffic at the Golgi. *FEBS Lett* 583: 3872-3879
42. Traub LM (2005) Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1744: 415-437
43. Ungewickell EJ, Hinrichsen L (2007) Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol* 19: 417-425
44. Hanton SL, Matheson LA, Brandizzi F (2006) Seeking a way out: export of proteins from the plant endoplasmic reticulum. *Trends Plant Sci* 11: 335-343
45. Paleotti O, Macia E, Luton F, Klein S, Partisani M, Chardin P, Kirchhausen T, Franco M (2005) The small G-protein Arf<sub>GTP</sub> recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem* 280: 21661-21666
46. Kasprovicz A, Michalak M, Wierzchowiecka M, Maruniewicz M, Wojtaszek P (2009) Endocytoza i zależny od cytoszkieletu transport składników ścian komórkowych roślin. *Postepy Biochem* 55: 181-186
47. Nielsen E, Cheung AY, Ueda T (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol* 147: 1516-1526
48. Olchowik M, Miaczynska M (2009) Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. *Postepy Biochem* 55: 171-180
49. Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006) Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11821-11827
50. Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6: 1070-1077

51. Sztul E, Lupashin V (2006) Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C11-C26
52. Sztul E, Lupashin V (2009) Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS Lett* 583: 3770-3783
53. Koumandou VL, Dacks JB, Coulson RMR, Field MC (2007) Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; evolution of tethering complexes and SM proteins. *BMC Evol Biol* 7: 29-45
54. Fukuda M (2008) Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci* 65: 2801-2813
55. Woollard AAD, Moore I (2008) The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr Opin Plant Biol* 11: 610-619
56. Latijnhouwers M, Gillespie T, Boevink P, Kriechbaumer V, Hawes C, Carvalho CM (2007) Localization and domain characterization of *Arabidopsis* golgin candidates. *J Exp Bot* 58: 4373-4386
57. Žárský V, Cvrčková F, Potocký M, Hala M (2009) Exocytosis and cell polarity in plants – exocyst and recycling domains. *New Phytol* 183: 255-272
58. Chong YT, Gidda SK, Sanford C, Parkinson J, Mullen RT, Goring DR (2010) Characterization of the *Arabidopsis thaliana* exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytol* 185: 401-419
59. Lipka V, Kwon C, Panstruga R (2007) SNARE-Ware: The role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 147-174
60. Chen L, Shiotani K, Tagashi T, Miki D, Aoyama M, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K (2010) Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance. *Plant Cell Physiol* 51: 585-595
61. Eklund DM, Svensson EM, Kost B (2010) *Physcomitrella patens*: a model to investigate the role of RAC/ROP GTPase signalling in tip growth. *J Exp Bot* 61: 1917-1937
62. Yalovsky S, Bloch D, Sorek N, Kost B (2008) Regulation of membrane trafficking, cytoskeleton dynamics, and cell polarity by ROP/RAC GTPases. *Plant Physiol* 147: 1527-1543
63. Sorek N, Segev O, Gutman O, Bar E, Richter S, Poraty L, Hirsch JA, Henis YI, Lewinsohn E, Jürgens G, Yalovsky S (2010) An S-acylation switch of conserved G domain cysteines is required for polarity signaling by ROP GTPases. *Curr Biol* 20: 914-920
64. Rossman KL, Der CJ, Sondel J (2005) GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 167-180
65. Zhang C, Kotchoni SO, Samuels AL, Szymanski DB (2010) SPIKE1 signals originate from and assemble specialized domains of the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 20: 2144-2149
66. Berken A, Thomas C, Wittinghofer A (2005) A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 436: 1176-1180
67. Fricke I, Berken A (2009) Molecular basis for the substrate specificity of plant guanine nucleotide exchange factors for ROP. *FEBS Lett* 583: 75-80
68. Kaothien P, Ok SH, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschietti J, McCormick S (2005) Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J* 42: 492-503
69. Zhang Y, McCormick S (2007) A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18830-18835
70. Molendijk AJ, Ruperti B, Singh MK, Dovzhenko A, Ditengou FA, Milia M, Westphal L, Rosahl S, Soellick T-R, Uhrig J, Weingarten L, Huber M, Palme K (2008) A cysteine-rich receptor-like kinase NCRK and a pathogen-induced protein kinase RBK1 are Rop GTPase interactors. *Plant J* 53: 909-923
71. Dorjgotov D, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Szűcs A, Ötvös K, Klement É, Biró J, Fehér A (2009) Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases *in vitro*. *FEBS Lett* 583: 1175-1182
72. Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, Drea S, Zarsky V, Dolan L (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013-1016
73. Jaffe AB, Hall A (2005) RhoGTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-269
74. Fehér A, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Dorjgotov D (2008) Regulation of ROP GTPase signalling at the gene expression level: A review. *Open Plant Sci J* 2: 37-46
75. Yang Z, Fu Y (2007) ROP/RAC GTPase signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 490-494
76. Berken A (2006) ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 63: 2446-2459
77. Brembu T, Winge P, Bones AM, Yang Z (2006) A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Res* 16: 435-445
78. Nibau C, Wu H-m, Cheung AY (2006) RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. *Trends Plant Sci* 11: 309-315
79. Nakashima A, Chen L, Thao NP, Fujiwara M, Wong HL, Kuwano M, Umemura K, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K (2008) RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* 20: 2265-2279
80. Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K (2005) A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol* 138: 1644-1652
81. Lavy M, Bloch D, Hazak O, Gutman I, Poraty L, Sorek N, Sternberg H, Yalovsky S (2007) A novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr Biol* 17: 947-952
82. Bloch D, Hazak O, Lavy M, Yalovsky S (2008) A novel ROP/RAC GTPase effector integrates plant cell form and pattern formation. *Plant Sign Behav* 3: 41-43
83. Li S, Gu Y, Yan A, Lord E, Yang Z-B (2008) RIP1 (ROP Interactive Partner 1/ICR1) marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Mol Plant* 1: 1021-1035
84. Chesarone MA, Goode BL (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 21: 28-37
85. Maruniewicz M, Kasprzewicz A, Wojtaszek P (2009) Roślinna twarz formin – organizatorów cytoszkieletu aktynowego. *Postepy Biochem* 55: 196-200
86. Staiger CJ, Blanchoin L (2006) Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr Opin Plant Biol* 9: 554-562
87. Mathur J (2005) The ARP2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *BioEssays* 27: 377-387
88. Szymanski DB (2005) Breaking the WAVE complex: the point of *Arabidopsis* trichomes. *Curr Opin Plant Biol* 8: 103-112
89. Brembu T, Winge P, Bones AM (2005) Catching the WAVES of plant actin regulation. *J Plant Growth Regul* 24: 55-66
90. Derivery E, Gautreau A (2010) Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* 32: 119-131
91. Wu G, Gu Y, Li S, Yang Z (2001) A genome-wide analysis of *Arabidopsis* Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* 13: 2841-2856
92. Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth *via* two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* 169: 127-138
93. Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z (2005) *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120: 687-700
94. Fu Y, Xu T, Zhu L, Wen M, Yang Z (2009) A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 19: 1827-1832
95. Yang Z (2008) Cell polarity signaling in *Arabidopsis*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 551-575

96. Kost B (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol* 18: 119-127
97. Meier I, Brkljacic J (2009) Adding pieces to the puzzling plant nuclear envelope. *Curr Opin Plant Biol* 12: 752-759
98. Meier I (2007) Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *J Exp Bot* 58: 27-34
99. Merkle T (2004) Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr Genet* 44: 231-260
100. Xu XM, Meier I (2008) The nuclear pore comes to the fore. *Trends Plant Sci* 13: 20-27
101. Lee Y, Lee H-S, Lee J-S, Kim S-K, Kim S-H (2008) Hormone- and light-regulated nucleocytoplasmic transport in plants: current status. *J Exp Bot* 59: 3229-3245
102. Zhao Q, Leung S, Corbett AH, Meier I (2006) Identification and characterization of the Arabidopsis orthologs of nuclear transport factor 2, the nuclear import factor of Ran. *Plant Physiol* 140: 869-878

## Small, monomeric G proteins in plants

Stanisław Kowalczyk, Anna Hetmann<sup>✉</sup>, Mariusz Czarnota

Nicolaus Copernicus University, Institute of General and Molecular Biology, Department of Biochemistry, 7 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: ahetmann@umk.pl

**Key words:** monomeric G proteins, vesicle trafficking, cytoskeleton

### ABSTRACT

The superfamily of small, monomeric GTP-binding proteins, in *Arabidopsis thaliana* comprising 93 members, is classified into four families: Arf/Sar, Rab, Rop/Rac, and Ran families. All monomeric G proteins function as molecular switches that are activated by GTP and inactivated by the hydrolysis of GTP to GDP. GTP/GDP cycling is controlled by three classes of regulatory protein: guanine-nucleotide-exchange factors (GEFs), GTPase-activating proteins (GAPs), and guanine-nucleotide-dissociation inhibitors (GDIs). Proteins of Arf family are primarily involved in regulation of membrane traffic and organization of the cytoskeleton. Arf1/Sar1 proteins regulate the formation of vesicle coat at different steps in the exocytic and endocytic pathways. Rab GTPases are regulators of vesicular transport. They are involved in vesicle formation, recruitment of cytoskeletal motor proteins, and in vesicle tethering and fusion. Rop proteins serve as key regulators of cytoskeletal reorganization in response to extracellular signals. Several data have also shown that Rop proteins play additional roles in membrane trafficking and regulation of enzymes activity. Ran proteins are involved in nucleocytoplasmic transport.

## VII edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2011 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłaszają siódmą edycję konkursu o nagrodę im. Witolda Drabikowskiego za najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w 2011 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 500 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie tez doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2012 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck.

Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowcy ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego, według formularza zgłoszeniowego (dostępnego na stronie [www.ptbioch.edu.pl](http://www.ptbioch.edu.pl) w zakładce Nagrody i Stypendia/W. Drabikowskiego), wraz z pracą doktorską i kopiami recenzji w formacie pdf należy przesłać w nieprzekraczalnym terminie do **1 marca 2012 roku** tylko drogą elektroniczną na adres:

**[elkar@csk.umed.lodz.pl](mailto:elkar@csk.umed.lodz.pl)**

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2012 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we wrześniu 2012 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Pytania dotyczące konkursu można kierować pod następujący adres poczty elektronicznej: [elkar@csk.umed.lodz.pl](mailto:elkar@csk.umed.lodz.pl).

Elżbieta Rębas  
Przewodnicząca Komisji Konkursowej

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

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

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

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

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

## WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępy Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

## PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

## ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

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

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

**Piśmiennictwo:** Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

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

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

**Ilustracje:** ryciny winny być zapisane jako: \*.tif, \*.cdr, \*.psd, lub \*.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerni i biel).

## PRZESYŁANIE PRAC:

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres:

[postepy@nencki.gov.pl](mailto:postepy@nencki.gov.pl)

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

**Sławomir Pikula**, Redaktor Naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## OPLATA ZA DRUK:

Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Opłata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

[www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm](http://www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm)

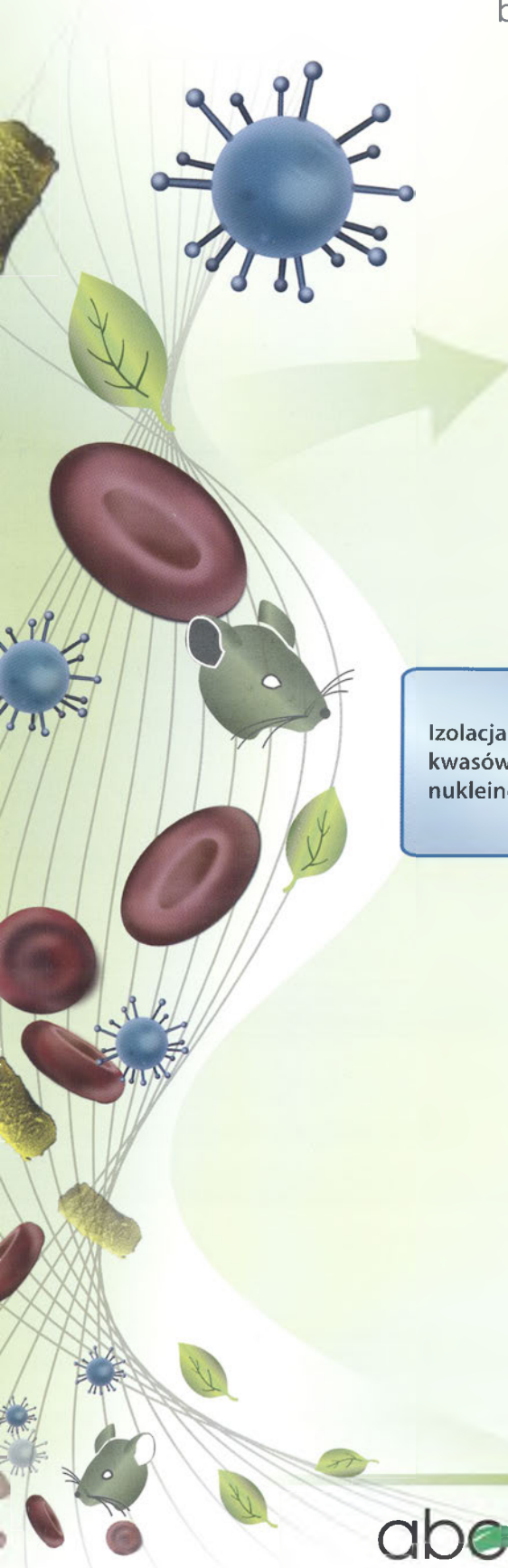
## KOREKTA:

Powinna być wykonana na pliku pdf przesłanym przez redakcję, w formie komentarzy lub skreśleń, w programie Adobe Reader V. 8 lub nowsza (program bezpłatny, <http://get.adobe.com/reader/>).

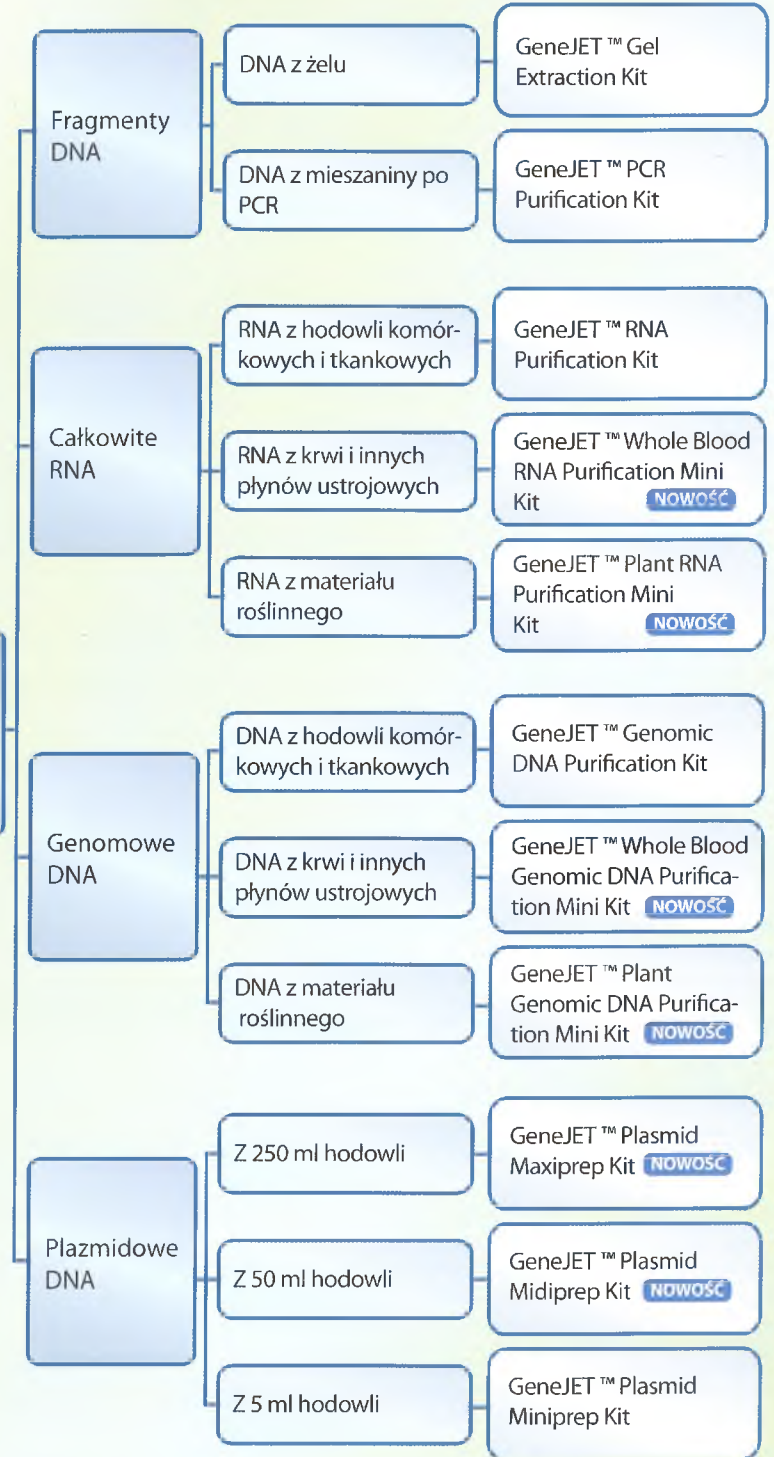
Korekta obejmuje błędy literówki, znaki interpunkcyjne oraz błędy zawinione przez redakcję, pozostałe zmiany są objęte dodatkem 10% do opłaty za druk.

# Poznaj nowe zestawy do oczyszczania kwasów nukleinowych GeneJET™

Wysoka wydajność, szybkość i czystość izolowanego DNA i RNA z różnorodnego materiału biologicznego w technologii membran krzemionkowych



**Izolacja kwasów nukleinowych**



# Z nowym cytometrem przepływowym Guava easyCyte™ więcej = mniej.

Nowa linia cytometrów przepływowych Guava easyCyte™ wyposażona w podajnik na pojedyncze próbki, umożliwia przeprowadzenie wielowymiarowej analizy wybranych parametrów komórek, która może zostać dostosowana do potrzeb każdego laboratorium badawczego. W zależności od budżetu oraz zakresu badań można dopasować odpowiednie rozwiązania systemowe. Urządzenia wyposażone są w jeden lub dwa lasery z możliwością jednoczesnej analizy do 8 znaczników fluorescencyjnych. Zaopatrzone są w przedni oraz boczny detektor światła rozproszonego i współdziałają z popularnymi, ogólnie dostępnymi na rynku fluorochromami. Dostarczane są z nowoczesnym oprogramowaniem InCyte.

Każdy system wyposażony jest w opatentowaną technologię mikrokapilarną, która nie wymaga płynu osłaniającego typu sheath fluid, umożliwia badanie bardzo małych próbek i niskie zużycie odczynników.

- + WIĘCEJ PARAMETRÓW
- + WIĘCEJ MOŻLIWOŚCI ANALIZY DANYCH
- + WIĘCEJ MIEJSCA NA STOLE
- + WIĘKSZA ŁATWOŚĆ OBSŁUGI
- + WIĘCEJ NOWOCZESNYCH ROZWIĄZAŃ

---

= MNIEJ ZŁ



Merck Sp. z o.o.,  
Aleje Jerozolimskie 178, 02-486 Warszawa  
tel.: 022 53 59 770; fax: 022 53 59 945  
dzial.handlowy@merck.pl; www.merck-chemicals.pl

[www.millipore.com/easyCyte5](http://www.millipore.com/easyCyte5)