

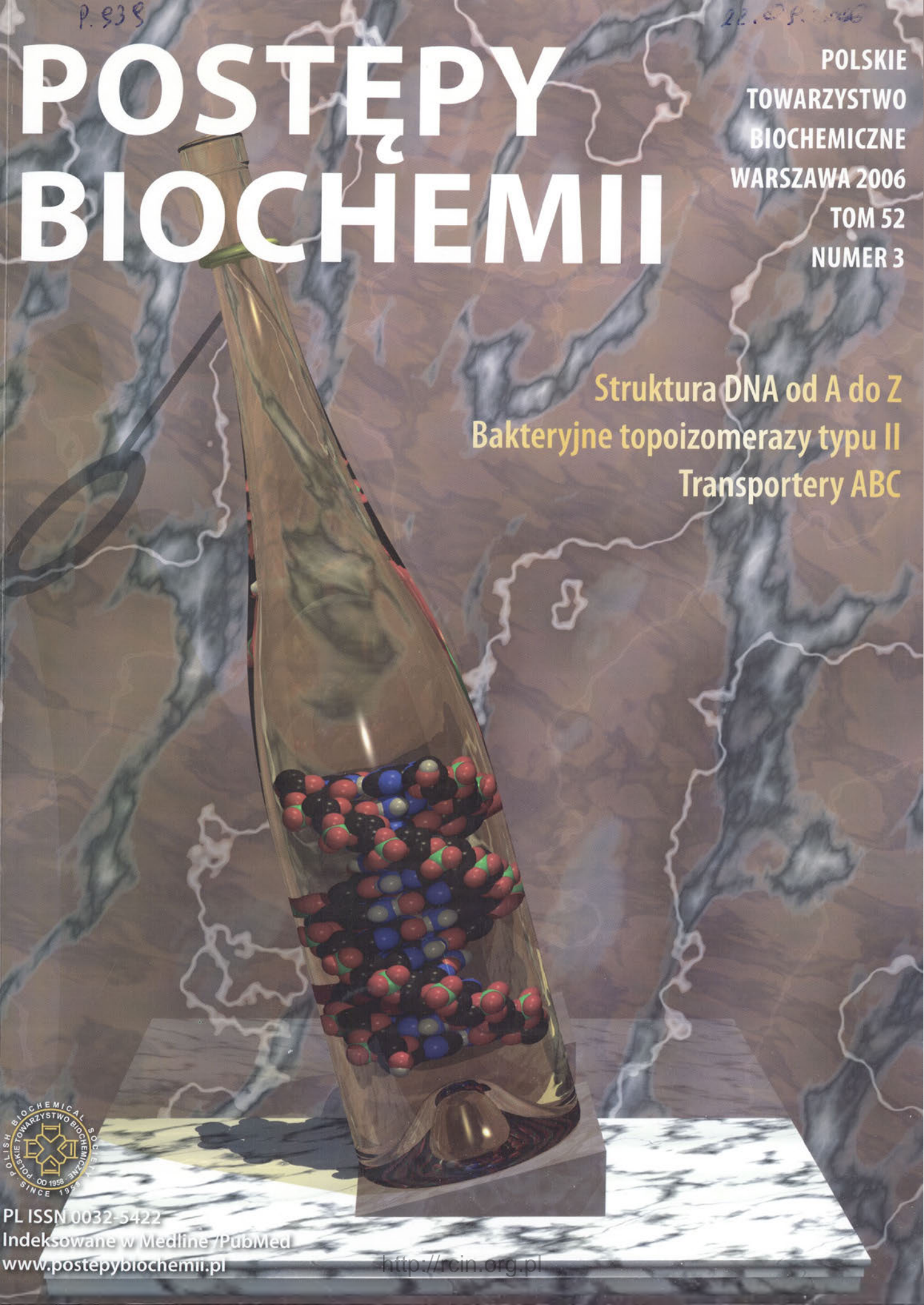
P. 938

22.09.2006

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2006
TOM 52
NUMER 3

Struktura DNA od A do Z
Bakteryjne topoisomerazy typu II
Transportery ABC



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline / PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://rcin.org.pl>

MP Biomedicals Family



IMMUNO™

Miles
Research
Products



Nutritional
Biochemicals



Enzyme
Systems
Products

Cappel®



DNA-ERASE™

Roztwór do usuwania DNA z powierzchni roboczych oraz narzędzi laboratoryjnych.

Wygodny i łatwy w użyciu, nie jest żrący oraz nie zawiera związków kancerogennych.

DNA-erase™ jest stabilny i odporny na wysokie temperatury.

Dostępny w formie gotowej do użycia.

RNase-ERASE™

Roztwór do usuwania RNaz z powierzchni roboczych oraz narzędzi laboratoryjnych.

Wygodny i łatwy w użyciu spray usuwa wszelkie zanieczyszczenia ze stołów, szkła i plastiku. Nietoksyczny, dostarczany w formie gotowej do użycia.

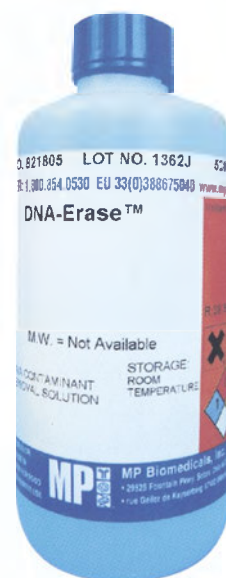
Nr kat.	Nazwa	Ilość
821805	DNA-ERASE™	500 ml
821682	RNase ERASE™	250 ml
821683	RNase ERASE™	2 x 125 ml
821684	RNase ERASE™	250 ml

Oferta MP BIOMEDICALS obejmuje:

biochemikalia, przeciwciała,
odczynniki do biologii molekularnej,
elektroforezy, apoptozy.

Nowa, ulepszona strona MP BIOMEDICALS!

<http://www.mpbio.com>



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



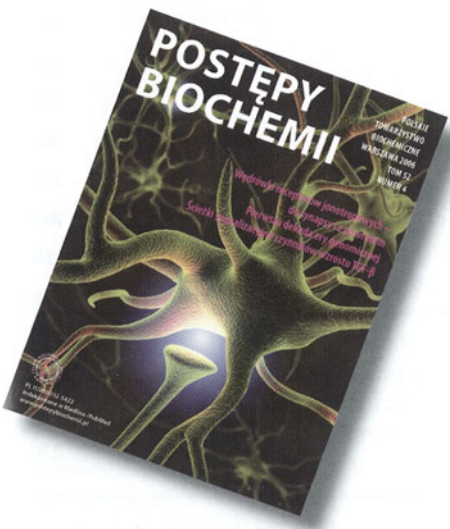


WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Opinia i komentarze do projektu ustawy z 29 maja 2006 r. „Prawo o organizmach genetycznie zmodyfikowanych”	223
Wiadomości krajowe	224

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Struktura DNA od A do Z – biologiczne implikacje różnorodności strukturalnej DNA	229
Małgorzata Bukowiecka-Matusiak, Lucyna A. Woźniak	
Naprawa chemicznie metylovanego DNA w <i>Escherichia coli</i> – rola białka AlkB	239
Celina Janion	
Redagowanie retrowirusowego DNA jako przykład mechanizmu obronnego komórek człowieka	247
Małgorzata Pupecka, Andrzej Pacak	
Krótkie interferencyjne RNA działające <i>in trans</i>	253
Zbigniew Warkocki, Marek Figlerowicz	
Aptamery w diagnostyce klinicznej	260
Adam Szpechciński, Alina Grzanka	
Badania struktury i funkcji prokariotycznych topoiomeraz klasy II szansą dla poszukiwania i syntezy nowych leków przeciwbakteryjnych	271
Michał Pietrusiński, Paweł Stączek	
Kinaza białkowa aktywowana przez AMP – kluczowe znaczenie w regulacji metabolizmu	283
Robert Jarzyna	
Odpowiedź na stres komórkowy i ekspresja genów <i>Hsp70</i> w męskich komórkach rozrodczych	289
Wiesława Widłak	
Roślinne transportery ABC – rodzina z tradycjami	296
Michał Jasiński, Marek Figlerowicz	
Wielofunkcyjne białka 14-3-3 komórki roślinnej	303
Sabina Janicka, Halina Augustyniak	
Receptory opioidowe i ich selektywne ligandy peptydowe	313
Mariola Katarzyna Piestrzeniewicz, Jakub Fichna, Anna Janecka	
Biochemiczne mechanizmy neurotoksycznego działania ołowiu	320
Irena Baranowska-Bosiacka, Dariusz Chlubek	
Struktura, funkcja oraz mechanizmy działania ATPaz z rodziny AAA	330
Sabina Kędzierska	



W NASTĘPNYM NUMERZE:

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Wędrowniki receptorów jonotropowych – do synapsy i z powrotem
Dorota Nowicka

Pierwsza dekada ery genomowej
Adrianna Skoneczna

Ścieżki sygnalizacyjne czynników wzrostu TGF- β
Małgorzata Zimowska

Molekularne metody diagnostyki i oceny efektywności terapii we współczesnej hematologii
Małgorzata Dawidowska,
Jacek Wachowiak, Michał Witt

Rysunek na okładce:

Front cover image „Bottled gene „ by Paul A. Thiessen, www.chemicalgraphics.com, with permission.

Events/Opinions/Comments	223
REVIEWS	
DNA structure from A to Z – biological implications of structural diversity of DNA	229
Chemically methylated DNA repair in <i>Escherichia coli</i> – the role of AlkB protein	239
The innate antiretroviral defense of human cells, based on the DNA editing	247
Trans-acting short interfering RNAs	253
Aptamers in clinical diagnostics	260
Bacterial type II topoisomerases as targets for antibacterial drugs	271
AMP-activated protein kinase – the key role in metabolic regulation	283
The heat shock response and HSP70 gene expression in male germ cells	289
Plant ABC transporters – the family with tradition	296
Multifunctional 14-3-3 proteins of plant cell	303
Opioid receptors and their selective ligands	313
Biochemical mechanisms of neurotoxic lead activity	320
Structure, function and mechanisms of action of ATPases from the AAA superfamily of proteins	330

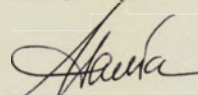
KILKA SŁÓW OD REDAKTORA DO AUTORÓW

Szanowni Państwo,

Korzystając z przywileju redaktora naczelnego chciałbym podzielić się z Państwem dwoma refleksjami. Pierwsza bardzo optymistyczna, że nasze czasopismo nadal ukazuje się drukiem. To jest między innymi zasługą Autorów zaakceptowanych do druku artykułów, którzy w przeważającej liczbie zgadzają się ponieść część kosztów druku artykułów (na 36 artykułów opublikowanych w numerach 1-3 w 2006 roku Autorzy 26 z nich opłacili "page charges"). Z tym problemem wiążą się Państwa częste prośby bym przesłał określony artykuł w wersji elektronicznej. Jakkolwiek tak powinno być w przyszłości, w obecnej chwili nie możemy rozpowszechniać zawartości czasopisma w tej formie, do momentu aż udostępniemy je całkowicie "on-line". Nie nastąpi to jednak szybko. Wyjątek czynimy w stosunku do Autorów pracujących zagranicą, dla których jest to jedyna możliwość otrzymania większej liczby kopii swojego artykułu.

Druga refleksja wiąże się, ze stosowaniem norm językowych, które redakcja stara się konsekwentnie wprowadzać na łamy „Postępów Biochemii”. Dlatego poniżej wymieniam niektóre z najczęściej spotykanych odstępstw od norm przyjętych przez redakcję, a w przyszłości pokusimy się o skatalogowanie tych odstępstw i podanie obok określeń, które są akceptowane przez redakcję. Przykładowo w artykułach pojawiają się często różne warianty „aminokwasów, motywów, domen, białek konserwowanych ewolucyjnie”. Redakcja prosi Autorów o stosowanie wyrażenia „sekwencje reszt aminokwasowych, domena, białko o strukturze zachowanej w ewolucji”. Równie często używane są nieprawidłowe terminy takie jak: inhibicja (zamiast hamowanie), membrana (zamiast błona), ubikwitynacja (zamiast ubikwitylacja), transdukcja sygnału (zamiast przekazywanie sygnału), ścieżki sygnałowe (zamiast szlaki sygnałowe), cytozol (zamiast cytosol), aminokwas ewolucyjnie konserwatywny (zamiast reszta aminokwasowa zachowana w ewolucji), alternatywny splicing (zamiast różnicowe cięcie i składanie mRNA), nabłonkowy czynnik wzrostu (zamiast naskórkowy czynnik wzrostu), ludzkie komórki (zamiast komórki człowieka), drożdżowe białko (zamiast białko z drożdży lub białko drożdży), domena N-terminalna (zamiast domena N-końcowa). Jak widać szereg nieprawidłowości wynika z bezpośredniego tłumaczenia angielskich wyrażen na język polski. Redakcja apeluje do przyszłych Autorów o zwrócenie uwagi na poprawność polskiego języka naukowego, mając na względzie rolę „Postępów Biochemii” w procesie kształtowania wiedzy biochemicznej w naszym społeczeństwie.

Dziękuję za uwagę i zapraszam jak zwykle do lektury naszego czasopisma oraz do częstego odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.



Sławomir Pikula

PARTNER POSTĘPÓW BIOCHEMII
OLYMPUS

Your Vision, Our Future

Redaktor naczelny: Sławomir Pikula; e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892347, Redaktor senior: Zofia Zielińska

Redaktor działu krajowego: Teresa Wesolowska; e-mail: redbioch@sci.pam.szczecin.pl, Redaktor działu „Forum Młodych Biochemików”: Grzegorz Bartosz; e-mail: gbartos@biol.uni.lodz.pl
Redaktorzy: Joanna Bendorowicz-Pikula, Jolanta Barańska, Andrzej Dżugaj, Krystyna Grzelak, Lilla Hryniewiecka, Danuta Hulanicka, Andrzej Jerzmanowski, Andrzej Kasprzak, Wanda Kłopocka, Liliana Konarska, Paweł Pomorski, Aleksander F. Sikorski, Anna Szakiel, Adam Szewczyk, Tomasz Twardowski, Marek Zembała, Krzysztof Zablocki, Alicja Żylicz

Sekretarz redakcja: Hanna Laskowska; e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl

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 (022) 6582099, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl, <http://www.ptbioch.edu.pl>

Kwartalnik „Postępy Biochemii” jest wydawany z pomocą finansową Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wzwyższego, „Postępy Biochemii” są indeksowane w Medline i Agrobilbex. Nakład 850 egz.

Redakcja nie zwraca materiałów niezamówionych, a w publikowanych artykułach zastrzega sobie prawo do dokonywania niezbędnych skrótów i zmian.

Redakcja nie odpowiada za treść zamieszczanych w czasopiśmie ogłoszeń.

Opinia i komentarze do projektu ustawy z 29 maja 2006 r. „Prawo o organizmach genetycznie zmodyfikowanych”



Tomasz Twardowski

Polska Federacja Biotechnologii, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź
e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

Gospodarka i jej rozwój muszą opierać się na solidnych podstawach: 1) naukowych, 2) prawnych i 3) społecznych. Fakty naukowe są reproduktywne i nie mogą być ustalone poprzez głosowanie. Normy prawne winny opierać się na danych obiektywnych, jednakże są efektem kompromisów, często wynikających z przesłanek politycznych. Opinie społeczne [a w konsekwencji głosy wyborców] są w istotnym stopniu efektem emocji i różnorodnych działań, często [wewnętrznie] sprzecznych.

W przedstawionym projekcie ustawy z 29 maja 2006 r. „Prawo o organizmach genetycznie zmodyfikowanych” jednoznaczny jest negatywny stosunek ustawodawcy do nowoczesnej biotechnologii. Podstawowe konkluzje tego dokumentu zostały bardzo jasno i klarownie sformułowane i można je streścić następująco:

1. Zamknięte użycie GMO jest akceptowane, jednakże związane jest z wieloma restrykcjami.
2. Uwolnienie doświadczenie GMO do środowiska jest niedopuszczalne.
3. Produkty GM inne niż żywność nie będą dostępne na polskim rynku.
4. GM żywność może być tylko sprowadzana [importowana i właściwie oznakowana], ale nie produkowana czy przetwarzana w naszym kraju.
5. GM pasze nie są akceptowane.
6. Uprawa GM roślin nie jest dopuszczalna.

Należy jednoznacznie stwierdzić, że dokument ten ma bardzo duże znaczenie dla rozwoju biotechnologii, a przez to całej polskiej **bioekonomii**. Przede wszystkim w kontekście rozwoju przemysłu biotechnologicznego

go oraz potencjalnego inwestowania środków przez zewnętrznych inwestorów. Termin **bioekonomia** oznacza oparcie rozwoju gospodarki na surowcach odnawialnych i wykorzystaniu metod biologicznych. Polska dysponuje całym kompleksowym zapleczem dla rozwoju bioekonomii. Normy prawne mogą ten rozwój stymulować lub zahamować.

Aspekty oceny projektu muszą uwzględniać następujące elementy:

- formalne [prawne],
- ekonomiczne:
 - finanse państwa,
 - rozwój gospodarki,
 - rynek pracy,
- efekty braku tej normy prawnej.

W ocenie musimy zauważyć zarówno POZYTYWNE, jak i NEGATYWNE efekty proponowanej nowej ustawy. Jako POZYTYWNE należy z pewnością zauważyć: aktualizację normy prawnej i jednoznaczne sformułowanie stanowiska Rządu. Natomiast jako NEGATYWNE:

- brak zgodności z normami prawnymi UE (dyrektywy) oraz konwencjami międzynarodowymi (np. TRIPS, CBD i BP) i zasadami członkostwa w organizacjach międzynarodowych (np. WTO),
- brak równości podmiotów – proponowany projekt ustawy zdecydowanie dyskryminuje potencjalnych użytkowników i producentów GMO,
- wstrzymanie rozwoju ważnych dziedzin gospodarki narodowej, jak np. produkcja biomateriałów czy też bioenergetyki,
- straty gospodarki: aktualne, związane przykładowo z emigracją kadry biotechnologów oraz koniecznością importu wielu produktów użytkowanych z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej (jak np. pasze, hormony, zestawy diagnostyczne), które z powodzeniem mogłyby być

produkowane w kraju, z wykorzystaniem rodzimego potencjału kadrowego i gospodarczego; w przyszłości, powstająca obecnie luka technologiczna będzie owocować w perspektywie jednej generacji; emigracja kadry czy też brak rozwijania własnych technologii będą mieć fatalne skutki dla naszej gospodarki.

W kwietniu 2006 r. przyjęto nowelizację „ustawy o nasiennictwie”, która zakazuje w Polsce handlu materiałem siewnym genetycznie zmodyfikowanym. Takie uregulowania prawne są sprzeczne z wieloma międzynarodowymi aktami prawnymi, jak przykładowo: dyrektywy UE, konwencje np. TRIPS i WTO, członkostwa w organizacjach międzynarodowych, np. w OECD.

W przedłożonym projekcie szereg proponowanych rozwiązań i stwierdzeń należy uznać za błędne lub pozbawione podstaw. Wprowadzanie takich założeń do uregulowań prawnych będzie skutkowało istotnymi stratami gospodarczymi.

PRZYKŁADOWO:

Nieprawdą jest, że nowa norma prawna spowoduje utworzenie nowych miejsc pracy. Odwrotnie: biotechnolodzy, którzy nie mogą realizować swej pracy zawodowej we własnym kraju będą emigrować, a w konsekwencji restrykcyjnej normy prawnej firmy nie będą inwestować w przemysł biotechnologiczny.

Podane „nowe” miejsca prawne dotyczą administracji i nadzoru, a nie rozwoju gospodarki narodowej. Podane dane dotyczące szacunku liczby analiz i ich kosztów, jak również liczby osób, które będą zaangażowane przy kontroli, są zdecydowanie zaniżone. Z całym naciskiem należy podkreślić, że są to nowe miejsca pracy nieprodukcyjne, a administracyjne i kontrolne.

Rolnictwo to jest nie tylko produkcja artykułów spożywczych oraz pasz. Polskie rolnictwo winno stawać się bazą surowcową dla bioenergetyki (etanol, oleje, biomasa do spalania) oraz biomateriałów (biodegradowalne plastiki, włókna naturalne).

Polska norma prawna nie może być sprzeczna z uregulowaniami UE. Zakaz obrotu nasionami GM na terenie Polski (art. 57 nowej ustawy „O nasiennictwie”) stanowi naruszenie tej zasady. Zakaz uprawy komercyjnej roślin GM w Polsce jest również naruszeniem prawa UE (art. 166).

Rolnictwo nie jest ograniczone do produkcji roślinnej (jak sugeruje analizowany dokument). Produkcja zwierzęca ma zasadnicze znaczenie nie tylko dla celów konsumpcyjnych, ale także przemysłowych, w tym produkcji leków, paraleków, żywności funkcjonalnej czy też organów zastępczych (np. ksenotransplantacje).

Prawo nie może preferować lub dyskryminować określonych grup obywateli. Zgodnie z przedłożonym projektem aktu prawnego producenci GMO są jednoznacznie dyskryminowani poprzez nadmierną administrację, biurokrację oraz obciążenia finansowe (poprzez opłaty bezpośrednie czy też gwarancje zabezpieczenia finansowego) (dział V, rozdz. II; art. 105, 130 i sąsiednie).

Proponowana norma prawna praktycznie uniemożliwia prowadzenie prac doświadczalnych w otwartym środowisku. Tak zatem, proponowane prawo uniemożliwia udzielenie odpowiedzi na pytanie stawiane przez polityków jak i społeczeństwo: jaki będzie efekt danego GMO w naszych, polskich, warunkach środowiskowych, bowiem jak wykonać eksperymenty, skoro są one niemożliwe do realizacji? (dział IV).

Przedłożony projekt nie zawiera żadnej propozycji rozporządzeń wykonawczych.

Konieczne jest jednoznaczne określenie krajowego koordynatora zagadnień dotyczących GMO.

Polskie normy prawne obecnie obowiązujące są zgodne z ustawodawstwem Unii Europejskiej. W odniesieniu do modyfikacji genetycznych genomu człowieka oraz w sprawach dotyczących żywności i środków farmaceutycznych obowiązują w naszym kraju (jak i w innych krajach UE) osobne regulacje prawne.

Przyszły rozwój polskiej biotechnologii jest w zasadniczym stopniu uwarunkowany przez normy prawne i opinię publiczną [a zatem przez wyborców]; postęp naukowy i techniczny – niestety – wydaje się mniej istotny w opinii Autorów tej ustawy.

W zgodnej opinii środowiska biotechnologów koncepcje rozwoju można sformułować w formie następujących wniosków:

Postęp biotechnologii stwarza szansę rozwoju ekonomicznego.

Należy zwrócić uwagę na to, że w przypadku biotechnologii nawet najbardziej zaawansowane badania naukowe są „przekładane” na zwykłe produkty, jak np. farmaceutyki, środki piorące czy też artykuły żywnościowe.

Współczesna biotechnologia w życiu codziennym wzbudza ambiwalentne odczucia w społeczeństwie.

W rzeczywistości istnieją zahamowania dotyczące rozwoju przemysłu biotechnologicznego spowodowane przez moratorium względem żywności zmodyfikowanej genetycznie (*GM foods*), stworzone w państwach Unii Europejskiej czy, też dokumenty rzą-

dowe, jak „Ramowe stanowisko Rządu Polskiego”.

W Polsce przemysł biotechnologiczny jest bardzo ograniczony, a zatem nie są tworzone miejsca pracy; natomiast istnieje duży rynek konsumentów, liczący ok. 38 mln. ludzi.

Uwarunkowania zrównoważonego rozwoju biotechnologii można sformułować jako pomoc państwa w zakresie:

Wspomagania innowacyjności (*kooperacja na linii nauka – business – przemysł*).

Pomocy dla przedsiębiorczości (*tworzenie małych firm*).

Dostępności środków finansowych (*mechanizmy finansowania typu Initial Public Offering – IPO, Venture Capital – VC, kredyty państwa wspierające powstawanie firm*).

Prawa (*stabilność norm prawa i międzynarodowa harmonizacja*).

Elastyczności rozwiązań rządowych i prawnych (*analiza zagrożeń w przeciwstawieniu do zysku społecznego*).

Otwartego handlu i swobody konkurencji (*bariery, protekcjonizm, cła*).

Aspektów społecznych (*odbiór społeczny, akceptacja innowacyjnych produktów*).

KONKLUDUJĄC:

W procesie formowania prawa ważna jest zarówno „litera prawa” jak i „duch prawa”. Z głębokim przekonaniem i ubolewaniem należy stwierdzić, że omawiany projekt ustawy nie spełnia zasad dobrej techniki legislacyjnej. Jednocześnie „duch” tego projektu jest wyraźnie sprzeczny z rozwojem innowacyjnej nauki i technologii oraz rozwojem gospodarczym kraju.

WIADOMOŚCI KRAJOWE

Polska Federacja Biotechnologii – PFB (prezes – prof. Tomasz Twardowski) **odniosła się krytycznie do projektu nowej ustawy „Prawo o or-**

ganizmach modyfikowanych genetycznie” przedstawionej 30 maja 2006 r. do konsultacji środowisku naukowemu (w terminie 3 tygodni) przez

Ministerstwo Środowiska. Ostre protesty przeciw zamierzonym utrudnieniom wobec badań nad i z GMO, eskalacji biurokratycznych i kontrolnych

działań wobec jednostek naukowych i badawczych pracujących nad GMO, przedstawiły Rady Wydziałów: Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (19 czerwca 2006 r.) oraz Biologii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (5 lipca 2006 r.).

W listach skierowanych do Ministerstwa Środowiska przez wspomniane wyżej Rady Wydziałów umieszczony jest protest przeciw uzależnieniu badań naukowych od decyzji urzędników MŚ i obawa, że bariery biurokratyczne osłabiają potencjał naukowy kraju, a przede wszystkim dobrze pojętą wolność nauki. Projekt wprowadza zamiar upublicznienia w Internecie każdego GMO, nad którym pracują naukowcy; grozi to utratą innowacyjnego charakteru badań, pozwoli na swobodny dostęp do zdobyczy intelektualnych konkurencyjnym grupom badawczym i przekreśli możliwość ubiegania się o przyznanie patentów. Projekt ustawy nie dąży do szerzenia wiedzy w społeczeństwie o GMO i możliwościach ich wykorzystania ani nie zmierza do zmniejszenia obaw i niechęci obywateli nieświadomych znaczenia hodowlanych i uprawnych GMO.

Szczegółowe informacje na temat stanowiska prezesa Polskiej Federacji Biotechnologii prof. Tomasza Twardowskiego zamieszczono na stronach 223-224.

Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości (PARP) wspiera młodych, przedsiębiorczych ludzi w ich dążeniu do rozpoczęcia pracy na własny rachunek, zwłaszcza w dziedzinach związanych z wykorzystaniem nowych technologii i innowacyjnych wyrobów. PARP działa także na rzecz komercjalizacji wyników badań prowadzonych przez jednostki badawczo-rozwojowe i polskie uczelnie oraz powstawania przy nich firm odpryskowych tzw. spin-off (ustawa z lipca 2005 r.). Rok 2005 był rokiem intensyfikacji działań w zakresie wspierania rozwoju przedsiębiorczości akademickiej. PARP nawiązała współpracę z Konferencją Rektorów Akademickich Szkół Polskich (KRASP) w zakresie wspierania działań mających na celu pobudzenie, a następnie rozwój przedsiębiorczości w środowisku akademickim. PARP zaangażowała się w prace Instytutu

Społeczeństwa i Wiedzy oraz Fundacji Rektorów Polskich nad opracowaniem *Kodeksu Partnerstwa Nauki i Gospodarki, etap I: Regulacje prawne, dobre wzorce, praktyki dotyczące korzystania przez podmioty gospodarcze z wyników prac badawczych i innych osiągnięć intelektualnych instytucji akademickich i naukowych* oraz ściśle współpracuje z Ministerstwem Gospodarki przy programowaniu systemowych rozwiązań oraz realizacji programów pilotażowych mających pobudzić rozwój przedsiębiorczości akademickiej.

PARP zleciła przeprowadzenie analizy stanu rozwoju przedsiębiorczości akademickiej w Polsce, pod kątem transferu technologii z uczelni do przemysłu i tworzenia tzw. spin-off'ów i na jej na zlecenie grupa polskich ekspertów opracowała przewodnik po doświadczeniach międzynarodowych w zakresie wspierania innowacyjnej przedsiębiorczości akademickiej. PARP patronuje inicjatywom służącym kreowaniu postaw przedsiębiorczych wśród studentów i pracowników nauki. Jesienią 2005 r. PARP uruchomiła portal poświęcony zagadnieniom innowacyjności i transferowi technologii (www.pi.gov.pl). Znalazł się w nim także dział poświęcony przedsiębiorczości akademickiej: Aktualizowana baza inicjatyw wspierających rozwój przedsiębiorczości akademickiej, zawierająca informacje o działaniach podejmowanych przez wybrane uczelnie i organizacje studenckie dostępne są m.in. dane nt. programów staży i praktyk, konkursów na pomysł na biznes, czy na najlepszy biznes plan, szkoleń z zakresu przedsiębiorczości; Zamknięte forum dyskusyjne, adresowane do przedstawicieli środowiska akademickiego, służące wymianie informacji i doświadczeń pomiędzy organizatorami poszczególnych inicjatyw, wspólnemu poszukiwaniu rozwiązań problemów dotyczących wsparcia rozwoju przedsiębiorczości akademickiej; Publikacje – w portalu prezentowane są wydawnictwa PARP, dotyczące innowacyjności i transferu technologii. Ponadto PARP ułatwia swoim partnerom (organiza-

torom inicjatyw służących rozwojowi przedsiębiorczości wśród studentów i pracowników nauki) dostęp do opracowań, związanych z zagadnieniem przedsiębiorczości akademickiej. **Portal Akademia PARP** – www.akademia.parp.gov.pl – zawiera ofertę szkoleń z zakresu przedsiębiorczości.

Program FOCUS subsydia dla młodych uczonych na tworzenie zespołów naukowych. FNP zaprasza młodych (nie przekroczone 37 lat) badaczy ze stopniem doktora uzyskanym nie dawniej niż 6 lat przed rokiem składania wniosku, o znaczącym dorobku naukowym w zakresie modelowania matematycznego procesów biologicznych, do zgłaszania wniosków do programu FOCUS. Konkurs kierowany jest do osób prowadzących aktywną działalność naukową, osiągających znaczące wyniki oraz prowadzących od niedawna lub tworzących samodzielny zespół naukowy. FNP oferuje laureatom konkursu trzyletnie (z możliwością prolongaty na kolejne 2 lata) subsydia w wysokości 240 tys. zł (80 tys. rocznie) obejmujące część stypendialną i część subwencyjną na badania. Laureaci będą mogli wziąć udział w zamkniętym konkursie grantowym na dodatkowe środki na doskonalenie warsztatu badawczego (suma na granty: 2 mln zł). **Termin składania wniosków: 15 października 2006 r.** Informacje: www.fnp.org.pl.

Nominacje profesorskie z rąk Prezydenta RP otrzymali w dniu 20 czerwca 2006 r. naukowcy różnych specjalności; wymieniam nazwiska profesorów zrzeszonych w Polskim Towarzystwie Biochemicznym. Są to: pani prof. **Mirosława Szczepańska-Konkel** (Fot. 1) i panowie prof. **Jerzy Edward Klimek** oraz **Michał Woźniak** (Fot. 2) z AM w Gdańsku, pan prof. **Rafał Roman Tarnawski** z Centrum Onkologii – Oddział w Gliwicach, pan prof. **Andrzej Kiejstut Kononowicz** z Uniwersytetu Łódzkiego i pan prof. **Ryszard Wiktor Stolarski** z Uniwersytetu Warszawskiego.



Fotografia 1. Profesor Mirosława Szczepańska-Konkel.

Prezydencka rada ds. Edukacji i Badań Naukowych. 18 lipca 2006 r.

w Pałacu Prezydenckim Prezydent Rzeczypospolitej Polskiej Lech Kaczyński spotkał się z przedstawicielami świata nauki. Gośćmi Prezydenta byli członkowie Prezydium Konferencji Rektorów Akademickich Szkół Polskich, przedstawiciele PAN oraz Sekcji Nauki NSZZ Solidarność. W spotkaniu wzięli też udział: Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego prof. Michał Seweryński, oraz Doradca Prezydenta RP ds. naukowych prof. dr hab. Michał Kleiber. W trakcie spotkania Prezydent Lech Kaczyński przypomniał zebranym, że zapowiadał wcześniej kolejne spotkania poświęcone statusowi nauki i edukacji, zwłaszcza edukacji wyższej w Polsce i – ujmując zagadnienie szerzej – statusowi wiedzy, oraz pewnym wizjom rozwoju kraju. Prezydent w swojej wypowiedzi uznał postęp edukacyjny w ciągu ostatnich siedemnastu lat – w szczególności postęp, jeśli chodzi o scholaryzację młodzieży na poziomie ponad maturalnym i wyższym – za największy sukces naszej transformacji, która ma



Fotografia 2. Profesor Michał Woźniak.

słabości (edukacja realizowana w ramach wzrostu kadry naukowej o niecałe 50%) i sukcesy (ok. 50% młodzieży na studiach). Z istoty rzeczy musi być to związane z problemem jakości nauczania. Przypomniał zebranym, że mówił o tym wysiłku edukacyjnym wcześniej, wracając do tego przy kolejnych nominacjach profesorskich, ponieważ uważa, że jakość edukacji w ogóle, a w szczególności jakość edukacji szkolnictwa wyższego w naszym kraju w roku 2006 i w latach następnych jest problemem zasadniczym. W trakcie wypowiedzi Prezydent poruszył istotę statusu wiedzy w kraju, podnoszącego kulturę społeczną i będącego narzędziem rozwoju, i zatrzymał się dłużej nad problemem nowym, tj. emigracją naukową młodych naukowców, zauważając, że praca badawcza za granicą jest przejawem pozytywnym, a powrót naukowca do kraju powinien być jednoznaczny z kontynuowaniem przez niego satysfakcjonującej pracy badawczej, wzmacniającej pozycję i konkurencyjność naukowej jednostki, w której został on zatrudniony. Pozostawanie młodych naukowców poza

granice Polski jest stratą intelektualną. W dalszej części swego wystąpienia Prezydent wyraził swoją gotowość, we współpracy z rządem, patronować różnym programom rozwojowym, które miałyby na celu zsumowanie wysiłków proedukacyjnych i mających na celu rozwój badań naukowych. Jedno z drugim jest bardzo wyraźnie związane. Miałyby one również za zadanie zachęcanie do powrotu tych Polaków, którzy opuścili Polskę na kilka lat, którzy mają istotne osiągnięcia, w szczególności w nauce. Po dyskusji z przedstawicielami nauki

doszło do powołania przy Prezydencie Rady ds. Edukacji i Badań Naukowych i do ogłoszenia decyzji o objęciu przez Prezydenta patronatu nad niezwykle uzdolnioną młodzieżą, o cechach „genialności”, której liczbę szacuje się na 100-200 osób, oraz zapewnienia, że w tej sprawie zostaną podjęte działania zmierzające do opracowania form instytucjonalnych patronatu.

Projekt ScanBalt. Jednym z głównych i najbardziej zaawansowanych projektów organizacji ScanBalt jest program o nazwie ScanBalt Campus (SBC), rozpoczęty oficjalnie na spotkaniu 14 czerwca 2005 r. w Lund. Ma on na celu utworzenie modelowej dla Europy, ponadnarodowej i transsektorowej instytucji integrującej edukację, badania naukowe, innowacyjność i transfer technologii w zakresie szeroko rozumianych nauk biologicznych, z udziałem uniwersytetów, instytutów naukowych, firm i szpitali oraz władz samorządowych. Program SBC jest w pełni zgodny z postulatami Deklaracji Bolońskiej i ma na celu podniesienie konkurencyjności bioregionu ScanBalt. Projekt, w którym aktualnie uczestniczy 32 partnerów, kierowany jest przez Radę Projektu (ScanBalt Campus Board) w składzie: Bo Samuelsson – przewodniczący (Uniwersytet w Goeteborgu, Szwecja), Borge Diderichsen – wiceprzewodniczący (Novo Nordisk, Dania), Horst Klinkmann (BioCon Valley, Niemcy), Valdis Pi-

rags (Uniwersytet Łotwy) i Wiesław Makarewicz (Fot. 3) (AM w Gdańsku). Budżet projektu w jego wstępnej fazie wynosi ok. 800 000 euro, a wsparcia



Fotografia 3. Profesor Wiesław Makarewicz.

finansowego udziela Komisja Europejska za pośrednictwem programu INTERREG III. Ambicją twórców programu jest stworzenie w bioregionie ScanBalt nowej jakościowo struktury, pozwalającej na skuteczne integrowanie wiedzy w zakresie szeroko rozumianych nauk biologicznych, poczynając od idei aż po wprowadzenie końcowego produktu na rynek. Jest to próba prze-

zwyciężenia, zakorzenionej w tradycji renomowanych europejskich państwowych uniwersytetów, tendencji do izolacji, niechęci do współpracy, a szczególnie braku otwartości na kontakty z firmami wdrażającymi nowoczesne technologie, szpitalami i instytutami naukowymi. Przygotowywane są wspólne programy kształcenia na poziomie studiów II^o (studia magisterskie) i III^o (studia doktoranckie), oparte na mobilności kadry i studentów. ScanBalt Campus, promując interdyscyplinarność i przełamując sektorowe podziały, daje szansę na tworzenie warunków sprzyjających zwiększeniu nakładów finansowych na naukę i rozwój oraz do poprawy konkurencyjności bioregionu ScanBalt w globalnej gospodarce. Projekt ScanBalt Campus ma strukturę macierzy i budowany jest oddolnie. Jego główną oś stanowią tzw. Centra (Sieci) Wiedzy (Knowledge Networks) posiadające swego koordynatora: Biotechnologia Środowiskowa (Environmental Biotechnology) – koordynatorami są Chalmers University of Technology i Goeteborg University, Szwecja. Osoba do kontaktu: Katarina Gardfeldt; Diagnostyka Molekularna (Molecular Diagnostics) – koordynatorem jest Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG. Osoba do kontaktu: Ewa Łojkowska (lojkowska@biotech.univ.gda.pl); Medycyna Regeneracyjna (Regenerative Medicine) – koordynatorami są: University of Rostock i BioConValley, Niemcy. Osoba do kontaktu: Gustav Steinhoff; Biologia Informacyjna (Informational Biology) – koordynatorem jest Abo

Akademi w Turku, Finlandia. Osoba do kontaktu: Mark Johnson); Procesorowa Technologia Analityczna (Process Analytical Technology [PAT]) – koordynatorem jest Linköping University w Szwecji. Osoba do kontaktu: Carl-Fredrik Mandenius; Własność Intelektualna i Bioprzedsiębiorczość (Intellectual Property & Bio-entrepreneurship) – koordynatorem jest Chalmers University of Technology w Goeteborgu, Szwecja. Osoba do kontaktu: Bo Heiden; Bałtycka Szkoła Przedsiębiorczości (Baltic Entrepreneurship Training) – koordynatorem jest International Entrepreneurship Center w Rostoku, Niemcy. Osoba do kontaktu: Christoph Diensberg; Kształcenie Menedżerów dla Bioprzemysłu Przyszłości (Education and Training of Leaders for the Life Science Industry of the Future) – koordynatorem jest Copenhagen Business School, Dania. Osoba do kontaktu: Jan Annerstedt. Lista Centrów Wiedzy może być rozszerzona po zgłoszeniu nowych inicjatyw obejmujących inne dziedziny wiedzy. **Środowisko naukowe Trójmiasta** zamierza w projekcie **ScanBalt Campus** zaferować swoją ekspertyzę i szerokie kontakty międzynarodowe w zakresie diagnostyki molekularnej. Jednostką koordynującą **ScanBalt Knowledge Network on Molecular Diagnostics** jest **Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu oraz Akademii Medycznej w Gdańsku** i aktualnie jego zespoły badawcze zaangażowane są w obecnej pilotowej fazie w przygotowanie wstępnych założeń tego przedsięwzięcia. Projekt stanowi kontynuację i równocześnie rozwinięcie współpracy międzynarodowej realizowanej w ostatnich latach w ramach Centrum Doskonałości BioMoBiL. Jego zadaniem jest przede wszystkim opracowanie nowatorskiego systemu kształcenia studentów i praktyków w zakresie diagnostyki molekularnej, m.in. nowotworów człowieka i chorób zakaźnych, w tym chorób wirusowych u ludzi i zwierząt, diagnostyki chorób roślin, identyfikacji i różnicowania patogenów roślin. Do udziału w projekcie zaprasza się także wszystkie te jednostki, zakłady i kliniki, które rozwijają i wykorzystują w praktyce diagnostykę molekularną. O ile udałoby się pozyskać dalsze finansowanie już na etapie realizacyjnym, projektowana jest organizacja studiów II stopnia, magister-

skich, w zakresie diagnostyki molekularnej oraz licznych specjalistycznych kursów podyplomowych w szerokiej współpracy międzynarodowej (wg artykułu prof. W. Makarewicza).

Krajowe stypendia wyjazdowe – 2006 r. W piątej edycji konkursu przyznano 11 stypendiów umożliwiających wyjazd na staż w innej niż macierzysta placówce badawczej. Otrzymali je (w naukach przyrodniczych): **dr Ewa Brucka-Jastrzębska** z Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego na staż na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ; **dr Artur Goławski** z Wydziału Rolniczego Akademii Podlaskiej w Siedlcach na staż w Zakładzie Ekologii Behavioralnej UAM; **dr Zbigniew Kasprzykowski** z Wydziału Rolniczego Akademii Podlaskiej w Siedlcach na staż w Katedrze Ekologii i Zoologii Kręgowców Uniwersytetu Gdańskiego; **dr Marcin Palusiak** z Wydziału Fizyki i Chemii UŁ na staż w Instytucie Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; **dr Piotr Przybylski** z Wydziału Chemii UAM na staż na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Szczecińskiej; **dr Justyna Rosicka-Kaczmarek** z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ na staż na Wydziale Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego.

Stypendia Zagraniczne Dla Młodych Doktorów. W siedemnastej edycji tego konkursu, rozstrzygniętej w czerwcu 2006 r., przyznano 19 stypendiów. Otrzymali je: **dr Tomasz Czyszczanowski** z Instytutu Fizyki PŁ na roczny staż w Department of Applied Physics and Photonics, Vrije Universiteit Brussels (Belgia), podczas którego zajmie się optymalizacją laserów półprzewodnikowych z kryształem fonicznym; **dr Anna Dubiec** z Zakładu Ornitologii PAN w Gdańsku na roczny staż w Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University w Cambridge (USA), gdzie będzie realizować badania dotyczące roli genów głównego układu zgodności tkankowej (MHC) w wyborze partnera u ptaków na przykładzie dziwonii ogrodowej; **dr Dorota Dworakowska** z Instytutu Chorób Wewnętrznych AM w Gdańsku na roczny staż w Barts and the London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry w Londynie (Wielka Brytania), który wykorzysta

na badania zaburzeń regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy komórek nowotworowych we wczesnych etapach onkogenezy; **dr Bartłomiej Dybiec** z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ na półroczny staż w Niels Bohr Institute Center for Models of Life, University of Copenhagen (Dania), który poświęcony będzie badaniem struktury sieci (w rozumieniu oddziaływań społecznych i technologicznych) jako pożytecznego medium przenoszącego epidemie; **dr Ewelina Knapka** z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie na roczny staż w Department of Psychology, University of Michigan w Ann Arbor (USA), który ma wykorzystać na zbadanie znaczenia poszczególnych części ciała migdałowatego w kontrolowaniu emocjonalnych zachowań zwierząt; **dr Ireneusz Kownacki** z Wydziału Chemii UAM na roczny staż; w Fachbereich Chemie, Universität Dortmund (Niemcy), który poświęci badaniom przemian nienasyconych związków organicznych zachodzących z udziałem związków krzemu oraz tlenu węgla, katalizowanych siloksyłowymi kompleksami rodu i irydu; **dr Piotr Lesiak** z Wydziału Fizyki Politechniki Warszawskiej na półroczny staż w Liquid Crystal Institute, Kent State University (USA), który będzie poświęcony badaniom materiałów ciekłokrystalicznych i polimerowych służących znalezieniu struktury charakteryzującej się ujemnym współczynnikiem załamania dla światła widzialnego; **dr Damian Plażuk** z Instytutu Chemii UŁ na roczny staż w École Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Francja), gdzie zamierza przeprowadzić syntezę oraz badania biochemiczne metaloorganicznych analogów leków przeciwnowotworowych; **dr Katarzyna Radwańska** z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie na roczny staż w Institute of Psychiatry, King's College London (Wielka Brytania), który poświęci badaniom molekularnego podłoża powstawania pamięci u myszy ze zmutowanym genem kodującym kinazę białkową zależną od wapnia i kalmoduliny; **dr Joanna Rutkowska** z Instytutu Nauk o Środowisku UJ na roczny staż w Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona (USA), podczas którego będzie badać bezpośredni mechanizm determinujący płęć potomstwa u pta-

ków pod wpływem czynników ekologicznych; **dr Katarzyna Smolarz** z Wydziału Biologii, Geografii i Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego na roczny staż w Södertörn University College w Huddinge (Szwecja), gdzie będzie prowadzić badania dotyczące analizy i oceny zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem południowego i północnego Bałtyku na przykładzie morskich małży. Stypendium finansowane z przekazanych FNP środków funduszu „Maria Skłodowska-Curie Joint Fund II”; **dr Piotr Zarzycki** z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie (filia w Lublinie) na roczny staż w College of Chemistry, University of California w Berkeley (USA), który poświęcony będzie projektowi dotyczącemu mechanizmu i kinetyki procesów powierzchniowych zachodzących na granicy faz: tlenek metalu/roztwór elektrolitu.

W trakcie uroczystości wręczona została również **Nagroda im. Artura Rojszczyka** przyznawana przez **Klub Stypendystów Zagranicznych FNP**, zrzeszający stypendystów z lat ubie-

głych. Jej laureatką jest **dr Ewa Kocój** (Fot. 4) z Instytutu Etnologii i Antropologii Kulturowej oraz Instytutu Filologii Romańskiej UJ.

W Gdańsku, 11 maja b.r. otwarto **14th International Student's Scientific Conference**. Wykład p.t. „Human genetic disease: a challenge for molecular biology and medicine” poświęcony pamięci prof. Włodzimierza Mozołowskiego p r o w a -
dził prof.

Grzegorz Węgrzyn z UG.

Prof. Louis J. Ignarro (Fot. 5), laureat Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii z 1998 roku, był gościem Akademii Medycznej w Warszawie w dniu 29 maja b.r. na zaproszenie JM Rektora. Wykład Profesora, wyjaśniający działanie tlenku azotu, połączony z prezentacją multimedialną, poprzedziło słowo Jego Magnificencji Rektora AM, prof. Leszka Pączka i Dziekana Wydziału Kształcenia Po-

dyplomowego, prof. Zdzisława Gacionga. Wyrazem niezwykłego szacunku, którym Akademia Medyczna w Warszawie darzy Profesora Louisa J. Ignarro było wręczenie Mu Medalu im. dr Tytusa Chałubińskiego. Jest to odznaka, którą Akademia Medyczna obdarza najbardziej zasłużone dla Uczelni osoby.

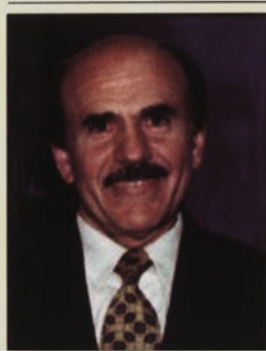
Uniwersytet Szczeciński, w dniu 26 czerwca b.r. nadał tytuł doktora honoris causa prof. Andrzejowi Le-gockiemu, wybitnemu chemikowi i biologowi, aktualnemu Prezesowi PAN. Prowadzi On badania nad ge-

nami roślin, przyczynił się do wyjaśnienia mechanizmu reakcji roślin na stres biotyczny, opracował szczepionki pokarmowe oparte o rośliny transgeniczne. Promotorem przewodu był prof. Jan Kępczyński z Katedry Fizjologii i Biotechnologii Roślin Wydziału Przyrodniczego US. Dyplom dhc odczytał dziekan Wydziału prof. Ryszard Borówka, a tytuł nadał prof. Waldemar Tarczyński, Rektor US.

pod redakcją
Teresy Wesołowskiej



Fotografia 4. Doktor Ewa Kocój.



Fotografia 5. Prof. Louis J. Ignarro.

Komunikat Zarządów Oddziałów Warszawskich Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki

Celem większej integracji warszawskiego środowiska naukowego biologii eksperymentalnej proponujemy organizowanie wspólnych mini-sympozjów. Planujemy organizować je w soboty, 3–4 razy w roku akademickim 2006/2007. Prosimy o zgłaszanie sugestii tematycznych i/lub chęci wygłoszenia wykładów. Liczymy na współpracę z Państwem strony.

Z pozdrowieniami, w imieniu Zarządów PTBK i PTBioch:

Hanna Fabczak, e-mail: hannaFab@nencki.gov.pl
Barbara Zabłocka, e-mail: zablocka@cmdik.pan.pl

Struktura DNA od A do Z – biologiczne implikacje różnorodności strukturalnej DNA

STRESZCZENIE

Kwas deoksyrybonukleinowy jest biopolimerem zbudowanym z czterech nukleotydów, najczęściej występującym w dwuniciowej postaci helikalnej. Jego struktura oparta jest na oddziaływaniach pomiędzy komplementarnymi zasadami. Najtrwalsza i dominująca *in vivo* jest prawoskrętna struktura B-DNA, jednak w określonych warunkach dwuniciowy DNA może przybierać różne inne formy zarówno prawo- jak i lewoskrętne (A-DNA, Z-DNA, P-DNA). Występowanie *in vivo* DNA w postaci struktur wieloniciowych (trypleks, tetrapleks) i wyjaśnienie funkcji biologicznych takich form są przedmiotem intensywnych badań.

WPROWADZENIE

Upłynęło pół wieku od chwili zaproponowania przez Watsona i Cricka struktury podwójnej helisy DNA [1]. W konkluzji pracy opisującej model podwójnej helisy Watson i Crick napisali: „nie uszło naszej uwadze, że zaproponowane przez nas specyficzne parowanie (zasad nukleinowych) sugeruje możliwy mechanizm kopiowania informacji genetycznej” (Nature 1953). Dziś nie sposób przecenić znaczenia tego odkrycia i można uznać, że jego wielkim ukoronowaniem było zsekwencjonowanie genomu człowieka w roku 2002 [2].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie różnorodnych struktur, jakie mogą tworzyć łańcuchy DNA w warunkach *in vitro* i *in vivo*, w zależności od sekwencji oraz od właściwości środowiska takich jak pH i siła jonowa roztworu, obecność jonów metali, obecność innych małych cząsteczek organicznych oraz oddziaływanie z innymi biomolekułami oraz pokazanie konsekwencji biologicznych występowania niektórych spośród tych struktur.

STRUKTURY DWUNICIOWE

W zaproponowanym przez Watsona i Cricka w 1953 roku kanonicznym modelu podwójnej helisy (B-DNA) (Ryc. 1), dwa łańcuchy polinukleotydowe oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe typu Watsona - Cricka występujące pomiędzy zasadami tworzącymi komplementarne pary (Ryc. 1A). Specyficzność parowania zasad stanowi podstawę rozpoznania molekularnego w obszarze kwasów nukleinowych. Struktury dwuniciowe są stosunkowo dobrze poznane i literatura na ich temat jest wyczerpująca [3].

Rycina 1B i 1C przedstawia formy kanoniczne B-DNA, A-DNA i Z-DNA i pozwala prześledzić najważniejsze różnice pomiędzy tymi strukturami. Dwa helikalne łańcuchy polinukleotydowe oplatają wspólną oś i biegną w przeciwnych kierunkach (anty-równoległe: 3'→5'/5'→3'). Płaszczyzny zasad w B-DNA są prostopadłe do osi helisy a płaszczyzny pierścieni cukrów są ułożone wokół osi helisy i oplaszczają zasady. Zasady purynowe i pirymidynowe znajdują się wewnątrz a grupy fosforanowe i reszty deoksyrybozy na zewnątrz

Rycina 1. (A) Oddziaływania wodorowe Watsona-Cricka i modele kanonicznych form B-DNA i A-DNA oraz Z-DNA. (B) widok wzdłuż osi helisy z wyraźnymi rowkami dużym (M-major groove ang.) i małym (m-minor groove ang.). (C) widok z góry, w środku widoczne układające się zasady otoczone szkieletem fosforanowo-cukrowym.

Małgorzata Bukowiecka-Matusiak¹

Lucyna A. Woźniak^{1,2,✉}

¹Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź

²Zakład Biologii Strukturalnej, Katedra Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

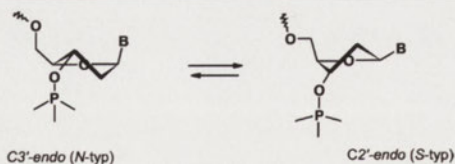
✉ Zakład Biologii Strukturalnej, Katedra Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź; e-mail: lwozniak@bio.cbmm.lodz.pl, lwozniak@achilles.wam.lodz.pl, tel.: (042) 681 69 70, (042) 680 32 48

Artykuł otrzymano 14 września 2005 r.

Artykuł zaakceptowano 16 stycznia 2006 r.

Słowa kluczowe: DNA, struktura, konformacja, dupleks, trypleks, tetrapleks

Wykaz stosowanych skrótów: c-myc – czynnik transkrypcyjny; ZDRs – regiony tworzące Z-DNA; CSFI (ang. colony stimulating factor) – czynnik stymulujący wzrost kolonii; NFI (ang. nuclear factor-1) – czynnik jądrowy; HIF-1α (ang. hypoxia inducible factor-1) – czynnik transkrypcyjny; mXRN1p (ang. mouse cytoplasmic exoribonuclease) – cytoplazmatyczna egzorybonukleaza myszy; VEGF (ang. vascular endothelial growth factor) – śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń; PDGF-A (ang. platelet-derived growth factor A) – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego A



Rycina 2. Skrajne konformacje wiązania glikozydowego i reszt cukrowych C3'-endo oraz C2'-endo.

helisy. Przyczyną znaczących różnic pomiędzy strukturami A-DNA oraz B-DNA jest różna konformacja reszt cukrowych (Ryc. 2). W przypadku struktury A-DNA węgiel C-3' deoksyrybozy znajduje się poza płaszczyzną pierścienia furanowego, przyjmując konformację C3'-endo (Typu N). Natomiast w dwuniciowym DNA o strukturze B-DNA poza płaszczyzną znajduje się atom węgla C2', tworząc konformację C2'-endo (Typu S). Różnica w konformacji pierścienia furanazy w A-DNA i B-DNA prowadzi w konsekwencji do różnych odległości pomiędzy sąsiadującymi resztami fosforanowymi, które wynoszą odpowiednio 5.9 Å w A-DNA oraz 7.0 Å w B-DNA.

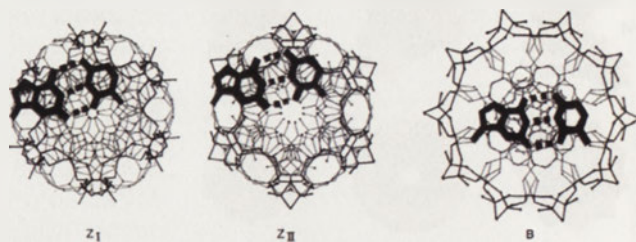
Helisa A-DNA jest bardziej zwarta i szersza w stosunku do B-DNA a pary zasad ulegają odchyleniu średnio o 20° od osi, natomiast zasady przesunięte są względem siebie średnio o 30-32°. W helisie typu A-DNA obserwuje się zanik małego rowka, ponieważ grupy fosforanowe wiążą znacznie mniej cząsteczek wody niż w helisie B-DNA. Badania rentgenostrukturalne A-DNA wykazały dużą różnorodność konformacyjną i strukturalną (rozmiary bruzd, nachylenie względem osi helisy, kąt przesunięcia zasad), zależną od sekwencji oraz długości badanych oligonukleotydów. Pytanie, czy istnieje możliwość równoczesnego występowania różnych form helikalnych *in vivo* stanowi jedno z bardziej istotnych zagadnień biologii molekularnej. Struktura A-DNA, podobnie jak kanoniczna struktura B-DNA, nie jest ograniczona ani uprzywilejowana sekwencyjnie. Istnieje szereg dowodów na możliwość interkonwersji A- i B-DNA w warunkach *in vitro*. Zarówno badania NMR jak i analiza rentgenostrukturalna wskazują na możliwość występowania połączeń A-B DNA, np. we fragmentach Okazaki, gdzie takie zmiany struktury dwuniciowego DNA powodują znaczące zagięcie helisy przy zachowaniu efektywnych oddziaływań warstwowych [4]. Analogiczne właściwości strukturalne jak A-DNA wykazują dwuniciowe obszary RNA oraz hybrydy DNA-RNA. Wprowadzenie niektórych modyfikacji wiązań internukleotydowych (np. metanofosfonianowych) oraz modyfikacji pierścienia cukrowego (np. pochodne 2'-OMe rybonukleozydowe, lub 2'-NH₂-2'-deoksyrybonukleozydowe) do jednego z łańcuchów może prowadzić do utworzenia z komplementarnymi nićmi DNA hybrydowych dupleksów wykazujących cechy strukturalne dwuniciowego A-DNA [5].

Warunkiem koniecznym dla utworzenia formy lewoskrętnej Z-DNA jest występowanie powtarzalnych traktów dinukleotydowych purynowo – pirymidynowych (CG, GC, AT itd.), które wymuszają lewoskrętność helisy oraz powodują zróżnicowanie konformacyjne pierścieni cukrowych (Ryc. 1), przyjmujących konformację zbliżoną do C3'-endo dla pierścieni połączonych z purynami i C2'-endo dla pierścieni połączonych z pirymidynami. W przypadku struktury A-DNA i B-DNA, wszystkie wiązania glikozydowe

wzdłuż łańcucha oligonukleotydu przyjmują konformację *anty*, czyli zasady ułożone są na zewnątrz od pierścienia cukrowego (kąt rotacji średnio χ 210°), co minimalizuje oddziaływania steryczne, natomiast w strukturze Z-DNA wiązanie glikozydowe ma konformację *anty* w 2'-deoksytydynie i tymidynie (kąt rotacji średnio χ 208°) oraz *syn* w 2'-deoksyguanozynie, której pierścień guaninowy położony jest ponad pierścieniem 2'-deoksyrybozy (kąt rotacji średnio χ 67°). Struktury Z-DNA wymagają odpowiednio wysokiego stężenia jonów metali dwuwartościowych (Mg²⁺, Zn²⁺) lub jednowartościowych (Na⁺), których funkcja polega na zminimalizowaniu odpychających oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy fosforanami szkieletu helisy. Stabilizacja Z-DNA w roztworze zależy od mocy jonowej roztworu i maleje w kierunku: spermina³⁺>spermidyna³⁺>Mg²⁺>Na⁺. Warto zwrócić uwagę, że w przypadku Z-DNA zasady nukleinowe są znacznie bardziej odsłonięte na działanie rozpuszczalnika i oddziaływania z innymi biomolekułami, niż w B-DNA (Ryc. 3). Odkrycie *in vivo* konwersji B-DNA do Z-DNA oraz dowód, że w przemianie tej zużywana jest energia ujemnie superhelikalnego DNA wskazuje, że struktura Z-DNA jest wysokoenergetycznym konformerem DNA uczestniczącym w procesach biologicznych [6,7,8].

W końcu lat osiemdziesiątych wykazano min., że prawoskrętna forma B i lewoskrętna forma Z występują w równowadze w plazmidowym DNA *Escherichia coli*. Położenie równowagi jest uzależnione od długości sekwencji podlegających przemianom B do Z. W *E. coli*, Z-DNA tworzy się bez udziału czynników zewnętrznych, ale ilość konformery Z-DNA wzrasta podczas transkrypcji. Zaobserwowano wzrost jego stężenia pod wpływem mutacji inaktywujących topoisomerazę I [9]. W chwili obecnej znanych jest szereg sekwencji podlegających interkonwersji B do Z lub istniejących w postaci struktur lewoskrętnych m. in. w 22 chromosomie człowieka w tzw. regionach tworzących Z-DNA [10].

W latach dziewięćdziesiątych opisano występowanie lewoskrętnego DNA w kompleksach z białkami: ZαADARI człowieka [11] oraz ZDAM myszy [12]. W komórkach ssaków występuje kompleks BAF regulujący poziom ekspresji ponad 80 genów w wyniku modyfikacji struktury chromatyny. Wykazano, że mechanizm tej regulacji polega na utworzeniu kompleksów pomiędzy białkami NFI/CTF z odpowiednim promotorem CSF1, którego aktywacja przebiega poprzez utworzenie Z-DNA pod wpływem kompleksu BAF. Tak więc w zaproponowanym modelu, kompleks BAF kontroluje przejście B-DNA do Z-DNA, która to zmiana



Rycina 3. Izomery Z-DNA występujące w postaci szeregu zbliżonych struktur (oznaczonych Z_I i Z_{II}) o zróżnicowanych konformacjach, które w różny sposób oddziałują z cząsteczkami wody lub jonami metali. Dla porównania pokazano strukturę B-DNA (B). Więcej danych można znaleźć na stronach www.dnahelicalconformationimage.library.of.biological.macromolecules.imb.jena.de/ http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/nana/IMAGE_NANA.html.

konformacji DNA powoduje stabilizację struktury chromaty-
ny na promotorze CSF1 [13]. Wykazano również, że *N*-ko-
niec (Z_{E3L}) białka E3L odpowiedzialnego za letalność myszy
zainfekowanych wirusem krowianki ma strukturę podobną
do rodziny $Z\alpha$ białek wiążących *Z*-DNA. Jednocześnie
wykazano, że mutacje obniżające powinowactwo E3L do
Z-DNA mogą powodować obniżenie patogenności wirusa
krowianki oraz innych wirusów z grupy *poxvirus* w sto-
sunku do różnych organizmów i stanowić interesujący cel
do poszukiwania leków sekwencyjnie zależnych przeciw
poszczepiennym postaciom ospy [14].

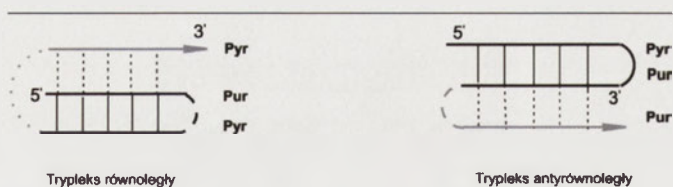
Pomimo swoich rozmiarów i złożonej budowy, łańcuch
DNA jest strukturą dynamiczną i podlegającą *in vivo* róż-
norodnym przemianom topologicznym. W procesach bio-
logicznych zachodzących w jądrze komórkowym dwuni-
ciowy DNA ulega rozplataniu m.in. w procesach replikacji
i transkrypcji, zachodzącym pod wpływem gyraz i topoi-
zomeraz [15] oraz ponownemu utworzeniu struktury dwu-
niciowej helisy. W czasie tych procesów lokalne zmiany
strukturalne mogą być bardzo znaczące i związane są z od-
wrotnym rozciąganiem (ang. *stretching*), zginiem (*ang.*
bending), skręcaniem (*ang. twisting*) oraz załamaniem
(*ang. kinking*) helisy.

STRUKTURY TRÓJNICIOWE

Wzajemne oddziaływania łańcuchów DNA (rozpozna-
nie na drodze tworzenia wiązań wodorowych), powodujące
utworzenie struktur wyższego rzędu, prowadzą również do
szeregu innych form niż te, które zostały opisane powyżej.
Mogą być w nie zaangażowane zarówno kolejne nici kwa-
sów nukleinowych lub inne fragmenty tego samego DNA o
określonej sekwencji jak również syntetyczne modyfikowa-
ne oligonukleotydy [16].

W ten sposób tworzą się m. in. struktury trójniciowe, tzw.
trypleks a także struktury, w których utworzenie zaangażo-
wane są cztery nici (lub cztery różne fragmenty tej samej
nici), czyli tzw. *tetrapleksy*. Tworzenie struktury tryplekso-
wej można rozpatrywać jako wynik zmian konformacyjnych
zachodzących w dupleksie, w wyniku których helisa jest w
stanie zasocjować trzeci łańcuch w bruzdzie większej. Try-
pleksy DNA mają więc ułożenie dwóch antyrównoległych
nici zbliżone do struktury *B*-DNA i powiązanych wiązaniami
typu Watsona-Cricka; najpoważniejszą różnicą jest od-
chylenie od osi i większe rozwinięcie helisy spowodowane
zawadą przestrzenną wynikającą z asocjowania trzeciej nici.
Warunkiem koniecznym utworzenia struktury trójniciowej
jest występowanie komplementarnych dwuniciowych trak-
tów polipurynowo-polipirimidynowych (Ryc. 4).

Trzecia nić trypleksu (najczęściej pirymidynowa) może
być ułożona w stosunku do nici, z którą oddziałuje w dwu-
niciowym DNA w sposób równoległy (tzn 3'-koniec trzeciej
nici oddziałuje z 3'-końcem fragmentu DNA) lub antyrów-
noległy (tzn 3'-koniec trzeciej nici tworzy odwrotne wiązania
typu Hoogsteena z 5'-końcem fragmentu DNA). Trypleks
równoległy powstaje, gdy do dupleksu purynowo-pirymi-
dynowego przyłącza się nić pirymidynowa [17] i oddziałuje
za pomocą wiązań wodorowych *typu Hoogsteena*, natomiast
trypleks antyrównoległy powstaje, gdy do dupleksu przyłą-

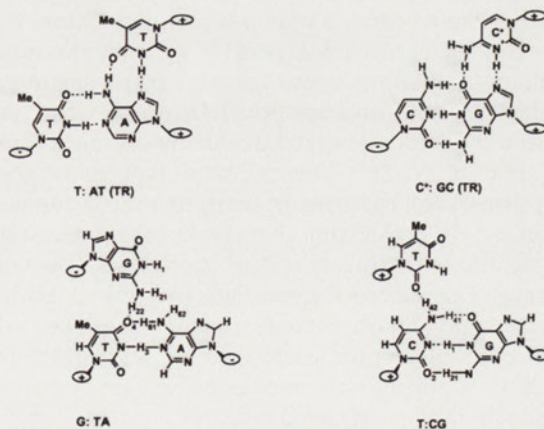


Rycina 4. Schemat trypleksów równoległych i antyrównoległych. Nić homopirymidynowa –szara, nić homopurynowa–czarna. Linie ciągłe oznaczają wiązania Watsona-Cricka, linie przerywane oznaczają (odwrotne) wiązania Hoogsteena.

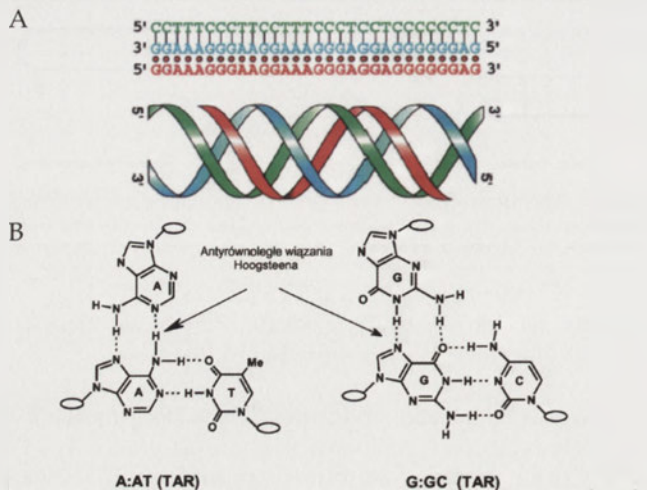
cza się nić purynowa, która jest związana z dupleksem wią-
zaniemami wodorowymi *typu odwrotnych wiązań Hoogsteena*
(ang. *reverse Hoogsteen hydrogen bonds*) (Ryc. 5, 6).

Utworzenie wiązań wodorowych *typu Hoogsteena* z 2'-de-
oksycytydyną, zaangażowaną w wiązania wodorowe Wat-
sona-Cricka wymaga uprotonowania azotu N^3 cytozyny
trzeciej nici i zachodzi wyłącznie w środowisku kwaśnym
(pH < 4.5).

Rycina 6 ilustruje strukturę trypleksu antyrównoległego
utworzonego z kanonicznych trypletów G:GC oraz A:AT.
Nić polipirimidynowa (zielona) jest komplementarna do
nici polipurynowej (niebieska) i wiąże się z nią wiązaniami
typu Watsona-Cricka. Trzecia nić, która jest nicią polipuryno-
wą (czerwona), jest antyrównoległa do nici polipurynowej
dwuniciowego DNA i znajduje się w dużym rowku podwój-
nej helisy. Dla trypleksu równoległego najbardziej trwałe są
struktury oparte na motywach kanonicznych tzn.: T:AT oraz
C*:GC. W przypadku występowania w trzecim łańcuchu nie-
kanonicznych zasad, mogą się utworzyć tryplety o znacząco
niższej trwałości, analogicznie jak destabilizujący wpływ na
trwałość dupleksu DNA wywierają niesparowane zasady.
Para AT jest najlepiej rozpoznawana przez tyminę, chociaż
adenina może również tworzyć stosunkowo trwały tryplet
A:AT. Podobnie para GC jest najlepiej rozpoznawana przez
protonowaną cytozynę (C*), jednakże może ona tworzyć w
różnych warunkach również inne mniej trwałe tryplety, w
tym A*:GC, T:GC lub G:GC [18]. Wykazano, że guanina (G)
tworzy najtrwalszy tryplet z parą TA, jednak w warunkach
niskiego pH oraz naprężeń superhelikalnych to tryplet C:TA
jest najtrwalszy. Para CG może być rozpoznawana zarówno
przez tyminę (T) jak guaninę (G), ale żaden z tych trypletów



Rycina 5. Wiązania wodorowe odpowiedzialne za tworzenie trypletów z udziałem trzeciej zasady w trypleksach równoległych. Kanoniczny tryplet T:AT i C*:GC oraz przykłady trypletu niekanonicznego G:TA i T:CG, wraz z numeracją atomów zaangażowanych w architekturę motywu trypletu (symbol „*” oznacza wiązanie Hoogsteena).

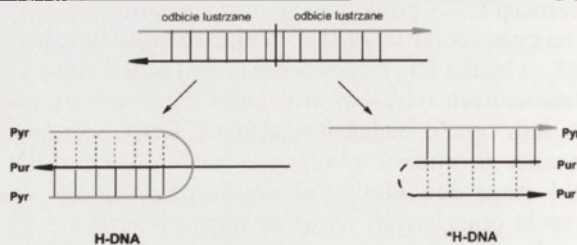


Rycina 6. (A) Trypleks antyrównoległy i stabilizujące go odwrotne wiązania Hoogsteena; (B) struktury kanoniczne trypletów antyrównoległych A:AT i G:GC.

nie jest stabilny, a ich względna stabilność zależy silnie od warunków. Wynika stąd, że dla trypleksu równoległego wszystkie cztery pary zasad mogą potencjalnie tworzyć tryplety, jednak względna trwałość takich struktur różni się znacząco, szczególnie w przypadku par TA i CG. Istotna w tym kontekście jest możliwość utraty specyficzności rozpoznawania wynikająca z faktu, że tymina (T) może rozpoznawać zarówno pary AT jak GC, podczas gdy cytozyna (C) rozpoznaje zarówno parę GC jak CG.

W przypadku trypleksu antyrównoległego, kanoniczne tryplety G:GC, A:AT i T:AT są znacznie bardziej stabilne niż tryplety niekanoniczne [19]. Jednak adenina (A) może tworzyć tryplet z parą GC natomiast tymina (T) wiąże się z parą CG. Jedynie para TA nie tworzy z innymi zasadami trwałego trypletu, co stanowi poważne ograniczenie tworzenia się trypleksów antyrównoległych. Z drugiej strony zdolność tyminy do tworzenia trypletów zarówno z parami AT jak i CG oraz adeniny (A) do rozpoznawania par AT i GC powoduje obniżenie specyficzności tworzenia trypleksów antyrównoległych. Kanoniczne tryplety T:AT i C:GC (TR) są izosteryczne w przeciwieństwie do trzech kanonicznych trypletów motywu antyrównoległego (A:AT, T:AT i G:GC), co może prowadzić do znaczących odkształceń w przypadku struktur składających się z różnych trypletów. Istotna różnica pomiędzy kanonicznymi trypletami w trypleksie równoległym (TR) oraz trypleksie antyrównoległym (TAR) wynika z faktu, że trypleksy równoległe są izosteryczne, podczas gdy TAR nie są izosteryczne. Struktury trypleksowe są stabilizowane obecnością jonów metali: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , oraz poliamin (spermina, spermidyna, putrescyna), które neutralizują ujemny ładunek grup fosforanowych. Wykazano, że trypleks *in vitro* jest stabilny przy 5-10 mM stężeniu jonów Mg^{2+} , podczas gdy w warunkach *in vivo* konieczne stężenie wynosi prawdopodobnie mniej niż 1 mM [20]. Tworzenie trwałego trypleksu wymaga pełnej komplementarności zasad we wszystkich trzech łańcuchach, a pojedyncze niesparowane zasady powodują znaczącą destabilizację struktury.

W latach osiemdziesiątych Frank-Kamenetskii z zespołem wykazali, że wewnątrzcząsteczkowe struktury trypleksowe mogą się tworzyć w wyniku oddziaływań homopury-



Rycina 7. Wewnątrzcząsteczkowe zmiany konformacyjne prowadzące do powstania H-DNA i *H-DNA, stanowiących przykład równoległego i antyrównoległego ułożenia trzeciego fragmentu łańcucha. Nić homopirymidynowa oznaczona kolorem szarym, nić homopurynowa – kolor czarny. Linie ciągłe oznaczają wiązania Watsona-Cricka, linie przerywane oznaczają wiązania (odwrotne) Hoogsteena.

nowo-homopirymidynowych powtórzeń lustrzanych (*ang. mirror repeat sequences*) w ujemnie splecionych plazmidach [21], co stanowiło przełom w poszukiwaniach dowodów na istnienie trypleksów *in vivo* i poznaniu ich funkcji biologicznych. Autorzy ci wskazali również na specjalne znaczenie takich struktur dla aktywności nukleazy S1. Ponieważ wiele spośród zidentyfikowanych dotąd traktów purynowo-pirymidynowych występuje w postaci powtórzeń lustrzanych, stanowi to poważną przesłankę istnienia trypleksów *in vivo*. Struktury takie, określane jako H-DNA, tworzą się, gdy jedna część sekwencji lustrzanej dysocjuje na oddzielne pojedyncze łańcuchy purynowy i pirymidynowy, po czym następuje ponowne przyłączenie łańcucha homopirymidynowego do pozostałej połowy sekwencji dupleksu sekwencji mieszanej i utworzenie w bruzdzie większej struktury o charakterze trypleksu równoległego (Ryc. 7). Pozostała część pojedynczej nici homopurynowej odpowiada za czułość nukleazy S1.

Możliwa jest również sytuacja, kiedy nić homopurynowa asocjuje ponownie tworząc trypleks antyrównoległy (*H-DNA). Struktury H-DNA zostały opisane szczegółowo w wielu monografiach i pracach przeglądowych [22]. Obecność kationów dwuwartościowych powoduje preferencyjne utworzenie *H-DNA (antyrównoległe) w stosunku do H-DNA. Hipoteza o występowaniu struktur H-DNA i *H-DNA w żywych organizmach została potwierdzona między innymi badaniami genu promotorowego *hsp26* muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*), w którym wykazano znaczenie segmentu purynowo-pirymidynowego (CT)_n(GA)_n dla prawidłowego tworzenia struktury chromatyny i aktywacji genu, przeprowadzając eksperymenty z serią transgenów *hsp26-lacZ* o zmienionej sekwencji [23]. Wykazano, że obecność sekwencji lustrzanej w regionie homopurynowo-homopirymidynowym, warunkująca utworzenie struktury H-DNA nie jest wystarczającym czynnikiem regulacji genu *hsp26* w sytuacji, gdy regiony wiązania czynnika GAGA zostały usunięte.

Konieczność protonowania N^3 cytozyny w trzecim łańcuchu trypleksu równoległego wskazuje na ograniczoną występowania trypleksów równoległych w pH neutralnym, stabilne są natomiast trypleksy, w których cytozyny trzeciego łańcucha zastąpione są naturalnie występującą 5-metylocytozyną (m^5C). Stabilizującym czynnikiem w warunkach neutralnego pH może być również wzrost ujemnej superhelikalnej gęstości [24].

Identyfikacja białek łączących się z fragmentami trypleksowymi stanowi kolejny dowód na występowanie tych struktur *in vivo*. Między innymi wyodrębniono dwa białka z komórek HeLa, które preferencyjnie wiążą się z trypleksami [25,26]. Istotne w tym kontekście wydaje się wyjaśnienie znaczenia struktur trypleksowych w regulowaniu procesów transkrypcji. Szereg prac wskazuje na aktywność trypleksów jako czynników *trans*-działających między innymi w komórkach myszy, gdzie sekwencje poli(dG) występują powyżej (*upstream*) genów działających jako aktywatory [27], co więcej długość tych sekwencji ma istotne znaczenie dla tego procesu; dG₂₇₋₃₀ działa aktywująco, podczas gdy dG₃₅ nie daje takiego samego efektu. Rezultatem wprowadzania *in vitro* traktów poli(dG) do superhelikalnego plazmidu było utworzenie H-DNA, gdy sekwencje te miały długość co najmniej 32 par zasad, podczas gdy sekwencje krótsze niż dG₃₀ nie wywoływały zjawiska H-DNA. Wskazuje to na możliwość tworzenia przez poli(dG) intramolekularnych trypleksów i blokowanie *trans*-transkrypcji.

Struktury trójniciowe mogą się tworzyć również przejściowo w procesie homologicznej rekombinacji. Wprowadzenie sekwencji poli(dG).poli(dC) pomiędzy dwa powtórzenia na drodze aktywnej transkrypcji *in vivo* wywołuje homologiczną rekombinację najprawdopodobniej w wyniku powstania *H-DNA i następującego potem powtórnego odtworzenia rozdzielonych sekwencji, stymulującego rekombinację [28], a powstająca w wyniku utworzenia H-DNA pojedyncza nić może działać jako łańcuch inwazyjny w rekombinacji homologicznej [29]. Innym przykładem jest udział trójniciowego *H-DNA tworzącego się z polimorficznych homopurynowo – homopirymidynowych sekwencji niezbędnych do replikacji genomu wirusowego Epsteina-Barra. Udowodniono, że w tym przypadku mutacje punktowe hamują zarówno replikację jak i tworzenie *H-DNA [30]. Wskazuje to na istotną rolę w procesie replikacji nie tylko sekwencji DNA, ale także struktur trzyczłonowych wywołanych obecnością traktów polimorficznych. Istnieje szereg pośrednich dowodów na występowanie podobnych struktur między innymi w genomowym DNA człowieka, w którym występują trakty homopirymidynowo-homopurynowe (Pyr-Pur), stanowiące ponad 1% całej puli DNA [31].

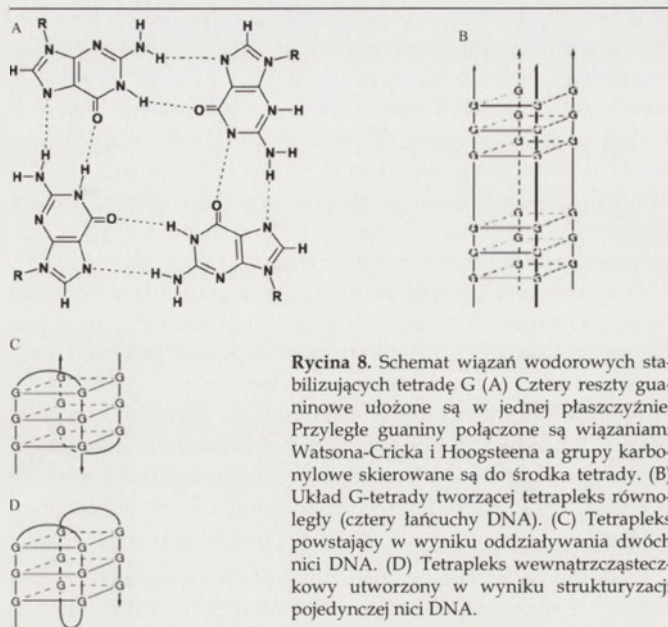
Tworzenie struktur trypleksowych *in vivo* nie jest warunkowane obecnością specyficznych białek, ale istnieniem odpowiednio długich traktów purynowo-pirymidynowych [32]. DNA w organizmach eukariotycznych występuje w postaci superhelikalnej, ściśle upakowane w nukleosomach i jest związane z białkami histonowymi, utrudniającymi tworzenie stabilnych struktur wyższego rzędu, w tym trypleksów [33]. Kompleksy DNA-białka są strukturami dynamicznymi, dzięki czemu możliwe jest rozpoznanie helikalnego DNA przez specyficzne sekwencje wiążące białka, a także przypuszczalnie przez fragmenty homopurynowe lub homopirymidynowe, prowadzące do przejściowego utworzenia struktur trójniciowych [34]. Wymuszenie tworzenia takich struktur poprzez wprowadzenie do komórki komplementarnych oligonukleotydów tworzących trypleks (TFO) może znaleźć zastosowanie w biochemii i biologii molekularnej. Wykazano bowiem, że utworzenie struktur trypleksowych w regionach promotorowych powoduje za-

blokowanie dostępu czynników transkrypcyjnych i prowadzi do inhibicji aktywacji genów *in vitro*, w tym również w komórkach ssaków. Zastosowanie TFO stwarza możliwość wyciszenia i korekcji genów poprzez wywołanie trwałych zmian w ich sekwencji. Powstawanie struktur trypleksowych wywołanych wprowadzeniem TFO na metabolizm DNA oraz potencjalne możliwości korekcji genów rekombinantowych i procesów naprawczych *in vitro* oraz *in vivo* są przedmiotem intensywnych badań [35,36]. W roku 2000 wykazano po raz pierwszy, że TFO mogą indukować mutacje w określonych obszarach genomu w komórkach somatycznych dorosłych myszy transgenicznym posiadających wbudowane plazmidowe geny reporterowe *supF* i *cII* [37]. Wynik ten stanowił potwierdzenie, że procesy kontrolowanej modyfikacji genomu spowodowane utworzeniem struktur trypleksowych mogą być przeprowadzone w organizmach zwierzęcych, co stanowi istotny krok w kierunku zastosowań medycznych i rozwoju terapii genowej [38,39].

Wiadomo obecnie, że znacząca część sekwencji pirymidynowo – purynowych, zdolnych potencjalnie do tworzenia struktur trypleksowych (H-DNA) w genomie organizmów eukariotycznych jest zlokalizowana w regionach 5' genów globulin β i γ , genu receptora interleukiny-2 oraz genu *c-myc* [40,41]. Ponadto struktury trypleksowe odgrywają także znaczącą rolę w organizowaniu się chromosomów. Trakty purynowo-pirymidynowe mogą tworzyć pętle DNA, które powstają w miejscu tworzenia się trypleksu na zasadach nukleinowych [42]. Stwierdzono, że liniowy *in vitro* plazmid, zawierający rozdzielone trakty homopurynowe i homopirymidynowe może *in vivo* tworzyć pętle cykliczne lub w kształcie litery Ω , będące najprawdopodobniej rezultatem tworzenia trypleksu [43].

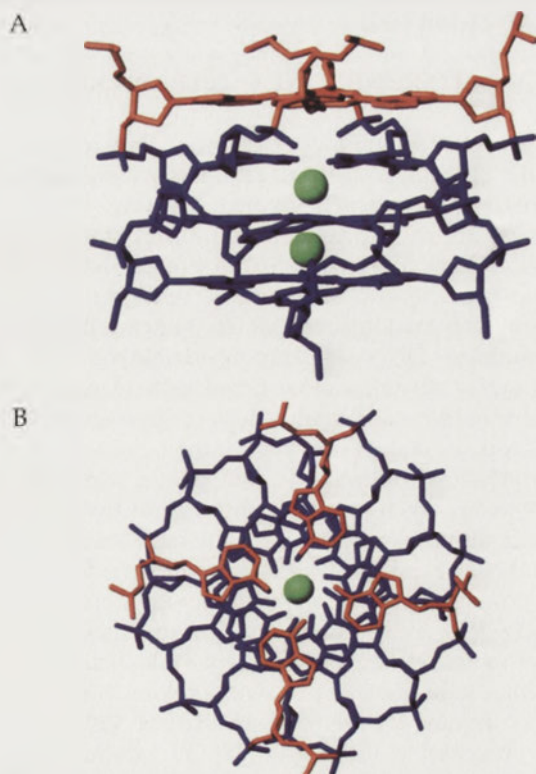
STRUKTURY CZTERONICIOWE – TETRAPLEKSY

Bogate w reszty guaninowe sekwencje DNA mogą tworzyć trwałe struktury, będące rezultatem oddziaływań czterech reszt guaninowych, tworzących tzw. tetradę G (G-tetrapleks) w fizjologicznych warunkach stężenia jednowartościowych kationów sodu lub potasu. Szczególnie dużo uwagi poświęcono strukturze i funkcjom sekwencji telomerowych znajdujących się na końcach liniowego chromosomalnego DNA [44], odpowiedzialnych m. in. za ochronę końców chromosomów przed uszkodzeniami genów i nieprawidłową rekombinacją, uczestniczących w kontroli ekspresji genów i replikacji homologicznej i innych procesach [45,46,47]. Obecnie uważa się, że wiele funkcji telomerów związanych jest ze zdolnością do tworzenia *in vivo* struktur tetrapleksowych. Wykazano, że szereg białek (np. RAP1, białko represorowo/aktywatorowe z drożdży) o wysokim powinowactwie do fragmentów telomerycznych DNA wykazuje również powinowactwo do struktur tetrapleksowych a nawet ułatwia tworzenie takich struktur *in vivo*, regulując jednocześnie aktywność telomerazy i wskazując na potencjalne znaczenie terapeutyczne tego procesu w terapii przeciwnowotworowej [48]. W ostatnich latach zidentyfikowano szereg helikaz odpowiedzialnych za rozplatanie G-tetrapleksów, m. in. w *Saccharomyces cerevisiae* (helikaza Sgs1) [49] czy helikaza związana z syndromem Wernera, odpowiedzialna za rozplatanie powtarzających się sekwencji d(CGG)_n [50], co stanowi dodatkowy dowód

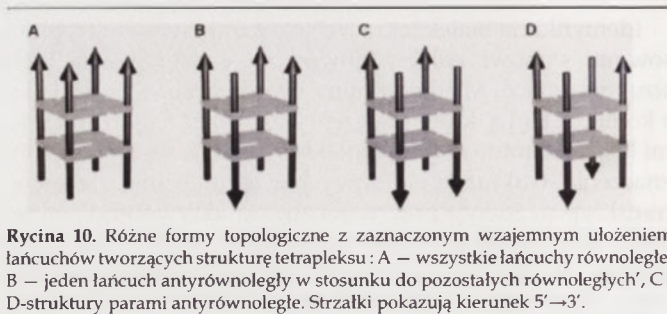


potwierdzający obecność i biologiczne znaczenie tetrapleksów *in vivo*.

Podstawową jednostką tej struktury jest *tetrada* – G, którą tworzą cztery pierścienie guanin (lub ogólniej, puryn) ułożonych w jednej płaszczyźnie i połączonych wiązaniami wodorowymi (Ryc. 8). Tleny grup karbonylowych O^6 ułożone są w jednej płaszczyźnie w kierunku centrum tetrazy i w obecności kationów sodu lub potasu (Na^+ , K^+) dodatko-



Rycina 9. Struktura tetrapleksu $d(TTAGGGT)_4$ utworzonego z równoległych nici DNA zawierających sekwencje telomerowe występujące u człowieka, uzyskana na podstawie NMR oraz symulacji dynamiki molekularnej; (A) struktura rdzenia AGGG wraz z lokalizacją jonów potasu pomiędzy płaszczyznami tetrad (B) kanał potasowy oraz widoczny skręt helikalny struktury; reproduковано za zgodą [52].



Rycina 10. Różne formy topologiczne z zaznaczonym wzajemnym ułożeniem łańcuchów tworzących strukturę tetrapleksu: A – wszystkie łańcuchy równoległe, B – jeden łańcuch antyrównoległy w stosunku do pozostałych równoległych, C i D-struktury parami antyrównoległe. Strzałki pokazują kierunek 5'→3'.

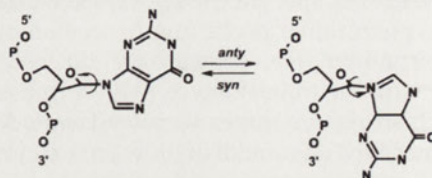
wo stabilizują całą strukturę *in vitro*. Szczególnie cenne dla wyjaśnienia lokalizacji i funkcji jonów metali w stabilizacji struktur tetrapleksowych okazały się badania krystalograficzne. Analizując sekwencję $d(TG_4T)$ Feigon i wsp. wykazali, że jony potasu, zlokalizowane pomiędzy płaszczyznami zdefiniowanymi przez tetrazy-G, wiążą się z nimi poprzez osiem wiązań koordynacyjnych stabilizujących strukturę [51]. Wykazano np., że sekwencja telomerowa człowieka $d(TTAGGGT)_4$ (Ryc. 9) tworzy intramolekularne struktury tetrapleksowe w roztworach zawierających kationy sodowe w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych. Tworzenie analogicznej struktury, stabilizowanej kationem amoniowym ułożonym symetrycznie pomiędzy dwoma płaszczyznami tetrad, potwierdzono przy wykorzystaniu spektroskopii NMR w roztworze oligonukleotydu o sekwencji $d(G_4T_4G_4)_2$ [52]. Również w tym przypadku stabilizująca rola kationu polegała na utworzeniu wiązań (typu wiązań wodorowych) z ułożonymi w jednej płaszczyźnie grupami O^6 guanin.

Istnieje szereg możliwości topologicznie zróżnicowanych oddziaływań czterech łańcuchów DNA prowadzących w efekcie do utworzenia tetrapleksów, przedstawionych schematycznie na Ryc. 10.

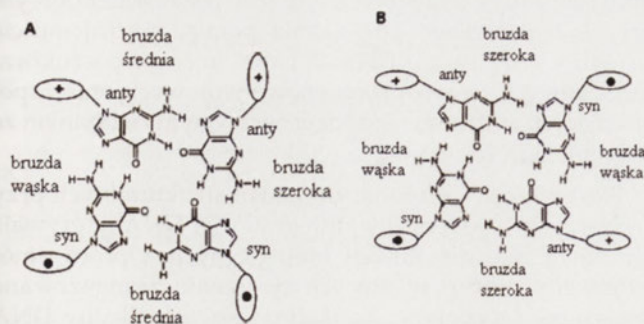
Utworzenie takich polimorficznych struktur wymaga konformacyjnej labilności wiązania glikozydowego w 2'-deoksyguanozynie, która może występować zarówno w konformacji *syn* jak i konformacji *anty* (Ryc. 11).

Konformacja wiązania glikozydowego określa orientację zasad w stosunku do pierścienia cukrowego oraz wzajemne ułożenie pierścieni zasad, w ten sposób determinując energię asocjacyjnych oddziaływań warstwowych. Jeśli łańcuchy tetrapleksu ułożone są równoległe (Ryc. 10A), wówczas wymuszona jest taka sama konformacja wszystkich reszt guanozyny (*syn*), ale gdy wszystkie nici są w stosunku do siebie antyrównoległe (Ryc. 10D), wymusza to konformację *anty* wszystkich wiązań glikozydowych guanozyn.

Architektura wiązań wodorowych pomiędzy pierścieniami purynowymi tworzącymi tetradę powoduje, że w strukturach tetrapleksowych występują cztery bruzdy o



Rycina 11. Rotacja wokół wiązania glikozydowego 2'-deoksyguanozyny – przejście pomiędzy konformacją *syn* i *anty* umożliwia tworzenie różnych struktur tetrapleksowych.



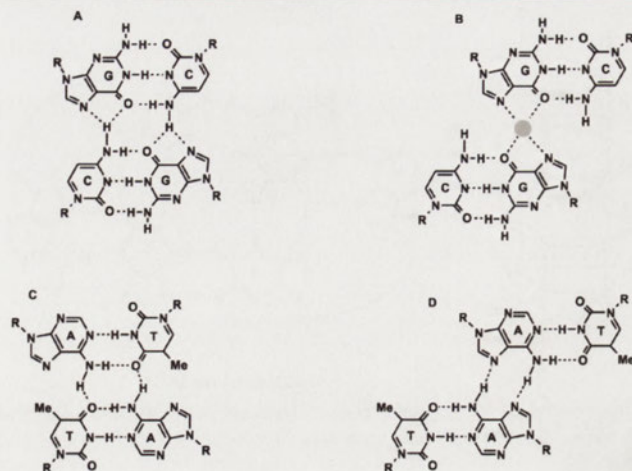
Rycina 12. Schemat tworzenia bruzd dla tetrapleksu zawierającego: (A) dwie pary nici wzajemnie równoległych; (B) wyłącznie nici antyrównoległe.

różnych rozmiarach. Jeżeli wszystkie nici w tetrapleksie są równoległe, wówczas wszystkie cztery bruzdy są średniego rozmiaru. Jeżeli natomiast ułożenie nici jest antyrównoległe, bruzdy mogą przyjmować różne kształty i rozmiary. W przypadku dwóch par sąsiadujących równoległych nici (Ryc. 12A), 2'-deoksyguanozyna, która należy do sąsiedniej nici i ma taką samą konformację wiązania glikozydowego tworzy bruzdę średnią, podczas gdy 2'-deoksyguanozyna sąsiedniej nici antyrównoległej (przyjmuje wtedy odwrotną konformację wiązania glikozydowego) tworzy dwie bruzdy o zróżnicowanych wymiarach (szeroką i wąską).

W przypadku nici wyłącznie antyrównoległych, ułożonych na przemian jak na Ryc. 12B, powstają dwie szerokie i dwie wąskie bruzdy. Takie zróżnicowanie kształtu i rozmiaru bruzd powoduje różnice w trwałości różnych typów tetrapleksów, różnice w oddziaływaniu z innymi ligandami, w tym odmienny wzór hydratacji. Z obliczeń *ab initio* wynika, że trakty 2'-deoksyguanozynowe chętniej tworzą struktury tetrapleksowe, w których wszystkie 2'-deoksyguanozyny przyjmują konformację *anty*, podczas gdy naprzemienny układ nukleozydów typu *anty/syn* występuje jedynie w tetrapleksach antyrównoległych [53]. Wiele struktur zawierających wyłącznie konformację *anty* lub *syn* zostało scharakteryzowanych jako struktury z regularną konformacją naprzemienną *anty/syn*.

Najnowsze prace Patela i wsp. wskazują ponadto na możliwości innej aranżacji tetrad, składających się nie tylko z oddziałujących ze sobą reszt guaninowych [54], ale powstających w wyniku oddziaływań dwuniciowych DNA, kiedy jedna z podwójnych helis stanowi ligand ulokowany w bruzdzie większej (zachowane są wiązania Watsona-Cricka, stabilizujące obydwie helisy) drugiej helisy (Ryc. 13).

Tworzenie struktur wieloniciowych *in vivo* jest procesem złożonym, uwarunkowanym zarówno superhelikalną strukturą chromosomalnego DNA, jak i oddziaływaniami DNA z białkami (np. strukturalne białka histonowe, czynniki transkrypcyjne oraz inne białka enzymatyczne i regulatorowe). Scharakteryzowano szereg białek, które oddziałują specyficznie z fragmentami DNA zdolnymi do wytworzenia struktur tetrapleksowych [55,56]. Białka z orzęsków *Tetrahymena thermophila* [57] i *Oxytricha* [58], oprócz funkcji wiązania do G-tetrapleksu, są czynnikami ułatwiającymi tworzenie tych struktur. Zidentyfikowano również egz nukleazę z drożdży, kodowaną przez gen *KEM1*, wykazującą preferencyjną aktywność w stosunku

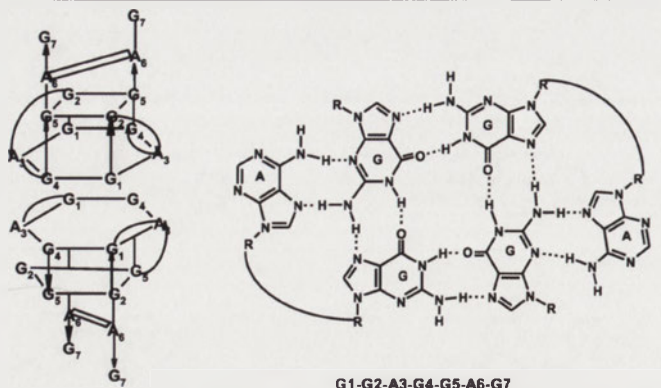


Rycina 13. Potencjalne motywy tetrady GCGC (pary CG Watsona-Cricka) oraz ATAT (pary AT Watsona-Cricka) o architekturze wynikającej z (A,C) bezpośredniego (B,D) przesuniętego oddziaływania krawędzi bruzdy większej helikalnego DNA. Oddziaływanie przesuniętych krawędzi (B) wymaga zaangażowania jednowartościowego kationu, koordynującego skierowane do wewnątrz tleny akceptorowe [54].

do pozycji 5' fragmentu zaangażowanego w strukturę tetrapleksową [59]. Ponadto, znana jest cytoplazmatyczna egzorybonukleaza myszy mXRN1p, rozpoznająca preferencyjnie tetrapleksy RNA jako substraty [60]. Trakty guaninowe występują nie tylko w sekwencjach telomerycznych. Zidentyfikowano je również w regionach kodujących geny supresorowe, które zapobiegają transformacji nowotworowej komórek glejaka (retinoblastoma) [61], w regionach kodujących insulinę człowieka [62], czy w regionach kontroli onkogenu *c-myc* [63]. Do badań klinicznych dopuszczone już obecnie są związki, których funkcja polega na niedopuszczeniu do tworzenia struktur tetrapleksowych w regionach promotorowych sekwencji kodującej szereg białek onkogennych, w tym VEGF, PDGF-A, HIF-1 α , H-Ras, *c-myc* [64]. Dalszego wyjaśnienia wymaga również funkcja niektórych białek m. in. podjednostki β białka wiążącego sekwencje telomero- wyizolowanego z orzęska *Oxytricha* [65] czy białka Rap1 drożdży [66], wykazujących właściwości białek opiekuńczych oraz przyspieszających tworzenie struktur tetrapleksowych. Nadal jednak stosunkowo niewiele wiadomo na temat molekularnych aspektów rozpoznawania i degradacji enzymatycznej różnych struktur tetrapleksowych DNA i funkcji biologicznych tych struktur.

PODSUMOWANIE

Powyższe opracowanie, z konieczności bardzo skrócone, ma na celu pokazanie, dlaczego pomimo ponad 50 letniej historii intensywnych studiów, DNA jest ciągle bardzo intensywnie badaną biomolekulą. Zbudowany ze stosunkowo prostych monomerów (cztery zasady nukleinowe), DNA cechuje się nadzwyczaj wysoką różnorodnością funkcjonalną i strukturalną. Na podkreślenie zasługuje fakt, że ciągle są odkrywane nowe motywy strukturalne, np. opisany w 2000 roku przez Patela i wsp. motyw *heksady*, który tworzą cztery guaniny oraz dwie adeniny, ułożone w jednej płaszczyźnie i powiązane za pomocą dodatkowych wiązań wodorowych (Ryc. 14) [67].



G1-G2-A3-G4-G5-A6-G7

Rycina 14. Schemat heksady, której rdzeń stanowi tetradą G połączona położonymi mostkowo dwoma resztami adeninowymi; przygotowano na podstawie [67].

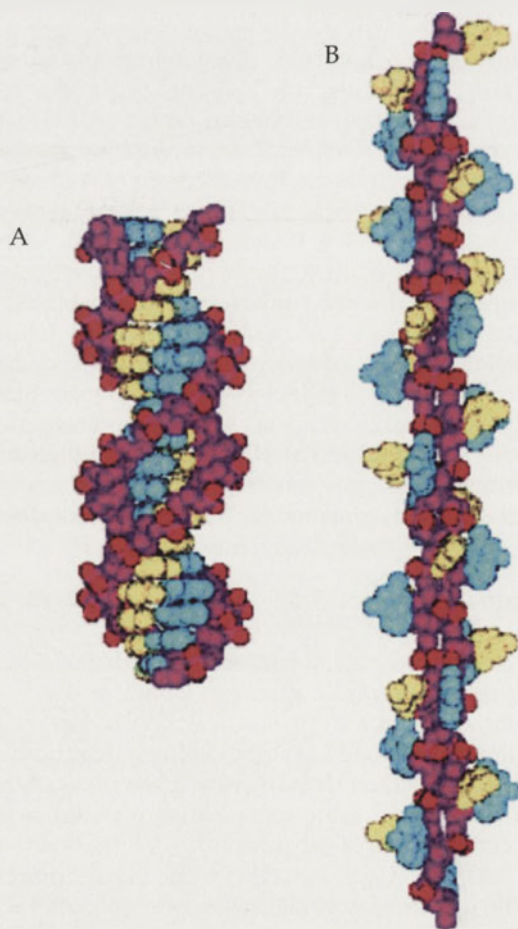
Z badań NMR wynika, że motyw heksady jest trwały, a zatem utworzenie takiej struktury może stanowić interesującą drogę do hamowania aktywności telomerazy. Wynik ten wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania różnych ligandów (w tym nukleotydów) oddziałujących z fragmentami chromosomów o sekwencjach telomerycznych, zdolnymi do wbudowania się pomiędzy płaszczyzny tetrad tetrapleksu i w ten sposób zaburzającymi oddziaływanie końców chromosomów z telomerazą, jako potencjal-

nych czynników terapeutycznych [68]. Jest również dobrym przykładem ścisłego powiązania pomiędzy znajomością struktury i organizacji DNA *in vitro* i *in vivo* a poszukiwaniem nowych terapii przeciwnowotworowych oraz zapobiegających zmianom neurodegeneracyjnym związanym ze starzeniem DNA.

Elastyczność i zdolność do zmian strukturalnych przy zachowaniu sekwencyjnej integralności DNA odgrywają kluczową rolę dla funkcji biologicznych. Oprócz omówionych struktur, w których tworzenie zaangażowane jest szereg łańcuchów, helikalny i superhelikalny DNA ulega procesom zginania, łamania i rozciągania. Skrajnym przykładem możliwości adaptacyjnych DNA jest postać rozciągniętej pod wpływem sił zewnętrznych nici DNA o sekwencji $(dG)_{18} \cdot (dC)_{18}$ [69]. W przypadku P-DNA (nazwa pochodzi od nazwiska L. Paulinga, który w 1953 roku zaproponował model helisy, w której zasady były ułożone na zewnątrz helisy) rozciąganie podwójnej helisy wzdłuż jej osi doprowadziło do całkowitej zmiany ułożenia łańcuchów względem siebie, przy zachowaniu kanonicznych reguł komplementarności (Ryc. 15B) [70]. Pozostaje otwarte pytanie o możliwość wystąpienia P-DNA *in vivo* oraz o czynniki, które mogłyby stabilizować taką strukturę.

PIŚMIENNICTWO:

1. Watson JD, Crick FH (1953) A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171: 737-738
2. International Human Genome Sequencing Consortium (2002) *Nature* 409: 860
3. Neidle S, ed (1999) *Oxford Handbook Nucleic Acid Structure*. Oxford Science Publication, Oxford University Press, New York
4. Saenger W (1984) *Principles of Nucleic Acids Structure*. Springer-Verlag, New York
5. Wang AH-J, Quigley GJ, Kolpak FJ, van der Marel G, van Boom JH, Rich A (1981) Left-handed double helical DNA: variations in the backbone conformation. *Science* 211: 171-176
6. Singleton CK, Klysik J, Stirdivant SM, Wells RD (1982) Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions. *Nature* 299: 312-316
7. Ha SC, Lowenhaupt K, Rich A, Kim Y-G, Kim KK (2005) Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. *Nature* 437: 1183-1186
8. Herbert A, Rich A (1999) Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica* 106: 37-47
9. Jaworski A, Higgins NP, Wells RD, Zacharias W (1991) Topoisomerase mutants and physiological conditions control supercoiling and Z-DNA formation *in vivo*. *J Biol Chem* 266: 2576-2581
10. Champ PC, Maurice S, Vargason JM, Camp T, Ho PS (2004) Distribution of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 32: 6501-6510
11. Schwartz T, Rould MA, Lowenhaupt K, Herbert A, Rich A (1999) Crystal structure of the Z alpha domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science* 284: 1841-1845
12. Schwartz T, Behlke J, Lowenhaupt K, Heinemann U, Rich A (2001) Structure of the DLM-1-Z-DNA complex reveals a conserved family of Z-DNA-binding proteins. *Nat Struct Biol* 8: 761-765
13. Liu R, Liu H, Chen X, Kirby M, Brown PO, Zhao K (2001) Regulation of CSF1 Promoter by the SWI/SNF-like BAF Complex. *Cell* 106: 309-318
14. Kim YG, Lowenhaupt K, Oh DB, Kim KK, Rich A (2004) Evidence that Vaccinia virulence factor E3L binds to Z-DNA *in vivo*: Implications for development of a therapy for poxvirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1514-1518



Rycina 15. „Rozciągnięta” (B) podwójna helisa o sekwencji $(dG)_{18}(dC)_{18}$ przyjmuje zaskakującą konformację, w której zasady ułożone są na zewnątrz łańcucha i eksponowane do rozpuszczalnika; dla porównania B-DNA (A) o tej samej sekwencji; reproduковано za zgodą [69].

15. Bates AD, Maxwell A (1999) DNA topology. IRL Press Oxford UK
16. Felsenfeld G, Davies DR, Rich A (1957) Formation of a 3-stranded polynucleotide molecule. *J Am Chem Soc* 79: 2023-2024
17. Beal PA, Dervan PB (1991) Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science* 251: 1360-1363
18. Macay RF, Gilbert DE, Malek S, Sinsheimer J, Feigon J (1991) Structure and stability of X-G-C mismatches in the third strand of intramolecular triplexes. *Science* 254: 270-274
19. Greenberg WA, Dervan PB (1995) Energetics of formation of sixteen triple helical complexes which vary at a single position within a purine motif. *J Am Chem Soc* 117: 5016-5022
20. Blume SW, Lebowitz J, Zacharias W, Guarcello V, Mayfield CA, Ebbinghaus SW, Bates P, Jones DE Jr, Trent J, Vigneswaran N, Miller DM (1999) The integral divalent cation within the intermolecular purine*purine pyrimidine structure: a variable determinant of the potential for and characteristics of the triple helical association. *Nucl Acids Res* 27: 695-702
21. Belotserovskii BP, Veselkov AG, Filippov SA, Dobrynin VN, Mirkin SM, Frank-Kamenetski MD (1990) Formation of intramolecular triplex in homopurine-homopyrimidine mirror repeats with point substitutions. *Nucl Acids Res* 18: 6621-6624
22. Besch R, Giovannangeli C, Degitz K (2004) Triplex-Forming Oligonucleotides – Sequence-Specific DNA Ligands as Tools for Gene Inhibition and for Modulation of DNA-Associated Functions. *Curr Drug Targets* 5: 691-703
23. Lu Q, Teare JM, Granok H, Swede MJ, Xu J, Elgin SCR (2003) The capacity to form H-DNA cannot substitute for GAGA factor binding to a (CT)_n(GA)_n regulatory site. *Nucl Acids Res* 31: 2483-2494
24. Rougee M, Faucon B, Mergny JL, Barcelo F, Giovannangeli C, Garestier T, Helene C (1992) Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatches. *Biochemistry* 31: 9269-927836
25. Paillart JC, Skripkin E, Ehresmann B, Ehresmann C, Marquet R (1996) A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5572-5577
26. Christiansen J, Kofod M, Nielsen FC (1994) A guanosine quadruplex and two stable hairpins flank a major cleavage site in insulin-like growth factor II mRNA. *Nucl Acids Res* 22: 5709-5716
27. Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T (1991) Altered gene expression correlates with DNA structure. *Genes Dev* 7: 1090-1101
28. Kohwi Y, Panchenko Y (1993) Transcription-dependent recombination induced by triple-helix formation. *Genes Dev* 7: 1766-1778
29. Rooney SM, Moore PD (1995) Antiparallel, intramolecular triplex DNA stimulates homologous recombination in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2141-2144
30. Portes-Sentis S, Sergeant A, Gruffat H (1997) A particular DNA structure is required for the function of a cis-acting component of the Epstein-Barr virus OriLyt origin of replication. *Nucl Acids Res* 25: 1347-1354
31. Wong AKC, Yee HA, van de Sande JH, Rattner JB (1990) Distribution of CT-rich tracts is conserved in vertebrate chromosomes. *Chromosome* 99: 344-351
32. Zain R, Sun JS (2003) Do natural DNA triple-helical structures occur and function *in vivo*? *Cell Mol Life Sci* 60: 862-870
33. Westin L, Blomquist P, Milligan JF, Wrangé O (1995) Triple helix DNA alters nucleosomal histone-DNA interactions and acts as a nucleosome barrier. *Nucl Acids Res* 23: 2184-2191
34. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080
35. Seidman MM, Glazer PM (2003) The potential for gene repair via triple helix formation. *J Clin Invest* 112: 487-494
36. Orson FM, Thomas DW, Meshan WM, Kessler DJ, Hogan ME (1991) Oligonucleotide inhibition of IL2R α mRNA transcription by promoter region collinear triplex formation in lymphocytes. *Nucl Acids Res* 19: 3435-3441
37. Vasquez KM, Narayanan L, Glazer PM (2000) Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* 290: 530-533
38. Kuan JY, Glazer PM (2004) Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides. *Methods Mol Biol* 262: 173-194
39. Besch R, Giovannangeli C, Degitz K (2004) Triplex-forming oligonucleotides-sequence-specific DNA ligands as tools for gene inhibition and for modulation of DNA-associated functions. *Curr Drug Targets* 5: 691-703
40. Ulrich MJ, Gray WJ, Ley TJ (1992) An intramolecular DNA triplex is disrupted by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *J Biol Chem* 267: 18649-18658
41. Kolluri R, Torrey TA, Kinniburgh AJ (1992) A CT promoter element binding protein: Definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucl Acid Res* 20: 111-116
42. Brown PM, Fox KR (1996) Nucleosome core particles inhibit DNA triple helix formation. *Biochem J* 319: 607-611
43. Hampel K.J, Ashley C, Lee JS (1994) Kilobase-range communication between polypurine-polypyrimidine tracts in linear plasmids mediated by triplex formation: A braided knot between two linear duplexes. *Biochemistry* 33: 5674-5681
44. Zakian VA (1995) Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270: 1601-1607
45. Hahn WC (2005) Telomere and telomerase dynamics in human cells. *Curr Molecular Medicine* 5: 227-231
46. Giraldo R, Suzuki M, Chapman L, Rhodes DP (1994) Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7658-7662
47. Simonsson T (2001) G-quadruplex DNA structures – variations on a theme. *Biol Chem* 382: 621-628
48. Raymond E, Soria JC, Izbic E, Boussin F, Hurley L, Von Hoff DD (2000) DNA G-quadruplexes, telomere-specific proteins and telomere-associated enzymes as potential targets for new anticancer drugs. *Invest. New Drugs* 18: 123-137
49. Sun H, Bennett RJ, Maizels N (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucl Acids Res* 27: 1978-1984
50. Fry M, Loeb LA (1999) Human Werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)_n. *J Biol Chem* 274: 12797-12802
51. Hud NV, Sklenar V, Feigon J (1999) Localization of ammonium ions in the minor groove of DNA duplexes in solution and the origin of DNA A-tract bending. *J Mol Biol* 286: 651-660
52. Gavathiotis E, Searle MS (2003) Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat: Evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations. *Org Biomol Chem* 1: 1650-1656
53. Aboul-ela F, Murchie AI, Lilley DM (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG₄T). *Nature* 360: 280-282
54. Zhang N, Gorin A, Majumdar A, Kettani A, Chernichenko N, Skripkin E, Patel DJ (2001) Dimeric DNA quadruplex containing major groove aligned ATAT and GCGC tetrads stabilized by inter-subunit Watson-Crick AT and GC pairs. *J Mol Biol* 312: 1073-1078
55. Balagurumoorthy P, Brahmachari SK (1995) Intra- and interloop interactions in the folded G quartet structure of *Oxytricha* telomeric sequence. *Indian J Biochem Biophys* 32: 385-390
56. Dempsey LA, Sun H, Hanakahi LA, Maizels N (1999) G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, a role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem* 274: 1066-1071
57. Schierer T, Henderson E (1994) A protein from *Tetrahymena thermophila* that specifically binds parallel-stranded G4-DNA. *Biochemistry* 33: 2240-2246
58. Fang G, Cech TR (1993) Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the β -subunit of the *Oxytricha* telomere-binding protein. *Biochemistry* 32: 11646-11657

59. Liu Z, Gilbert W (1994) The yeast KEM1 gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: Implication of *in vivo* functions for this novel DNA structure. *Cell* 77: 1083-1092
60. Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buertsedde JM, Heyer WD (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 136: 761-773
61. Murchie AJ, Lilley DM (1992) Retinoblastoma susceptibility genes contain 5' sequences with a high propensity to form guanine-tetrad structures. *Nucl Acids Res* 20: 49-53
62. Hammond-Kosack MC, Dobrinski B, Lurz R, Dochert K, Kilpatrick MW (1992) The human insulin gene linked polymorphic region exhibits an altered DNA structure. *Nucl Acids Res* 20: 231-236
63. Han H, Hurley LH (2001) G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol Sci* 21: 136-141
64. Lim JKC, Rice WG, Schwaebe MK, Siddiqui-Jain A, Trent KB, Whitten JP, Hurley LH, von Hoff D (2005) Clinical development of CX-3543, a novel multi-targeting antitumor agent. *J Clin Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings* 23: 3206
65. Fang G, Cech TR (1993) The β subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* 4: 875-885
66. Giraldo R, Rhodes D (1994) The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA. *EMBO J* 13: 2411-2420
67. Kettani A, Gorin A, Majumdar A, Hermann A, Skripkin E, Zhao H, Jones R, Patel DJ (2000) A dimeric DNA interface stabilized by stacked A (G G G G)·A hexads and coordinated monovalent cations. *J Mol Biol* 297: 627-644
68. Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH (1998) NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry* 37: 12367-12374
69. Allemand JF, Bensimon D, Lavery R, Croquette V (1998) Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14152-14157
70. Pauling L, Corey RB (1953) A proposed structure for the nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 39: 84-97

DNA structure from A to Z – biological implications of structural diversity of DNA

Małgorzata Bukowiecka-Matusiak¹, Lucyna A. Wozniak^{1,2} 

¹Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences; Department of Bioorganic Chemistry, 112 Sienkiewicza Str., 90-363 Łódź, Poland

²Medical University, 7/9 Żeligowskiego Str., 90-752 Łódź, Poland

e-mail: lwozniak@bio.cbmm.lodz.pl, lwozniak@achilles.wam.lodz.pl

Key words: DNA, conformation, structure, duplex, triplex, tetraplex

ABSTRACT

Deoxyribonucleic acid (DNA) is a biopolymer of nucleotides, usually adopting a double-stranded helical form in cells, with complementary base pairing holding the two strands together. The most stable is B-DNA conformation, although numerous other double helical structures can occur under specific conditions (A-DNA, Z-DNA, P-DNA). The existence of multiple-stranded (triplex, tetraplex) forms *in vivo* and their biological function in cells are subject of intensive studies.

Naprawa chemicznie metylowanego DNA w *Escherichia coli* – rola białka AlkB

STRESZCZENIE

Czynniki metylujące należą do najbardziej rozpowszechnionych mutagenów środowiskowych. Związki te metylują głównie zasady w DNA i RNA i powodują zmiany ich funkcji. W *E. coli* alkiłowane zasady są naprawiane przez białka i enzymy, które znajdują się stale w komórkach (Ogt, Tag) lub pojawiają się okresowo (Ada, AlkB, AlkA, Aid) po indukcji systemu obronnego Ada. W *E. coli* czynniki alkiłujące indukują również system SOS, obejmujący ekspresję około 40 różnorodnych białek, a wśród nich i te, które biorą udział w naprawie, rekombinacji, replikacji i mutagenizie DNA. Całość oddziaływań, modyfikacja-naprawa, stanowi zadziwiający i bardzo sprawnie działający system komórkowy. Wśród białek i enzymów zadziwia fakt występowania rzadko obserwowanych w przyrodzie niekonwencjonalnych mechanizmów naprawy alkiłowanych zasad. Szczególnie zdumiewa mechanizm działania dioksygenazy AlkB, która łączy naprawę metylowanych, etylowanych i etenowanych zasad w DNA z oksydacją i dysocjacją grupy modyfikowanej, co prowadzi do bezpośredniego odzyskania zasad naturalnych. Przegląd ten usiłuje ocenić rolę poszczególnych białek uczestniczących w procesach naprawy metylowanego DNA.

WPROWADZENIE

Ze zdziwieniem i zaskoczeniem przyjmowano gromadzone fakty, z których wynikało, że materiał genetyczny DNA względnie łatwo ulega uszkodzeniom, a zachowanie stałości genetycznej jest wynikiem aktywności licznych systemów naprawczych. Pomysłowość ewolucji w generowaniu różnych systemów korygujących uszkodzenia w DNA jest zadziwiająca, a białka o podobnej budowie i specyficzności działania występują w taksonomicznie odległych organizmach, takich jak bakterie i człowiek. Czynniki alkiłujące są w naturze szeroko rozpowszechnione, a mechanizmy naprawy alkiłowanego DNA są bardzo zróżnicowane. Alkiłowane DNA w *E. coli* jest naprawiane dzięki produktom 6-ciu genów, ekspresja dwóch, *tag* i *ogt*, przebiega stale w komórce (ekspresja konstytutywna) a pozostałych czterech, *ada*, *alkB*, *alkA* i *aidB*, zachodzi po indukcji systemu adaptacyjnego Ada (ang. *adaptive- lub Ada- response*). Indukcja systemu Ada następuje po zetknięciu się komórek nawet z bardzo niskimi dawkami czynników metylujących, a induktorem ekspresji jest 39 kDa białko Ada, w którym reszta cysteiny w pozycji Cys-38 została zmetylowana [1-3]. Czynniki alkiłujące, oprócz ekspresji genów połączonych systemem Ada, powodują także ekspresję systemu SOS obejmującego syntezę około 40-tu różnych białek, wśród których są również te związane z rekombinacją, replikacją, mutagenizacją i naprawą DNA [4-7].

Rola i mechanizm działania białka AlkB zostały opisane pod koniec roku 2002 [8,9]. Jego funkcje przez dwie dekady pozostawały nieznane. Obecnie ustalono, że białko AlkB katalizuje nowy i dotąd niespotykany typ naprawy alkiłowanych zasad, który łączy oksydację 2-oksyglutaranu (2OG) do bursztynianu z oksydacją i demetylacją reszt 1meA i 3meC w DNA i RNA [8-10]. W wyniku reakcji grupy alkiłowe zostają usunięte, a pierwotna struktura zasad zostaje odzyskana. Ostatnio stwierdzono, że w ten sam oksydacyjny sposób AlkB katalizuje naprawę reszt N⁶etenoA i 3, N⁴etenoC w DNA [11,12]. Eteno-podstawione zasady powstają w wyniku reakcji zasad naturalnych z dwu węglowymi fragmentami lipidowymi wytwarzanymi w czasie stresu oksydacyjnego. Warto więc jeszcze raz zastanowić się nad tym co wiemy o chemicznych i biologicznych skutkach alkiłacji DNA, strategii komórek przeciwstawiających się tym uszkodzeniom i mechanizmach naprawy alkiłowanego DNA.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ALKILANÓW NA KWASY NUKLEINOWE

Czynniki alkiłujące (alkilany) powodują alkiłację (metylację, etylację) zasad i powstawanie alkilo-trójestrów fosforu w strukturze DNA, a niekiedy alkiłację lipidów i białek. Uważa się, że obecność alkiłowanych zasad jest przyczyną genotoksycznych i mutagennych zmian w komórkach. Wszystkie azoty (N) i tlony (O), występujące w zasadach kwasów nukleinowych, mogą ulegać alkiłacji, ale

Celina Janion[✉]

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

[✉]Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; e-mail: celina@ibb.waw.pl, tel.: (022) 592 11 04, faks: (022) 658 46 36

Artykuł otrzymano 23 marca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 26 kwietnia 2006 r.

Słowa kluczowe: metylacja DNA, naprawa alkiłowanego DNA, system Ada, dioksygenaza AlkB, mutacje indukowane MMS, *E. coli*

Wykaz skrótów: BCNU – *N,N'*-bis-chloroetylo-*N*-nitrozomocznik; CNU – *N*-(2-chloroethyl)-*N*-nitrozomocznik; OGT – 2-oksoglutaran (inna nazwa, alfa-ketoglutaran); AP liaza – apuryno-apirymidynowa liaza; 5'-dRP-liaza – 5'-dezoksyrybofosfo-liaza

Podziękowanie: Praca powstała w czasie realizacji grantu MNiSW 0420/P04/2004/27

proporcje w jakich one powstają są zależne od rodzaju czynnika alkilującego [13-15]. Zależnie od mechanizmu działania, czynniki alkilujące dzielą się na dwie grupy związków, na te które reagują z zasadami zgodnie z typem S_N1 lub z typem S_N2 . W reakcji alkilacji typu S_N1 (mono-molekularnej) podstawienie miejsc N czy O alkilem następuje wtedy, gdy grupa alkilowa atakuje nukleofilowe miejsca zasad. W reakcji alkilacji typu S_N2 (bi-molekularnej) do miejsc ulegających alkilacji przyłączają się przejściowo obydwie grupy czynnika alkilującego i następnie grupa alkilowa wypiera anionową. Na przykład, po reakcji zasady z chlorkiem metylu (CH_3Cl ; związek typu S_N2) i utworzeniu związku przejściowego, gazowy chlor (Cl_2) zostaje wyparty, a centra nukleofilowe zasad zostają zmetylowane [16].

Do alkilanów typu S_N1 należą np.: *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidina (MNNG) i *N*-methyl-*N'*-nitrozo-mocznik (MNU). Są to związki nitrozowe które wymagają aktywacji w komórkach. Do alkilanów typu S_N2 , należą różne halidki metylu (CH_3Br , CH_3Cl , CH_3I), siarczan dwumetylowy (DSM), siarczan metylo-metanowy (MMS). Natomiast siarczan etylo-metylowy (EMS) reaguje z zasadami DNA w sposób mieszany, zgodny z typami S_N1/S_N2 . Obydwa typy alkilanów powodują akilacje azotów i tlenów zasad w DNA, ale występują znaczące różnice w proporcjach wytwarzanych produktów.

Podział alkilanów według typów reakcji (S_N1, S_N2) znacznie uporządkował tę grupę mutagenów. Zwrócił uwagę na korelacje między zmianami chemicznymi i ich efektami biologicznymi i pomógł w zrozumieniu przyczyn zróżnicowanego działania alkilanów. W obecnej pracy omawiane będą głównie skutki działania czynników metylujących na *E. coli*, oraz wpływ metylacji DNA na metabolizm, mutacje i letalność komórek.

ALKILANY WYSTĘPUJĄCE W ŚRODOWISKU NATURALNYM

Czynniki alkilujące są szeroko rozpowszechnione w naturze i prawdopodobnie stanowią najliczniejszą grupę naturalnych mutagenów środowiskowych. Najliczniej występującymi alkilanami są chlorki halidków (metylu, bromu, jodku). Znaczne ilości chlorku metylu (CH_3Cl) powstają w wyniku działalności przemysłowej i naturalnych przemian abiotycznych. Chlorek metylu wytwarza się w czasie detrofizacji starzejących się liści, po spalaniu odpadów organicznych, w gnijących środowiskach wodnych. Dawcą grupy metylowej jest powszechnie występująca w roślinach pektyna [17]. Niektóre algi i grzyby produkują CH_3Cl w wyniku detoksykacji chloru. Chlorek metylu stanowi główną przyczynę destrukcji ozonu i sprzyja powstawaniu dziur ozonowych w stratosferze. Chlorek bromu jest wytwarzany w znacznych ilościach w środowisku morskim.

Związki metylujące są immanentnym składnikiem organizmów żywych. Na przykład *S*-adenozylometionina (SAM), która służy jako donator metylu dla wielu reakcji biologicznych, jako czynnik S_N2 , może chemicznie metylować azoty zasad kwasów nukleinowych. Związki metylujące typu nitrozoamin powstają w tkankach po konden-

sacji azotynów z aminokwasami i amidami. Na przykład kondensacja metyloaminy (katabolit amin) z karbamyllo-fosforanem (prekursor pirymidyn) powoduje powstawanie metylo-mocznika (MU), który po nitrozacji tworzy metylo-nitrozomocznik (MNU) [18]. Różnorodnie silnie rakotwórcze pochodne nitrozoamin powstają w wyniku palenia wyrobów tytoniowych. Niektóre związki alkilujące typu S_N1 (ale nie typu S_N2), jak czynniki metylujące, temozolomid, dakarbazyna, wytwarzany przez grzybnię *Streptomyces achromogenes* antybiotyk streptozotocyna lub chloroetylowe pochodne BCNU i CNU, jak chlorambucyl, karmustyna, lomustyna i inne tego typu związki, są powszechnie używane jako leki cytotoksyczne i przeciwnowotworowe [15, 16, 19]

PRODUKTY CHEMICZNEJ METYLACJI DNA

Metylacja DNA powoduje powstawanie wielu różnorodnych metylowanych zasad oraz metylo-trójestrów fosforu łączących nukleotydy w łańcuchach DNA. Dane o procentowym rozmieszczeniu metylowanych produktów otrzymanych po działaniu MNNG, MNU lub MMS na jedno i dwuniciowe DNA są zgromadzone w Tabeli 1. Te alkilany są najczęściej stosowane do badań laboratoryjnych. W Tabeli 1 umieszczone są też informacje jakie znaczenie biologiczne wywierają poszczególne produkty alkilacji i jaka jest ich potencjalna specyficzność mutacji. W dolnej części tabeli znajdują się dane, które wykazują w jakich stosunkach wytwarzane są reszty O⁶alkiloG i N7alkiloG w alkilowanym DNA. Z tych porównań widać, że znacznie wyższy procent reszt O⁶meG wytwarza się po metylacji DNA czynnikami typu S_N1 (MNU i MNNG) niż czynnikami typu S_N2 (MMS). Natomiast po alkilacji siarczanem etylo-metanowym EMS (typ reakcji mieszany, S_N1/S_N2) stosunek wytwarzanych reszt O⁶alkiloG do N7alkiloG jest pośredni. Dane te są wynikiem kompilacji wielu prac [14-15, 19-21].

METYLOWANE ZASADY BIOLOGICZNIE NIESZKODLIWE

Najczęściej występującymi metylowanymi zasadami w DNA są reszty 7meG. Stanowią one od 67% do 83 % wszystkich zmodyfikowanych struktur DNA. Ta modyfikacja jest raczej nieszkodliwa, gdyż zarówno zasada naturalna G jak i metylowana 7meG mają jednakowe zdolności do wytwarzania kompleksów par zasad i w czasie replikacji DNA tworzą pary z substratem dCTP. Nieszkodliwymi modyfikacjami są również metylacje fosfo-dwuestrów do metylo-fosfo-trójestrów i prawdopodobnie metylacja A → 7meA.

Czynniki metylujące typu S_N1 powodują wytwarzanie dwóch diastereoizomerów metylo-fosfo-trójestrów w DNA, formy: Sp i Rp. Tylko forma Sp jest biologicznie aktywna i powoduje metylacje Ada → meCys38-Ada. Można więc uznać, że białko Ada jest demetylazą stereoisomeru metylo-fosfo-trójestrowego w DNA, występującego w formie Sp. Na temat naprawy stereoisomeru Rp brak jest danych.

Zmetylowane białko meCys38-Ada, po przekształceniu i przyłączeniu do miejsc promotorowych, jest pozytywnym regulatorem transkrypcji wszystkich genów regulonu Ada.

Tabela 1. Rozmieszczenie produktów metylacji (%) uzyskanych po działaniu MMS (typ S_N2) lub MNU i MNNG (typ S_N1) na jedno lub dwuniciowe DNA.

Produkty metylacji DNA	MMS + DNA		MNU + DNA		MNNG + DNA	Biologiczne znaczenie produktów	Specyficzność mutacji
	jedno- i dwuniciowe (%)		jedno- i dwuniciowe (%)		dwuniciowe (%)		
N1meA	18,0	3,5	2,8	1,3	1,0	toksyczne i mutagenne	AT→TA (GC)
N3meA	1,4	10,8	2,6	9,0	12,0	toksyczne i mutagenne	AT→TA
N7meA	3,8	1,8	1,8	1,7	–	nieszkodliwe	–
N3meG	≈1	0,6	0,4	0,8	–	toksyczne i mutagenne	GC→?
O ⁶ meG	nw	0,3	3,0	6,3	7,0	mutagenne i toksyczne nieszkodliwe	GC→AT
N7meG	68,c	83,0	69,0	67,0	67,0		–
O ² meT	nw	nw	n.w	0,11	–	–	–
N3meT	nw	nw	0,1	0,3	–	mutagenne	AT→TA
O ⁴ meT	nw	nw	–	0,4	–	toksyczne i mutagenne	AT→GC
O ² meC	nw	–	–	0,1	–	–	–
N3meC	10	<1	–	0,6	2,0	toksyczne i mutagenne	GC→AT
metylo-fosforój-ester [O=P-(O ⁺) ₂ Ome]	(<1%)	0,8	~10	17	–	Nieszkodliwe. Forma S _R jest donorem CH ₃ dla Cys-38-Ada, które przekształca się w regulator transkrypcji genów Ada-response	
ALKILANY	TYP REAKCJI		O⁶alkilG / 7alkilG				
MMS	S _N 2		0,0035				
EMS	S _N 1/ S _N 2		0,03				
MNU	S _N 1		0,1				
MNNG	S _N 1		0,1				

Wyniki zgromadzone w tabeli pochodzą z [14,15, 18-21, 43]. Skrót: nw, oznacza nie wykryto; (–) oznacza, nie sprawdzano.

Natomiast czynniki metylujące typu S_N2 (np. MMS), w odróżnieniu od czynników metylujących typu S_N1 metylują wprost resztę Cys38 w białku Ada i w sposób bezpośredni przekształcają Ada w regulator transkrypcji [22]. Związanie reszt cysteinowych z grupami metylowymi są bardzo silne i raz zmetylowane białka Ada i Ogt nie ulegają demetylacji. Czynniki metylujące są dobrymi induktorami systemu Ada. Czynniki etylujące, w odróżnieniu od metylujących, są słabymi induktorami systemu Ada [23]. Białko Ada spełnia kilka funkcji. Inne jego funkcje zostaną opisane w dalszej części pracy.

MUTACJE WYWOŁANE METYLACJĄ ZASAD W DNA

Metylowanymi zasadami w DNA o znaczeniu mutagenym są reszty O⁶meG (silnie mutagenne) oraz 3meA, 1meA i 3meC (silnie cytotoksyczne i mutagenne). Reszty O⁴meT, 3meG, 3meT są wytwarzane w mniejszych ilościach i efekty biologiczne wynikające z ich obecności są prawdopodobnie znacznie słabsze. Przyczyną mutagenności O⁶meG jest fakt jej dwuznaczności komplementarnej. W czasie replikacji kierowanej przez polimerazę DNA III (główny enzym replikujący DNA w *E. coli*) reszty O⁶meG w matrycowym DNA w tym samym stopniu tworzą wią-

zania komplementarne z resztami dCTP (brak mutacji) jak i z resztami dTTP, co może prowadzić do tranzycji GC→AT [21]. Pary zasad O⁶meG::T w DNA mogą być rozpoznawane przez zespół białek, który bierze udział w naprawie źle sparowanych zasad (ang. *mismatch repair*, MMR) i usuwaniu źle dopasowanej zasady z nowo-syntetyzowanej nici DNA. Usytuowanie reszt O⁶meG w nici matrycowej uniemożliwia ich naprawę, a próby naprawy mogą prowadzić do podwyższenia letalności komórek [24].

Przyczyną mutagenności O⁴meT może być tworzenie się par zasad O⁴meT::G, co prowadzi do tranzycji AT→GC [21]. Natomiast N-metylowane zasady, jak 3meA (substrat dla glikozylaz DNA) oraz 1meA i 3meC (substraty dla AlkB) silnie hamują syntezę DNA a dalsza synteza (oraz mutacje) DNA mogą zajść tylko z udziałem mutagennej polimerazy DNA V (pol V) kodowanej przez geny *umuCD* i syntetyzowanej po indukcji systemu SOS. W szczepach bakteryjnych z uszkodzonymi genami *umuD* lub *umuC*, mutacje wywoływane działaniem MMS są silnie lub całkowicie supresorowane [25-27]. Polimeraza V umożliwia replikację uszkodzonego DNA (ang. *translesion synthesis*) gdy w matrycowej nici DNA zasada została usunięta lub, gdy w skutek modyfikacji, utraciła

swe naturalne właściwości do wytwarzania komplementarnych par zasad [28]. Polimeraza V w komórkach *E. coli* jest wytwarzana tylko po indukcji systemu SOS [4-7,28]. Alkilany (związki metylowe i etylowe) są dobrymi induktorami systemu SOS.

Zmianami mutagennymi wynikającymi z obecności 3meA w DNA są wyłącznie transwersje AT→TA, a z obecności 1meA i 3meC, głównie transwersje AT→TA i tranzykcje GC→AT [25, 27, 29]. Należy zaznaczyć, że mutacje wynikające z obecności 1meA i 3meC w DNA (substraty dla enzymu AlkB) można śledzić tylko w mutantach *E. coli* z uszkodzonym genem *alkB*, a różnice w poziomach mutacji występujących po działaniu MMS na komórki bakteryjne *alkB*⁻ i *alkB*⁺ wyznaczają potencjał mutacyjny reszt 1meA i 3meC w DNA.

Białka AlkB w normalnych komórkach typu dzikiego *alkB*⁺ nie są syntetyzowane. Ich synteza następuje po indukcji systemu Ada. To sugeruje, że w komórkach *alkB*⁺ pod wpływem MMS białka AlkB są szybko indukowane, a reszty 1meA i 3meC są szybko i wydajnie przekształcane do zasad wyjściowych A i C. Z danych umieszczonych w Tabeli 1 wynika, że ilość i jakość zmetylowanych produktów zależy nie tylko od czynnika metylującego, ale i od struktury DNA, np.: po reakcji DNA z MMS (typ reakcji S_N2) ilość wytwarzanych reszt 1meA jest znacznie wyższa w jedno- niż w dwuniciowym DNA (18% vs 3.8%; rząd 1, kolumna 2). Dlatego uważa się, że mutacje wynikające z metylacji A do 1meA zachodzą głównie w widełkach replikacyjnych lub podczas transkrypcji, gdy nici DNA są rozplecione [29]. Taka zależność nie występuje gdy czynnikiem metylującym jest MNU (typ reakcji S_N1). Ilość produkowanych reszt 1meA w jedno- i dwuniciowych DNA są znacznie niższe (2.8% vs 1.3%); a ich wartości są do siebie zbliżone (rząd 1, kolumny 2 i 3). Czyli reasumując, metylacja reszt A do 1meA w jednoniciowym DNA zachodzi szczególnie łatwo gdy czynnikiem metylującym jest MMS i jest ponad 6-krotnie niższa gdy czynnikiem metylującym jest MNU. Z analizy danych w tabeli 1 wynika jeszcze jedna, często pomijana w dyskusjach informacja. Produkcja reszt 3meA (odwrotnie niż 1meA), bez względu na to czy czynnikiem metylującym są związki typu S_N2 (MMS) czy S_N1 (MNU, MNNG), jest zawsze znacznie wyższa w dwuniciowym DNA.

MUTACJE WYNIKAJĄCE Z WTÓRNYCH USZKODZEŃ DNA

Zmiany mutacyjne mogą być wynikiem tworzenia się apuryno-apirymidynowych (AP) miejsc w DNA. Miejsca AP w DNA mogą powstawać spontanicznie w wyniku oderwania się puryn (modyfikacja zasad przyspiesza rozpad wiązania N-glikozydowego) lub w wyniku działania glikozylaz, enzymów usuwających zmodyfikowane zasady z DNA. Miejsca AP, które powstają w wyniku działania glikozylaz 3meA DNA I i II na alkilowane DNA stanowią pierwszy etap naprawy tych alkilowanych zasad. Gdy poziom miejsc AP w DNA przewyższa zdolność komórek do ich naprawy, miejsca apurynowe mogą wywoływać mutacje, ale dla wywołania mutacji wymagany jest udział SOS-zależnej, kodowanej przez *umuD umuC*, polimerazy DNA V.

BIAŁKA I ENZYMY NAPRAWIAJĄCE SKUTKI ALKILACJI DNA

BIAŁKA SYNTETYZOWANE KONSTITUTYWNIE

W czasie normalnego wzrostu komórek w *E. coli* syntetyzowane są dwa białka Tag i Ogt, które są związane z naprawą alkilowanych zasad w DNA. 21,1 kDa białko Tag (produkt genu *tag*) ma aktywność enzymatyczną glikozylazy 3meA DNA I. Enzym ten usuwa głównie reszty 3meA i w mniejszym stopniu reszty 3meG z DNA, pozostawiając miejsca AP. Jest to pierwszy etap naprawy. Odrębne enzymy kolejno, przecinają łańcuch DNA i usuwają resztki uszkodzonego nukleotydu (AP- i 5'dRP-liazy) i po resyn-tezie utraconego nukleotydu (polimeraza DNA I) włączają odbudowany fragment (ligaza) w strukturę DNA [2,3]. Natomiast białko 19 kDa Ogt (produkt genu *ogt*) *fide bona* nie jest enzymem. Białko Ogt ma funkcje metylotransferazy O⁶meG DNA, która przenosi grupę metylową z reszt O⁶meG (jak również z reszt O⁶etyloG i O⁶meT) w alkilowanym DNA na resztę cysteinową własnego białka. W wyniku reakcji, pierwotna struktura naturalnej zasady G (i T) zostaje odzyskana, a białko Ogt ulega bezpowrotnej inaktywacji. Ta reakcja jest bardzo szybka ale nieodwracalna [30].

BIAŁKA INDUKOWANE W SYSTEMIE Ada

Po indukcji systemu Ada syntetyzowane są cztery białka związane z naprawą uszkodzeń alkilacyjnych w DNA. Są to białka: 39 kDa Ada, AlkB, AlkA i AidB. Geny *ada* i *alkB* tworzą jeden operon i są transkrybowane z jednego promotora Ada. Ostatni nukleotyd A w tryplecie UAA, który kończy syntezę białka Ada stanowi pierwszy nukleotyd w tryplecie AUG, zaczynającym syntezę białka AlkB [31]. Pozostałe geny *alkA* i *aidB*, tworzą pojedyncze operony i każdy z nich jest transkrybowany oddzielnie. Szacuje się, że w stanie podstawowym ilość białek Ada wynosi od 2-4, a ilość Ogt od 20-30 cząstek na komórkę. Po indukcji systemu Ada ilość transkrybowanego białka Ada wzrasta 1000-krotnie, białka AlkB 100-krotnie, a AlkA 10-krotnie [16, 18] Sądząc po sile indukcji, białko AlkB w stanie podstawowym komórki nie jest syntetyzowane (gdyż 4-rem cząstką białka Ada odpowiadają 0.4 cząstki AlkB). Ilość białek AidB w komórce nie została oszacowana.

WIELOFUNKCYJNE BIAŁKO Ada

Białko Ada spełnia kilka funkcji 39 kDa białko Ada (produkt genu *ada*) ma dwie reszty cysteiny (spośród 12-tu), które są zdolne do akceptacji grup metylowych z alkilowanego DNA. Są to reszty Cys38 i Cys321. Reszta Cys38 w białku Ada jest związana (poprzez Zn) z 3 innymi resztami Cys42, Cys69 i Cys72 i ta struktura ułatwia metylację Cys38 [32]. Dawcami grup metylowych dla Cys38 są w DNA metylo-fosfo-trójestry w formie Sp, a dla reszt Cys321, reszty O⁶meG i O⁶meT w DNA [2,3]. Zmetylowane 39 kDa białko meCys38-Ada (i też podwójnie-zmetylowane meCys38, meCys321-Ada) po przekształceniu konformacyjnym staje się pozytywnym regulatorem transkrypcji wszystkich genów regulonu Ada i po przyłączeniu się do odpowiednich miejsc promotorowych uruchamia transkrypcję wszystkich genów regulonu Ada: *ada*, *alkB*, *alkA* i *aidB*. Natomiast nadprodukowane, ale nie zmetylowane

białko Ada jest negatywnym regulatorem i powoduje zmniejszenie poziomu transkrypcji genów *Ada* [33].

KONTROLOWANY ROZPAD 39 kDa BIAŁKA Ada

39 kDa białko Ada (metylowane lub nie) pod wpływem proteaz komórkowych rozpada się na dwa odrębne białka: 20 kDa N-Ada i 19 kDa C-Ada. Funkcja regulatora transkrypcji zostaje bezpowrotnie utracona, ale każde z białek zachowuje swe poprzednie zdolności akceptacji grup metylowych na reszty cysteinowe [34]. Cys38, znajdująca w 20 kDa białku N-Ada (część Ada z grupą NH₂), w dalszym ciągu może akceptować grupy CH₃ występujące w metylofosfo-trójestrach w formie Sp, a Cys321, znajdująca się w 19 kDa C-Ada (część Ada z grupą karboksylową) jest akceptorem grup alkilowych z reszt O⁶meG i O⁴meT. Okazało się, że 19 kDa białko C-Ada wytwarzane na skutek rozpadu 39 kDa Ada i 19 kDa białko Ogt są strukturalnie i funkcyjnie podobne. Obydwa spełniają rolę transferazy O⁶alkiloG DNA i dealkilują zasady w DNA przez przeniesienie reszt alkilowych na Cys321, ale występują znaczne różnice w kinetyce dealkilacji. Białko Ogt, z podobną szybkością jak C-Ada, demetyluje O⁶meG (1,1:1) ale dealkiluje O⁶etylG i O⁴meT z szybkością, odpowiednio 173- i 84-krotnie wyższą niż C-Ada [35].

Być może przyczyną tego jest fakt, że czynniki etylujące są słabymi induktorami systemu Ada [23]. W takim przypadku białko Ogt pozostaje jedynym białkiem w komórkach *E. coli*, które ma zdolność do naprawy reszt O⁶meG, O⁶etylG i O⁴meT w DNA.

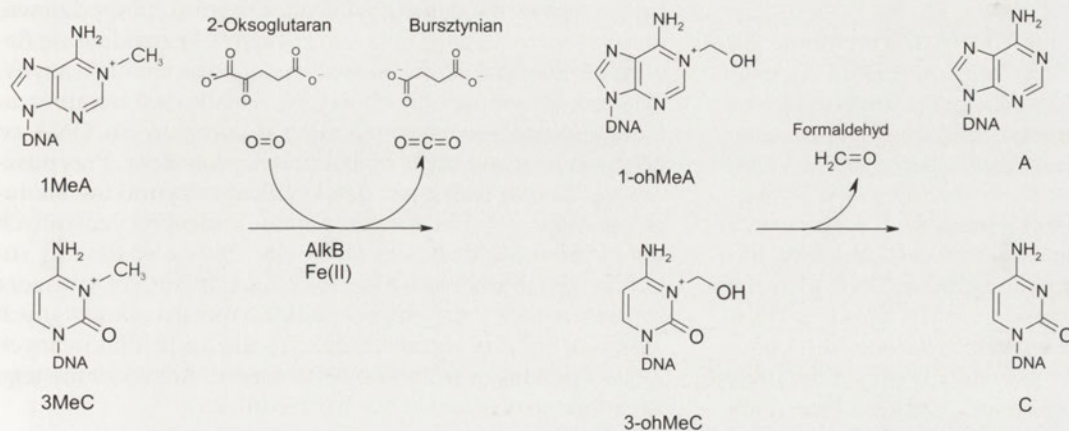
ROLA I MECHANIZM DZIAŁANIA BIAŁKA AlkB

Białko AlkB zostało wykryte w komórkach *E. coli* w roku 1982 [36] po izolacji pierwszego mutantu *alkB22*, ale jego funkcje zostały ustalone pod koniec roku 2002 [8,9]. Wcześniej ustalono wiele cech mutantów. Stwierdzono, że mutanty *alkB* (w stosunku do *alkB*⁺) mają znacznie wyższą letalność, gdy rosną w obecności MMS, ale ich wzrost hamowany jest nieznacznie, gdy rosną w obecności MNNG.

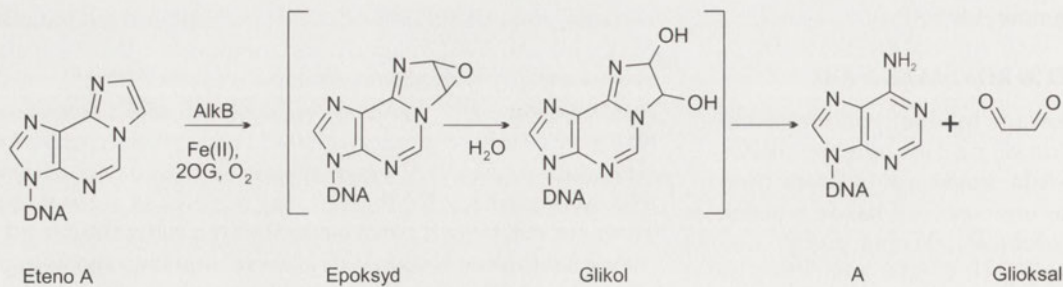
Stwierdzono, że jedno-niciowe fagowe DNA jest znacznie bardziej podatne na uszkodzenie pod wpływem działania MMS, niż MNNG, a fagi uszkodzone przez MMS są reaktywowane gdy wzrastają w szczepach *E. coli alkB*⁺ ale nie są reaktywowane gdy wzrastają w szczepach *alkB*⁻. Zauważono też, że różnice w przeżywalności i reaktywacji dwuniciowego fagowego DNA, bez względu na to czy czynnikiem uszkadzającym jest MMS, MNU czy MNNG, są nieznaczne. Te wszystkie cechy fagów i bakterii stały się zrozumiałe gdy określono funkcje białka AlkB jako enzymu naprawiającego reszty 1meA/3meC w DNA i zwrócono uwagę, że brak lub występowanie opisywanych cech w fagach lub bakteriach jest skorelowana z ilością reszt 1meA/3meC, występujących w metyloowanym DNA. Już we wczesnych pracach zauważano, że w budowie białka AlkB występują sekwencje homologiczne do białek z rodziny superoksydaz z tkanek ssaków [31]. Jednak dopiero zakwalifikowanie AlkB do białek z grupy oksydaz zależnych od Fe(II) i 2-oksoglutaranu (2OG) [37] spowodowało jego szybką identyfikację. Okazało się, że białko AlkB jest zależną od Fe(II) dioksygenazą, która łączy utlenienie 2OG do bursztynianu z utlenieniem grup metylowych w resztach 1meA i 3meA. W wyniku reakcji powstają grupy hydroksymetylowe, które łatwo dysocjują w postaci formaldehydu, a w DNA zostają odzyskane zasady naturalne A i C (Ryc. 1). Gdy substratem dla AlkB są reszty 1etyloA w DNA, grupy etylowe zostają utlenione do hydroksy-etylowych i uwalniane w postaci acetaldehydu CH₃CHO [8-10].

Odkrycie funkcji białka AlkB i mechanizmu jego działania wzbudziło ogromne zainteresowanie. Białko AlkB ma zdolność do odzyskania zasad naturalnych z reszt 1meA/3meC, znajdujących się w DNA i RNA [8-10]. Najmniejszymi substratami dla AlkB są reszty 1medAMP i 1medATP [42]. Substratami dla AlkB są również reszty 1meG i 3meT, które jednak rzadko występują w metyloowanym DNA [43]. Reszty 1meA i 3meC w DNA zatrzymują replikację DNA i są silnie genotoksyczne. Ponieważ metylacji ulegają również zasady znajdujące się w RNA (mRNA tRNA) możliwe jest, że genotoksyczne działanie MMS jest wynikiem chemicznej metylacji mRNA i tRNA co powoduje zahamowanie syntezy białka. Wykazano, że chemicznie metylowane tRNA traci swe funkcje biologiczne, które następnie po inkubacji z białkiem AlkB zostają odzyskane, potwierdzając te przypuszczenia [44].

Ostatnio stwierdzono, że AlkB utlenia i usuwa również cykliczne grupy etenowe, występujące w 1,N⁴etenA i 3,N⁴etenC-DNA [11,12]. Etenowe zasady powstają po reakcji reszt A lub C z produktami rozpadu oksydacyjnie uszkodzonych związków lipidowych lub rakotwórczym chlorkiem winylu i



Rycina 1. Przebieg reakcji demetylacji reszt 1meA i 3meC w DNA. W reakcji, oprócz substratów 1meA i 3meC udział bierą: AlkB, Fe(II), 2-oksoglutaran i O₂, ubocznymi produktami reakcji są bursztynian i CO₂, a produktami pośrednimi hydroksymetylowe pochodne A i C, z których, po uwolnieniu grupy hydroksymetylowej w postaci formaldehydu, zostają odzyskane zasady naturalne A i C. Gdy substratami są etylowe pochodne zasad, zamiast formaldehydu uwalnia się acetaldehyd. Opracowano na podstawie prac [19, 39-42].



Rycina 2. Reakcje utlenienia i deetnozacji reszt etenowych z 1,N⁶etenoa w DNA. Reakcja przebiega w sposób analogiczny jak reakcja demetylacji zasad przedstawiona na Ryc. 1 i wymaga dioksygenazy AlkB, Fe(II) 2OG i O₂. Grupa etenowa z 1,N⁶etenoa zostaje utleniona, uwodniona i odczepiona w postaci glioksalu, a zasada naturalna zostaje odzyskana. Opracowane według [11,12].

jego metabolitami (np chloroacetaldehydem, (CCA)). Reakcja deetnozacji przy udziale białka AlkB przebiega w sposób analogiczny jak procesy demetylacji i wymaga, oprócz białka AlkB i Fe(II), 2OG i tlenu cząsteczkowego. Następnie egzocykliczne grupy etenowe zostają utlenione do grup epoksydowych, uwodnione do grup glikolowych i odczepione w postaci glioksalu, co prowadzi do odzyskania pierwotnych zasad naturalnych (Ryc. 2).

Reakcje utlenienia 2OG do bursztynianu występują często w metabolizmie komórek. Te związki pojawiają się w cyklu utlenienia kwasów tłuszczowych i utlenienia kwasu cytrynowego (dawniej cykl Krebsa) oraz w wielu innych reakcjach syntetycznych [45]. Połączenie procesów oksydacyjnych z modyfikacją zasad i z procesami naprawy metylowanych i etenowanych zasad w DNA jest intrygujące. Wydaje się, że AlkB jest jednym z ważniejszych białek syntetyzowanych w systemie Ada. W komórkach bakteryjnych występuje jedno białko AlkB. W tkankach człowieka wykryto 8 różnych białek homologicznych do białka AlkB [46], ale tylko dla dwóch, ABH2 i ABH3, stwierdzono aktywność enzymatyczną. ABH2 demetyluje reszty 1meA/3meC w dwuniciowym DNA, a ABH3, podobnie jak AlkB, demetyluje reszty 1meA/3meC w DNA i z mniejszą aktywnością w RNA i w niewielkim stopniu deetyluje reszty 1-etyloA. [38,47].

ROLA BIAŁKA ALKA

Białko AlkA (glikozylaza 3meA DNA II), podobnie jak konstytucyjny enzym Tag (glikozylaza 3meA DNA II), usuwa reszty 3meA DNA, pozostawiając miejsca AP w DNA i jest to jedyna cecha wspólna dla tych obydwóch enzymów. AlkA różni się od Tag ciężarem cząsteczkowym (31.4 kDa *versus* 21,1 kDa) i specyficznością substratową, a w ich budowie brak jest sekwencji homologicznych. Ewolucja tych białek przebiegała więc w sposób całkowicie odmienny. Enzym Tag jest wysoce specyficzny, usuwa z DNA głównie reszty 3meA i, z niską aktywnością, reszty 3meG z DNA [48]. Enzym AlkA jest mało specyficzny i oprócz 3meA usuwa z DNA metylowane zasady purynowe i pirymidynowe, 3meG, 7meG, 7meA, 7-hydroxy-etyloG, O²meT, O³meC, ich pochodne etylowe, a także hipoksantynę (produkt deaminacji A), ksantozynę i oksaninę (produkty reakcji tlenu azotu z guaniną), 5-fluorouracyl oraz uwaga! zasady naturalne (głównie guaninę) oraz etenowane pochodne zasad: 1,N⁶etenoa, 1,N²-O²meC, 1,N²-etenog i 3,N⁴etenoc z DNA [49,

50]. AlkA jest więc następnym (poza AlkB) białkiem indukowanym w systemie Ada, który może uczestniczyć w naprawie etenopochodnych zasad w DNA.

Usuwanie z DNA eteno pochodnych zasad przez glikozylazę DNA AlkA jest bardziej wydajne, niż odwracanie reakcji etenozacji przy udziale białka AlkB. Wydaje się, że wytwarzanie w komórkach, w czasie szoku oksydacyjnego, pochodnych etenozasad jest reakcją często występującą w DNA, gdyż w *E. coli* istnieje jeszcze jeden enzym, glikozylaza MUG (*mug*) która wydajnie usuwa etenowane zasady z DNA [51,52]. Być może procesy etenozacji zasad ulegają natężeniu w obecności czynników alkilujących.

Białko Tag usuwa 3meA głównie z dwuniciowego DNA, natomiast białko AlkA usuwa 3meA z dwuniciowego DNA, i z 10-20-krotnie wyższą wydajnością niż Tag z jednoniciowego DNA [53]. Reszty 3meA w DNA służą jako sygnał do indukcji systemu SOS w *E. coli* [54]. Usuwanie 3meA z DNA wpływa więc na obniżenie indukcji systemu SOS. W organizmie człowieka zidentyfikowano wiele białek naprawiających alkilowane DNA, o sekwencjach homologicznych do białek Ada, AlkB i AidB *E. coli*, ale nie znaleziono białek homologicznych do białka AlkA. Budowa glikozylaz APNG (zwana różnie, AAG, MPG), usuwających alkilowane zasady z DNA tkanek człowieka, jest całkowicie odmienna od budowy białka AlkA *E. coli*.

ROLA BIAŁKA AidB

Rola białka AidB jest najmniej znana. Jego sekwencja jest zbliżona do sekwencji dehydrogenaz koenzymu A (CoA), występujących u ssaków i faktycznie białko to wykazuje słabą aktywność dehydrogenazy izowaleryl-CoA [55]. Wiemy też, że nadekspresja *aidB* ochrania komórki *E. coli* przed mutagenym działaniem MNNG. Ostatnio niespodziewanie stwierdzono, że w składzie z AidB (1:1) znajduje się flawina (żółto zabarwiony barwnik, pochodna izoalloksazy, składnik enzymów oddechowych), a białko jest tetramerem i ma zdolność do wiązania się z dwuniciowym DNA co ochrania znaczną część białka przed proteolizą. Przypuszcza się, że rolą białka jest detoksyfikacja czynników alkilujących typu S_N1 i być może naprawa niesprecyzowanych dotąd produktów alkilacji DNA [56]. Obecność flawiny sugeruje udział procesów oksydo-redukcyjnych, przypuszcza się, że również i w tym przypadku naprawa alkilowanych zasad zachodzi w wyniku redukcji (oksydacji) alkilowanych zasad i przebiega w sposób bezpośredni. Rozwiązanie tego zagadnienia wydaje się być bardzo bliskie.

PODSUMOWANIE

Naprawa alkilacyjnych uszkodzeń w DNA przedstawia niezwykle rozbudowany system metaboliczny. Czynniki al-


kilujące mogą indukować dwa globalne systemy naprawy uszkodzeń w DNA: SOS i Ada. Zarówno przy wytwarzaniu uszkodzeń w DNA, jak i w naprawie alkilowanego DNA, procesy oksydacyjne przeplatają się z procesami alkilacji i dealkilacji. Jest to chyba pierwszy przykład tak bliskiego powiązania i przenikania odmiennych procesów metabolicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Cairns J (1980) Efficiency of the adaptive response of *Escherichia coli* to alkylating agents. *Nature* 286: 176-178
- Lindahl T, Sedgwick B (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem* 57: 133-157
- Shevell DE, Friedman BM, Walker GC (1990) Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: role of the Ada protein in induction of the adaptive response. *Mutation Res* 233: 53-72
- Walker GC, Smith BT, Sutton MD (2000) The SOS response to DNA damage. W: Storz G, Hengge-Aronis R (red) *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C. str. 131-144
- Fernandez de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35: 156-1572
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt C (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild type and SOS deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158: 41-64.
- Janion C (2001) Some aspects of SOS response system - a critical survey. *Acta Biochim Polon* 48: 599-610
- Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B (2002) Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* 419: 174-178
- Falnes O, Johansen RF, Seeberg E (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 419: 178-182
- Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vagbo CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjoras M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE (2003) Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421: 859-863
- Delaney JC, Smeester L, Wong C, Frick LE, Taghizadeh K, Wishnok JS, Drennan CL, Samson LD, Essigmann JM (2005) AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* 12: 855-860
- Mishina Y, Yang CG, He C (2005) Direct repair of the exocyclic DNA adduct 1,N⁶-ethenoadenine by the DNA repair AlkB proteins. *J Am Chem Soc* 127: 14594-14595
- Singer B, Kuśmierk JT (1982) Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* 52: 655-693
- Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231: 11-30
- Sedgwick B (2004) Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 148-157
- Hamilton JTG, McRoberts WC, Keppler F, Kalin RM, Herpes DB (2003) Chloride methylation by plant pectin: an efficient environmentally significant process. *Science* 301: 206-209
- Taverna P, Sedgwick B (1996) Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 5105-5111
- Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaabgø CB, Kavli B, Bratlie MS, Pena-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3: 1389-1407
- Margison G (2002) A new damage imitation exercise: ironing (Fe(II)) out minor DNA methylation lesions. *DNA Repair* 1: 1057-1061
- Singer B, Grunberger D (1983) *Molecular biology of mutagens and carcinogens: reactions of directly acting agents with nucleic acids*. Plenum Press, New York str. 45-96
- Kleibst K (2002) Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in other organism. *Mutation Res* 512: 67-84
- Takahashi K, Kawazoe Y, Sakumi K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M (1988) Activation of Ada protein as a transcriptional regulator by direct alkylation with methylating agents. *J Biol Chem* 263: 13490-13492
- Volkert MR, Gately FH, Hajec LI (1989) Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutation Res* 217: 109-115
- Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P (2000) Unmasking a killer: DNA O⁶-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation Res* 462: 71-82
- Śledziwska-Gójska EC, Janion C (1989) Alternative pathways of methyl methane sulfonate-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Metab* 216: 126-131
- Grzesiuk E, Janion C (1994) The frequency of MMS induced, *umuDC*-dependent, mutation declines during starvation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245, 486-492
- Nieminuszczy J, Sikora A, Wrzesinski M, Janion C, Grzesiuk E (2006) AlkB dioxygenase in preventing MMS- induced mutagenesis in *Escherichia coli*: Effect of Pol V and AlkA proteins. *DNA Repair* 5: 181-188
- Fuchs RP, Fujii S, Wagner J (2004) Properties and functions of *Escherichia coli*: pol IV and pol V. *Advance Protein Chem* 69: 229-264
- Dinglay S, Trewick SC, Lindahl T, Sedgwick B (2000) Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli alkB* mutants. *Genes Develop* 14: 2097-2105
- Potter PM, Wilkinson MC, Fitton J, Carr FJ, Brennand J, Cooper DP, Margison GP (1987) Characterisation and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-alkyl guanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. *Nucleic Acid Res* 15: 9177-9193
- Kondo H, Nakabeppu Y, Kataoka H, Kuhara S, Kawabata S-I, Sekiguchi M (1986) Structure and expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA. *J Biol Chem* 261: 15772-15777
- He C, Wei H, Verdine GL (2003) Converting the sacrificial DNA repair protein N-Ada into a catalytic methyl phosphotriester repair enzyme. *J Am Chem Soc* 125: 1450-1451.
- Sager BM, Walker GC (1994) Ada protein acts as both a positive and a negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9730-9734
- Teo I (1987) Proteolytic processing of the Ada protein that repairs DNA O⁶-methylguanine residues in *E. coli*. *Mutation Res* 183: 123-127
- Wilkinson MC, Potter PM, Cawkwell L, Georgiadis P, Patel D, Swann PF, Margison GP (1989) Purification of the *E. coli ogt* gene product to homogeneity and its rate of action on O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine and O²-methylthymine in dodecadeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* 17: 8475-8484
- Kataoka H, Yamamoto Y, Sekiguchi M (1983) A new gene (*alkB*) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate. *J Bacteriol* 153: 1301- 1307
- Aravind L, Koonin EV (2001) The DNA repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol* 2: research 0007.1-0007.8
- Duncan T, Trewick SC, Koivisto P, Bates PA, Lindahl T, Sedgwick B (2002) Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16660-16665
- Sedgwick B, Lindahl T (2002) Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* 21: 8886-8894
- Falnes PO, Rognes T (2003) DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res Microbiol* 15: 4531-538
- Begley TJ, Samson LD (2003) AlkB mystery AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. *Trends Biochem Sci* 28: 2-5

42. Koivisto P, Duncan T, Lindahl T, Sedgwick B (2003) Minimal methylated substrate and extended substrate range of *Escherichia coli* AlkB protein, a 1-methyladenine-DNA dioxygenase. *J Biol Chem* 278: 44348-44354
43. Delaney JC, Essigmann JM (2004) Mutagenesis, genotoxicity, and repair of 1-methyladenine, 3-alkylcytosines, 1-methylguanine, and 3-methylthymine in *alkB Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14051-14056
44. Ougland R, Zhang CM, Liiv A, Johansen RF, Seeberg E, Hou YM, Remme J, Falnes PO (2004) AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell* 16: 107-116
45. Schofield CJ, Zhang Z (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxogutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 9: 722-731
46. Kurowski MA, Bhagwat AS, Papaj G, Bujnicki JM (2003) Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB. *BMC Genomics* 4: 48-59
47. Falnes PO, Bjørås M, Aas PA, Sundheim O, Seeberg E (2004) Substrate specificities of bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acid Res* 32: 3456-3461
48. Bjeland S, Bjoras M, Seeberg E (1993) Excision of 3-methylguanine from alkylated DNA by 3-methyladenine DNA glycosylase I of *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Res* 21: 2045-2049
49. Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325: 1-16
50. Terato H, Masaoka A, Asagoshi K, Honsho A, Ohya Y, Suzuki T, Yamada M, Makino K, Yamamoto K, Ide H (2002) Novel repair activities of AlkA (3-methyladenine DNA glycosylase II) and endonuclease VIII for xanthine and oxanine, guanine lesions induced by nitric oxide and nitrous acid. *Nucleic Acids Res* 30: 4975-4984
51. Lutsenko E, Bhagwat AS (1999) The role of the *Escherichia coli* mug protein in the removal of uracil and 3,N(4)-ethenocytosine from DNA. *J Biol Chem* 274: 31034-31038
52. Jurado J, Maciejewska A, Krwawicz A, Laval J, Saparbaev MK (2004) Role of mismatch-specific uracil-DNA glycosylase in repair of 3,N(4)-ethenocytosine *in vivo*. *DNA Repair* 3: 1579-1590
53. Bjeland S, Seeberg E (1996) Different efficiencies of the Tag and AlkA DNA glycosylases from *Escherichia coli* in the removal of 3-methyladenine from single-stranded DNA. *FEBS* 397: 127-129
54. Costa de Oliveira R, Laval J, Boiteux S (1986) Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase activities. *Mutation Res* 183: 11-20
55. Landini P, Hajec LI, Volkert MR (1944) Structure and transcriptional regulation of the adaptive response gene *aidB*. *J Bacteriol* 176: 6583-6589
56. Rohankhedkar MS, Mulrooney SB, Wedemeyer WJ, Hausinger RP (2006) The AidB component of the *Escherichia coli* adaptive response to alkylating agents is a flavin-containing, DNA-binding protein. *J Bacteriol* 188: 223-230

Chemically methylated DNA repair in *Escherichia coli* – the role of AlkB protein

Celina Janion 

Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 5A Pawińskiego St., 02-106 Warszawa, Poland
e-mail: celina@ibb.waw.pl

Key words: DNA methylation, alkylated DNA repair, system Ada, dioxygenase AlkB, MMS-induced mutations, *E. coli*

ABSTRACT

Methylating agents belong to mutagens occurring most frequently in our environment. They methylate mainly the nitrogen bases in DNA and RNA, affecting their functions. In *E. coli* the alkylated bases are repaired by proteins and enzymes either permanently present in the cells (Ogt, Ada) or produced transiently (Ada, AlkB, AlkA, Aid), after induction of the Ada defence system. Alkylating agents induce also the SOS system, which enhances the synthesis of about 40 proteins, including those participating in recombination, replication and mutagenesis of DNA. All DNA interactions, modifications and repairs constitute an amazing and highly efficiently functioning cellular system. Among the repair proteins there are some which affect the alkylated bases in a non-conventional way, very rarely occurring in nature. Especially amazing is the mechanism of action of dioxygenase AlkB, which combines the repair of methyl-, ethyl- and etheno-base derivatives with oxidation and dissociation of the modified groups, leading to direct recovery of natural bases. This review attempts to elucidate the role of the individual proteins involved in the repair processes.

Redagowanie retrowirusowego DNA jako przykład mechanizmu obronnego komórek człowieka

STRESZCZENIE

Proces redagowania DNA może pełnić istotną funkcję w mechanizmach obronnych komórek człowieka przed wirusem HIV. Deaminaza cytydyny człowieka, APOBEC3G, katalizując reakcję deaminacji deoksytydyny do deoksyurydyny w (–)DNA wirusa HIV, może prowadzić do zaburzeń w cyklu życiowym wirusa. Mutacje tego typu obserwuje się gdy wiriony infekujące komórki, w których syntezie ulega białko APOBEC3G, pozbawione są wirusowego białka Vif. Sporadyczne mutacje występujące w trakcie infekcji wirusem HIV-1 typu dzikiego mogą być przyczyną zmienności wirusa a tym samym jego oporności na leki. W poniższym materiale przeglądowym przedstawiamy wyniki najnowszych badań dotyczących samego mechanizmu deaminacji, katalizowanej przez białko APOBEC3G, specyficzności jego działania, a także oddziaływania pomiędzy deaminazą a wirusowym białkiem Vif. Opisane procesy mogą okazać się istotne przy projektowaniu nowoczesnych terapii skierowanych przeciwko wirusowi HIV.

WPROWADZENIE

Zjawisko redagowania RNA znane jest od 1986 roku. Proces ten powoduje powstawanie różnic między genem obecnym w DNA a powstałym na jego matrycy transkrypcyjnym, czyli cząsteczką RNA. Ostatnie badania wykazały jednak, że redagowanie może odbywać się również na poziomie DNA, spełniając istotną funkcję w procesach obronnych organizmu. Jednym z białek odpowiedzialnych za proces redagowania DNA jest białko APOBEC3G człowieka (ang. *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*). Białko to, należące do rodziny enzymów katalizujących reakcję deaminacji zasady – cytozyny do uracylu, bierze udział w modyfikacji materiału genetycznego wirusa HIV-1, co prowadzi do tranzykcji G→A. Zjawisko to, nazywane hipermutacją, zaobserwowano w genomach wirusów HIV-1 pochodzących z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów zakażonych wirusem HIV, po długookresowej hodowli tych komórek w warunkach *in vitro*. Choć wcześniej zjawisko hipermutacji próbowano wyjaśnić różnicami w dostępności substratów niezbędnych w procesie odwrotnej transkrypcji, bądź mechanizmem zwanym mutagenizacją dyslokacyjną [1-3], obecnie wiadomo, że zmiany w genomie wirusa HIV-1 wynikają z ukierunkowanego procesu obronnego komórek, mającego doprowadzić do mutacyjnej inaktywacji wirusa i degradacji kopii jego genomowego DNA, powstających w procesie odwrotnej transkrypcji. W związku z nieustającymi próbami opracowania skutecznej terapii przeciw infekcji wirusem HIV, odkrycie białka APOBEC3G i sposobu jego działania zwiększa szanse na opracowanie tak pożądanego leku przeciw wirusowi HIV.

PROCES REDAGOWANIA

Redagowanie określane jest często jako proces potranskrypcyjnej modyfikacji specyficznych miejsc w cząsteczce RNA. Obecnie wiadomo, że modyfikacjom może ulegać również DNA. Skutki redagowania przejawiające się zmianami w sekwencji RNA zostały zidentyfikowane u wielu organizmów, poczynając od jednokomórkowych pierwotniaków (delecje urydyny w mitochondrialnym mRNA *Trypanosoma brucei* [4]), kończąc na człowieku (m. in. deaminacja rybonukleozydu – cytydyny w transkrypcie apolipoproteiny B [5]).

Za redagowanie można uznać takie zmiany w niedojrzałym transkrypcyjnym, jak insercja, delecja oraz przekształcenie/modyfikacja jednego nukleotydu na inny. Takim nowo pojawiającym się nukleotydem, może być ester fosforanowy adenozy, cytozyny, inozy, guanozyny lub urydyny. Delecję zaobserwowano jedynie dla urydyny [6]. Modyfikacja zasady azotowej – cytozyny do uracylu jest dobrze poznanym przykładem redagowania RNA. Ten rodzaj modyfikacji, jako jedyny też pojawia się w cząsteczkach jednoniciowego DNA.

Małgorzata Pupecka¹

Andrzej Pacak^{2,✉}

¹Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań
²Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów, Poznań

✉Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Ekspresji Genów, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, e-mail: apacak@amu.edu.pl, tel.: (061) 829 27 34

Artykuł otrzymano 16 września 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 6 czerwca 2006 r.

Słowa kluczowe: APOBEC3G, deaminaza cytydyny, hipermutacja, HIV, redagowanie, Vif

Wykaz stosowanych skrótów: AGM (ang. *African Green Monkey*) – zielona małpa afrykańska; APOBEC3G (ang. *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) – deaminaza cytydyny; BER (ang. *Base excision repair*) – naprawa z wycinaniem zasad; HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) – wirus upośledzenia odporności immunologicznej człowieka; LTR (ang. *long terminal repeats*) – długie powtórzenia końcowe; MLV (ang. *murine leukemia virus*) – wirus białaczki myszy; PBS (ang. *primer binding site*) – miejsce wiązania startera; SIV (ang. *simian immunodeficiency virus*) – wirus upośledzenia odporności immunologicznej małpy; ssDNA (ang. *single stranded DNA*) – jednoniciowy DNA; Vif (ang. *viral infectivity factor*) – wirusowy czynnik infekcyjności

Podziękowanie: Andrzej Pacak jest stypendystą Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2004-2005)

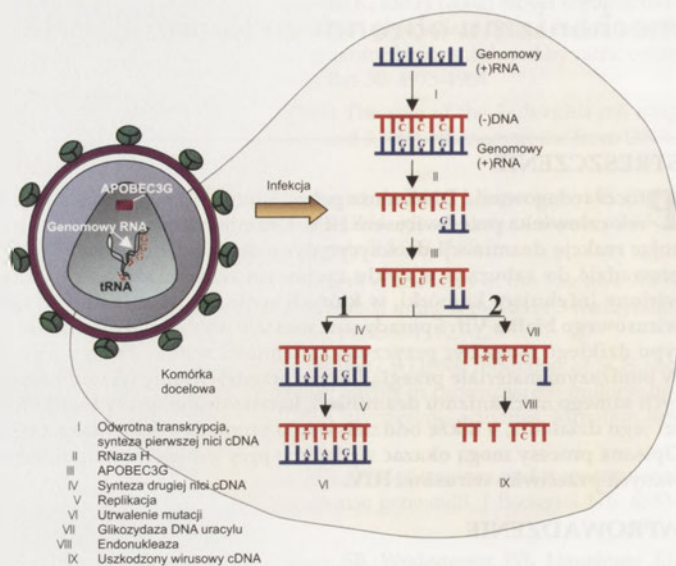
Modyfikację cytydyny do urydyny zaobserwowano po raz pierwszy u kręgowców w cząsteczce mRNA apolipoproteiny B (apoB), gdzie następuje zamiana kodonu kodującego aminokwas glutaminę (CAA) na kodon stop (UAA) [5]. Gen dla tego białka koduje polipeptyd złożony z 4536 aminokwasów, zwany apolipoproteiną B100. Ta forma białka jest syntetyzowana w komórkach wątroby i wydzielana do krwioobiegu, a następnie transportowana do różnych tkanek organizmu. W komórkach jelita powstaje krótsza forma apolipoproteiny, B tj. apolipoproteina B48 o długości zaledwie 2152 aminokwasów. Jest ona syntetyzowana na matrycy mRNA dla białka pełnej długości, poddanym jednak procesowi redagowania. W jego wyniku dochodzi do wcześniejszego zatrzymania translacji, co prowadzi do powstania krótszego polipeptydu [7]. Do redagowania apolipoproteiny B wymagana jest obecność specjalnego, trójzłednego motywu regulatorowego, występującego w długorzędowej strukturze RNA, otaczającego docelową zasadę (złożony jest on z trzech elementów: ang. *efficiency element*, *spacer*, *mooring sequence*). Potrzebne jest też działanie multiproteinowego kompleksu, zwanego editosomem, w skład którego wchodzi enzym o masie 27 kDa nazywany deaminazą cytydyny (APOBEC1) oraz wiele pomocniczych czynników białkowych [6]. Deaminaza cytydyny występuje wyłącznie w komórkach jelita cienkiego. Mechanizm modyfikacji C→U stwierdzonej w transkrypcie kodującym neurofibrominę, białko komórek nowotworowych nerwiakowłókniakowatości typu I (NFI), wydaje się być podobny [8].

Do rodziny deaminaz cytydyny zaliczamy wiele białek, przy czym wszystkie one mają zachowaną w ewolucji domenę cynkowo-zależną, która jest miejscem katalitycznym reakcji [9]. Na szczególną uwagę zasługuje tu białko APOBEC3G zaangażowane w proces redagowania jednoniciowego (-)DNA (ssDNA, ang. *single stranded DNA*) wirusa HIV-1, hamujące rozszerzanie się infekcji wirusa HIV-1 w organizmie.

REDAGOWANIE CZĄSTECZKI (-)DNA WIRUSA HIV-1 PRZY UDZIALE BIAŁKA APOBEC3G CZŁOWIEKA

Deaminaza APOBEC3G ma wpływ na proces replikacji retrowirusów w komórkach gospodarza. Cząsteczki retrowirusa po zaatakowaniu komórki, integracji DNA wirusa HIV z genomem gospodarza, powieleniu swojego genomu i syntezie białek wchodzących w skład wirionu, ulegają składaniu i odpączkowują od zainfekowanej komórki. Jeżeli w zainfekowanej komórce jest produkowane białko APOBEC3G, zostanie ono włączone do kapsydu podczas procesu pączkowania i uwalniania wirionów. Działanie deaminazy ujawnia się przy infekcji kolejnej komórki, gdy wirusowa odwrotna transkryptaza kopiuje genomowy RNA wirusa do dwuniciowej cząsteczki DNA. Synteza zaczyna się od przyłączenia startera tRNA^{Lys3} i prowadzi do syntezy pierwszej nici (-)DNA, a następnie nici (+)DNA. Białko APOBEC3G (Ryc. 1) katalizuje deaminację 2'-deoksytydyny na nici (-)DNA, dając w efekcie produkt w postaci 2'-deoksyurydyny [10].

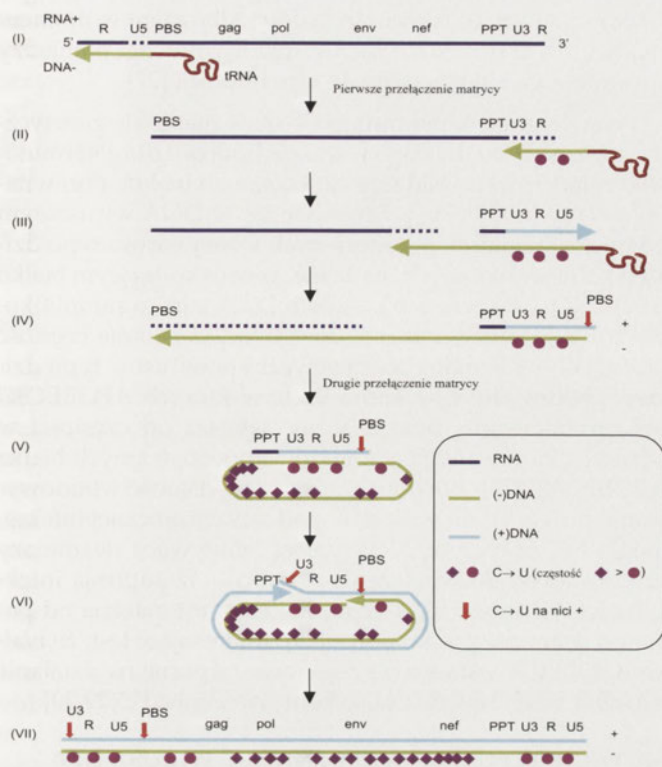
Na skutek deaminacji, w nici (+)DNA pojawia się mutacja typu G→A, ponieważ podczas syntezy, uracyl ulega



Rycina 1. Deaminacja deoksytydyny na ssDNA wirusa i jej prawdopodobne skutki: inaktywacja wirusa poprzez utrwalenie rozległych i szkodliwych dla wirusa mutacji (1); dezintegracja cDNA wirusa na skutek działania glikozydazy DNA uracylu (2). Wg. Harris i wsp. [24], oraz Gu i Sundquist [10].

komplementarnemu sparowaniu z adeniną, a nie z guaniną, jakby to było w przypadku, gdyby cytozyna na nici (-)DNA nie ulegała deaminacji. Sekwencjonowanie poszczególnych fragmentów wirusowego genomu wykazało, iż liczba mutacji G→A wzrasta stopniowo w kierunku 5'→3', przy czym znacznie spada w rejonie 3'LTR (ang. *long terminal repeats*) [11]. Sugeruje to, że deaminacja dotyczy szczególnie 5' regionu nici (-)DNA. Co ciekawe, zidentyfikowano również trzy mutacje C→U, dwie w rejonie U3 5'LTR oraz jedną w rejonie wiązania startera PBS (ang. *primer binding site*).

Przyczyną nierównomiernie pojawiających się mutacji G→A oraz C→U, może być swoistość działania APOBEC3G na ssDNA. Autorzy jednego z ostatnich doniesień [12] tłumaczą to sposobem, w jaki genomowy RNA wirusa HIV ulega przepisaniu na DNA. Synteza łańcucha (-)DNA przebiega na matrycy wirusowego, genomowego RNA. Po wykorzystaniu, RNA ulega degradacji przez RNazę H (RNaza H trawi cząsteczki RNA występujące w heterodupleksach z DNA), tym samym odsłaniając deaminazie APOBEC3G jednoniciowy (-)DNA. Przyczyną nierównomiernego rozmieszczenia produktów deaminacji wzdłuż cząsteczki DNA mogą być różnice w czasie, w jakim nowopowstałe odcinki (-)DNA pozostają w postaci jednoniciowej. Ponieważ odcinek (+)DNA jest przejściowo odsłonięty dla APOBEC3G, może on być poddany działaniu deaminazy, co w konsekwencji prowadzi do mutacji C→U (Ryc. 2). Ostatnie dane pokazują, że APOBEC3G działa jako dimer na jednoniciowym DNA. Przy czym jeden z monomerów jako pierwszy przyłącza się do DNA. To wiązanie ma charakter przypadkowy. Posuwając się ruchem ślizgowym i skokowym enzym przeprowadza reakcję deaminacji. Jednak proces ten występuje wyłącznie, gdy enzym przesuwa się w kierunku 3'→5' [13].



Rycina 2. Proponowany mechanizm deaminacji odwrotnego transkryptu, katalizowany przez APOBEC3G. (I) Synteza (-)DNA po przyłączeniu i wydłużeniu przez odwrotną transkryptazę startera tRNA^{Lys3} (II) Jednoniciowy koniec DNA łączy się z 3'LTR, a RNAza H degradowuje fragment matrycy (+)RNA; (III) APOBEC3G katalizuje reakcję deaminacji C → U na (-)DNA (różowe kółka). Synteza (+)DNA zostaje zainicjowana w sekwencji polipurynowej (PPT) i jest utrzymywana do momentu przepisania informacji z sekwencji przyłączonej ((-)DNA) wraz ze starterem tRNA; (IV) RNAza H trawi tRNA^{Lys3}, ekspozując fragment nici (+)DNA w miejscu wiązania startera na deaminację; (V) Cyrkularyzacja DNA na skutek przeniesienia zsyntetyzowanego fragmentu (+)DNA na koniec 3'(-)DNA; (VI) Kontynuacja syntezy. Koniec 5' łańcucha (+)DNA staje się tymczasowo jednoniciowy i ulega deaminacji; (VII) Kompletna cząsteczka DNA wraz z LTR. Wg. Navarro i Landau [12].

MECHANIZM HAMOWANIA FUNKCJI BIAŁKA APOBEC3G PRZEZ BIAŁKO Vif WIRUSA

Badając przyczyny ograniczonych zdolności infekcyjnych mutantów wirusa HIV-1, określanego jako Δ vifHIV-1 (mutant ten nie posiadał białka Vif wirusa, ang. *viral infectivity factor*), zidentyfikowano gen, nazwany CEM15 [14]. Kodował on białko bardzo podobne do enzymu redagującego mRNA apolipoproteiny B, dlatego określono je mianem APOBEC3G [15]. Zaobserwowano także, że efektywna infekcja wirusem HIV-1 komórek, w których wirus naturalnie się namnażał (tj. limfocytów T CD4+, makrofagów), była uzależniona od białka Vif [16]. Niektóre komórki oraz ich pochodne nowotworowe linie komórkowe, uniemożliwiały replikację wirusa Δ vifHIV-1. Nazwano je komórkami niepermissywnymi. Takimi komórkami są limfocyty T CD4+, makrofagi oraz nowotworowa linia komórkowa H9 pochodząca z białaczki limfocytów T. W komórkach permissywnych (np. nowotworowej linii limfocytów T-293T) powielanie wirusów Δ vifHIV-1 nie było hamowane [14,16,17]. Wyniki fuzji obu typów komórek pozwoliły wnioskować, iż niepermissywność komórek jest cechą dominującą, co świadczyłoby o obecności czynnika wpływającego na naturę ko-

mórek [16]. Ustalono, że czynnikiem hamującym rozwój wirusa Δ vifHIV-1 było białko APOBEC3G [14].

Ponieważ wiriony HIV-1 typu dzikiego (zawierające białko Vif), pączkujące w komórkach niepermissywnych zawierały 140-krotnie niższy poziom białka APOBEC3G niż wiriony Δ vifHIV-1 [18], wysunięto hipotezę iż białko Vif wiążąc białko APOBEC3G, w jakiś sposób zapobiega jego inkorporacji do kapsydu. Stosując metody immunoprecypitacji udowodniono, iż między tymi białkami zachodzą interakcje [18]. Na podstawie kolejnych eksperymentów, w których blokowano komórkowy system degradacji białek (proteasom), dowiedziono, iż białko Vif hamuje pakowanie białka APOBEC3G do pączkujących wirionów, poprzez interakcje zarówno z deaminazą, jak i z czynnikami komórkowymi, które indukują ubikwitynację enzymu i przeczyszczają go do degradacji proteolitycznej [19]. Inni badacze udowodnili, że oprócz potranslacyjnej degradacji z udziałem proteosomu 26S, białko Vif zaburza translację mRNA APOBEC3G [20].

Znany jest mechanizm pakowania białka APOBEC3G do wirionów Δ vifHIV-1 [21]. W nieobecności białka Vif, w komórkach, w których syntezie ulegało białko nukleokapsydu HIV-1 Gag zaobserwowano, iż APOBEC3G ulega wiązaniu z błoną komórkową, a następnie inkorporacji do cząstek wirusowo podobnych (VLPs, ang. *viral like particles*) zbudowanych z białka Gag. Jednak w obecności białka Vif, bądź też zmutowanego białka Gag niezdolnego do wiązania z błoną, nie zaobserwowano takiego procesu. Wynika z tego, iż nukleokapsyd zbudowany z białka Gag jest czynnikiem niezbędnym do inkorporacji białka APOBEC3G do wirionu [21].

AKTYWNOŚĆ PRZECIWWIRUSOWA BIAŁKA APOBEC3G

Dowodów na działanie przeciwwirusowe białka APOBEC3G dostarczyły badania nad zdolnością integracji prowirusowego Δ vifHIV DNA do genomu komórek człowieka, replikacji, a w efekcie produkcji wirionów. Wiele informacji dostarczyły też studia nad stopniem infekcyjności wirusa wstępnie hodowanego w komórkach, w których powstawało białko APOBEC3G. Rozpatrzono między innymi przypadki, w których komórki linii permissywnej zostały zainfekowane dzięki formą wirusa HIV-1 (wtHIV, ang. *wild type*) lub Δ vifHIV. Wirusy wcześniej namnożono w komórkach, które produkowały, bądź nie produkowały deaminazy APOBEC3G. Białko otoczki wirusa HIV-1 Env (ang. *envelope*) zostało zastąpione białkiem powierzchniowym G wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej VSV (ang. *vesicular stomatitis virus*) [22]. Metoda ta pozwala osiągnąć wyższe miano wirionów i zgromadzić większy zapas wirusowych cząstek [23]. Z wyników eksperymentu wywnioskowano, iż defektywność wirusów, po okresie powielania w komórkach niepermissywnych, objawia się nawet, jeśli kolejną komórką zainfekowaną jest komórka w pełni permissywna, na dodatek defektywność ujawnia się już na początku, poprzez obniżoną zdolność powielania materiału genetycznego wirusa. Końcowym efektem jest ich praktyczna niezdolność do produkcji wirionów [21]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że gdy zawartość zintegrowanego prowirusowego Δ vifHIV DNA spada około 50 krotnie, to aż 800 krot-

nie spada produkcja prawidłowego białka transgenicznego, wprowadzonego do genomu retrowirusa. Oznacza to, że zaledwie w 1 na 16 komórek białko kodowane przez wirus będzie produkowane [22].

SPEKTRUM DZIAŁANIA BIAŁKA APOBEC3G

W związku z sugestiami iż białko Vif stymuluje infekcję i replikację onkoretrowirusa MLV (ang. *murine leukemia virus*), postanowiono sprawdzić, czy białko APOBEC3G oddziałuje na wirus MLV. Do tego celu wykorzystano zrekombinowany wirus MLV, kodujący białko żółtej fluorescencji YFP (ang. *yellow fluorescent protein*). Wirus namnażano w komórkach, w których dochodziło albo nie dochodziło do syntezy białka APOBEC3G. Następnie rekombinanty posłużyły do infekcji mysich fibroblastów. Poziom infekcji oszacowano poprzez analizę fluorescencji komórek za pomocą cytometru przepływowego i dowiedziono, iż stopień zahamowania infekcji wzrasta wraz z poziomem białka APOBEC3G. Białko APOBEC3G zlokalizowano również w wirionach MLV [24]. Powyższe wyniki świadczą o szerokim zasięgu działania białka APOBEC3G [24].

Zbadano także czy APOBEC3G uczestniczy w kontroli retrotranspozycji jednego z retrotranspozonów genomu człowieka, określanego jako LINE-1 (ang. *long interspersed element-1*). Nie udowodniono jednak takiej aktywności. Jednym z wyjaśnień może być fakt, iż synteza DNA retrotranspozonu LINE-1 zachodzi w jądrze, a APOBEC3G jest głównie białkiem cytoplazmatycznym [25]. Ponieważ spektrum działania enzymu jest na tyle rozległe, że hamuje replikację zarówno wirusa HIV jak i innych retrowirusów, można wnioskować, iż reakcja deaminacji nie jest specyficzna tylko dla sekwencji DNA wirusa HIV-1 [22].

PREFERENCYJNE MIEJSCA MUTACJI

Kolejne doświadczenia dostarczyły informacji dotyczących samego mechanizmu deaminacji. Analiza sekwencji DNA Δ vifHIV-1 po kontakcie z białkiem APOBEC3G dowiodła, iż deaminacja preferencyjnie zachodzi w miejscu 5'-T/CCC-3' na nici (-)DNA, gdzie deaminowana deoksytydyna poprzedzona jest deoksyrybonukleotydami 5'-T/C (pirymidyna) – C, co na nici (+)DNA daje docelowy trideoksynukleotyd 5'-GGA lub 5'-GGG [24]. Z kolei niedawno odkryta deaminaza APOBEC3F, dokonuje deaminacji cytozyny znajdującej się w układzie 5'-TC na nici (-)DNA, co prowadzi do powstania tranzycji typu 5'-GA→5'-AA na nici (+)DNA [26]. Sekwencje te są zgodne z miejscami, w których pojawiała się mutacja podczas długoterminowej hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej [1,3] zakażonych wirusem HIV-1. Prawdopodobne jest więc, że oba te białka biorą udział w mutowaniu retrowirusów *in vivo*. Badania potwierdziły, że wspólne działanie obu enzymów zwiększa znacznie częstość pojawiania się mutacji [26].

W przeszłości sądzono, iż pojawiające się hipermutacje w sekwencjach wirusa HIV-1, wyizolowanych od zainfekowanych osobników, były wynikiem braku równowagi pomiędzy dostępnymi substratami dTTP a dCTP niezbędnymi do syntezy wirusowego DNA [2,3]. Dowiedziono jednak,

że hipermutacje nie były wywołane różnicą w dostępności wspomnianych deoksynukleotydów, albowiem w momencie, w którym doszło do zachwiania równowagi pomiędzy substratami nie dochodziło do hipermutacji [27].

Pojawianie się hipermutacji G→A w materiale genetycznym wirusa typu dzikiego w trakcie hodowli długoterminowej, zainspirowało badaczy do kolejnych badań. Porównano zmiany mutacyjne pojawiające się w DNA wirusowym po infekcji komórek permissywnych formą wirusa typu dzikiego, transfekowanych, bądź nie, genem kodującym białko APOBEC3G. Po czterech pasażach DNA wirusa zamplifikowano i zsekwencjonowano, dowodząc, iż istotnie częstość mutacji G→A w materiale genetycznym wirusów typu dzikiego, hodowanych w komórkach, w których APOBEC3G był produkowany, była znacznie wyższa od częstości w wirusach hodowanych w komórkach pozbawionych białka APOBEC3G [27]. Również mniejsza wydajność wbudowania białka Vif do wirionów podczas chronicznej infekcji, mogła być przyczyną niewydajnej inaktywacji deaminazy [27]. Podobne doświadczenie wykazało, iż supresja infekcyjności wirusów HIV-1 typu dzikiego jest zależna od poziomu deaminazy w komórce [28]. Interesujące jest, że białko APOBEC3F okazało się częściowo odporne na działanie Vif, choć ta sprawa pozostaje kontrowersyjna [25,29,30].

MUTACJE TYPU G→A A ZMIENNOŚĆ WIRUSA HIV

Warto się zastanowić, jaki jest realny wpływ hipermutacji G→A na żywotność wirusa, w czasie długotrwałej infekcji HIV-1. Prawdopodobnie, ograniczone działania APOBEC3G na materiał genetyczny HIV-1 ma istotne znaczenie dla zwiększania zmienności pierwotnej populacji wirusa, a w konsekwencji dla zwiększenia oporności wirusa na działanie mechanizmów obronnych organizmu oraz na leki [27].

PROCESY PROWADZĄCE DO NIESTABILNOŚCI WIRUSA HIV

Omawiając mechanizm mutacyjny, zachodzący w cząsteczce (-)DNA wirusa Δ vifHIV-1, warto się zastanowić, jaki wpływ na dalsze losy wirusa mają procesy następujące po zjawisku deaminacji. Po pierwsze o ile prowirusowy DNA zintegruje się z genomem gospodarza, to hipermutacje mogą okazać się dla wirusa letalne, np. może powstać przedwczesny kodon stop w mRNA kodującym białko wirusowe [24,31] lub też zmutowane białka wirusowe. Może także dojść do sytuacji, w której wirusowa nić (-)DNA będzie na tyle niestabilna, że prowirus w ogóle nie ulegnie integracji do genomu gospodarza. Deoksyurydyna zawarta w nici (-)DNA może zostać rozpoznana przez glikozydazę DNA uracylu (enzym ten również ulega inkorporacji do wirionu podczas pączkowania) i wycięta, tworząc miejsce AP (apirymidynowe) rozpoznawane z kolei przez endonukleazę. Następnie w szlaku charakterystycznym dla naprawy DNA – BER (ang. *base excision repair*) dojdzie do usunięcia cukru z miejsca AP. Ponieważ zmutowanych miejsc w cząsteczce (-)DNA będzie na tyle dużo, iż zostanie ona wielokrotnie przecięta przez nukleazę, taki DNA nie będzie mógł dalej służyć jako matryca do syntezy drugiej nici (+)DNA i ulegnie stopniowej degradacji w cytoplazmie. Intrygujący pozostaje cel, dla którego wirus pakuje do kapsydu cząsteczk-

ki glikozydazy DNA uracylu. Prawdopodobnie, enzym ten ma zapobiegać spontanicznej deaminacji deoksycytydyny w DNA HIV-1 (Ryc. 1) [24]. Pozostaje jeszcze trzecia możliwa przyczyna niestabilności wirusa, a mianowicie, zmiana specyficzności inicjacji syntezy drugiej nici (+)DNA, ze względu na obecność deoksurydyny w pierwszej nici (-)DNA. Każda z wymienionych sytuacji może być prawdopodobną przyczyną zmniejszenia produkcji wirusów w komórkach, w których APOBEC3G ulega syntezie względem tych, w których deaminaza nie występuje [24].

SPECYFICZNOŚĆ BIAŁKA VIF

Mimo entuzjazmu, jaki wzbudziło odkrycie białka APOBEC3G i poznanie jego roli w procesie redagowania, częstość mutacji G→A prowirusowego DNA HIV-1 typu dzikiego jest dowodem, iż wirus dobrze sobie radzi z redagowaniem obronnym w komórkach człowieka. Badania prowadzone nad białkiem APOBEC3G pochodzącym od innych przedstawicieli ssaków, dały ciekawe wyniki. Okazało się bowiem, iż cząsteczka Vif wirusa HIV-1 jest bierna w stosunku do białka APOBEC3G pochodzącego z myszy. Nie zapobiega ona pakowaniu do wirionu ani białka myszy, ani małpy (Małpy Starego Świata, tu: Makaki, AGM (ang. *African Green Monkey*) - Zielone Małpy Afrykańskie), tym samym dowodząc, że APOBEC3G z tych organizmów silnie hamuje infekcję wirusem HIV-1. Vif hamuje jednak aktywność białka kodowanego przez małpy człekokształtne (tu: szympansa) [18]. Specyficzność gatunkowa interakcji, zachodzących pomiędzy APOBEC3G a Vif, może być barierą zawężającą infekcję wirusem HIV-1 do organizmów gatunku ludzkiego.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WRAŻLIWOŚĆ BIAŁKA APOBEC3G NA BIAŁKO VIF

Powyższe odkrycia pociągnęły za sobą kolejne pytanie, a mianowicie, jakie różnice w białku pochodzącym z człowieka, myszy i małpy, powodują tak odmienny wpływ na infekcję wirusem HIV-1? Odpowiedź jest dość zaskakująca. Okazało się, iż zaledwie jeden aminokwas (kwas asparaginowy – D) w pozycji 128 białka APOBEC3G człowieka i białka pochodzącego z Zielonej Małpy Afrykańskiej – AGM (lizyna – K) warunkuje gatunkowo-specyficzną wrażliwość tych białek na proteolityczną degradację z udziałem białka Vif wirusa [32]. Warto wspomnieć, że niewielkie ilości białka APOBEC3G człowieka oraz AGM, ale zmutowanego w pozycji 128 (mutacja ta powoduje wrażliwość na białko Vif), ulegały wbudowaniu do wirionów, nawet w obecności Vif, co jednak mogło być skutkiem sztucznych warunków doświadczalnych z udziałem wektorów do nadekspresji. Poziom z jakim infekcyjność wirusa HIV-1 typu dzikiego ulega hamowaniu jest tu ciągle na znacznie niższym poziomie niż w przypadku wirusa defektywnego lub też w układzie z udziałem białka AGM typu dzikiego [32]. Co więcej, mutant białka APOBEC3G człowieka z substytucją D128K, podobnie jak AGM APOBEC3G, wykazywał oporność na neutralizujące działanie białka Vif wirusa HIV-1 [33,34,35]. Wbrew oczekiwaniom, zmutowane białko APOBEC3G D128K tworzyło kompleksy z białkiem Vif, co wykazano za pomocą immunoprecypitacji białek pochodzących z lizatów komórkowych po kotransfekcji wektorami niosącymi geny Vif i APOBEC3G D128K [33,35]. Dodatkowo białko APOBEC3G z substytucją

D128K okazało się wrażliwe na działanie białek Vif pochodzących od wirusów SIVmac239 (ang. *simian immunodeficiency virus*) oraz HIV-2, które wchodząc w kontakt z deaminazą od razu kierowały białko APOBEC3G na drogę degradacji proteolitycznej [35]. Wydaje się, że oddziaływania zachodzące między białkiem APOBEC3G D128K człowieka a białkiem Vif HIV-1 są różne od tych między czynnikiem wirusowym a naturalną formą deaminazy i że są one niewystarczające by zainicjować degradację enzymu. Być może, białko Vif poprzez kontakt z APOBEC3G inicjuje jego zmiany konformacyjne, co w konsekwencji prowadzi do rozpoznania go przez system ubikwitynujący jako źle sfałdowane i następuje jego degradacja. Możliwe, że mutacja typu D128K zapobiega takiemu działaniu.

Z terapeutycznego punktu widzenia, wprowadzenie takiego zmienionego białka do komórek mogło by okazać się pomocne w leczeniu infekcji wirusem HIV-1.

PODSUMOWANIE

Odkrycie białka APOBEC3G, katalizującego reakcję deaminacji deoksycytydyny w cząsteczce (-)DNA, powstającej podczas procesu odwrotnej transkrypcji genomowego RNA wirusa HIV-1, rzuca nowe światło na procesy obronne organizmu, uczestniczące w zwalczaniu infekcji HIV-1. Choć mechanizm ten jest niewydolny ze względu na neutralizujące działanie czynnika Vif wirusa, poznanie jego, a także źródła wrażliwości APOBEC3G na białko Vif, może się okazać istotne w celu uskutecznienia walki z wirusem i zapobiegania skutkom jego infekcji. Uwagę warto zwrócić między innymi na inhibitory białka Vif oraz związki zakłócające jego oddziaływanie z czynnikami komórkowymi kierującymi APOBEC3G do degradacji. Należałoby również zastanowić się nad opracowaniem terapii genowej, wykorzystującej jako transgen sekwencję białka APOBEC3G z mutacją D128K, o ile białko to nie będzie powodować odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Świat wirusów jest jednak bardziej skomplikowany niż może się to wydawać, dlatego warto sobie uzmysłowić, że nawet, jeśli terapia genowa okazałaby się skuteczną bronią przeciw HIV-1, najprawdopodobniej nie zapobiegałaby ona zakażeniu wirusem HIV-2. Ponadto, ciężko jest przewidzieć skutki takiej ingerencji człowieka w organizm, tym bardziej, gdy nie dysponuje się odpowiednim zwierzęcym modelem doświadczalnym.

PIŚMIENNICTWO

1. Vartanian J P, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S (1991) Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 65: 1779-1788
2. Martinez MA, Vartanian JP, Wain-Hobson S (1994) Hypermutagenesis of RNA using human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and biased dNTP concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11787-11791
3. Vartanian JP, Meyerhans A, Sala M, Wain-Hobson S (1994) G→A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3092-3096
4. Simpson L, Thiemann OH, Savill NJ, Alfonzo JD, Maslov DA (2000) Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6986-6993

5. Chen SH, Habib G, Yang CY, Gu ZW, Lee BR (1987) Apolipoprotein B-48 is a product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238: 363-366
6. Gott JM, Emeson RB (2000) Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet* 34: 499-531
7. Brown TA (2001) *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 226-228
8. Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC (1996). The neurofibromatosis type I messenger RNA undergo base-modification RNA editing. *Nucleic Acids Res* 24: 478-485
9. Wedekind JE, Dance GS, Sowden MP, Smith HC (2003) Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* 19: 207-216
10. Gu Y, Sundquist WI (2003) Good to CU. *Nature* 424: 21 - 22
11. Yu Q, Konig R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, Richman D, Coffin JM, Landau NR (2004) Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* 5: 435-442
12. Navarro F, Landau NR (2004) Recent insights into HIV-1 Vif. *Curr Opin Immunol* 16: 477-82
13. Chelico L, Pham P, Calabrese P, Goodman MF (2006) APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3'→5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*, published online 23 April 2006: 1-8
14. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 6898
15. Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS (2002) RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* 10: 1247-1253
16. Madani N, Kabat D (1998) An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol* 72: 10251-10255
17. Gabuzda DH (1992) Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T Lymphocyte. *J Virol* 66: 6489-6495
18. Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114: 21-31
19. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302: 1056-1060
20. Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC (2003) HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 12: 591-601
21. Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J, Kleiman L (2004) The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279: 33177-33184
22. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424: 99-103
23. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Book@NCBI
24. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113: 803-809
25. Turelli P, Vianin S, Trono D (2004) The innate antiretroviral factor APOBEC3G does not affect human LINE-1 retrotransposition in a cell culture assay. *J Biol Chem* 279: 43371-43373
26. Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS (2004) APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 14: 1385-1391
27. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424: 94-98
28. Shindo K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Abudu A, Fukunaga K, Uchiyama T (2003) The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* 278: 44412-44416
29. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH (2004) Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14: 1392-1396
30. Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR (2004) A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J* 23: 2451-2458
31. KewalRamani VN, Coffin JM (2003) Weapons of mutational destruction. *Science* 301: 923-925
32. Mangeat B, Turelli P, Liao S, Trono D (2004) A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* 279: 14481-14483
33. Bogerd HP, Doehle BP, Wiegand HL, Cullen BR (2004) A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3770-3774
34. Schrofelbauer B, Chen D, Landau NR (2004) A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3927-3932
35. Xu H, Svarovskaia ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebek K, Pathak VK (2004) A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5652-5657

The innate antiretroviral defense of human cells, based on the DNA editing

Małgorzata Pupecka¹, Andrzej Pacak²✉

¹Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences, 32 Strzeszyńska St., 60-479 Poznań, Poland

²Department of Gene Expression, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 5 Międzychodzka St., 60-371 Poznań, Poland

✉e-mail: apacak@amu.edu.pl

Key words: APOBEC3G, cytidine deaminase, editing, hipermutation, HIV, Vif

ABSTRACT

The editing process may play an essential role in the antiviral cell defense. The human cytidine deaminase APOBEC3G, that catalyses the deoxycytidine to deoxyuridine deamination reaction in the reverse transcript of the HIV-1 genome, leads to instability of the viral DNA, if only HIV-1 virion is defective and lacks the Vif protein. This mechanism has an effect on G→A hipermutation appearing in the provirus DNA and defective HIV-1 viral RNA, yielded in infected cell. Such hipermutation has previously been discovered in the viral HIV-1 genome, produced in peripheral blood mononuclears that were long-term cultured after collection from infected patient. Probably, the deamination reaction that is inhibited in the wild type HIV-1 by the Vif protein, occurs rarely during infection and thus increases viral diversity and drug's resistance. In this review, we present the results of latest studies concerning the mechanism of viral DNA deamination, specificity of this process and APOBEC3G - HIV-1 Vif interactions, that may be useful in designing the new anti-HIV therapies.

STRESZCZENIE

Obecnie RNA uważany jest za jeden z głównych czynników kontrolujących proces ekspresji informacji genetycznej. Przeprowadzone w ostatnich latach badania pozwoliły wyróżnić kilka typów krótkich regulatorowych RNA biorących udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów, a także w epigenetycznej modyfikacji DNA. Najpóźniej poznaną grupą są krótkie interferencyjne RNA działające *in trans* (tasiRNA). Jak dotąd zidentyfikowano jedynie 5 genów kodujących tasiRNA u *Arabidopsis thaliana*. TasiRNA powstają w oparciu o niekodujące prekursorowe RNA. W pierwszym etapie cząsteczki prekursorowe poddawane są ukierunkowanej hydrolizie w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez specyficzne miRNA. Następnie polimeraza RNA zależna od RNA (RDR6) przekształca oba fragmenty prekursora do formy dwuniciowej (dsRNA). W kolejnym etapie endorybonukleaza typu Dicer (DCL4) „wycina” z dsRNA funkcjonalne 21-nukleotydowe tasiRNA. TasiRNA, podobnie jak większość miRNA, biorą udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów. Stwierdzono, że tasiRNA uczestniczą w regulacji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na auksyny (ARF) i białka PPR zawierające charakterystyczny 35-aminokwasowy motyw.

WPROWADZENIE

Przełom XX i XXI wieku obfitował w wiele niezwykle istotnych dokonań w dziedzinie biologii molekularnej. Jednym z najbardziej fascynujących wydaje się być odkrycie krótkich cząsteczek RNA odpowiedzialnych za regulację procesu ekspresji informacji genetycznej. W rezultacie podjętych badań zidentyfikowano wiele tego typu cząsteczek zarówno w organizmach zwierzęcych, jak i roślinnych. Stwierdzono, iż zazwyczaj są one wyzwalane z większych dwuniciowych lub częściowo dwuniciowych prekursorowych RNA. W pierwszym etapie cząsteczka prekursorowa cięta jest na 20–28 nukleotydowe duplety, posiadające dwa niesparowane nukleotydy na obu końcach 3' i grupę fosforanową na obu końcach 5'. Następnie jedna z nici dupletu włączana jest do kompleksu białkowego, w którym służy jako sonda umożliwiająca precyzyjne rozpoznanie komplementarnych sekwencji obecnych w DNA lub RNA. W zależności od rodzaju kompleksu, do jakiego wbudowany został krótki RNA, zhybrydyzowana z nim cząsteczka jest cięta lub modyfikowana [1–9].

Początkowo wszystkie identyfikowane 20–28 nukleotydowe cząsteczki określano mianem krótkich interferencyjnych RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*). Dokładniejsze analizy ujawniły jednak istotne różnice zarówno w pochodzeniu, jak i sposobie działania poszczególnych cząsteczek. Okazało się, iż znaczna ich część zakodowana jest w genomie, podczas gdy pozostałe powstają w oparciu o egzogenne RNA lub DNA (np. wprowadzone do komórki w wyniku infekcji wirusowej). Stwierdzono, że dłuższe cząsteczki (ok. 24–28 nt) wpływają na strukturę genomowego DNA, a nieco krótsze (20–23 nt) indukują degradację mRNA lub hamują translację. Biorąc pod uwagę zarówno biogenezę, jak i sposób funkcjonowania krótkich regulatorowych RNA podzielono je na dwie zasadnicze grupy; pierwszą tworzą siRNA drugą mikro RNA (miRNA; ang. *micro RNA*). Jednakże wraz ze wzrostem naszej wiedzy na temat krótkich regulatorowych RNA proponowane są ich dalsze podziały na mniejsze, bardziej wyspecjalizowane podgrupy [10].

Obecnie postuluje się, iż w komórkach roślin obok miRNA występują trzy typy siRNA: rasiRNA (siRNA związane z sekwencjami powtórzeniowymi; ang. *repeat-associated siRNA*), egzogenne siRNA oraz tasiRNA (siRNA działające *in trans*; ang. *trans-acting siRNA*) [10–13]. MiRNA stanowią najliczniejszą grupę krótkich regulatorowych RNA. Większość z nich kodowana jest przez specjalne geny (tzw. geny *MIR*) występujące w genomie jądrowym. Niekiedy jednak sekwencje kodujące miRNA ulokowane są w intronach genów białkowych [1,14,15]. W procesie powstawania w pełni funkcjonalnych miRNA wyróżnić można dwa podstawowe etapy. W pierwszym, transkrypt genu *MIR* zwany pri-miRNA trawiony jest przez endorybonukleazę typu Dicer (u *Arabidopsis thaliana* DCL1, ang.

Zbigniew Warkocki¹

Marek Figlerowicz^{2,✉}

¹Wydział Biologii; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

²Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

✉Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; e-mail: marekf@ibch.poznan.pl, tel. (061) 852 85 03

Artykuł otrzymano 15 marca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2006 r.

Słowa kluczowe: tasiRNA, miRNA, geny *TAS*, regulacja ekspresji genów

Wykaz skrótów: ARF (ang. *auxin response factors*) – białka odpowiedzi na auksyny; DCL (ang. *Dicer-like protein*) – endorybonukleaza typu Dicer; miRNA (ang. *micro RNA*) – mikro RNA; PPR (ang. *pentatricopeptide repeats*) – trzydziestopięcio-aminokwasowe powtórzenia; rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*) – krótkie interferencyjne RNA związane z sekwencjami powtórzeniowymi; RDR (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) – polimeraza RNA zależna od RNA; RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) – kompleks wyciszający indukowany przez RNA; SGS3 (ang. *suppressor of gene silencing 3*) – supresor wyciszania genów; siRNA (ang. *small interfering RNA*) – krótkie interferencyjne RNA; *TAS* – gen kodujący tasiRNA; tasiRNA (ang. *trans-acting small interfering RNA*) – krótkie interferencyjne RNA działające *in trans*

Podziękowanie: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki, nr projektu: PBZ-KBN-089/P06/2003

Dicer-like protein). W rezultacie uwolniony zostaje tzw. pre-miRNA przyjmujący charakterystyczną strukturę spinki do włosów (ang. *hairpin*). W drugim etapie pre-miRNA staje się substratem dla rybonukleazy DCL1, która wycina z niego 21-nukleotydowy miRNA [16,17]. W przypadku *A. thaliana* w biogenezę miRNA zaangażowane jest także białko HYL1 (białko wiążące dsRNA; ang. *Hyponastic leaves*), HEN1 (metylotransferaza; ang. *Hua enhancer*) oraz HASTY (transportuje miRNA z jądra do cytoplazmy) [18-22]. Dojrzałe miRNA włączane są do kompleksu RISC (kompleks wyciszający indukowany przez RNA; ang. *RNA-induced silencing complex*) i uczestniczą w hydrolizie komplementarnych mRNA [23]. Regulacja ekspresji genów roślinnych przez miRNA ma zatem charakter potranskrypcyjny.

RasiRNA są odpowiedzialne za wyciszanie sekwencji powtórzeniowych, z których się wywodzą. W *A. thaliana* cząsteczki te powstają przy udziale polimerazy RNA zależnej od RNA (RDR2) oraz białka typu Dicer – DCL3. Funkcjonalne 24-nukleotydowe cząsteczki rasiRNA wchodzą w kompleks z białkiem AGO4 i uczestniczą w tworzeniu heterochromatyny. Wstępny etap tego procesu polega na metylacji reszt cytydynowych w DNA oraz lizyn 9 w histonach H3 [24,25,26]. W następstwie infekcji wirusowej lub wprowadzenia do komórki transgeny tworzone są egzogenne siRNA. Podobnie jak rasiRNA wpływają one na funkcjonowanie sekwencji, z których się wywodzą. Ich pojawienie się prowadzi zatem do wyciszenia genów wirusowych (VIGS; ang. *virus induced gene silencing*) lub transgenów (TIGS; ang. *transgene induced gene silencing*) [24,27-30].

TasiRNA są najpóźniej odkrytym typem krótkich regulatorowych RNA [31-35]. W przeciwieństwie do pozostałych rodzajów siRNA, wpływają one na ekspresję innych genów, aniżeli te, z których się wywodzą. TasiRNA podobnie jak miRNA kodowane są przez specjalne geny jądrowe, tzw. geny *TAS*. W biogenezę tasiRNA zaangażowane jest białko: RDR6 (polimeraza RNA zależna od RNA – w starszych publikacjach określana także jako SGS2/SDE1), SGS3 i DCL4 oraz co najdziwniejsze miRNA.

ODKRYCIE tasiRNA

W 2004 roku ukazały się dwie publikacje [31,32] informujące o odkryciu krótkich regulatorowych RNA różniących się od wcześniej poznanych siRNA [24,25,36] oraz miRNA [1,37]. Autorzy pierwszej z prac starali się zidentyfikować czynniki kontrolujące procesy rozwojowe u *A. thaliana* [31]. W tym celu poszukiwali mutantów *A. thaliana* podobnych fenotypowo do roślin z niefunkcyjnym genem *zip*¹ (w literaturze określany także jako: *zippy*, *argonaute 7*, *ago7*). Wcześniej zaobserwowano bowiem, że mutant *zip-1* charakteryzuje się przedwczesnym wystąpieniem cech związanych ze zmianą fazy wzrostu, m.in. dwa pierwsze liście rozety u *zip-1* są wydłużone i podwijają się ku dołowi w przeciwieństwie do roślin typu dzikiego, u których są one okrągłe i płaskie. Dodatkowo, u *zip-1* szybciej pojawiają się włoski na górnej powierzchni liści, a także występują charakterystyczne zmiany w obrębie kwiatostanu [38]. W rezultacie, zidentyfikowano mutanty *rdr6-11* i *sgs3-11*, u

których stwierdzono zwiększoną ilość transkryptów genów At1g63130 i At5g18040. U mutantów *rdr6-11* i *sgs3-11*, podobnie jak u *zip-1*, w zwiększonej ilości występowały również transkrypty genów z rodziny *ARF* (*ARF3* i *ARF2*). Wykazano, że u *rdr6-11* i *sgs3-11* wzrostowi akumulacji transkryptu At5g18040 towarzyszy zanik trzech krótkich interferencyjnych RNA (siRNA255, siRNA289 i siRNA752). Zaobserwowane zmiany nie wpływały jednak na proces powstawania miRNA. Zidentyfikowano także 3 loci, z których każde, koduje kilka różnych siRNA oraz jedną wspólną dla wszystkich cząsteczkę zwaną siR255. Uzyskane wyniki wskazywały, że nowo scharakteryzowane siRNA wpływają na ekspresję innych genów niż te, z których się wywodzą, stąd zostały określone jako działające *in trans* (ang. *trans-acting*). Podobne obserwacje poczynili autorzy drugiej publikacji [32]. Badając mutanty *sgs3-1* i *sgs2-1* (*rdr6*) zidentyfikowali oni sześć genów (Tabela 1), których transkrypty ulegały kilkukrotnie wyższej akumulacji niż u roślin typu dzikiego. Z zaskoczeniem stwierdzono, że w obrębie jednego z tych transkryptów (At2g27400) występują sekwencje całkowicie identyczne lub komplementarne do dwunastu wcześniej sklonowanych 21-nukleotydowych RNA. Co ważne, cząsteczki te występowały u roślin typu dzikiego, były jednak nieobecne u mutantów *sgs3-1* i *sgs2-1* (*rdr6*). W roślinach typu dzikiego wykryto także produkty degradacji trzech z sześciu wspomnianych powyżej transkryptów (At5g18040, At4g29760, At4g29770). Do ich cięcia dochodziło zawsze w obrębie sekwencji komplementarnej do jednego z 21-nukleotydowych RNA pochodzących z At2g27400.

GENY KODUJĄCE tasiRNA

Jak dotąd w genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 5 loci, z których każde koduje kilka tasiRNA [31-34,39]. Allen i wsp. zaproponowali aby sekwencje DNA kodujące tasiRNA nazwać genami *TAS*: *TAS1a* (At2g27400), *TAS1b* (At1g50055), *TAS1c* (At2g39675), *TAS2* (At2g39680) i *TAS3* (At3g17185) [33]. Występujące w ich obrębie sekwencje 21-nukleotydowych tasiRNA bezpośrednio ze sobą sąsiadują, ale nie zachodzą na siebie [32-34]. Gen *TAS3* w przeciwieństwie do *TAS1a*, *b*, *c* i *TAS2* jest silnie konserwowany ewolucyjnie zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych [33,39]. Wszystkie wymienione geny *TAS* ułożone są pomiędzy rejonami kodującymi białka, a ich transkrypcja zachodzi najprawdopodobniej przy udziale polimerazy III [33].

Dotychczas najpełniej scharakteryzowano transkrypty *TAS1a* i *TAS2*. W obrębie 926 nt *TAS1a* wyróżniono dwa egzony oraz centralnie ułożony intron o długości 572 nt. Stwierdzono, że dojrzały transkrypt podobnie jak mRNA posiada kap na końcu 5' i jest poliadenylowany na końcu 3'. Nie koduje jednak białka, lecz co najmniej 10 tasiRNA. Dodatkowo 2 tasiRNA powstają z nici komplementarnej, za syntezę której odpowiedzialna jest roślinna polimeraza RNA zależna od RNA [32]. Tworzenie krótkich regulatorowych RNA zarówno z transkryptu *TAS1a*, jak i z komplementarnego RNA umożliwia opisany w dalszej części pracy mechanizm powstawania tasiRNA. Transkrypt *TAS2* wykazuje szereg podobieństw do *TAS1a*: ma kap, jest poliadenylowany oraz posiada umieszczony centralnie intron

¹Dalej w tekście termin „mutant” odnosi się do roślin posiadających mutacje typu delecji, insercji lub substytucji. Zmutowane rośliny cechują się brakiem, lub prawie całkowitą utratą aktywności białka kodowanego przez dany gen. Dodatkowe oznaczenia numeryczne są zgodne ze stosowanymi przez autorów cytowanych publikacji.

Tabela 1. Geny i regulujące ich ekspresję tasiRNA.

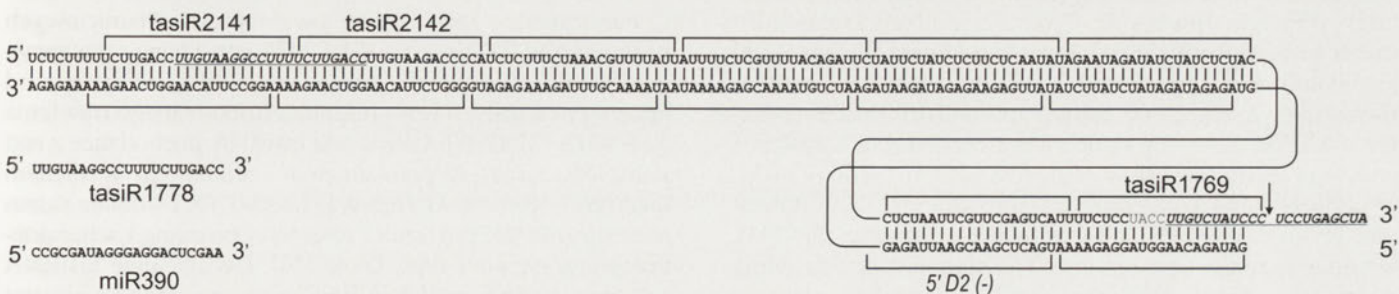
Locus (kodowane białko)	TasiRNA (TAS)	Identyfikacja tasiRNA	Odnosnik literaturowy
At5g62000 (ARF2)	tasiR2141 (TAS3) tasiR2142 (TAS3)	a. k.	33, 39
At2g33860 (ARF3)	tasiR2141 (TAS3) tasiR2142 (TAS3)	a. k. i eks.	31, 33, 39
At5g60450 (ARF4)	tasiR2141 (TAS3) tasiR2142 (TAS3)	a. k. i eks.	31, 33, 39
At1g12770 (białko PPR)	tasiR2140 (TAS2)	a. k. i eks.	33, 34
At1g63130 (białko PPR)	tasiR2140 (TAS2)	a. k. i eks.	31, 33, 34
At1g63230 (?)	(TAS2)	a. k. i eks.	34
At1g62930 (?)	(TAS2)	a. k. i eks.	34
At4g29760 (?)	tasiR255 (TAS1c) tasiR752 (TAS1a)	a. k. i eks.	32
At4g29770 (?)	tasiR850 (TAS1c) tasiR255 (TAS1a,b,c) tasiR752 (TAS1a)	a. k. i eks.	32, 33
At5g18040 (?)	tasiR850 (TAS1c) tasiR255 (TAS1a,b,c) tasiR752 (TAS1a)	a. k. i eks.	31, 32

? – gen o nieznannej funkcji; a. k. – analiza komputerowa, eks. – eksperymentalnie; wg <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/> [67]

o długości 569 nt [34]. Niezwykle interesującą cechą obu transkryptów jest to, iż cząsteczki tasiRNA są kodowane w obrębie ich intronów. Dodatkowo zasugerowano związek pomiędzy produkcją tasiRNA, a enzymami zaangażowanymi w biogenezę i/lub funkcjonowanie miRNA [32,33].

ROLA miRNA W TWORZENIU tasiRNA

Analizując zidentyfikowane wcześniej miRNA Allen i wsp. stwierdzili, że miR173 i miR390 są komplementarne do pięciu transkryptów TAS [33]. Wykryto produkty cięcia transkryptów TAS1a, TAS1b, TAS1c i TAS2 w środku sekwencji komplementarnej do miR173 [33,34]. Zidentyfikowano także dwa produkty trawienia TAS3 RNA, z których jeden odpowiadał fragmentowi powstającemu w efekcie cięcia w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez miR390. W przypadku drugiego fragmentu zasugerowano, iż powstaje on na skutek trawienia zachodzącego z udziałem hipotetycznej cząsteczki 5'D2(-) [33] (Ryc. 1).



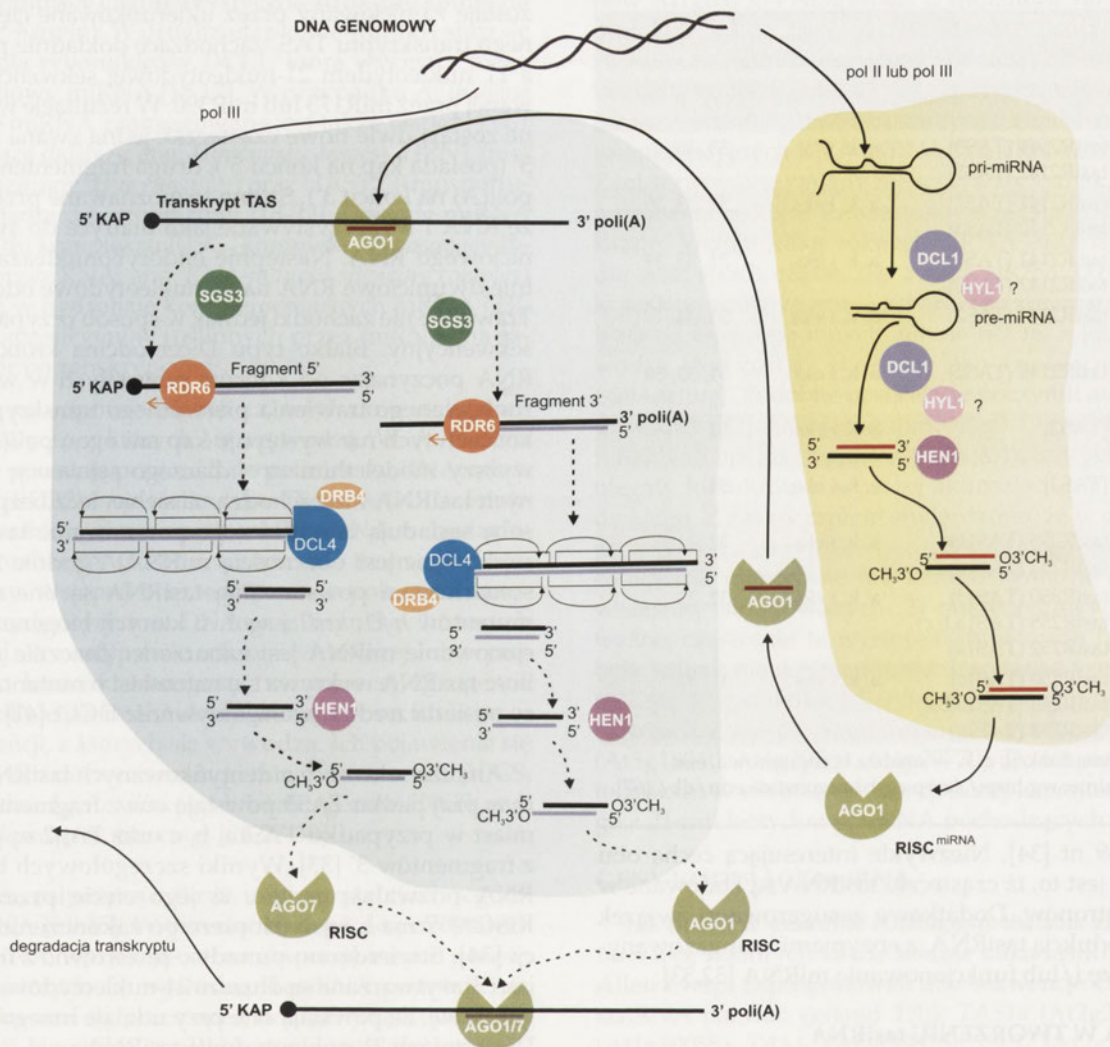
Rycina 1. Przykładowy odcinek dwuniciowego RNA, z którego generowane są tasiRNA. Pierwotny transkrypt TAS3 podlega cięciu w środku sekwencji rozpoznawanej przez miR390 (kursywa, podkreślenie). Powstały fragment 5' służy jako matryca do syntezy dwuniciowego RNA przez polimerazę RNA zależną od RNA (RDR6). Następnie endorybonukleaza typu Dicer (DCL4) generuje 21-nukleotydy tasiRNA. Klamry obejmują sekwencje dwuniciowych tasiRNA. Nad klamrami umieszczone są nazwy tasiRNA [wg 67]. Sekwencja tasiRNA1778 i fragment rozpoznawany przez miR390 są wyróżnione kursywą i podkreśleniem.

Obecnie uważa się, iż proces tworzenia tasiRNA (Ryc. 2) zostaje zainicjowany przez ukierunkowane cięcie pierwotnego transkryptu TAS, zachodzące dokładnie pomiędzy 10 a 11 nukleotydem 21-nukleotydu sekwencji rozpoznawanej przez miR173 lub miR390. W rezultacie wygenerowane zostają dwie nowe cząsteczki: jedna zwana fragmentem 5' (posiada kap na końcu 5'), druga fragmentem 3' (posiada poli(A) na końcu 3'). Są one rozpoznawane przez polimerazę RNA i wykorzystywane jako matryce do syntezy dwuniciowego RNA. Następnie endorybonukleaza typu Dicer tnie dwuniciowe RNA na 21-nukleotydy odcinki [33,34]. Trawienie nie zachodzi jednak w sposób przypadkowy, lecz sekwencyjny. Białko typu Dicer odcina krótkie dupлекsy RNA poczynając od końców powstałych w wyniku ukierunkowanego trawienia pierwotnego transkryptu TAS (na końcach tych nie występuje kap ani ogon poli(A)) [40]. Powyższy model tłumaczy, dlaczego sekwencje poszczególnych tasiRNA nie zachodzą na siebie, lecz bezpośrednio ze sobą sąsiadują oraz dlaczego powstawanie tasiRNA warunkowane jest obecnością miRNA. Zgodnie z przyjętym scenariuszem powstawania tasiRNA są one nieobecne u mutantów *hyl1*, *hen1* i *ago1*, w których biogeneza lub funkcjonowanie miRNA jest zaburzone. Znacznie zmniejszoną ilość tasiRNA wykrywa się natomiast u mutantu *dcl1-7*, który posiada zredukowaną aktywność DCL1 [41].

Analiza sekwencji zidentyfikowanych tasiRNA ujawniła, iż w przypadku TAS3 powstają one z fragmentów 5', natomiast w przypadku TAS1a, b, c oraz TAS2 są generowane z fragmentów 3' [33]. Wyniki szczegółowych badań TAS2 RNA pozwalają sądzić, iż jego cięcie przez kompleks RISC^{miR173} ma miejsce dopiero po zakończeniu transkrypcji [34]. Stwierdzono ponadto, że zarówno z fragmentu 5', jak i 3' wytwarzane są dłuższe 24-nukleotydy siRNA. Sugeruje się, że powstają one przy udziale innego białka typu Dicer aniżeli 21-nukleotydy tasiRNA.

UDZIAŁ BIAŁEK RDR6, SGS3 I DCL4 W TWORZENIU tasiRNA

Białko RDR6 jest jedną z sześciu polimeraz RNA zależnych od RNA występujących w *A. thaliana*. Z dostępnych obecnie danych wynika, że kodujący ją gen *rdr6* ulega konstytutywnej ekspresji [27,29]. Znacznie słabiej poznane jest białko SGS3. Posiada ono domenę zwaną palcem cynkowym i stąd przypuszcza się, że SGS3 jest zdolne do wiązania RNA [42]. Białko DCL4 jest jedną z czterech endorybo-



Rycina 2. Biogeneza tasiRNA (jasnoniebieskie tło) i miRNA (jasnozielone tło) – szczegółowy opis obu procesów przedstawiony został w tekście.

nukleaz typu Dicer obecnych u *Arabidopsis* [2,43]. Wykazano, że białka RDR6 i SGS3 biorą udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów indukowanym obecnością obcych sekwencji (np. transgenów) wprowadzonych do genomu w orientacji sens lub pojawieniem się wirusa DNA. Nie biorą one natomiast udziału w wyciszaniu indukowanym przez: (i) transgeny o charakterze odwróconych powtórzeń, (ii) wirusy RNA oraz (iii) sekwencje powtórzeniowe będące źródłem rasiRNA [25,27,29,30,44]. TasiRNA nie zostały wykryte w mutantach *rdr6* i *sgs3* co sugeruje, iż białka RDR6 i SGS3 odgrywają zasadniczą rolę w biogenezie tych krótkich regulatorowych RNA [31-34]. Prawdopodobną funkcją SGS3 jest stabilizacja fragmentów 3' i 5' powstałych w wyniku ukierunkowanego cięcia transkryptów TAS. Produkty trawienia TAS2 RNA nie są bowiem obecne lub ich ilość jest znacznie zredukowana w mutancie *sgs3*. Przeciwny efekt, tj. podwyższoną akumulację fragmentów 3' i 5' powstałych w wyniku cięcia TAS2, obserwowano u mutantu *rdr6* [34]. Wydaje się zatem, że fragmenty TAS stanowią odpowiednią matrycę dla RDR6, która przekształca je w dsRNA, będący substratem dla endonukleazy typu Dicer [33,34]. Jak dotąd nie wiadomo jednak w jaki sposób roślinna polimeraza RNA rozpoznaje cząsteczki matrycowe. Zaproponowano

dwa mechanizmy ich selekcji [45,46]. Pierwszy zakłada, że dostarczenie polimerazy do końca 3' cząsteczki RNA zachodzi dzięki specyficznym oddziaływaniom RDR6 z kompleksem RISC^{miRNA}. Drugi przyjmuje, że polimeraza preferencyjnie wiąże uszkodzone mRNA, tj. cząsteczki pozbawione kapu lub ogona poli(A). Niezależnie jednak od sposobu, w jaki RDR6 rozpoznaje matrycę, uważa się, że to właśnie ona jest odpowiedzialna za dobudowanie komplementarnej nici RNA do fragmentów 3' i 5'.

Funkcjonalne tasiRNA są uwalniane z dwuniciowych prekursorów RNA przez DCL4. Białko to odcina sekwencyjnie 21-nukleotydom dwuniciowe tasiRNA, poczynając od końców powstałych w wyniku ukierunkowanego trawienia TAS RNA [34,47,48]. Cząsteczki tasiRNA pochodzące z nici komplementarnej są przesunięte o 2 nukleotydy względem tasiRNA z tzw. nici kodującej [32,33,34]. DCL4 działa zatem analogicznie jak pozostałe, wcześniej poznane i scharakteryzowane enzymy typu Dicer [40]. Dwuniciowe tasiRNA włączane są do kompleksu RISC, następnie jedna z nici jest usuwana zgodnie z tzw. zasadą asymetryczności [49-51]. Mówi ona, że w kompleksie RISC pozostaje ta nić dupletu, której koniec 5' tworzy termodynamicznie mniej stabilne

pary zasad. Druga nić (często oznaczana jako siRNA* lub miRNA*) jest natomiast cięta, przez co łatwiej dochodzi do jej uwolnienia [52,53].

Pomimo, że u mutantu *dcl4* nie stwierdzono obecności 21-nukleotydocy tasiRNA, wykryto u niego 22- i 24-nukleotydocy RNA pochodzące z transkryptów TAS [34,47,48]. Sugeruje się, że w tworzeniu 22-nukleotydocy RNA uczestniczy DCL2, natomiast 24-nukleotydocy RNA powstają przy udziale DCL3 [48]. Na podstawie badań transkryptu TAS2 zaproponowano ponadto, że 24-nukleotydocy RNA mogą powstawać z TAS2 RNA nawet także i wówczas, gdy nie doszło do jego ukierunkowanego cięcia, w którym uczestniczy miR173 [34]. Osobnym zagadnieniem jest czy 22- i 24-nukleotydocy fragmenty są zdolne do pełnienia funkcji analogicznej do 21-nukleotydocy tasiRNA. W tym przypadku najistotniejszą wydaje się być komplementarność 22- i 24-nukleotydocy RNA do docelowych transkryptów.

tasiRNA FUNKCJONUJĄ PODOBNIEM JAK miRNA

Cząsteczki miRNA działają jako negatywne regulatory ekspresji genów, szczególnie tych, których produkty pełnią różnorakie funkcje w procesach rozwojowych, a także odpowiedzi na stres [1,13,15,54,55]. W przeciwieństwie do zwierzęcych, roślinne miRNA są niemal w pełni komplementarne do docelowych transkryptów i indukują ich cięcie w środku rozpoznawanej sekwencji [1,56]. U *A. thaliana* proces ten katalizowany jest przez białko AGO1 będące zasadniczym elementem kompleksu RISC [23,57]. Ostatnio dowiedziano jednak, że analogiczną funkcję może także pełnić AGO7 [58,59]. Uważa się, że cząsteczki tasiRNA działają w podobny sposób jak miRNA, biorąc udział w ukierunkowanym cięciu mRNA. TasiRNA pochodzące z TAS3 wykazują niemal pełną komplementarność do transkryptów ARF1, ARF2, ARF3 (określanych również jako ETTIN lub ETT) i ARF4 i są odpowiedzialne za ich degradację [33,39]. Wykazano, że transkrypty ARF2, ARF3 i ARF4 są cięte za 10-tym nukleotydem licząc od końca 3' tasiRNA, czyli w charakterystycznym dla miRNA i siRNA miejscu [33,56]. Wykryto ponadto produkty trawienia tych mRNA w innych pozycjach w obrębie, a także blisko sekwencji rozpoznawanych przez odpowiednie tasiRNA [39]. TasiRNA wywodzące się z TAS2 wpływają na poziom ekspresji genów kodujących białka z rodziny PPR [34]. U *A. thaliana* stwierdzono występowanie aż 441 tego typu genów. Część białek PPR jest odpowiedzialna za potranskrypcyjną obróbkę RNA w organellach [60,61]. Funkcja pozostałych genów regulowanych przy współudziale tasiRNA nie została jak dotąd poznana (Tabela 1).

Pełnienie zarówno przez miRNA, jak i tasiRNA roli negatywnych regulatorów ekspresji genów nasuwa pytanie o powód ich współistnienia w roślinie. Jest prawdopodobne, że mechanizmy działania miRNA i tasiRNA różnią się między sobą. Ostatnio wykazano, że wspomniane wcześniej białko HEN1 posiada zdolność metylacji 3'-końcowych grup hydroksylowych w siRNA i miRNA [20,21,62]. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* sugerują jednak, że siRNA są metylowane z mniejszą wydajnością od miRNA. Najprawdopodobniej, zarówno w przypadku miRNA, jak i

siRNA, metylacji poddawana jest głównie grupa 2'-OH [21]. Wcześniej zaproponowano, że siRNA służą jako startery dla polimerazy RNA zależnej od RNA [63,64]. Obecność grupy metylowej na końcu 3' siRNA lub miRNA może wpływać na zdolność polimerazy do ich wydłużania, tym samym zaś na produkcję tzw. drugorzędowych siRNA (ang. *secondary siRNAs*) [21,64].

tasiRNA SĄ GRUPĄ NIEJEDNORODNĄ

Pomimo wyodrębnienia tasiRNA spośród innych krótkich regulatorowych RNA, nie jest do końca przesądzone, czy cząsteczki te stanowią całkowicie jednorodną grupę. Stwierdzono bowiem, że TAS3 różni się od pozostałych genów TAS. Podobnie tasiRNA powstałe w oparciu o TAS3 różnią się sposobem działania od pozostałych tasiRNA. Dwie 21-nukleotydocy sekwencje oraz miejsce rozpoznawane przez miR390 w transkrypcie TAS3 są silnie konserwowane ewolucyjnie u roślin jedno- i dwuliściennych. Dodatkowo wysoka zachowawczość genów ARF w przebadanych roślinach wskazuje, że mechanizm ich regulacji przy udziale tasiRNA rozwinął się jeszcze przed oddzieleniem linii ewolucyjnych jedno- i dwuliściennych [33,39]. Tymczasem geny *MIR173*, *TAS1a*, *b*, *c* oraz *TAS2* nie są konserwowane ewolucyjnie i rozwinęły się prawdopodobnie „całkiem niedawno” [33]. Różny jest także sposób, w jaki DCL4 generuje tasiRNA z TAS3 i pozostałych transkryptów. W przypadku TAS3 powstają one z fragmentu 5', a w przypadku *TAS1a*, *b*, *c* i *TAS2* z fragmentu 3'. Nie bez znaczenia wydaje się także fakt, że w ukierunkowanym cięciu pierwotnych transkryptów *TAS1a*, *b*, *c* i *TAS2* uczestniczy ta sama cząsteczka miRNA- miR173. Co więcej, zarówno transkrypt *TAS1a*, jak i *TAS2* koduje sekwencje tasiRNA w obrębie centralnie usytuowanego intronu [32,34]. W obrębie intronu dochodzi też do ukierunkowanego cięcia *TAS1a* i *TAS2* RNA, a więc niezgodnie z zasadą, w myśl której miRNA uczestniczą jedynie w trawieniu sekwencji kodujących lub niekodujących końców 3' [1,56].

W przypadku transkryptu TAS3 zaproponowano, że jego działanie oparte jest o tzw. mechanizm sprzężenia zwrotnego [33]. TAS3 jest cięty w dwóch miejscach: pierwsze znajduje się w środku sekwencji rozpoznawanej przez miR390, drugie, przesunięte o 33 nukleotydy w kierunku 5', wykazuje komplementarność do hipotetycznej cząsteczki regulatorowej zwanej 5'D2(-). Wydaje się, że cząsteczka 5'D2(-) powstaje z TAS3 (zgodnie z opisanym powyżej modelem tworzenia tasiRNA, patrz Ryc. 1), a następnie uczestniczy w jego cięciu. Zgromadzone dotąd dane pozwalają przypuszczać, iż istnieją dwie przyczyny, dla których TAS3 jest cięty przy udziale 5'D2(-): (i) regulacja funkcji TAS3 poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego, (ii) uzyskanie dodatkowych tasiRNA, np. tasiR1778, który został zidentyfikowany u roślin typu dzikiego. Niewykluczone, że oba powyższe założenia są prawdziwe. Regulację poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego zaproponowano także dla transkryptów DCL1 i AGO1 znajdujących się pod kontrolą odpowiednio miR162 i miR168 [57,65]. Białka DCL1 i AGO1 odgrywają kluczową rolę w biogenezie (DCL1) i działaniu (AGO1) miRNA, tym samym ich regulacja poprzez miR162 i miR168 ma wpływ na powstawanie i funkcjonowanie wszystkich innych tego typu cząsteczek. Kontrola funkcji

TAS3 przez 5'D2(-) miałyby jednak bardziej subtelny charakter, ograniczony tylko do TAS3 i pochodzących z niego tasiRNA. Niezwykle ciekawe spostrzeżenia dotyczące funkcjonowania tasiRNA zostały ostatnio poczynione przez zespoły Vauchereta oraz Carringtona [58,59]. Sugerują oni, iż krótkie RNA pochodzące z TAS3 różnią się od pozostałych tasiRNA, gdyż wchodzi w kompleks z białkiem AGO7, a nie jak wcześniej sądzono AGO1. Co więcej, wykazano, że AGO7, podobnie jak AGO1, jest zdolne do katalitycznego cięcia mRNA tworzącego dupleks z tasiRNA.

PODSUMOWANIE

Niewiele czasu upłynęło od momentu odkrycia cząstek tasiRNA do chwili, gdy zaproponowany został schemat ich biogenezy. Najbardziej zaskakującym jego elementem jest rola jaką przypisano mikro RNA. Szczegółowa analiza uzyskanych danych nasuwa jednak wiele pytań dotyczących zarówno biogenezy, jak i funkcjonowania tasiRNA m. in: (i) dlaczego tasiRNA wchodzi w kompleks z AGO7 (ZIP), a nie tylko z AGO1; (ii) w jaki sposób przecięty transkrypt TAS jest rozpoznawany przez RDR; (iii) czy tasiRNA służą jako startery dla polimerazy RNA zależnej od RNA? Rozwiązanie powyższych problemów może przynieść odpowiedź na najbardziej fundamentalne pytanie dotyczące pochodzenia tasiRNA. Jak dotąd niewiadomo bowiem dlaczego cząsteczki te wyewoluowały w roślinie skoro rolę negatywnych regulatorów ekspresji genów pełnią powstałe wcześniej miRNA [66]? Jest niemal pewne, że już wkrótce poznamy szereg nowych fascynujących faktów pozwalających lepiej zrozumieć zjawiska związane z funkcjonowaniem tasiRNA.

PIŚMIENNICTWO

- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363
- Bąk D (2003) RNAi- interferencja RNA – skuteczny sposób na ciszę. *Postepy Biochem* 49: 136-146
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349
- Król J, Kaczyńska D, Krzyżosiak WJ (2003) Mikro RNA- nowi członkowie rodziny niekodujących RNA. *Postepy Biochem* 49: 214-228
- Pacak A, Barciszewska-Pacak M (2003) Zależne od RNA potranskrypcyjne i transkrypcyjne wyciszenie genów u roślin. *Biotechnologia* 61: 67-83
- Szarzyńska B, Szweykowska-Kulińska Z, Jarmołowski A (2005) Mikrozarządzanie. *Biotechnologia* 70: 144-164
- Szweykowska-Kulińska Z, Jarmołowski A, Figlerowicz M (2003) RNAi, PTGS i *quelling*- trzy wariacje na jeden temat? *Biotechnologia* 61: 54-66
- Wienholds E, Plasterk R (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579: 5911-5922
- Tuschl T, Aravin A (2005) Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 579: 5830-5840
- Willmann MR, Poethig RS (2005) Time to grow up: the temporal role of smallRNAs in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8: 548-552
- Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev* 20: 759-771
- Herr AJ (2005) Pathways through the small RNA world of plants. *FEBS Lett* 579: 5879-5888
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge C, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy S, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G,

- Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279
- Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* 579: 5923-5931
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004) *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12753-12758
- Park W, Li J, Song R (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12: 1484-1495
- Vazquez F, Gascioli V, Crete P, Vaucheret H (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14: 346-351
- Hiraguri A, Itoh R, Kondo N, Nomura Y, Aizawa D, Murai Y, Koizumi H, Seki M, Shinozaki K, Fukuhara T (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57: 173-188
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307: 932-935
- Yang Z, Ebright JW, Yu B, Chen X (2006) HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 34: 667-675
- Park M, Wu G, Gonzales-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3691-3696
- Baumberger N, Baulcombe DC (2005) *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11928-11933
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21: 4671-4679
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: 642-652
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716-719
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553
- Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-659
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542
- Muangsan N, Beclin C, Vaucheret H, Robertson D (2004) Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant J* 38: 1004-1014
- Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HW, Poethig RS (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of *trans-acting* siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18: 2368-2379
- Vasquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory A, Hilbert JL, Bartel DP, Crete P (2004) Endogenous *trans-acting* siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* miRNAs. *Mol Cell* 16: 69-79
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005) MicroRNA-directed phasing during *trans-acting* siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221

34. Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS (2005) A pathway for the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 19: 2164-2175
35. Vaucheret H (2005) MicroRNA-dependent *trans*-acting siRNA production. *Sci STKE* 300: pe43
36. Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605-1619
37. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520
38. Hunter C, Sun H, Poethig RS (2003) The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an *ARGONAUTE* family member. *Curr Biol* 13: 1734-1739
39. Williams L, Carles CC, Osmont KS, Fletcher JC (2005) A database analysis method identifies an endogenous *trans*-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9703-9708
40. Hammond SM (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579: 5822-5829
41. Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002) Dicer-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci* 7: 487-491
42. Bateman A (2002) The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC Bioinformatics* 3: 21
43. Qi Y, Hannon G (2005) Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. *FEBS Lett* 579: 5899-5903
44. Beclin C, Boutet S, Waterhouse P, Vaucheret H (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol* 12: 684-688
45. Hutvagner G, Zamore PD (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12: 225-232
46. Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R (2004) A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306: 1046-1048
47. Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing *trans*-Acting siRNAs. *Curr Biol* 15: 1494-1500
48. Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC (2005) DICER-LIKE 4 functions in *trans*-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12984-12989
49. Hutvagner G (2005) Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett* 579: 5850-5857
50. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208
51. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216
52. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123: 607-620
53. Rand T, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123: 621-629
54. Bartel B, Bartel DP (2004) MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* 132: 709-717
55. Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-799
56. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297: 2053-2056
57. Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18: 1187-1197
58. Adenot X, Elmayan T, Laussergues D, Boutet S, bouche N, Gascioli V, Vaucheret H (2006) DRB4-dependent *TAS3 trans*-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* 16: 927-932
59. Fahlgren N, Montgomery T, Howell M, Allen E, Dvorak S, Alexander A, Carrington JC (2006) regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3 ta*-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 16: 939-944
60. Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharmy A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103
61. Raczynska KD, Augustyniak H (2005) Białka PPR wiążące kwasy nukleinowe. *Postepy Biochem* 51: 440-446
62. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 1501-1507
63. Lipardi C, Wei Q, Paterson BM (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307
64. Nishikura K (2001) A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 107: 415-418
65. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2003) Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol* 13: 784-789
66. Axtell MJ, Bartel DP (2005) Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* 17: 1658-1673
67. Gustafson AM, Allen E, Givan S, Smith D, Carrington JC, Kasschau KD (2005) ASRP: the *Arabidopsis* Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33: D637-640

Trans-acting short interfering RNAs

Zbigniew Warkocki¹, Marek Figlerowicz²✉

¹Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

²Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, 12/14 Noskowskiego St., 61-704 Poznań, Poland

✉e-mail: marekf@ibch.poznan.pl

Key words: tasiRNA, miRNA, *TAS* genes, regulation of gene expression

ABSTRACT

RNA is now considered a key factor in the regulation of gene expression. There are several classes of small regulatory RNAs in plants, functioning in posttranscriptional gene silencing (PTGS) or epigenetic DNA modification. *Trans*-acting short interfering RNAs (tasiRNAs) form a class of small regulatory RNAs which has been distinguished only recently. To date, five genes encoding tasiRNAs have been identified in *Arabidopsis thaliana*. TasiRNAs derive from non-coding RNA precursors which are initially targeted for cleavage by a miRNA. Cleavage products are then converted into dsRNAs by a RNA dependent RNA polymerase and sequentially cleaved into 21-nt tasiRNAs. Like the majority of plant miRNAs, tasiRNAs regulate gene expression at the posttranscriptional level, guiding cleavage of ARF and PPR transcripts. Here, we briefly present tasiRNAs and speculate whether they form a homogeneous class of siRNAs.

Adam Szpechciński[✉]

Alina Grzanka

UMK, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz

✉UMK, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: adam_szpechcinski@cm.umk.pl, tel.: (052) 585 37 25

Artykuł otrzymano 26 października 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 6 marca 2006 r.

Słowa kluczowe: aptamery, chemia kombinatoryczna, selekcja *in vitro*, SELEX, rozpoznanie molekularne, diagnostyka kliniczna

Wykaz stosowanych skrótów: cDNA (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA; DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy; dsDNA (ang. *double stranded DNA*) – dwuniciowy DNA; ELISA (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny; FITC (ang. *fluorescein isothiocyanate*) – izotiocyanian fluoresceiny; FMN – mononukleotyd flawinowy; HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) – wirus nabytego niedoboru odporności; HNE (ang. *human neutrophil elastase*) – elastaza neutrofilowa człowieka; hTSH (ang. *human thyroid stimulating hormone*) – hormon uwalniający tyreotropinę u człowieka; PAGE (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym; PBMCs (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy; RT-PCR (ang. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy sprzężona z odwrotną transkrypcją; RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*) – receptorowa kinaza tyrozynowa; ssDNA (ang. *single stranded DNA*) – jednociowy DNA; TNF α (ang. *tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworów alfa; TTF (ang. *thyroid transcription factor*) – tarczycowy czynnik transkrypcyjny; VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

STRESZCZENIE

Aptamery to jednociowe oligonukleotydy DNA lub RNA, selekcjonowane *in vitro* z kombinatorycznych bibliotek w procesie zwanym SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). Pełnią one funkcje syntetycznych, nukleinowych ligandów zdolnych rozpoznawać specyficznie i wiązać z wysokim powinowactwem organiczne lub nieorganiczne cząsteczki docelowe. Aptamery potrafią rozpoznawać nawet bardzo podobne strukturalnie molekuly. Podlegają również łatwo chemicznym modyfikacjom, jak znakowanie radioaktywnymi izotopami, konjugowanie z barwnikami fluorescencyjnymi i enzymami czy poprawianie biostabilności. Ze względu na swoje właściwości aptamery mogą konkurować z przeciwciałami o miano uniwersalnych receptorów i być wykorzystywane jako narzędzie rozpoznania molekularnego w metodach diagnostycznych. Do tej pory opisano szereg zastosowań aptamerów w detekcji różnego rodzaju nisko- lub wysokocząsteczkowych molekuł za pomocą cytometrii przepływowej, metod immunochemicznych oraz technik diagnostyki obrazowej.

WPROWADZENIE

Aptamery definiuje się jako kilkunasto- lub kilkudziesięcionukleotydowe sekwencje RNA lub DNA, charakteryzujące się wysokim powinowactwem i specyficznością wiązania ze ściśle określoną cząsteczką docelową [1]. Nazwa ich wywodzi się od łacińskiego słowa „*aptus*” – co oznacza dost. „dopasowany, przyczepiony”. Zawdzięczają ją niezwykle dopasowaniu struktury przestrzennej do budowy cząsteczki docelowej, osiąganemu w drodze kombinatorycznego procesu syntezy i cyklicznej selekcji *in vitro* [2]. Aptamery pełnią rolę ligandów wiążących inne molekuly. Mogą one wiązać małe cząsteczki chemiczne, m.in. jony metali, barwniki organiczne, aminokwasy, witaminy, antybiotyki, nukleotydy, lipidy, czy peptydy. Dołączają się również do dużych molekuł, jak białka, wśród których są enzymy, czynniki wzrostu, białka regulatorowe, przeciwciała, a także czynniki adhezyjne komórek i lektyny [3,4]. Lista cząsteczek, dla których wyróżniono swoiste dla nich aptamery, wydłuża się sukcesywnie z roku na rok.

W ciągu 15 lat rozwoju technologii aptamery okazały się wygodnym narzędziem badawczym w dziedzinach proteomiki i genomiki, uzupełniając metody konwencjonalne. Swoistość rozpoznawania różnych klas molekuł stawia aptamery co najmniej na równi ze stosowanymi w diagnostyce przeciwciałami monoklonalnymi [3]. Jednak unikalne własności fizykochemiczne i ogromne możliwości modyfikacji ligandów nukleinowych, skłaniają do poszukiwań i rozwoju nowych technik diagnostycznych, zwłaszcza wobec substancji dotąd niewykrywalnych metodami z użyciem przeciwciała. Duże nadzieje wiąże się również z wykorzystywaniem aptamerów w celach terapeutycznych. Aptamery mogłyby odgrywać rolę leku lub być nośnikami czynników terapeutycznych, rozróżniającymi komórki zmienione chorobowo od zdrowych [5]. Wiążąc się specyficznie z danym czynnikiem patologicznym w warunkach fizjologicznych, aptamery potrafią skutecznie blokować jego działanie [6].

Celem niniejszej pracy przeglądowej jest charakterystyka właściwości aptamerów pod kątem ich użyteczności w diagnostyce klinicznej. W pracy przedstawiono podstawowe informacje dotyczące produkcji, struktury, modyfikacji i mechanizmów działania nukleinowych ligandów. W dalszej części artykułu dokonano przeglądu literatury naukowej z ostatnich lat, prezentującej wyniki badań nad wykorzystaniem aptamerów w powszechnie stosowanych metodach diagnostyki klinicznej. Oprócz prac oryginalnych, przytoczono szereg interesujących artykułów poglądowych, których lektura umożliwi czytelnikowi poszerzenie zakresu wiadomości zawartych w obecnej publikacji.

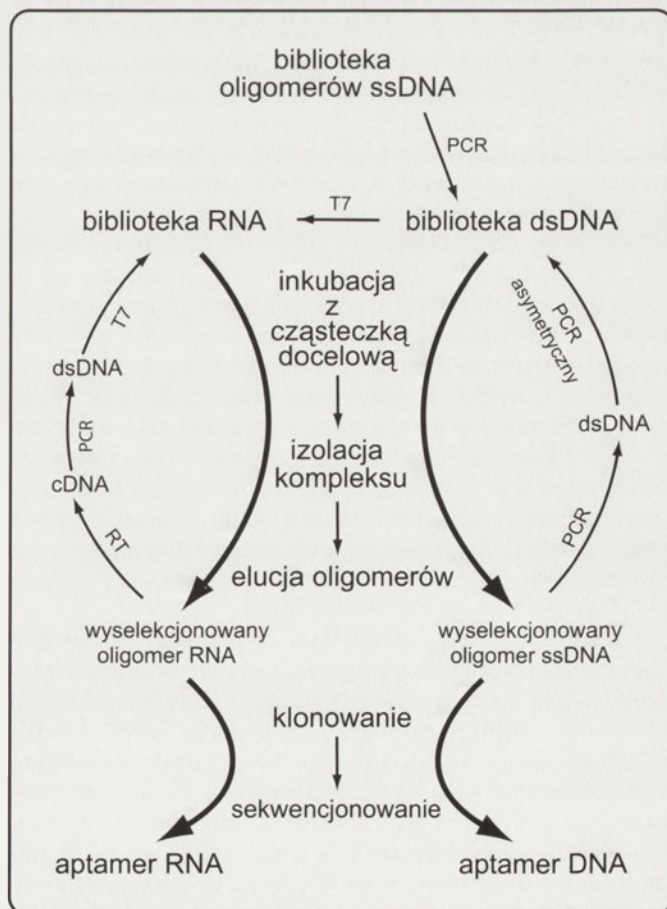
SELEX

W 1990 roku Tuerk i Gold oraz Ellington i Szostak [7,8] równocześnie przedstawili metodę generowania *in vitro* oligorybonukleotydowych ligandów zdolnych do specyficznego wiązania się do wybranych nisko- bądź wysoko-cząsteczkowych biomolekuł. Proces ten określany jest w literaturze jako „selekcja *in vitro*” lub SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). Polega on na identyfikacji i wybiórczej amplifikacji cząsteczek o pożądanym właściwościach spośród bardzo licznej puli krótkich losowych sekwencji DNA, naśladując w ten sposób mechanizmy naturalnej ewolucji, tzn. zmienność, selekcję i replikację [7]. Dwa lata później tą samą metodą otrzymano również ligandy o strukturze DNA [9].

W pierwszym etapie SELEXu, drogą syntezy chemicznej, tworzy się tzw. kombinatoryczną bibliotekę jednoniciowych oligomerów DNA. Jest to zbiór (zazwyczaj 10^{14} – 10^{15}) wszystkich możliwych do zsyntetyzowania oligodeoksyrybonukleotydów o określonej długości n [10]. Każdy taki oligonukleotyd zawiera fragment środkowy – o przypadkowej sekwencji nukleotydów (ang. *random sequence*) – oflankowany na końcach 5' i 3' sekwencjami stałymi oraz zawiera region promotorowy dla polimerazy RNA na końcu 5'. Proporcje dodawanych do mieszaniny reakcyjnej monomerów A, T, G i C dobierane są w taki sposób, aby prawdopodobieństwo wystąpienia każdego z nich w danej pozycji sekwencji losowej było podobne [3].

Aptamery selekcjonuje się zarówno z puli oligonukleotydów DNA jak i RNA. W przypadku drugim, zsyntetyzowana chemicznie biblioteka jednoniciowych DNA jest najpierw amplifikowana metodą PCR (startery przyłączają się do sekwencji stałych), a następnie transkrybowana enzymatycznie w analogiczną bibliotekę RNA. Najczęściej wykorzystuje się tu polimerazę RNA T7, rozpoznającą sekwencję promotorową na końcu 5' każdego oligomeru DNA [11]. Podczas selekcji, całą pulę zróżnicowanych oligonukleotydów (DNA lub RNA) inkubuje się z interesującą nas cząsteczką docelową w ściśle ustalonych warunkach pH, temperatury i składu buforu. Wybrane białko zazwyczaj immobilizuje się na błonie nitrocelulozowej, a wiązanie się frakcji swoistych do niego oligonukleotydów następuje podczas filtracji mieszaniny przypadkowych sekwencji przez pory [7]. Frakcję cząsteczek nukleinowych niezwiązanych z matrycą nitrocelulozową można łatwo usunąć poprzez płukanie filtru. Opisano szereg alternatywnych metod rozdziału aptamerów, w zależności od natury biomolekuły wiązanej przez aptamer. Wykorzystuje się kolumnową chromatografię powinowactwa [12], immunoprecypitację [13], elektroforezę w żelu poliakryloamidowym (PAGE) [14], kuleczki magnetyczne [15] oraz elektroforezę kapilarną [16]. Ekspozycja „pustego” nośnika (bez immobilizowanej substancji docelowej) na działanie aptamerów może stanowić dodatkową selekcję negatywną, eliminującą sekwencje wiążące się niespecyficznie z samym nośnikiem [4]. Populację aptamerów wykazującą powinowactwo do cząsteczki docelowej amplifikuje się metodą PCR (biblioteka DNA) lub PCR sprzężoną z reakcją odwrotnej transkrypcji (biblioteka RNA) w celu uzyskania dwuniciowego DNA, które posłuży jako matryca do syntezy zawężonej puli oligonukleotydów.

Podczas kolejnych cykli selekcji, w których stopniowo zaostrza się warunki reakcji, powtarza się opisaną wyżej procedurę a stosunek sekwencji aktywnych, tj. wiążących cząsteczkę docelową, do nieaktywnych w mieszaninie sukcesywnie wzrasta [3]. Ważnym jest, aby podczas każdego cyklu istniał wyraźny (10–1000-krotny), ilościowy nadmiar ligandu względem cząsteczki docelowej. Zapewnia to aktywną konkurencję aptamerów o specyficzne miejsca wiązania i przez to uskutecznia selekcję [7]. Po zakończeniu kilku kolejnych cykli sprawdza się powinowactwo otrzymanych aktywnych aptamerów do cząsteczki docelowej, np. metodą radiograficzną (znakowanie nukleotydów izotopem ^{32}P) [14] lub enzymatyczną (reakcja peroksydazy). Ponadto określa się siłę oddziaływania między aptamerem i cząsteczką docelową, wyznaczając stałą dysocjacji K_d powstałego kompleksu [15]. Po kilku lub kilkunastu cyklach osiąga się stan, w którym populacja oligonukleotydów składa się w większej części z sekwencji najlepiej wiążących cząsteczkę docelową. Następnie aptamery klonuje się w komórkach bakteryjnych i selekcjonuje, aby poznać unikalną strukturę każdego z nich. Gdy sekwencja aptameru jest znana, jego dalsza produkcja odbywa się na drodze syntezy chemicznej [3]. Częstym zabiegiem, zwiększającym wydajność syntezy, jest skrócenie pierwszorzędowej struktury aptamerów, poprzez usunięcie z nich sekwencji stałych – o ile te nie biorą udziału w tworzeniu konformacji przestrzennej aptameru i wiązaniu cząsteczki docelowej [17] Ryc. 1.



Rycina 1. Schemat przedstawiający alternatywne etapy selekcji *in vitro* aptamerów o strukturze RNA i DNA. T7 oznacza proces transkrypcji z udziałem polimerazy T7, RT oznacza proces odwrotnej transkrypcji.

Liczba cykli potrzebnych do identyfikacji aptamerów zależy przede wszystkim od właściwości cząstki docelowej oraz od doboru warunków reakcji dla każdego cyklu. W większości przypadków selekcja aptamerów odbywa się w 8–15 cyklach. Klasyczny proces SELEX wykonywany ręcznie, włączając klonowanie i sekwencjonowanie, trwa średnio od 2 do 3 miesięcy. Jednakże uzyskanie kilku nanomoli oczyszczonego aptameru o znanej sekwencji drogą syntezy chemicznej zabiera zaledwie kilka dni [3]. Pełna automatyzacja procesu pozwoliła znacznie skrócić czas selekcji *in vitro* i generować z dużą wydajnością aptamery o wysokiej czystości i powinowactwie do wybranej cząsteczki docelowej nawet w ciągu kilku dni [18,19]. Nowoczesne roboty pipetujące, odpowiednio zaprogramowane, zdolne są samodzielnie przeprowadzić kompletny proces SELEX, nie wymagając dodatkowych czynności manualnych. Zautomatyzowana, multipleksowa selekcja *in vitro*, prowadzona na wielu płytkach mikrotitracyjnych jednocześnie, poprawia wydajność i znacznie skraca czas generacji aptamerów [13].

ROZPOZNIANIE MOLEKULARNE

Aptamery wykazują niezwykle wysoką specyficzność rozpoznawania i wiązania cząsteczek docelowych. Ligandy wygenerowane w procesie zwanym „counter-SELEX” (identyfikacja i odrzucanie aptamerów wiążących molekuły podobne strukturalnie do właściwej cząsteczki docelowej) [20] mogą rozróżniać poszczególne izoformy danej cząsteczki, np. białka enzymatycznego [21], wiązać stereospecyficznie D- lub L-enancjomery [22], jak również identyfikować molekuły o bardzo subtelnych różnicach strukturalnych, np. z obecnością lub brakiem grupy metylowej [18] czy hydroksylowej [23,24]. Powinowactwo aptamerów do cząsteczek docelowych zawiera się w zakresie od mikromolarnych do niskich pikomolarnych wartości stałej K_d i jest porównywalne, a niekiedy wręcz lepsze, do przeciwciał monoklonalnych [20]. Właściwości te wynikają przede wszystkim z unikalnej sekwencji nukleotydów aptameru, a co za tym idzie, z konformacji przestrzennej oraz molekularnego mechanizmu wiązania cząsteczki docelowej [25]. Krystalograficzne i spektroskopowe badania struktury kompleksów aptamer-cząsteczka docelowa stwarzają możliwość wglądu w trójwymiarową architekturę kwasów nukleinowych. Wskazują także te elementy ich budowy, które odgrywają kluczową rolę w tzw. procesie rozpoznania molekularnego (ang. *molecular recognition*), stanowiącym podstawę metod analitycznych i diagnostycznych oraz działania leków w organizmie [26].

Kwasy nukleinowe zbudowane są z pojedynczego łańcucha nukleotydów, który fałdując się tworzy oprócz fragmentów helikalnych szereg drugo- i trzeciorzędowych motywów strukturalnych [27]. W procesie identyfikacji i wiązania cząsteczki docelowej przez aptamer uczestniczą określone elementy struktur obu molekuł. Zazwyczaj fragment wiążący, biorący bezpośredni udział w tworzeniu kompleksu aptamer-cząsteczka docelowa liczy 10–15 nukleotydów. Zauważono również, że przeciętna powierzchnia rozpoznawania aptamerów ma podobną wielkość do powierzchni rozpoznawania fragmentów Fab przeciwciał [28]. Selekcja *in vitro* ma na celu znalezienie takiej unikal-

nej sekwencji spośród biblioteki kombinatorycznej, której liniowy układ nukleotydów purynowych i pirymidynowych pozwoli utworzyć odpowiedni motyw strukturalny, dopasowany do budowy cząsteczki docelowej na zasadzie klucza i zamka.

Związki małowcząsteczkowe, m.in. ATP, FMN, teofilina, bądź aminokwasy z reguły inkorporują w dwuniciowe struktury szpilkowe (ang. *hairpins*) aptamerów RNA, wykorzystując takie motywy strukturalne, jak wybrzuszenia jednostronne (ang. *bulges*) i dwustronne (ang. *internal loops*), pseudowęzły (ang. *pseudoknots*) oraz oddziaływania zasad innych niż Watsona-Cricka (ang. *mismatches*). W przypadku bardzo dużych biomolekuł, peptydów i białek, to aptamery muszą wpasować się swoją strukturą w złożoną budowę przestrzenną cząsteczki docelowej za pomocą różnego rodzaju oddziaływań chemicznych. Interesującym zjawiskiem jest też tworzenie kompleksów między aptamerami i aminoglikozydami, np. tobramycyną lub neomycyną, gdzie, oprócz komplementarności strukturalnej, motywów wiążących i wiązań chemicznych, znaczącą rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationowymi grupami amoniowymi antybiotyków a ujemnie naładowanym RNA [26,29,30].

Pośród DNA-aptamerów niezwykle, pod względem strukturalnym, są ligandy wiążące się z trombiną [31] i integrzą HIV-1 [32], których sekwencje bogate są w reszty guaninowe. Mogą one przybierać konformację czteroniciowych, prawoskrętnych helis (tetrapleksów), zbudowanych z powtarzających się czterech reszt guaninowych leżących w jednej płaszczyźnie, tzw. kwartetów guaninowych. Każda z tych guanin jest zarówno donorem jak i akceptorem wiązań wodorowych Hoogsteena [33].

W tworzeniu i stabilizacji struktur przestrzennych aptamerów biorą udział różne rodzaje oddziaływań chemicznych. Najbardziej typowymi są wiązania wodorowe Watsona-Cricka, które powstają między komplementarnymi zasadami A i T (U) oraz G i C. Determinują one przede wszystkim trwałość dupleksów w strukturach RNA i DNA [30]. Różnorodność topologii przestrzennych i motywów strukturalnych oraz trwałość kompleksów z cząsteczkami docelowymi aptamery zawdzięczają głównie nietypowym wiązaniom wodorowym (odwrócone wiązania Watsona-Cricka, wiązania Hoogsteena i odwrócone Hoogsteena), a także oddziaływaniami elektrostatycznym i oddziaływaniami warstwowym (ang. *stacking interactions*) [26].

Aptamery selekcjonuje się z puli oligonukleotydów RNA lub DNA. Jednak, jak można się spodziewać, aptamery deoksyrybonukleinowe z reguły nie funkcjonują po przekształceniu ich sekwencji w RNA i odwrotnie – aptamery rybonukleinowe przetranskrybowane w DNA również nie są aktywne [11]. Ponadto, kwasy rybonukleinowe tworzą bardziej złożone struktury drugorzędowe niż DNA [30]. Dzieje się tak między innymi za sprawą grup 2'-OH ryboz, które mogą brać udział w tworzeniu wiązań wodorowych nawet między niekomplementarnymi odcinkami tej samej nici RNA oraz uczestniczyć w tworzeniu kompleksu aptamer-cząsteczka docelowa. Brak tych grup w DNA sprzyja z kolei tworzeniu i stabilizacji jego struktury helikalnej [11].

Poza tym, większość wygenerowanych *in vitro* aptamerów RNA przyjmuje przestrzenną konformację dopiero po związaniu się z cząsteczką docelową, natomiast drugorzędowe struktury aptamerów DNA są stabilne [34].

APTAMERY JAKO CZĄSTECZKI DETEKCYJNE

Detekcja biomolekuł i ich analiza jakościowo-ilościowa stanowią podstawę zarówno badań molekularnych jak i praktyki klinicznej. Postęp w medycynie wymusza, a jednocześnie zależy od wprowadzania nowych, dokładniejszych i tańszych metod diagnostycznych, bądź ulepszania obecnie stosowanych. Ligandy stosowane w diagnostyce do wykrywania i oznaczania określonych substancji powinny cechować się wysokim powinowactwem i specyficznością działania, trwałością w warunkach fizjologicznych i możliwością znakowania różnymi sposobami. Jak dotąd, wśród najpowszechniej wykorzystywanych cząsteczek, zdolnych do specyficznego rozpoznawania i wiązania danej biomolekuły, prymat wiodą przeciwciała.

APTAMERY KONTRA PRZECIWCIAŁA

Podstawy technologii otrzymywania przeciwciał monoklonalnych opracowali w połowie lat 70' ubiegłego wieku Kohler i Milstein [35], którzy w 1984 roku za swoje osiągnięcia w dziedzinie immunologii zostali uhonorowani nagrodą Nobla. Kilkanaście lat później chemia kombinatoryczna zaowocowała wynalezieniem nukleinowych aptamerów, w których upatruje się najpoważniejszych rywali dla przeciwciał wykorzystywanych w metodach diagnostycznych [3]. Przeciwciała monoklonalne udowodniły swoją użyteczność w procedurach wymagających rozpoznania molekularnego i pozyskały status „uniwersalnych receptorów”, wyprowadzonych przeciwko olbrzymiej ilości różnorodnych ligandów. Istnieją jednak pewne ograniczenia ich technologii, jak

również takie obszary diagnostyki, w których przeciwciała nie mogą podoleć stawianemu im zadaniu [36]. Wydaje się, że właśnie aptamery mogłyby je w tym zastąpić i wypełnić istniejące luki na polu metod diagnostycznych. Porównując przeciwciała z aptamerami pod kątem ich użyteczności jako „uniwersalnych receptorów”, można zauważyć, że te cechy przeciwciał, które limitują ich zastosowanie, stanowią główne zalety aptamerów i *vice versa* (Tab. 1).

ZNAKOWANIE APTAMERÓW

Wyzwaniem do pokonania przed zastosowaniem aptamerów w metodach diagnostycznych jest rozwinięcie takiego systemu znakowania (ang. *labeling system*) oligonukleotydowych ligandów, który nie uszkadzałby ich unikalnej struktury ani nie obniżał własności wiążących.

Aptamery można znakować radioaktywnie za pomocą modyfikowanych nukleotydów, zawierających np. atomy izotopów ^3H lub ^{32}P , włączanych w strukturę kwasu nukleinowego podczas replikacji *in vitro* [25]. Ten sposób znakowania oligonukleotydów jest często wykorzystywany w procedurze SELEX (monitoring kolejnych rund selekcji pod kątem udziału sekwencji wiążących cząsteczkę docelową w puli) [14], ale okazuje się również niezwykle przydatny w metodach diagnostyki obrazowej (ang. *in vivo imaging*) [39,40].

Aptamery można także konjugować z barwnikami fluorescencyjnymi, stosowanymi powszechnie do znakowania przeciwciał [41]. Podczas gdy znakowanie radioaktywne nie wpływa znacząco na funkcjonalność aptamerów jako ligandów [42], to konjugowanie oligonukleotydów z fluorochromami wymaga precyzyjnego określenia miejsca i sposobu dołączenia znacznika. Badania z fluoresceiną przyłączoną do aptameru w różnych pozycjach (do końca 5' bądź 3') oraz w różny sposób (bezpośrednio do oligonukleotydu

Tabela 1. Porównanie właściwości przeciwciał i aptamerów.

Przeciwciała	Aptamery
Konieczność immunizacji zwierząt ogranicza możliwość produkcji przeciwciał wobec cząsteczek nie tolerowanych przez organizm zwierzęcia (toksyn) lub nie wywołujących odpowiedzi immunologicznej [3]	Aptamery są generowane niezależnie od organizmów żywych i warunków <i>in vivo</i> ; mogą być skierowane przeciwko dowolnej cząsteczce chemicznej, bez względu na stopień jej toksyczności i właściwości immunogenne [3]
Identyfikacja i produkcja przeciwciał monoklonalnych jest czasowo- i pracochłonna (immunizacja zwierząt, tworzenie hybryd komórkowych, testowanie dużej liczby kolonii komórkowych) [3]	Proces chemicznej syntezy i selekcji <i>in vitro</i> aptamerów może być zautomatyzowany, co skraca czas produkcji, zmniejsza nakłady pracy i zapewnia wysoką powtarzalność i dokładność [62]
Często występuje tzw. zmienność partii produkcyjnych [3]	Chemiczna synteza i rygorystyczna selekcja aptamerów ogranicza zmienność produkcyjną do minimum [3]
Immunogen używany do generowania i identyfikacji przeciwciał nie musi być w postaci wysoce oczyszczonej [3]	Proces selekcji <i>in vitro</i> aptamerów wymaga obecności w środowisku reakcji cząsteczki docelowej o wysokim stopniu czystości chemicznej [15]
Koszt produkcji 1 grama przeciwciała wynosi od 1.000 do 10.000 \$ [37]	Koszt produkcji 1 grama aptamerów szacuje się na 1.000 \$ [37]
Przeciwciała mogą być przechowywane jedynie przez kilkanaście miesięcy; ulegają nieodwracalnej denaturacji w warunkach wysokich temperatur, skrajnych wartościach pH i obecności związków chaotropowych [38]	Aptamery mogą być przechowywane przez bardzo długi okres; są stabilne w temperaturze otoczenia; działają w różnych środowiskach reakcji, ulegają odwracalnej denaturacji [3]
Duży ciężar molekularny ~180 kDa (ogranicza zastosowania <i>in vivo</i> , m.in. w diagnostyce obrazowej i terapii) [39]	Mały ciężar molekularny ~10 kDa [39]
Znakowanie przeciwciał może powodować spadek ich powinowactwa do antygeny [61]	Istnieje możliwość precyzyjnego określenia miejsca i sposobu dołączenia cząsteczki reporterowej do aptameru, bez wpływu na jego funkcjonalność [43]
Działają wyłącznie w warunkach fizjologicznych [3]	Manipulowanie warunkami selekcji umożliwia otrzymanie aptamerów zdolnych do działania w danym środowisku reakcji [3]

lub za pomocą łącznika – glikolu polietylenowego) wskazują na konieczność stosowania cząsteczek pomostowych do konjugowania aptameru z barwnikiem, przez co zachowywane są zarówno wysokie powinowactwo aptamerów, jak i optymalne właściwości fluorescencyjne barwnika [43]. Z kolei porównanie właściwości fotofizycznych aptamerów znakowanych fluoresceiną, rodaminą i czerwienią teksaską (ang. *Texas red*), z użyciem poliwęglowych łączników, dowiodło, że rozkład fluorescencji poszczególnych konjugatów może zależeć od pH, potencjału elektrostatycznego i temperatury środowiska [41]. Biotynylowane oligonukleotydy sprzęgano również z kompleksem streptawidyna-fluoresceina i streptawidyna-fikoerytryna [44].

Aptamery skonjugowane z fluorochromami drobnocząsteczkowymi, np. fluoresceiną, jak również z dużymi białkami, np. fikoerytryną (masa cząsteczkowa 240 kDa) zachowują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania biomolekuł, sugerując możliwość współdziałania również z innymi cząsteczkami detektorowymi, stosowanymi w diagnostyce [3].

BIOSTABILNOŚĆ APTAMERÓW

Istnieje szereg sposobów polepszania biostabilności oligonukleotydów. Jedną z nich jest podstawienie grupy 2'-OH rybozy aptameru grupą aminową (NH_2) lub fluorową (F). W rezultacie oligorybonukleotydy zawierające grupy 2'- NH_2 bądź 2'-F są przynajmniej tysiąckrotnie bardziej odporne na degradację w plazmie, niż niemodyfikowane kwasy nukleinowe [47]. Powszechne stosowanie tego typu aptamerów *in vivo* budzi jednak zastrzeżenia z powodu ryzyka włączenia modyfikowanych nukleotydów w struktury natywnych kwasów nukleinowych organizmu. Ponadto, modyfikacja właściwości termodynamicznych oligonukleotydów tą metodą znacznie zwiększa koszty produkcji.

Tańszym i bezpieczniejszym sposobem jest alkilacja kwasów nukleinowych. Oligonukleotydy zawierające 2'-O-metylopirymidynę są odporne na działanie nukleaz, stosunkowo niedrogo w produkcji, a przede wszystkim występują naturalnie w organizmach żywych, więc nie są toksyczne [48].

Tioaptamery mają zmodyfikowane chemicznie reszty fosforanowe, w których w miejsce jednego (lub więcej) z czterech atomów tlenu wprowadzono atom siarki. Tiofosforanowe analogi oligonukleotydów są odporne na działanie 3'-egzonukleaz oraz nie są rozpoznawane jako substraty przez terminalną transferazę. Jak dowodzą liczne badania, specyficzność i powinowactwo tioaptameru względem cząsteczki docelowej mogą zależeć zarówno od liczby i pozycji zmodyfikowanych nukleotydów w sekwencji oligonukleotydu jak i liczby podstawionych atomów siarki w każdej grupie fosforanowej [49].

Interesującą z chemicznego punktu widzenia modyfikacją kwasów nukleinowych, chroniącą przed ich degradacją nukleolityczną, jest dodawanie mostków metylenowych łączących atomy 2'-O i 4'-C w pierścieniu rybozy każdego nukleotydu. Cząsteczki takie określa się jako „usztwnione kwasy nukleinowe” lub LNA (ang. *Locked Nucleic Acids*).

Zmiany tego typu nie powodują obniżenia powinowactwa i specyficzności aptameru względem cząsteczki docelowej [50].

Konstruowanie koliście zamkniętych aptamerów (ang. *circular aptamers, captamers*) stanowi ciekawą alternatywę dla metod doskonalenia biostabilności tych ligandów poprzez modyfikacje chemiczne. Metoda ligacji wolnych końców oligonukleotydu skutecznie zabezpiecza przed degradacją egzonukleolityczną, jednocześnie nie wpływając na funkcjonalność ligandów. Ponadto, do produkcji aptamerów można wtedy używać wyłącznie naturalne nukleotydy [51].

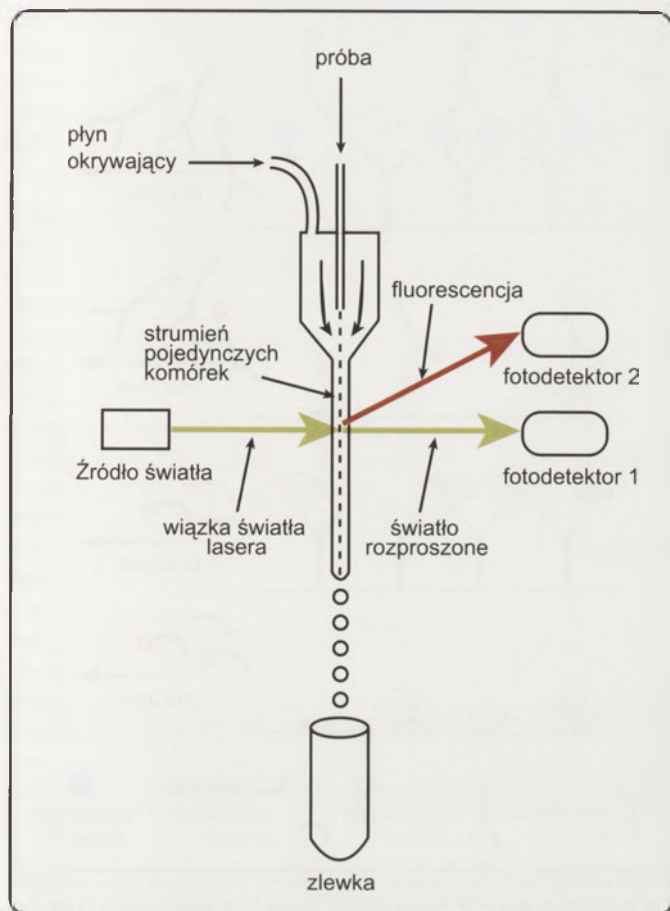
Innym sposobem produkcji aptamerów odpornych na działanie nukleaz jest ich selekcja *in vitro* z puli fragmentów D-DNA lub D-RNA, wiążących enancjomer rzeczywistej cząsteczki docelowej. Sekwencje takich aptamerów syntetyzuje się ponownie w konfiguracji L-enancjomerów. Otrzymane „aptamery lustrzane” (ang. *spiegelmers, mirror-image aptamers*) są, zgodnie z zasadami symetrii, ligandami rzeczywistej cząsteczki docelowej i pozostają stabilne w płynach fizjologicznych przez wiele godzin [17]. Wyprodukowano m.in. aptamery zbudowane z L-DNA, wiążące wazopresynę [52] oraz cząsteczki L-RNA przeciwko L-adenozynie [53] i L-argininie [54].

DIMERYZACJA APTAMERÓW

Wykorzystywane w diagnostyce przeciwciała klasy IgG są biwalentne, z kolei aptamery uzyskane podczas selekcji *in vitro* mają naturę monowalentną [3]. Wykazano, że dimeryczne formy aptamerów odznaczają się wielokrotnie większym powinowactwem do cząsteczek docelowych niż monomery [43,45], a okres półtrwania kompleksu aptamer-cząsteczka docelowa może być nawet dwukrotnie dłuższy niż kompleksów przeciwciało-antygen [45]. Podstawową zaletą aptamerów multiwalentnych jest ich plejotropowość. Cząsteczki tego typu mają większą liczbę miejsc wiążących i zdolne są do jednoczesnego oddziaływania z więcej niż jedną cząsteczką docelową. Ponadto aptamery heterogeniczne mogą wiązać jednocześnie różne cząsteczki docelowe [46].

CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA

Cytometria przepływowa jest obecnie jedną z najpowszechniej wykorzystywanych metod w diagnostyce klinicznej. Pozwala rozpoznawać i monitorować wiele schorzeń hematologicznych, wrodzone i nabyte niedobory odporności, choroby nowotworowe, choroby płuc, choroby autoimmunizacyjne oraz przeszczepy narządów. Ocena fenotypu komórek w danej próbce polega na badaniu ekspresji powierzchniowych determinant charakterystycznych dla poszczególnych subpopulacji i typów komórek. Można wykonać ocenę fenotypową krwi obwodowej, szpiku, węzłów chłonnych, płynu mózgowo-rdzeniowego czy popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelikowych. W rutynowej analizie, do wyznakowania badanych komórek bądź innych mikrosfer, wykorzystuje się dostępne komercyjnie przeciwciała monoklonalne, skonjugowane z fluorochromem [55]. Zasadę pomiaru w cytometrze przepływowym przedstawia rycina 2.



Rycina 2. Schemat przedstawiający zasadę analizy komórek w zawiesinie w cytometrze przepływowym.

Davis i wsp. [43] przeprowadzili serię doświadczeń, w których dokonali cytometrycznego pomiaru intensywności świecenia aptamerów DNA, skierowanych przeciwko elastazie neutrofilowej człowieka, skonjugowanych z fluoresceiną. W pomiarach użyto pojedynczych bądź zdimerizowanych konstruktów DNA-fluoresceina. We wszystkich doświadczeniach użyto mikrokuleczek polistyrenowych, opłaszczonych cząsteczkami elastazy. Choć w każdym z przypadków wyznakowane fluoresceiną aptamery przyłączały się do kuleczek, intensywność sygnału zależała od sposobu przyłączenia fluorochromu. Badania potwierdziły również przydatność aptamerów w procedurze podwójnego znakowania, która w przypadku cytometrii przepływowej stosowana jest w celu wzmocnienia sygnału.

Elastaza neutrofilowa człowieka (HNE) jest proteinazą serynową, obecną w ziarnistościach komórek neutrofilowych, zdolną do trawienia białek tkanki włóknistej. Infekcja i stan zapalny są przyczyną miejscowej akumulacji aktywowanych neutrofilów i uwalniania elastazy do przestrzeni międzykomórkowej. Dodatkowo, cząsteczki HNE mogą pozostawać trwale związane z powierzchnią neutrofilów [56]. Analiza cytometryczna z wykorzystaniem znakowanych fluoresceiną DNA-aptamerów, skierowanych przeciwko cząsteczkom elastazy, wykazała istnienie liniowej zależności między aktywnością enzymu a intensywnością świecenia. Aptamery wybarwiły odsetek aktywowanych neutrofilów w zawiesinie, co potwierdza obecność elastazy

na powierzchni tych komórek [39]. Jednocześnie wykazano, że aptamery są skutecznym narzędziem rozpoznającym specyficjnie biomolekuły komórkowe i mogą stanowić substytut przeciwciał w metodach barwienia żywych komórek, a zwłaszcza w analizie fenotypowej.

Cytometryczna analiza fenotypowa może być wykonana tylko w zawiesinie żywych komórek, bez zamrażania i środków konserwujących [55]. W przypadku wykorzystywania RNA-aptamerów do barwienia żywych komórek, konieczna jest ochrona ich oligonukleotydowej struktury przed działaniem nukleaz. Hicke i wsp. [45] zsyntetyzowali aptamery zawierające 2'-aminopirymidynę, skierowane przeciwko selektynie L, błonowej cząsteczce adhezyjnej leukocytów, odgrywającej kluczową rolę w zapoczątkowaniu ich przylegania do aktywowanego śródbłonnka. Końce 5' aptamerów skonjugowano z fluoresceiną za pomocą łącznikowego glikolu polietylenowego. Aptamery dodane do mieszaniny komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs) specyficjnie barwiły tylko leukocyty i neutrofile wykazujące ekspresję selektyny L. Wyniki pomiarów cytometrycznych były podobne dla komórek barwionych znakowanymi przeciwciałami i aptamerami. Jednak aptamery niezakowane wykazywały większe powinowactwo do selektyny L, niż aptamery skonjugowane z fluoresceiną i blokowały barwienie komórek.

Aptamery RNA z 2'-F pirymidyną wykorzystano z powodzeniem do identyfikacji subpopulacji limfocytów wykazujących powierzchniowo ekspresję cząsteczki CD4 w heterogennej zawiesinie PBMCs [44]. Biotynylowane oligonukleotydy konjugowano z kompleksem streptawidyna-fluoresceina (SA-F) bądź streptawidyna-fikoerytryna (SA-PE). Obydwa konstrukty miały naturę multiwalentną. Porównawcze pomiary odsetka CD4⁺ limfocytów T_h w mieszaninie mononuklearów krwi obwodowej, barwionych za pomocą przeciwciał i aptamerów dały w obydwu przypadkach identyczne wyniki. Powinowactwo aptamerów do cząsteczek CD4 było porównywalne do przeciwciał. Ponadto przeprowadzone jednoczesne barwienie komórek przeciwciałami i aptamerami wyznakowanymi różnymi barwnikami i wiążącymi odmienne domeny cząsteczek CD4 stwarza podstawy do wykorzystywania obu klas ligandów w analizach multiparametrycznych.

Aptamery stanowią atrakcyjny substytut przeciwciał w analizach, gdzie regiony Fc przeciwciał reagują w niepożądanym sposób z receptorami Fc, obecnymi na błonach wielu komórek, fałszując tym samym odczyt pomiaru. W dodatku generowanie aptamerów di- lub multiwalentnych, które jest stosunkowo prostym zabiegiem, może znacznie polepszyć charakterystykę pomiaru [3].

METODY IMMUNOCHEMICZNE

ELISA

Standardowa procedura wykrywania białek w krwi, moczu, ślinie i innych płynach ustrojowych bazuje na tzw. teście kanapkowym (ang. *sandwich assay*) z użyciem dwóch przeciwciał monoklonalnych: pierwotnego – swoistego antygenowo oraz wtórnego – detektorowego, wyznakowanego enzymatycznie lub fluorescencyjnie [57]. Podstawową

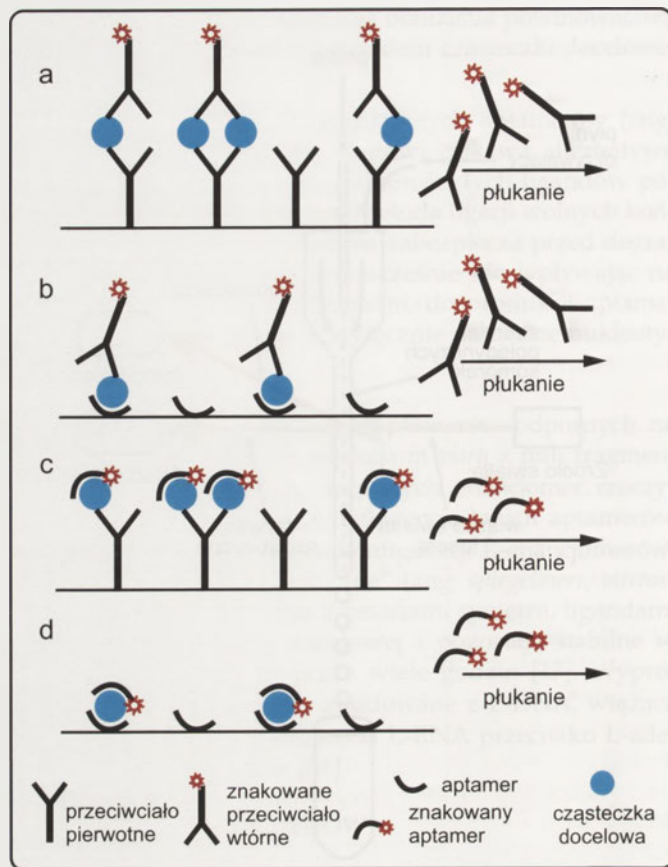
metodą diagnostyczną, opartą na teście kanapkowym jest test immunoenzymatyczny – ELISA (Ryc. 3a). Zapewnia on wysoką czułość wykrywania i umożliwia ilościowe oznaczenie antygenów w próbce [58]. W praktyce diagnostycznej test ELISA jest używany do detekcji m.in. zakażeń wirusowych (np. HIV, wirus zapalenia wątroby, wirus opryszczki, wirus ospy wietrznej), toxoplazmozy czy chorób autoimmunologicznych. Dotychczas przeprowadzone badania potwierdzają możliwość stosowania aptamerów w tej metodzie.

Naukowcy z firmy farmaceutycznej NexStar (obecnie Gilead Sciences, Foster City California) opracowali i opatentowali test kanapkowy z użyciem oligonukleotydów, nazwany ELONA (ang. *enzyme-linked oligonucleotide assay*), w którym przeciwciała pierwotne zastąpili aptamerem RNA [59] (Ryc. 3b). Porównano ELONA z klasycznym testem ELISA pod kątem parametrów ilościowych analizując izoformę VEGF₁₆₅ w próbce surowicy krwi człowieka. Związany z VEGF aptamer, uprzednio wyznakowany na końcu 5' fluoresceiną, wykryto za pomocą fragmentu Fab, skonjugowanego z fosfatazą alkaliczną. Wyniki testu ELONA były powtarzalne i niemal identyczne z danymi uzyskanymi w teście ELISA. Wysokiej dokładności, precyzji, czułości i specyficzności testu ELONA dowiodły również badania zespołu chińskiego, który w teście ELONA zastosował biotynylowane aptamery RNA do detekcji przeciwciał monoklonalnych związanych z TNF α w surowicy człowieka [60]. W tym przypadku aptamery zajęły miejsce przeciwciał wtórnych (Ryc. 3c). Istnieje również trzeci wariant testu ELONA, w którym aptamery pełnią funkcję zarówno ligandów wiążących analizowaną biomolekulę, jak i wyznakowanych cząsteczek reporterowych [61] (Ryc. 3d).

Test konkurencyjny (ang. *competitive binding assay*) jest rodzajem testu ELISA, stosowanym zazwyczaj do wykrywania i oznaczeń ilościowych tych antygenów, które dostępne są w formie oczyszczonej i wysoce oczyszczonej. Do immobilizowanego na fazie stałej antygeny dodaje się próbę zawierającą nieznaną ilość tego antygeny i roztwór znakowanego przeciwciała. Zachodzi wtedy zjawisko „wyłapywania przeciwciał” (ang. *antibody capture*) przez rozpuszczalny antygen obecny w próbce i obniżenie wiązania tego przeciwciała do antygeny immobilizowanego. W analogiczny sposób prowadzi się test konkurencyjny z „wyłapywaniem antygeny” (ang. *antigen capture*) [58]. Ito i wsp. [62] zastosowali aptamery DNA do ilościowego oznaczenia hormonu tarczycowego T₄ testem konkurencyjnym ELONA. Aby zwiększyć specyficzność wiązania, aptamery poddano dodatkowej selekcji negatywnej w procesie „counter-SELEX”. Oligonukleotydy wyznakowano biotyną lub radioizotopem ³²P i poddano wiązaniu z unieruchomionym w żelu T₄. Ilość uwalnianych z matrycy ligandów DNA wzrastała liniowo w miarę dodawania próbki – rozpuszczalnego hormonu T₄, natomiast zjawisko to nie występowało, gdy próbę stanowił hormon T₃.

WESTERN BLOT

Aptamery można wykorzystywać również do detekcji białek immobilizowanych na membranie, w sposób analogiczny do przeciwciał stosowanych w technikach immu-



Rycina 3. Schemat przedstawiający istotę testu ELISA (a) oraz testu ELONA, z uwzględnieniem różnych wariantów (b, c, d). Opis zawarty w tekście pracy.

nodetekcyjnych typu Western Blot lub dot-blot [3]. Wyznakowany radioaktywnie oligorybonukleotydowy ligand zawierający zasady 2'-amino-pyrimidynowe, zastosowano do detekcji hormonu człowieka, uwalniającego tyreotropinę (hTSH) w teście dot-blot [63]. Aptamer odznaczał się nie tylko wysokim powinowactwem do hTSH (K_d rzędu 2,5 nM), lecz również wysoką specyficznością, gdyż rozróżniał hTSH spośród innych glikohormonów o bardzo zbliżonej strukturze. Dokładny pomiar poziomu hormonu uwalniającego tyreotropinę w surowicy krwi jest podstawą diagnozowania zaburzeń czynnościowych przysadki mózgowej i tarczycy.

Murphy i wsp. [15] przeprowadzili porównawczy, chemiluminescencyjny Western Blot unieruchomionego na membranie czynnika transkrypcyjnego tarczycowego (TTF), z użyciem znakowanego przeciwciała anti-PentaHis oraz z zastosowaniem biotynylowanych aptamerów DNA. Aptamery nie wykazywały reaktywności krzyżowej z białkami kontroli i cechowała je podobna specyficzność działania do tej, obserwowanej u przeciwciał.

DIAGNOSTYKA OBRAZOWA

Radiologia, nazywana również diagnostyką obrazową, jest działem klinicznym, w skład którego wchodzi różne techniki obrazowania, np. tomografia komputerowa, radiografia, ultrasonografia, a także rezonans magnetyczny. Służą one do określania patomorfologii oraz oceny zmian w metabolizmie i funkcji obrazowanych narządów. Pomi-

mo stosowania zaawansowanych metod kontrastowania wciąż poszukuje się nowych środków kontrastujących: zupełnie nieszkodliwych dla pacjenta, o pożądanych parametrach emitowanego sygnału i wyższej swoistości tkankowej.

SELEX umożliwia otrzymanie aptamerów zdolnych wiązać się *in vivo* z białkami obecnymi na powierzchni wybranego typu komórek lub określonej tkanki. Aptamery tego rodzaju, odpowiednio wyznakowane i zabezpieczone przed degradacją nukleolityczną, stanowią obiecujące narzędzie diagnostycznego obrazowania radiologicznego w medycynie. Komórki i tkanki nowotworowe, ze względu na swą specyficzną charakterystykę biochemiczną, wydają się być wymiennym celem dla aptamerów – zarówno w zakresie diagnostyki jak i terapii. Hicke i wsp. [64] wykorzystali całe komórki (ustalone linie komórkowe hodowane *in vitro*) jako matryce do selekcji aptamerów (symbol TTA1) skierowanych przeciwko tenascynie C, białku markerowym produkowanym w dużych ilościach przez komórki nowotworowe, począwszy od transformacji do metastazy. W podobny sposób, inkubując pulę oligonukleotydów z zawiesiną komórek w procesie SELEX, wyselekcjonowano aptamery wiążące zewnątrzkomórkową domenę receptorowej kinazy tyrozynowej (RTK) [65]. RTK jest transbłonowym białkiem zaangażowanym w różne szlaki sygnałowe procesów regulujących wzrost i proliferację pewnych typów nowotworów. Lupold i wsp. [66] użyli oczyszczonego, rekombinowanego polipeptydu, identycznego z zewnątrzkomórkowym fragmentem białka PMSA, do selekcji oligonukleotydów wiążących się do powierzchni błon komórek raka prostaty. PMSA (ang. *prostate-specific membrane antigen*) jest specyficznym markerem komórek raka prostaty. Ekspresja tego białka wzrasta wraz ze stopniem złośliwości nowotworu. Selekcja aptamerów w obecności całych komórek redukuje ryzyko otrzymania ligandów wiążących dane białko błonowe jedynie w postaci oczyszczonej, podczas gdy natywna, prezentowana na powierzchni błony komórkowej proteina pozostawała by niewidoczna dla tych oligonukleotydów.

Aptamery przyłączające się do powierzchni komórek lub tkanek określonego typu można selekcjonować również wtedy, gdy specyficzne białko błonowe, będące właściwym molekularnym celem aptameru, nie jest znane. W tym przypadku aptamery mogą służyć do identyfikacji nowych, białkowych markerów komórek nowotworowych oraz późniejszej diagnostyki *in vivo* ognisk rakowych, opartej na wskazywaniu komórek prezentujących dane białko. Blank i wsp. [67] wyselekcjonowali oligonukleotydy przyłączające się do mikronaczyń krwionośnych szczurzego guza mózgu. Drobne naczynia krwionośne nowotworu mogą bowiem różnić się strukturalnie, biochemicznie i funkcjonalnie od systemu naczyniowego zdrowej tkanki. Spośród 25 wyselekcjonowanych sekwencji przyłączających się do naczyń krwionośnych guza, tylko jedna specyficznie odróżniała tkankę nowotworową od zdrowej. Aptamer skonjugowany z FITC użyto do wybarwienia skrawków mrożakowych guza w celu diagnozy histopatologicznej. Przypuszcza się, że oligonukleotydy, wyselekcjonowane w podobny sposób względem nowotworu mózgu człowieka, posłużą w przyszłości do diagnozowania i kontrolowania przebiegu choroby *in vivo*.

Badania nad uzyskaniem aptamerów specyficznie rozróżniających tkankę zmienioną chorobowo od zdrowej stwarzają podstawy dla rozwoju metod diagnozowania obrazowego, wykorzystujących wyznakowane oligonukleotydy jako czynniki kontrastujące w organizmie pacjenta. Zanim jednak aptamery staną się narzędziem rutynowych analiz w diagnostyce klinicznej konieczne są testy ich parametrów farmakokinetycznych i dystrybucji wewnątrz ustroju. Farmakokinetyka oligonukleotydów jest wypadkową ich podstawowych własności fizycznych, chemicznych i biologicznych: stabilności, wielkości cząsteczki, rozpuszczalności, zdolności do pokonywania barier biologicznych, klirensu z krwi, metabolizmu w nerkach i wątrobie itd. [68]. Charlton i wsp. [69] podali dożylnie aptamery wyznakowane radionuklidem ^{99m}Tc szczerom, u których kilka godzin wcześniej wywołano miejscowy odczyn zapalny (reakcję Arthusa) w kończynie przedniej. Markerem zapalenia i molekularnym celem dla aptamerów była wspomniana wyżej elastaza neutrofila. Działanie oligonukleotydów porównywano z kontrolą pozytywną, którą stanowiło przeciwciało klasy IgG, rutynowo stosowane w diagnozowaniu zapalenia. Aptamery charakteryzował bardzo szybki klirens z krwioobiegu kończyn nie objętych zapaleniem, podczas gdy przeciwciała utrzymywały się w nich przez dłuższy czas. Ponadto ligandy nukleinowe osiągnęły istotnie wyższy stosunek sygnału do szumu niż immunoglobuliny.

Trombina jest kompleksowym enzymem osocza, odgrywającym kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi. Zwiększona obecność trombin w organizmie, bądź niedobór naturalnych antykoagulantów, prowadzą do trombofilii. Pod tym szerokim pojęciem kryją się takie przypadki chorobowe, w których stwierdza się predyspozycję pacjenta do nadmiernej krzepliwości krwi. Są to przede wszystkim choroby zakrzepowo-zatorowe żył oraz ich powikłania, zatory tętnic, które nie leczone mogą kończyć się zgonem. Podstawą udanej terapii przeciwzakrzepowej jest z kolei skuteczna diagnoza wczesnego stadium rozwoju choroby. Początki badań nad aptamerami antytrombinowymi sięgają już wczesnych lat 90-tych ubiegłego wieku [70,71]. Prace z ostatnich lat w dużej części dotyczą oceny działania aptamerów antytrombinowych *in vivo*. Dougan i wsp. [72] sprawdzali okres trwania znakowanych radioaktywnie aptamerów antytrombinowych (ODN 1 i ODN 2), zabezpieczonych przed działaniem 3'-egzonukleaz, w warunkach zatrzymanego krążenia, jakie występują w miejscu zatoru naczyniowego oraz w krwi krążącej. Wyniki dla obu przypadków drastycznie różniły się od siebie. Podczas gdy w miejscu zatoru żylnego aptamery utrzymywały się przez kilka godzin, to okres ich trwania w krwi krążącej wynosił zaledwie minutę. Nagły klirens oligonukleotydów z krwi i ich retencja w wątrobie ograniczały możliwość penetracji zakrzepu i związania się z trombiną. Późniejsze badania tego zespołu dotyczyły obrazowania aktywnych miejsc powstawania zakrzepów w naczyniach krwionośnych na podstawie ilościowego oznaczania trombin [73]. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że aptamer ODN2 może tworzyć potrójny kompleks z trombiną związaną z włóknikiem, przyłączając się do niej w tym samym miejscu wiązania co heparyna. Wiązanie aptamerów ODN2 do modelowego skrzepu *in vitro* wzrastało proporcjonalnie w

miarę dodawania trombiny. Jednak uzyskanie podobnych wskaźników w warunkach *in vivo*, na modelu zwierzęcym, okazało się niemożliwe z powodu gwałtownego klirensu z krwi obwodowej. Autorzy sugerują również istnienie innego białka wszechobecnego w osoczu, które alternatywnie do trombiny może posiadać miejsce wiązania ODN2.

Szybki klirens czynnika kontrastującego z ustroju jest zjawiskiem pożądanym w diagnostyce obrazowej. Jednak optymalny okres utrzymywania się aptamerów w krwioobiegu powinien być na tyle długi, aby możliwe było dotarcie cząsteczek do właściwego miejsca ich działania, dostateczne wysycenie obrazowanej tkanki oraz odpowiednio długa emisja sygnału, umożliwiająca dokonanie pomiaru. Chemiczne modyfikacje mogą znacznie poprawić biostabilność oligonukleotydów, lecz zarazem mogą wpływać niekorzystnie na ich właściwości farmakokinetyczne, wymagane w technikach obrazowania [68]. Najbardziej obiecującymi kandydatami do stosowania w diagnostyce *in vivo* wydają się zatem być oligonukleotydy modyfikowane w sposób, który nie wpływa zarówno na ich powinowactwo i specyficzność wiązania, emitowany sygnał jak i zdolność penetracji chorej tkanki. Niemodyfikowane aptamery RNA skierowane przeciwko tenascynie C (oznaczone TTA1) porównywano w doświadczeniach *in vivo* z ich analogami zawierającymi 2'-O-metylopirymidynę (TTA1.1) oraz oligonukleotydami usztywnionymi (TTA1.2) pod kątem stabilności w krwi obwodowej, biodystrybucji w organizmie, klirensu ustrojowego i wychwytu przez nowotwór [74]. Wszystkie aptamery wyznakowano izotopem ^{99m}Tc. Okres półtrwania aptamerów TTA1.2 (53 godziny) w osoczu krwi człowieka był niemal o 25% dłuższy niż aptamerów niemodyfikowanych (42 godziny). Testy wiązania aptamerów TTA1.1 i TTA1.2 do cząsteczki docelowej na drodze konkurencji z TTA1 nie wykazały istotnych różnic w powinowactwie i specyficzności ligandów. W badaniach nad biodystrybucją i farmakokinetyką, aptamery wstrzyknięto dożylnie myszom z rozwiniętym podskórnie glejakiem człowieka. Zgodnie z oczekiwaniami, TTA1.2 wykazywały najlepszy wychwyt przez tkankę nowotworu, przy jednocześnie najwolniejszym klirensie z krwi. Towarzystwoło mu zjawisko retencji modyfikowanych aptamerów w wątrobie i nerkach, opisywane również w innych pracach. Badania z aptamerem TTA1 dostarczają unikalnych i kompleksowych danych i predystynują usztywnione oligonukleotydy do pełnienia roli czynników kontrastujących w diagnostyce obrazowej. Jednakże prawdziwie przełomowe wydają się być doświadczenia przyżyciowe z wykorzystaniem znakowanych izotopowo aptamerów, obrazowanych techniką pozytronowej emisyjnej tomografii komputerowej, PET (ang. *Positron Emission Tomography*).

Tomografia pozytronowa jest nieinwazyjną techniką obrazowania, w której rejestruje się promieniowanie powstające podczas rozpadu tzw. krótkożyjących izotopów promieniotwórczych (najczęściej ¹⁸F), podanych pacjentowi. PET jest uznaną metodą diagnostyki i monitorowania chorób nowotworowych na podstawie aktywności metabolicznej tkanek. Badanie daje możliwość dokładnego różnicowania między nowotworami złośliwymi i łagodnymi. Także pacjenci cierpiący na choroby nienowotworowe, takie jak

przewlekłe zapalenia i infekcje, mogą korzystać z osiągnięć tej metody diagnostyki obrazowej. W badaniach rutynowo wykorzystuje się deoksyglukozę znakowaną izotopem ¹⁸F (preparat ¹⁸F-FDG) [75]. Boisgard i wsp. [68] użyli nieaktywnych aptamerów lustrzanych L-RNA i L-DNA, znakowanych izotopami ¹⁸F, ¹²⁵I oraz ³⁵S w technice obrazowania PET. Celem doświadczeń było określenie biodystrybucji i parametrów farmakokinetycznych oligonukleotydów w organizmach pawianów i szczurów. Zwierzętom podano dożylnie L-RNA, bądź L-DNA aptamery, po czym pobrano próbki osocza krwi i moczu. W krwi naczelnych, pobranej 3 godziny po iniekcji, nie stwierdzono degradacji ani cząsteczek L-RNA, ani L-DNA. Próbkę moczu ujawniły po 3 godzinach ograniczoną nukleolizę aptamerów na poziomie ok. 30%. Analizy biologicznych próbek od szczurów dostarczyły podobnych wyników. Pomiaru tomograficzne, wykonywane przyżyciowo pawianom w krótkich odstępach czasu od momentu iniekcji, ujawniły doskonałe właściwości aptamerów lustrzanych. Nie stwierdzono niespecyficznego wiązania aptamerów w tkankach. Natomiast wzrastająca w miarę upływu czasu retencja tych cząsteczek w nerkach, przy jednoczesnym braku ich biodegradacji do wolnych L-nukleotydów, wskazuje na prawidłowy metabolizm aptamerów lustrzanych w organizmie.

Unikalne własności aptamerów zachęcają do prób zaadaptowania ich do technik obrazowania diagnostycznego. Aptamery są cząsteczkami o niewielkich rozmiarach (~10 kDa), dzięki czemu krótko pozostają w układzie krążenia, szybko przedostają się do docelowego miejsca działania w organizmie [39] i mogą być podawane zarówno dożylnie jak i podskórnie [37]. Dotąd nie stwierdzono, aby wywoływały odpowiedź immunologiczną organizmu [76].

PODSUMOWANIE

Światowe zainteresowanie technologią aptamerów nukleinowych wynika przede wszystkim z ich uniwersalizmu aplikacyjnego. Wielomilionowe inwestycje takich dużych firm farmaceutycznych, jak NOXXON Pharma AG, Gilead Sciences czy Archemix, na rozwój technologii SELEX świadczą o olbrzymim potencjale ukrytym w aptamerach i równie dużych nadziejach na wprowadzenie ich do powszechnego stosowania w medycynie. Aptamery znajdują szereg potencjalnych i praktycznych zastosowań w badaniach naukowych, analityce, diagnostyce oraz terapii, jako narzędzia rozpoznania molekularnego [4]. Niestety, ligandy nukleinowe wciąż pozostają w cieniu stosowanych powszechnie przeciwciał, ze względu na brak dostatecznie rozbudowanego zaplecza technologicznego i zbyt silnej konkurencji ze strony firm produkujących przeciwciała. Wyniki badań dowodzą jednak, że aptamery można w stosunkowo łatwy sposób dostosowywać do wymogów technicznych metod diagnostycznych. Autorzy licznych publikacji na temat aptamerów i ich zastosowań przewidują intensywny rozwój tej technologii. Niezwykle przydatnym, usystematyzowanym źródłem informacji o aptamerach – ich cząsteczkach docelowych, sekwencjach, procesie selekcji – jest internetowa baza danych stworzona przez zespół Andrew D. Ellingtona, dostępna pod adresem: <http://aptamer.icmb.utexas.edu/> [77].

PIŚMIENNICTWO

1. Maclean D, Baldwin JJ, Ivanov VT, Kato Y, Shaw A, Schenider P, Gordon EM (1999) Glossary of terms used in combinatorial chemistry. *Pure Appl Chem* 71: 2349-2365
2. Ellington AD, Szostak JW (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822
3. Jayasena SD (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45: 1628-1650
4. Tombelli S, Minunni M, Mascini M (2005) Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron* 20: 2424-2434
5. Hicke BJ, Stephens AW (2000) Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest* 106: 923-928
6. Figurska M, Stankiewicz A (2005) Terapia wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanej z wiekiem: stan obecny i perspektywy. *Klinika Oczna* 107: 334-339
7. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-510
8. Ellington AD, Szostak JW (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-822
9. Ellington AD, Szostak JW (1992) Selection *in vitro* of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 355: 850-852
10. Tyczewska A, Figlerowicz M, Twardowski T (2003) Aptamery RNA jako potencjalne leki przeciwwirusowe. *Biotechnologia* 2: 153-164
11. Wilson DS, Szostak JW (1999) *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem* 68: 611-647
12. Lorsch JR, Szostak JW (1994) *In vitro* selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry* 33: 973-982
13. Drolet DW, Jenison RD, Smith DE, Pratt D, Hicke BJ (1999) A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen* 2: 271-278
14. Golden MC, Collins BD, Willis MC, Koch TH (2000) Diagnostic potential of photo-SELEX-evolved ssDNA aptamers. *J Biotechnol* 81: 167-178
15. Murphy MB, Fuller ST, Richardson PM, Doyle SA (2003) An improved method for the *in vitro* evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Research* 31: e110
16. Mendosa SD, Bowser MT (2004) *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc* 126: 20-21
17. Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klussmann S (2003) Short bioactive spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res* 31: e130.
18. Cox JC, Hayhurst A, Hesselberth J, Bayer TS, Georgiou G, Ellington AD (2002) Automated selection of aptamers against protein targets translated *in vitro*: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res* 30: e108
19. Eulberg D, Buchner K, Maasch C, Klussmann S (2005) Development of an automated *in vitro* selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucleic Acids Res* 33: e45
20. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263: 1425-1429
21. Conrad R, Keranen LM, Ellington AD, Newton AC (1994) Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers. *J Biol Chem* 269: 32051-32054
22. Michaud M, Jourdan E, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E (2003) A DNA aptamers as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc* 125: 8672-8679
23. Sasanfar M, Szostak JW (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364: 550-553
24. Mannironi C, Nardo AD, Fruscoloni P, Tocchini-Valenti GP (1997) *In vitro* selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry* 36: 9726-9734
25. James W (2000) Aptamers. W: Meyers RA (red) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, str. 4848-4871
26. Hermann T, Patel DJ (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287: 820-825
27. Ziomek K, Kierzek R (1999) Drugorządowe motywy strukturalne RNA. *Postepy Biochem* 45: 80-87.
28. Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* 64: 763-797
29. Feigon J, Dieckmann T, Smith FW (1996) Aptamer structures from A to zeta. *Chem Biol* 3: 611-617
30. Kierzek R (1998) Właściwości termodynamiczne kwasów rybonukleinowych. W: Koroniak H, Barciszewski J, Markiewicz WT, Ziemiński K (red) *Na pogramnicu chemii i biologii, t I*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, str. 369-416
31. Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3745-9374.
32. Phan AT, Kuryavii V, Ma J-B, Faure A, Andreola M-L, Patel DJ (2005) An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: A potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl Acad Sci USA* 102: 634-639
33. Williamson JR (1994) G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 703-730
34. Piganeau N, Schroeder R (2003) Aptamer structures: a preview into regulatory pathways? *Chem Biol* 10: 103-104
35. Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 496-497
36. Hesselberth J, Robertson MP, Jhaveri, Ellington AD (2000) *In vitro* selection of nucleic acids for diagnostic applications. *Rev Mol Biotech* 74: 15-25
37. McCarthy A (2002) Archemix. *Nucleic Acids Platforms. Chem Biol* 9: 663-665
38. Romig TS, Bell C, Drolet DW (1999) Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 731: 275-284
39. Charlton J, Sennello J, Smith D (1997) *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 4: 809-816
40. Pestourie C, Tavitian B, Duconge F (2005) Aptamers against extracellular targets for *in vivo* applications. *Biochimie* 87: 921-930
41. Unruh JR, Gokulrangan G, Wilson GS, Johnson CK (2005) Fluorescence properties of fluorescein, tetramethylrhodamine and texas red linked to a DNA aptamer. *Photochem Photobiol* 81: 682-690
42. Fitzwater T, Polisky B (1996) 'A SELEX primer'. *Methods Enzymol* 267: 275-301
43. Davis KA, Abrams B, Lin Y, Jayasena SD (1996) Use of high affinity DNA ligand in flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 24: 702-706
44. Davis KA, Lin Y, Abrams B, Jayasena SD (1998) Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 26: 3915-3924
45. Hicke BJ, Watson SR, Koenig A, Lynott CK, Bargatze RF, Chang Y-F, Ringquist S, Moon-McDermott L, Jennings S, Fitzwater T, Han H-L, Varki N, Albinana I, Willis MC, Varki A, Parma D (1996) DNA aptamers block L-selectin function *in vivo*. *J Clin Invest* 98: 2688-2692
46. King GC, Knox SM, Williams BB, Harris J, Gupta DM, Di Giusto DA, Gabutero ER, Tyrelle GD, Lai Y-C, Aung MT, McCutcheon ST, Voelcker N, Le HTT (2005) Multivalent circular aptamers: versatile nanostructures for biomedical applications. *Nanotech* 1: 258-261
47. Pieken WA, Olsen DB, Benseler F, Aurup H, Eckstein F (1991) Kinetic characterisation of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 253: 314-317
48. Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Shannon Pendergrast P, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C, Keefe AD (2005) Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem Biol* 12: 25-33
49. Yang X, Gorenstein DG (2004) Progress in thioaptamer development. *Curr Drug Targets* 5: 705-715
50. Duatti A (2004) *In vivo* imaging of oligonucleotides with nuclear tomography. *Curr Drug Targets* 5: 753-760

51. Di Giusto DA, King GC (2004) Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J Biol Chem* 279: 46483-46489
52. Williams KP, Liu XH, Schumacher TN, Lin HY, Ausiello DA, Kim PS, Bartel DP (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11285-11290
53. Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Furste JP (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature Biotechnol* 14: 1112-1115
54. Nolte A, Klussmann S, Bald R, Erdmann VA, Furste JP (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature Biotechnol* 14: 1116-1119
55. Kaczmarek A, Osawa T, Leporowska E, Mackiewicz A (2002) Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej. *Współczesna Onkologia* 6: 366-373
56. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ (1995) Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, no-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* 131: 775-789
57. Brody EN, Gold L (2000) Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Rev Mol Biotech* 74: 5-13
58. Ugorski M, Krop-Wątopek A (1999) Metody immunochemiczne. W: Zabel M (red) *Immunocytochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 227-259
59. Drolet DW, Moon-McDermott L, Romig TS (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* 14: 1021-1025
60. Yan XR, Gao XW, Yao LH, Zhang ZQ (2004) Novel methods to detect cytokines by enzyme-linked oligonucleotide assay. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 20: 679-682
61. O'Sullivan CK (2002) Aptasensors – the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem* 372: 44-48
62. Ito Y, Kawazoe N, Imanishi Y (2000) *In vitro* selected oligonucleotides as receptors in binding assays. *Methods* 22: 107-114
63. Lin Y, Nieuwlandt D, Magallanez A, Feistner B, Jayasena SD (1996) High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by *in vitro* selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acids Res* 24: 3407-3414
64. Hicke BJ, Marion C, Chang Y-F, Gould T, Lynott CK, Parma D, Schmidt PG, Warren S (2001) Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* 276: 48644-48654
65. Cerchia L, Duconge F, Pestourie C, Boulay J, Aissouni Y, Gombert K, Tavitian B, de Franciscis V, Libri D (2005) Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biology* 3: 697-704
66. Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS (2002) Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 62: 4029-4033
67. Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. *J Biol Chem* 276: 16464-16468
68. Boisgard R, Kuhnast B, Vonhoff S, Younes C, Hinnen F, Verbavatz JM, Rousseau B, Furste JP, Wlotzka B, Dolle F, Klussmann S, Tavitian B (2005) *In vivo* biodistribution and pharmacokinetics of 18F-labelled Spiegelmers: a new class of oligonucleotidic radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 470-477
69. Charlton J, Sennello J, Smith D (1997) *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 4: 809-816
70. Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL (1993) *In vivo* anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood* 81: 3271-3276
71. Li WX, Kaplan AV, Grant GW, Toole JJ, Leung LL (1994) A novel nucleotide-based thrombin inhibitor inhibits clot-bound thrombin and reduces arterial platelet thrombus formation. *Blood* 83: 677-682
72. Dougan H, Lyster DM, Vo CV, Stafford A, Weitz JI, Hobbs JB (2000) Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol* 27: 289-297
73. Dougan H, Weitz JI, Stafford AR, Gillespie KD, Klement P, Hobbs JB, Lyster DM (2003) Evaluation of DNA aptamers directed to thrombin as potential thrombus imaging agents. *Nucl Med Biol* 30: 61-72
74. Schmidt KS, Borkowski S, Kurreck J, Stephens AW, Bald R, Hecht M, Friebe M, Dinkelborg L, Erdmann VA (2004) Application of locked nucleic acids to improve aptamer *in vivo* stability and targeting function. *Nucleic Acids Res* 32: 5757-5765
75. Nowak B, Szechiński J (2005) Zastosowanie pozytronowej tomografii emisyjnej (PET) w diagnostyce zapaleń dużych naczyń – przegląd dotychczasowych badań. *Reumatologia* 43: 26-30
76. Cerchia L, Hamm J, Libri D, Tavitian B, de Franciscis V (2002) Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett* 528: 12-16
77. Lee JF, Hesselberth JR, Meyers LA, Ellington AD (2004) Aptamer database. *Nucleic Acids Res* 32: 95-100

Aptamers in clinical diagnostics

Adam Szpechciński[✉], Alina Grzanka

UMK, Department of Histology and Embriology, L. Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun, 24 M. Karłowicza St., 85-092 Bydgoszcz, Poland

[✉]e-mail: adam_szpehcinski@cm.umk.pl

Key words: aptamers, combinatorial chemistry, *in vitro* selection, SELEX, molecular recognition, clinical diagnostics

ABSTRACT

Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotides selected *in vitro* from combinatorial libraries in a process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). Aptamers play a role of artificial nucleic acid ligands that can recognize and bind to various organic or inorganic target molecules with high specificity and affinity. They can discriminate even between closely related targets and can be easily chemically modified for radioactive, fluorescent and enzymatic labeling or biostability improvement. Aptamers can thus be considered as universal receptors that rival antibodies in diagnostics as a tool of molecular recognition. To date aptamers have been successfully used instead of monoclonal antibodies in flow cytometry, immunochemical sandwich assays and *in vivo* imaging as well to detect wide range of small or large biomolecules.

Badania struktury i funkcji prokariotycznych topoizomeraz klasy II szansą dla poszukiwania i syntezy nowych leków przeciwbakteryjnych

STRESZCZENIE

Bakteryjne topoizomerazy typu II są enzymami niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania genomu i wzrostu komórek. Gyraza jest odpowiedzialna za utrzymanie stanu negatywnego superskręcenia DNA w komórce, natomiast topoizomeraza IV za rozdzielanie splecionych chromosomów po replikacji (dekatenaacji). Topoizomerazy typu II posiadają miejsce wiązania ATP, które może być wykorzystane jako cel dla leków przeciwbakteryjnych. Poznanie struktur krystalicznych fragmentów białek zawierających miejsce wiązania ATP sprzężone z ADPNP czy antybiotykami pozwoliło określić naturę tego miejsca i zrozumieć mechanizm działania obecnych leków przeciwbakteryjnych, a także przyczynia się do opracowywania nowych antybiotyków. Kumaryny, chinoliny, cyklotialidyny to różne klasy leków przeciwbakteryjnych, dla których wspólnym celem są topoizomerazy typu II, jednak mechanizm ich działania jest zasadniczo odmienny. Ostatnio scharakteryzowano nową klasę antybiotyków o nazwie symocyklinony. Działają one w zupełnie inny sposób na gyrazę DNA, co może przyczynić się do wynalezienia nowych skuteczniejszych leków przeciwbakteryjnych.

WPROWADZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie genomu prokariotycznego możliwe jest, między innymi, dzięki obecności specyficznej grupy enzymów zwanych topoizomerazami DNA. Topoizomerazy DNA stanowią maszynę komórkową, zarządzającą stanem topologicznym DNA w żywej komórce. Mają one zdolność relaksowania negatywnych i pozytywnych superskręć oraz wprowadzania zarówno negatywnych (bakteryjna gyraza DNA), jak i w niektórych przypadkach, pozytywnych superskręć (odwrotna gyraza). Poza wpływem na poziom superskręcenia zamkniętej domeny DNA, aktywność topoizomeraz może prowadzić do katenacji lub dekatenaacji kolistych cząsteczek DNA oraz do rozplątywania nawiniętych liniowych chromosomów [1,2].

Topoizomerazy to enzymy, które spełniają swe funkcje poprzez przemieszczenie jednej nici przez pęknięcie powstałe w drugiej nici (typ I) lub przeniesienie fragmentu dupleksu przez przerwę wygenerowaną w dwuniciowym DNA (typ II) [3]. W komórce *Escherichia coli* można wyróżnić cztery enzymy należące do dwóch klas. Są to topoizomerazy I i III, należące do klasy IA oraz topoizomerazy II i IV, należące do klasy IIA [4]. Topoizomeraza II, zwana gyrazą, jako jedyna jest w stanie wprowadzać negatywne superskręty kosztem hydrolizy ATP i jest odpowiedzialna za globalne generowanie negatywnych superskręć w chromosomie bakteryjnym. Z kolei topoizomeraza IV, wykorzystując energię z hydrolizy ATP, rozdziela zaplecione wzajemnie siostrzane chromosomy po replikacji (dekatenaacja), może także relaksować zarówno pozytywne jak i negatywne superskręty [2-4].

TYP II BAKTERYJNYCH TOPOIZOMERAZ DNA

Topoizomerazy należące do typu II charakteryzują się określonymi cechami wspólnymi dla tej grupy enzymów. Są to białka, których aktywną formę stanowi dimer wiążący dupleks DNA i tnący nici w miejscach znajdujących się naprzeciwko siebie. Podczas cięcia DNA każda podjednostka dimeru wiąże się poprzez mostek fosfotyrozynowy do końca 5' dupleksu za pomocą wiązania kowalencyjnego. Zmiana konformacyjna, powstająca w wyniku cięcia, powoduje wygenerowanie przerwy w obszarze DNA zwanym segmentem G (ang. *gate*). Drugi fragment tej samej lub innej cząsteczki DNA zwany segmentem T (ang. *transport*) jest przenoszony przez segment G. Reakcja wymaga obecności jonów Mg^{+2} oraz hydrolizy ATP do prawidłowego przebiegu [4-6].

Występująca powszechnie we wszystkich komórkach bakterii gyraza DNA jest enzymem składającym się z dwóch podjednostek, a mianowicie GyrA i

Michał Pietrusiński¹

Paweł Stączek^{2,✉}

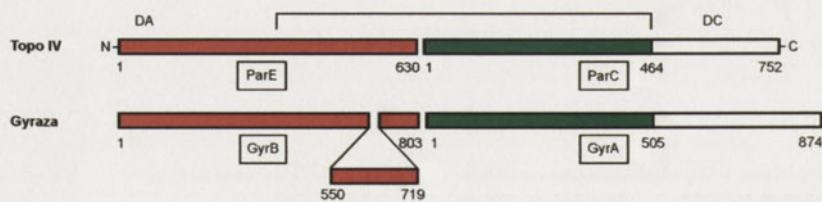
¹Zakład Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź
²Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Uniwersytet Łódzki, Łódź

✉ Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: pstaczek@biol.uni.lodz.pl, tel. (042) 635 44 66

Artykuł otrzymano 12 grudnia 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 6 marca 2006 r.

Słowa kluczowe: gyraza, topoizomeraza IV, kumaryny, chinolony, symocyklinon D8

Wykaz skrótów: ADPNP – 5'-adenylo- β,γ -imidodifosforan; analog ATP



Rycina 1. Porównanie organizacji gyrazy DNA i topoiomerazy IV *Escherichia coli*. Klamrą zaznaczono domenę wiążącą i tnącą DNA. DA – domena ATP-azowa, DC – domena C-końcowa.

GyrB. Podjednostki tworzą tetrametr A_2B_2 , stanowiący aktywną formę enzymu [7].

Podjednostka GyrA kodowana jest przez gen *gyrA* o długości 2625 pz. Białko GyrA składa się z 874 reszt aminokwasowych, a jego masę cząsteczkową szacuje się na 97 kDa. W skład podjednostki GyrA wchodzi dwie domeny. Domena N-końcowa, o masie cząsteczkowej 59–64 kDa, jest zaangażowana w cięcie DNA i jego późniejsze łączenie. Domena C-końcowa, o masie cząsteczkowej 33 kDa, jest odpowiedzialna za przyłączanie enzymu do dupletu DNA [7,8].

Podjednostka GyrB jest kodowana przez gen *gyrB* o długości 2412 pz. Białko GyrB składa się z 803 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi 90 kDa. Podobnie jak białko GyrA, podjednostka GyrB składa się z dwóch domen. Domena N-końcowa, o masie 43 kDa, ma aktywność ATP-azy. Domena C-końcowa, o masie 47 kDa, odpowiada za interakcje z DNA oraz podjednostką GyrA. W mniejszej domenie białka GyrB można wyróżnić subdomenę o masie 24 kDa, charakteryzującą się wysokim powinowactwem do antybiotyków kumarynowych [7,8].

Drugim enzymem należącym do tej grupy topoiomeraz jest topoiomeraza IV, kodowana przez geny *parC* i *parE*. Gen *parC* koduje białko składające się z 752 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi blisko 84 kDa. Gen *parE*, z kolei, koduje białko składające się z 630 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej powyżej 70 kDa [8,9]. Podjednostki ParC i ParE wykazują wysoki stopień podobieństwa organizacji do, odpowiednio, podjednostki GyrA i GyrB [10] (Ryc. 1).

ParE:	1	MTQTYHADAIIEVLTGLEPVRERPCMYT ----DTTRPNHLGQEVIDNSVDEALAGHAKRVD	56
GyrB:	1	M+ +Y++ +I+VL GL+ VR+RPGMY D T +H+ EV+DN++DEALAGH K +	60
ParE:	57	VILHADQSLFVIDDGRMPVDIHPPEGVPAVELILCLRLEHAGGKFSNKYQFSGGLEHGVGI	116
GyrB:	61	VTIHADNSVSVQDDGRGIPGTHPEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDNSYKVSGLLEHGVGV	120
ParE:	117	SVVHALSKRVEVNRDQVYNIAPFENGKQDLQVVGTCGERNTGTSVHFWD-ETFFD	175
GyrB:	121	SVVHALSQKLELVIQREGKIHRIYEHGVPQAPLAVTGETEK--TGTMVRVFWPSELTFTN	178
ParE:	176	SPRFSVSRLETHVLEAKAVLCPGVEITFKEINNTQRWCYQD	117
GyrB:	179	VTEFEYRILAKRRLRELSFLNSGVSIRLRDRDKGKEDHFRYEG	220

Rycina 2. Porównanie N-końcowych sekwencji ParE i GyrB. Aminokwasy zaznaczone pomiędzy liniami ParE i GyrB wskazują na identyczność sekwencji, natomiast znaki plus wskazują na podobieństwo strukturalne reszt aminokwasowych. W kolorze zielonym zaznaczono podstawniki ważne dla wiązania ATP, z kolei na czerwono podstawniki zaangażowane w wiązanie nowobiocyny. Kolorem niebieskim wyróżniono podstawniki wiążące zarówno ATP jak i antybiotyki.

W roztworach, podjednostki GyrA i ParC tworzą dimery, natomiast podjednostki GyrB i ParE pozostają w formie monomerów [10,11]. Funkcjonalne enzymy występują jako heterotetramery w postaci $GyrA_2GyrB_2$ oraz $ParC_2ParE_2$ [3]. Podczas wiązania ATP, podjednostki GyrB i ParE dimeryzują, co prawdopodobnie jest jednym z kluczowych elementów w proponowanym mechanizmie działania topoiomerazy DNA [4,6,12].

Podjednostki GyrA i ParC mają znaczenie przy wiązaniu DNA, a także jego cięciu i ponownym łączeniu [10,11]. Działanie wszystkich topoiomeraz opiera się na zasadzie utworzenia mostka fosfotyrozynowego, pomiędzy tyrozyną znajdującą się w aktywnym miejscu, a szkieletem DNA [3-5]. Podstawnik tyrozynowy znajduje się w pozycji 122 aminokwasu w przypadku GyrA [8], natomiast w przypadku ParC w pozycji 120 [8,13]. Zarówno gyraza, jak i topoiomeraza IV tną w sposób specyficzny, tworząc wolny koniec 3'OH i czteronukleotydu lepki koniec od strony 5' [8,10]. GyrB odpowiada za wiązanie ATP i jego hydrolizę [14]. Bazując na fakcie wysokiego podobieństwa sekwencji aminokwasowej pomiędzy GyrB i ParE można wywnioskować, że ParE pełni podobną rolę dla topoiomerazy IV, co GyrB dla gyrazy [8] (Ryc. 2).

W procesie wprowadzania negatywnych superskrętów przez gyrazę, sposób wiązania enzymu z DNA ma kluczowe znaczenie. DNA zostaje owinięty wokół enzymu w orientacji prawoskrętnej. Około 140 pz DNA bezpośrednio styka się z enzymem, z czego około 40 pz położonych centralnie jest najbardziej odporne na trawienie DNazą I [8]. Za wiązanie DNA i wprowadzanie ujemnych superskrętów, odpowiada w głównej mierze domena C-końcowa podjednostki GyrA [11]. Orientacja prawoskrętna DNA owiniętego na rdzeniu enzymu pozwala wywnioskować, że gyraza powinna wiązać się z najwyższym powinowactwem do pozytywnie superskręconego, następnie zrelaksowanego i negatywnie superskręconego DNA [3,15].

Gyraza może katalizować reakcję usuwania pozytywnych superskrętów na zasadzie: jeden pozytywny superskręt jest zamieniany na jeden negatywny superskręt. Jednakże jej aktywność jest wówczas co najmniej 30-krotnie mniejsza, niż w przypadku wprowadzania negatywnych superskrętów na zrelaksowanym DNA. Poza ATP-zależną relaksacją pozytywnych superskrętów, enzym ten może katalizować reakcję usuwania negatywnych superskrętów w sposób ATP-niezależny [14,16]. Reakcja ta zachodzi z około 40-krotnie mniejszą częstością i nie jest hamowana przez antybiotyki kumarynowe, które współzawodniczą z ATP o miejsce wiązania w enzymie [11,17].

Topoiomeraza IV ma najwyższe powinowactwo do negatywnie superskręconego

DNA. Związana z DNA, nie powoduje jego owijania się wokół enzymu w orientacji prawoskrętnej, a region oporny na działanie DNazy I ma zaledwie 34 pz [9]. W obecności ATP relaksuje negatywne superskręty, jednak ze znacznie mniejszą wydajnością, niż w reakcji dekatenuacji kolistych cząsteczek DNA. Ponadto, topoiizomeraza IV ma zdolność relaksowania pozytywnych superskrętów w reakcji ATP-zależnej, jednak jej aktywność jest 30-krotnie niższa, niż w przypadku rozdzielania połączonych cząsteczek DNA (katenatów) [18]. Dekatenacja cząsteczek DNA jest najważniejszą funkcją tego enzymu pełnioną *in vivo* [19].

N-KOŃCOWA DOMENA PODJEDNOSTKI GyrB I ParE

Poznanie struktury krystalicznej podjednostki GyrB sprzężonej z ADPNP pozwoliło wysunąć wnioski, że strukturę kompleksu stanowią dwie domeny 43 kDa, tworzące dimer oraz po jednej cząsteczce ADPNP przypadającej na monomer GyrB. Każda domena 43 kDa zawiera dwa regiony: N-końcowy, który stanowi 8-łańcuchowa β -harmonijka oraz 5 α -helis, natomiast C-końcowy składa się z 4-łańcuchowej β -harmonijki oraz 4 α -helis. Ponadto w obecności ATP lub jego analogu domena ATP-azowa GyrB dimeryzuje, przy czym ADPNP łączy się z białkiem zarówno poprzez N-koniec jak i C-koniec. Podczas dimeryzacji obu domen dochodzi do powstania zagłębienia pomiędzy monomerami, którego podstawę tworzą długie α -helisy C-końcowych regionów domen 43 kDa podjednostki GyrB. Jak się później okazało, w zagłębieniu znajdują się podstawniki arginino-we, posiada ono także wymiary umożliwiające swobodne umieszczenie podwójnej nici DNA. Z kolei N-końcowy region jednego monomeru, owija się wokół drugiego monomeru, eksponując kluczowy podstawnik odpowiedzialny za wiązanie ATP, tj. resztę tyrozynową w pozycji piątego aminokwasu (Tyr⁵) [12].

Dzięki eksperymentom z wykorzystaniem krystalografii strukturalnej, możliwa stała się ocena udziału hydrolizy ATP podczas jednego cyklu działania enzymu, a także lokalizacja miejsca, w którym uwięziony zostaje fragment dupleksu DNA [20]. Co więcej, udało się zaproponować ogólny, a zarazem najbardziej prawdopodobny model działania topoiizomerazy typu II, według którego, na skutek dimeryzacji dwóch domen podjednostek GyrB, powstaje białkowy zatrząsk, którego działanie zależy od ATP [5,6]. W końcu, dane pochodzące z krystalografii, okazały się być bardzo cenne w zrozumieniu mechanizmu oddziaływania różnego rodzaju związków o charakterze przeciwbakteryjnym z miejscem wiązania ATP [12].

Podobnie jak w przypadku podjednostki GyrB gyrazy, N-końcowa domena 43 kDa podjednostki ParE, zawierająca miejsce wiązania ATP, dimeryzuje w obecności ADPNP. Związek ten wiąże się z poszczególnymi monomerami ParE tworzącymi dimer. Każdy monomer ParE zawiera dwie subdomeny: N-końcową (podstawniki od 1 do 217), składającą się z 8-łańcuchowej β -harmonijki oraz 5 α -helis i subdomenę C-końcową (podstawniki 218 do 390), składającą się z 4-łańcuchowej β -harmonijki oraz 4 α -helis. Podobnie jak w przypadku GyrB, dimer ParE stabilizowany jest przez N-końcowe ramię (podstawniki 1 do 15) jednego monomeru, które owija się wokół drugiego monomeru, eksponując

konserwatywny ewolucyjnie aminokwas Tyr⁵. Z kolei C-końcowe domeny, tworzą zagłębienie otoczone długimi α -helisami po obu stronach dimeru, które odpowiedzialne jest za umieszczenie segmentu T DNA w pobliżu segmentu G DNA [21].

Strukturalne podobieństwo, występujące pomiędzy podjednostką GyrB gyrazy a ParE topoiizomerazy IV, pozwoliło zaliczyć oba enzymy do zróżnicowanej rodziny białek, zwanej rodziną GHKL (ang. *Gyrase*, *Hsp90*, *Histidine Kinases*, *MutL*). Wszystkie białka należące do rodziny GHKL posiadają zbliżoną trójwymiarową budowę miejsca wiążącego ATP [22]. Do rodziny białek GHKL przypisać można, na zasadzie podobieństwa sekwencyjnego pomiędzy domenami ATP-azowymi, wszystkie topoiizomerazy typu II (w tym eukariotyczną topo II). Jednakże w skład rodziny, oprócz GyrB, wchodzi także inne białka, których funkcja jest zupełnie odmienna, a mianowicie: bakteryjne białko MutL oraz białka MLH i PMS ssaków, należące do systemu naprawy błędnie sparowanych zasad. Rodzinę GHKL stanowią także białka pomocnicze Hsp90 człowieka, a także mitochondrialne kinazy BCK oraz kinazy histydynowe, np. białko CheA bakterii, odpowiedzialne za chemotaksję [22].

Warto zauważyć, że strukturalne podobieństwo, występujące pomiędzy poszczególnymi białkami należącymi do rodziny GHKL, może mieć bardzo niekorzystny wpływ na skuteczność stosowania niektórych leków. Leki przeciwbakteryjne, których działanie opiera się na blokowaniu dostępu ATP do miejsca wiązania w enzymie, mogą również negatywnie wpływać na zasadnicze funkcje białek należących do rodziny GHKL.

MECHANIZM DZIAŁANIA

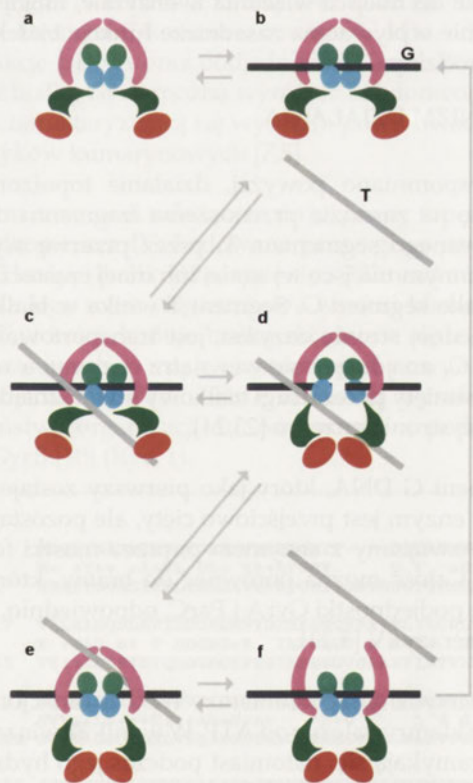
Jak wspomniano powyżej, działanie topoiizomerazy II opiera się na zasadzie przenoszenia fragmentu dupleksu DNA, zwanego segmentem T, przez przerwę wygenerowaną w innym miejscu tej samej lub innej cząsteczki DNA, zwanej jako segment G. Segment T wnika w białkowy otwór po jednej stronie enzymu, jest transportowany przez segment G, znajdujący się wewnątrz enzymu, a następnie zostaje usunięty przez drugi białkowy otwór, znajdujący się po drugiej stronie enzymu [23,24].

Fragment G DNA, który jako pierwszy zostaje związany przez enzym jest przejściowo cięty, ale pozostaje kowalencyjnie związany z enzymem poprzez mostki fosfotyrozynowe. Całość można porównać do bramy, której wrota stanowią podjednostki GyrA i ParC, odpowiednio, gyrazy i topoiizomerazy IV [5,23].

Prokariotyczne topoiizomerazy typu II funkcjonują jako białkowe klamry zależne od ATP. W wyniku wiązania ATP klamry zamykają się, natomiast podczas jego hydrolizy, w następstwie uwolnienia ADP oraz ortofosforanu, dochodzi do ich otwarcia [25]. W obecności ATP, N-końcowe domeny podjednostek GyrB i ParE dimeryzują i to prawdopodobnie one tworzą szczęki białkowego zatrząsku (ang. *N-gate*). W wyniku zatrzaśnięcia się klamry, segment T może zostać uwięziony wewnątrz, a następnie przeniesiony przez związany z białkami, przecięty segment G [6,23].

Podsumowując działanie topoizomeraz typu II, według przedstawionego na Ryc. 3 modelu, można wyróżnić kilka etapów. Początkowo gyraza jak i topoizomeraza IV wiążą się z DNA (Ryc. 3b). Podjednostki GyrB lub ParE dimeryzują w obecności ATP, zamykając tym samym segment T wewnątrz enzymu (Ryc. 3c, d). Segment T zostaje przeniesiony przez przerwę w dwuniciowym DNA wygenerowaną w segmencie G (Ryc. 3e). Segment T zostaje uwolniony na zewnątrz przez drugi otwór białkowy utworzony z podjednostek GyrA lub ParC (ang. *C-gate*), (Ryc. 3f). Hydroliza ATP i uwolnienie ADP i ortofosforanu ponownie otwiera kleszcze białkowe (*N-gate*) przygotowując enzym na przyjęcie kolejnego fragmentu dupleksu DNA (Ryc. 3a) [5,6,23].

Jakkolwiek mechanizm działania topoizomeraz typu II został dobrze poznany, rola hydrolizy ATP wymaga bardziej szczegółowych wyjaśnień. Jak wiadomo, hydroliza ATP wymagana jest w reakcjach, które są niekorzystne z energetycznego punktu widzenia. W przypadku gyrazy, konieczność obecności ATP jest więc oczywista. Gyraza wprowadza negatywne superskręty w DNA, na drodze niekorzystnej energetycznie reakcji, hydrolizując równocześnie ATP. Topoizomeraza IV nie ma zdolności wprowadzania superskrętów, tylko relaksuje DNA w sposób ATP-zależny. Przyjmując, że jest to reakcja korzystna energetycznie nie jest jasne dlaczego wymaga ATP. Analiza reakcji dekatena-



Rycina 3. Proponowany mechanizm działania topoizomeraz typu II (opis w tekście). Na rysunku zaznaczono kolorami: czerwonym – domeny ATP-azowe; ciemnozielonym – domeny wiążące DNA; niebieskim – C-końcowe fragmenty podjednostek GyrB; jasnozielonym – regiony zawierające reszty tyrozynowe; ciemnoróżowym – fragmenty podjednostek GyrA. G i T – segmenty DNA biorące udział w reakcji

cji i relaksacji DNA przez topoizomerazy typu II ujawniła, że enzymy te mogą generować nierównowagową dystrybucję topoizomerów [26]. To zachowanie może być wytłumaczone faktem obecności ATP, którego hydroliza pozwala na przeprowadzenie reakcji z dala od miejsca równowagi.

Po odkryciu gyrazy DNA wykazano, że aktywność ATP-azy posiada podjednostka GyrB. Następnie udowodniono, że do hydrolizy ATP potrzeba zarówno enzymu, jak i DNA, bowiem obecność samego białka nie zapewnia przebiegu reakcji na wymaganym poziomie [27]. Fragment DNA niezbędny dla wysokiej aktywności enzymu musi posiadać co najmniej 100 pz [27]. Można stąd wnioskować, że stymulacja aktywności ATP-azy wymaga obecności zarówno segmentu G jak i T [12].

Związanie ATP przez gyrazę jest wystarczające aby wprowadzić pewną ilość superskrętów, jednak poziom superskręcenia jest zależny od gęstości superhelikalnej DNA. Potwierdza to model sugerujący, że związanie nukleotydów zawsze prowadzi do uwięzienia segmentu T przez białkowy zatrzask (*N-gate*) zależny od ATP. Jednak następujące po sobie reakcje przeniesienia fragmentów nici przez wygenerowane przerwy zależą od gęstości superhelikalnej DNA [28].

Badania nad poziomem superskręcenia wskazują, że gęstość superhelikalna $\sigma \sim -0.11$ jest maksymalną wartością ujemnego superskręcenia, którą może wprowadzić enzym, a ograniczona jest ilością wolnej energii wyzwolonej podczas hydrolizy ATP oraz poziomem napięcia torsyjnego generowanego w DNA [29]. Ostatni etap wprowadzania superskrętów wymaga dostarczenia ~ 116 kJ/mol wolnej energii, co odpowiada hydrolizie dwóch cząsteczek ATP. Na jeden cykl zmiany stanu superskręcenia, GyrB musi związać dwie cząsteczki ATP, jednak hydroliza ATP nie jest konieczna w przypadku obu podjednostek GyrB tworzących dimer [12,30].

W celu zrozumienia charakteru podjednostki GyrB, a zwłaszcza jej roli w hydrolizie ATP, przeprowadzono wiele eksperymentów z użyciem ukierunkowanej mutagenety. Do badań wybrano zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe, które znajdują się w bezpośrednim otoczeniu miejsca wiązania ATP. Pierwszą przebadaną resztą aminokwasową była Glu⁴². Z danych strukturalnych wynika, że podstawnik ten leży blisko γ -fosforanu związanej cząsteczki ATP. Jego funkcja polega na aktywacji cząsteczki wody do ataku nukleofilowego na γ -fosforan ATP [31]. Mutacja prowadząca do substytucji tej reszty aminokwasowej resztami Ala lub Gln (Glu⁴² do Ala lub Gln), znacząco obniża aktywność enzymu, natomiast substytucja Asp nie ma bezpośredniego wpływu, co wskazuje, że dla katalizy bardzo ważne znaczenie ma reszta kwasu karboksylowego. Ponadto łańcuch boczny aminokwasu spełnia istotną rolę w funkcjonowaniu białka [32].

Wszystkie mutacje prowadzące do zastąpienia Asn⁴⁶ resztami Ala, Asp, Glu czy Gln objawiają się całkowitym brakiem aktywności ATP-azowej i zdolności superskręcenia DNA [33]. Jest to zasadne, ponieważ Asn⁴⁶ jest zachowany w ewolucji wszystkich topoizomerazach typu II, a jego

łańcuch boczny spełnia kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu enzymu. Dane strukturalne wskazują, że aminokwas ten koordynuje pracę jonów Mg^{2+} w miejscu wiązania ATP [32,34].

Badania krystalograficzne udowodniły, że Glu^{50} i Arg^{76} oddziałują między sobą, tworząc fragment zagłębienia dla wiązania reszty adenylowej z ATP (a także nowobiocyny). Substytucja Glu^{50} do Asp i Gln charakteryzuje się, praktycznie zupełnym zanikiem zdolności do hydrolizy ATP. Dane te sugerują, że istotne znaczenie ma nie tylko reszta kwasu karboksylowego, ale również łańcuch boczny aminokwasu. Podobnie objawia się substytucja Arg^{76} do Ala czy Lys . Enzym traci znacząco zdolność hydrolizy ATP, natomiast staje się całkowicie niezdolny do wprowadzania superskrętów, co dowodzi konieczności występowania Arg w tym miejscu [32].

Asp^{73} tworzy bezpośrednie wiązanie wodorowe z adenozyną pochodzącą z ATP. Zamiana tego podstawnika na Ala czy Asn , kończy się utratą właściwości ATP-azy, jak i zdolności do wprowadzania superskrętów do DNA [33]. Interesujący jest fakt, że substytucja Asp do Glu nie wpływa znacząco na obie aktywności $GyrB$ *in vitro*, jednak *in vivo* skutecznie zakłóca pracę enzymu. Jest to spowodowane obecnością dłuższego łańcucha bocznego w przypadku Glu , co uniemożliwia prawidłowe ułożenie adeniny z ATP w miejscu wiązania. Te same wyniki zostały uzyskane w przypadku oddziaływań z nowobiocyną [32].

Z danych strukturalnych wynika, że Gly^{77} umiejscowiona jest bardzo blisko adeniny pochodzącej ze związanego ATP. Dodanie jednej grupy metylowej, poprzez zamianę tego aminokwasu na alaninę, niemal całkowicie pozbawia enzym aktywności [32].

Substytucja Ile^{78} do Ala charakteryzuje się utratą powinowactwa do ATP, jak i zdolności do jego hydrolizy, jednakże enzym nie traci całkowicie zdolności do wprowadzania superskrętów *in vivo*. Zdolność przeprowadzenia reakcji hydrolizy ATP może zostać częściowo przywrócona poprzez wprowadzenie w pozycji 78 reszty aminokwasowej Leu bądź Val zamiast Ala . Spowodowane jest to faktem, że oba aminokwasy posiadają hydrofobowy łańcuch boczny, dowodząc tym samym, że oddziaływania hydrofobowe są niezbędne przy wiązaniu ATP [32].

Interesujące dane płyną z badań nad substytucjami Pro^{79} do Ala i Lys^{103} do Ala . Okazało się bowiem, że mutanty są zdolne do hydrolizy ATP, jednak nie są w stanie zmieniać stanu superskręcenia DNA. Wynika z tego, że łańcuchy boczne tych aminokwasów są zaangażowane w przekształcenie energii z hydrolizy ATP na aktywność wprowadzania superskrętów. Innymi słowy, mutanty nie są zdolne efektywnie wykorzystać energii z hydrolizy ATP. Prawdopodobnie spowodowane jest to nieprawidłowym działaniem białkowego zatrasku, ponieważ oba mutanty zdolne są do relaksacji superskręconego DNA na drodze niezależnej od ATP, na podobnym poziomie co szczep dziki. Zarówno Pro^{79} jak i Lys^{103} są zachowanymi w ewolucji resztami aminokwasowymi we wszystkich topoizomerazach typu II. Przypuszcza się, że oba aminokwasy funkcjonują jako czuj-

niki wykrywające, w którym momencie nastąpiła hydroliza ATP [32].

W przypadku substytucji Val^{120} do Ala , nieznacznie zwiększa się powinowactwo do ATP, ze względu na usunięcie bocznego łańcucha hydrofobowego. Z badań strukturalnych wynika, że łańcuch boczny waliny znajduje się w pobliżu α -fosforanu związanej cząsteczki ATP, a jego usunięcie może przybliżyć cząsteczkę ATP do podjednostki $GyrB$. Główną rolą Val^{120} jest więc wiązanie ATP [32].

Dane krystalograficzne dotyczące białek *E. coli* pokazują, że grupa guanidynowa Arg^{136} jednej podjednostki $GyrB$ tworzy wiązanie wodorowe z głównym łańcuchem grupy karbonylowej, pochodzącej z N-końcowej części drugiej podjednostki $GyrB$ [35]. N-końcowa część zawiera około 14 reszt aminokwasowych, które są niezbędne w procesie dimeryzacji i aktywacji centrum katalitycznego enzymu [36]. Utrata łańcucha bocznego Arg^{136} w wyniku substytucji do Ala , objawia się obniżeniem zdolności oddziaływania między podjednostkami, a przez to hydrolizy ATP [32].

Jedną z najważniejszych reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie ATP jest Thr^{165} . Jest to reszta aminokwasowa zachowana w ewolucji we wszystkich podjednostkach $GyrB$. Jego substytucja resztą alaninową, prowadzi do obniżenia zdolności wiązania ATP, natomiast mutacja wprowadzająca resztę serynową, z powrotem przywraca funkcjonalność enzymu. Wynika z tego, że kluczową rolę w wiązaniu ATP pełni grupa hydroksylowa tego aminokwasu. Ponadto, grupa hydroksylowa bocznego łańcucha Thr^{165} uczestniczy w tworzeniu sieci wiązań wodorowych z azotem N-7 pierścienia adeniny [32,34].

Konieczność przeprowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem techniki ukierunkowanej mutagenyzy wynikała z faktu, że miejsce wiązania ATP w gyracie, pokrywa się z miejscem działania leków, dla których topoizomerazy są celem. Użycie mutantów pozwoliło zdefiniować naturę aktywnego miejsca w enzymie, a także dać podstawy do racjonalnego uzasadnienia mechanizmu oporności na działanie tych leków. W tym rodzaju oporności bakteryjnej na antybiotyki, białkowy cel jest modyfikowany w taki sposób, że jego inhibitor nie może się z nim wiązać efektywnie. Ten typ oporności jest charakterystyczny dla antybiotyków, które tworzą kluczowe wiązania z aminokwasami nie mającymi znaczenia dla katalitycznej funkcjonalności enzymu. Do tych antybiotyków niewątpliwie należą kumaryny, jako że ich miejsca wiązania z $GyrB$ oraz $ParE$ nie pokrywają się całkowicie z miejscem wiązania ATP, a jedynie częściowo zachodzą na siebie [37].

TOPOIZOMERAZY KLASY II JAKO CELE DLA LEKÓW

Ogromne zainteresowanie topoizomerazami w ostatnich latach, wynika nie tylko z ich kluczowej roli w kontrolowaniu topologii DNA w komórce, ale także z odkrycia różnorodnych leków, dla których topoizomerazy są molekularnymi celami. Należą do nich rozmaite leki antibakteryjne, a także chemioterapeutyki przeciwnowotworowe, z których wiele znalazło już szerokie zastosowanie w leczeniu klinicznym.

W przypadku komórek prokariotycznych, topoizomery DNA okazały się być bardzo skutecznym celem dla rozmaitych leków przeciwbakteryjnych, współzawodniczących z ATP o miejsce wiązania w enzymie (kumaryny, cyklotialidyny) [37,38] oraz stabilizujących kompleks DNA – topoizomeraza na etapie cięcia DNA (tzw. kompleks przecinalny) (chinolony i ich pochodne, mikrocyna B17) [38]. Topoizomerazy eukariotyczne mogą być równie skutecznym celem molekularnym dla niektórych leków przeciwnowotworowych [12].

Wiadomo, że jednym z kluczowych etapów działania wszystkich topoizomerazy DNA jest czasowe cięcie jednej bądź obu nici dupleksu aby umożliwić przeniesienie fragmentu DNA przez wygenerowaną przerwę. Prawidłowa stabilizacja tak utworzonej przerwy, przez formowanie fosfotyrozynowych mostków pomiędzy enzymem a DNA, ma ogromne znaczenie przy ponownym odtwarzaniu ciągłości nici. Z kolei uniemożliwienie ponownej ligacji DNA, skutkuje jego nieodwracalnym uszkodzeniem, a w konsekwencji śmiercią komórki. Leki, które mają zdolność stabilizowania kompleksu przecinalnego, mogą być szeroko wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej. Należą do nich między innymi kamptotecyny oraz jej pochodne, amsakryna, a także epipodofylotoksyny takie jak etopozyd czy tenipozyd. Te ostatnie okazały się być bardzo skutecznymi lekami w terapii przeciwnowotworowej, których celem jest topoizomeraza II człowieka. Pomimo niewielu podobieństw do antybiotyków kumarynowych czy cyklotialidyn, które nie dopuszczają do uwolnienia energii z hydrolizy ATP, wykazano, że etopozyd może również współzawodniczyć z ATP o miejsca wiązania w topoizomerazie II człowieka [12]. Jednak ostateczne udowodnienie czy epipodofylotoksyny istotnie, oprócz zdolności stabilizowania kompleksu przecinalnego, blokują również dostęp do domeny ATPazowej topoizomerazy typu II, wymaga dalszych badań.

Gyraza i blisko z nią spokrewniona topoizomeraza IV są celami dla trzech grup związków o działaniu przeciwbakteryjnym: chinolonów [39], antybiotyków cyklotialidynowych oraz kumarynowych [37], a także niezgrupowanych w wyżej wymienionych klasach, np. mikrocyn B17 [40]. Chinolony, takie jak kwas nalidyksynowy czy ciprofloksacyna, a także mikrocyna B17, działają zakłócając proces cięcia i ligacji DNA przez gyrazę. Antybiotyki cyklotialidynowe i kumarynowe funkcjonują w zupełnie inny sposób, blokując hydrolizę ATP, katalizowaną przez podjednostkę GyrB. Struktura krystaliczna kompleksów topoizomerazy z tymi antybiotykami wskazuje, że pomimo zasadniczych różnic w budowie pomiędzy nimi a ATP, wiążą się one w miejscu, które pokrywa się z miejscem wiązania ATP w enzymie. Ich działanie opiera się więc na zasadzie współzawodnictwa z ATP o miejsce wiązania w enzymie [33,38,41].

Chinolony to grupa antybiotyków otrzymywanych całkowicie na drodze syntetycznej. Mimo, że ich powinowactwo w stosunku do topoizomerazy nie jest tak silne jak w przypadku kumaryn, są one szeroko wykorzystywane jako czynniki przeciwbakteryjne. Blokują replikację DNA, oddziałując na etap cięcia i ligacji DNA, uniemożliwiając przez to topoizomerażom pełnienie swych funkcji. Mecha-

nizm działania opiera się na stabilizacji kompleksu przecinalnego, po wytworzeniu przerwy w dwuniciowym DNA, gdzie końce 5' nici połączone są z podjednostkami GyrA poprzez mostki fosfotyrozynowe [42]. Ich toksyczność jest jednoznacznie skorelowana z pojawianiem się przerw w dwuniciowym DNA [41].

W komórkach *Escherichia coli*, mutacje nadające fenotyp oporności na chinolony występują głównie w genie *gyrA* [7]. Mutacja prowadząca do substytucji Ser⁸³ do Trp charakteryzuje się wysoką opornością na te antybiotyki, zarówno *in vivo* i *in vitro* [43]. Wiele danych wskazuje, że komórkowym celem chinolonów może być, oprócz gyrazy, również topoizomeraza IV. Mutacje nadające oporność na te antybiotyki są zlokalizowane w genie *parC* topoizomerazy IV (odpowiednik *gyrA* gyrazy). Charakterystyczną mutacją jest substytucja Ser⁸⁰ do Leu [44].

W niektórych szczepach bakterii gram-dodatnich, topoizomeraza IV może być nawet pierwszorzędowym celem, jednakże u większości gatunków jest celem drugorzędowym [38]. Zostało to potwierdzone poprzez wykorzystanie szczepu *E. coli* niosącego mutację w gyrazie, warunkującą odporny fenotyp. Okazało się, że w porównaniu z funkcjonalną gyrazą, gdzie po zadziałaniu chinolonów następuje natychmiastowa terminacja replikacji DNA, w zmutowanym szczepie tempo syntezy DNA ustaje powoli. Wy tłumaczeniem jest tutaj miejsce aktywności obu enzymów, bowiem gyraza działa przed widełkami replikacyjnymi, natomiast topoizomeraza IV za widełkami. Daje to jednoznaczną odpowiedź, dlaczego gyraza jest pierwszorzędowym celem chinolonów. Inaktywacja gyrazy przed widełkami powoduje powstanie przerwy w dwuniciowym DNA i uniemożliwia dokończenie replikacji, co prowadzi do śmierci komórki [8,44].

Mikrocyny to bogate w glicynę białka, produkowane przez filogenetycznie spokrewnione szczepy *Enterobacteriaceae*, służące do zwalczania lub hamowania wzrostu pokrewnych szczepów. Są mniejsze od klasycznych kolicyn i podlegają złożonej potrancyzacyjnej modyfikacji [45]. W wyniku oddziaływania mikrocyn na wrażliwe szczepy *E. coli*, dochodzi do natychmiastowego zatrzymania replikacji DNA, a w konsekwencji indukcji systemu SOS, degradacji DNA i śmierci komórki [38]. Mutacja nadająca fenotyp oporności na mikrocyny, jest zlokalizowana w podjednostce GyrB, dowodząc, że gyraza jest pierwszorzędowym celem tych peptydów. Jest to punktowa mutacja, która zamienia Trp w pozycji 751 reszty aminokwasowej na Arg. Co więcej, mikrocyna MccB17 jest zdolna do stabilizowania nacięć DNA, na zasadzie podobnej do działania chinolonów, jednak nie identycznej. Pełne zrozumienie działania tego typu związków, może w przyszłości przyczynić się do wynalezienia leków przeciwbakteryjnych, opierających się na zasadzie interakcji pomiędzy tymi toksynami a topoizomerażami DNA [40].

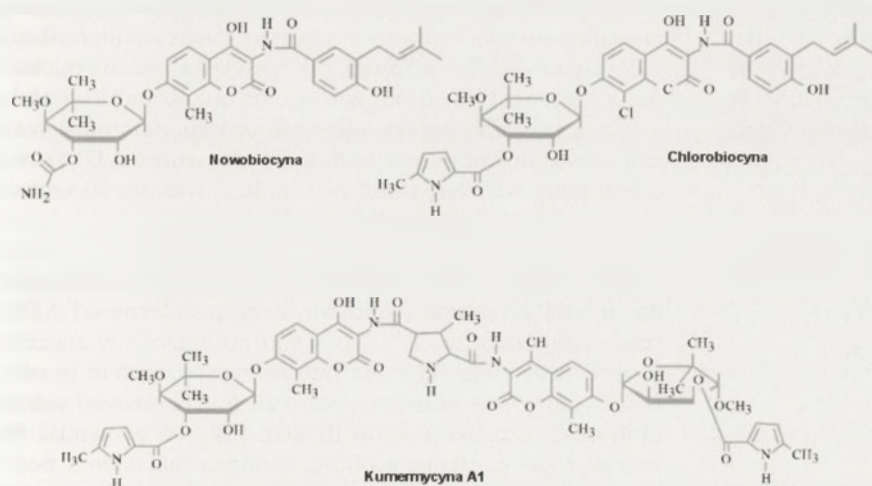
Antybiotyki z grypy cyklotialidyn są całkowicie naturalnymi produktami niektórych gatunków *Streptomyces* [46]. Zbudowane są z pierścienia laktonowego, połączonego z pentapeptydem, który zawiera 3-hydroksy prolinę i rezorcynol. Przykładem może być związek o nazwie GR122222X. Jest on słabym czynnikiem antibakteryjnym ze względu na

niską przepuszczalność przez błony [12], jednakże może być wykorzystywany jako potencjalny inhibitor gyrazy, bowiem wiąże się w pobliżu miejsca wiązania ATP, w ten sposób blokując jego hydrolizę. Warto zaznaczyć, że jego aktywność w stosunku do gyrazy jest znacznie większa, niż w przypadku nowobiocyny [12,46].

Mutacje prowadzące do powstania fenotypu opornego na cyklotialidyny są zlokalizowane w genie *gyrB* [47]. Niektóre z tych mutacji, prowadzą do wzrostu oporności nie tylko na GR122222X i jego pochodne, ale również na antybiotyki kumarynowe. Jednak substytucja Arg¹³⁶ charakterystyczna dla GyrB, pomimo że powoduje znaczny wzrost oporności na nowobiocynę, nie wpływa zasadniczo na oporność na cyklotialidyny. Badania z wykorzystaniem nowobiocyny znakowanej izotopem wykazały, że cyklotialidyny mogą współzawodniczyć z kumarynami o ich miejsce wiązania w GyrB. Wskazuje to na fakt, że miejsca wiązania obu grup leków zachodzą na siebie [48].

Poznanie struktury krystalicznej GR122222X, sprzężonego z domeną 24 kDa białka GyrB, pozwoliło oznaczyć główne wiązania wodorowe między białkiem a antybiotykiem. Większość wiązań wodorowych tworzy się między pierścieniem rezorcynolu a GyrB. Antybiotyk układa się w hydrofobowym zagłębieniu i tworzy wiązania wodorowe z resztami aminokwasowymi Asn⁴⁶, Asp⁷³, Thr¹⁶⁵. Cyklotialidyny nie umiejscawiają się dokładnie tam, gdzie przyłącza się ATP, miejsca te jedynie zachodzą na siebie. Główną rolę odgrywa właśnie pierścień rezorcynolu, nie dopuszczając do wiązania adeniny z ATP [12].

Antybiotyki kumarynowe (Ryc. 4), takie jak nowobiocyna, chlorobiocyna i kumermycyna A₁, są naturalnymi produktami niektórych promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Zbudowane są z 3-amino-4,7-dihydroksy-kumarynowego rdzenia, który jest przyłączony do cukru nowiozy. Chlorobiocyna ma identyczną budowę jak nowobiocyna, za wyjątkiem dwóch podstawników: w pozycji 8' pierścienia kumarynowego znajduje się chlor zamiast grupy metylowej, natomiast w pozycji 3'' nowiozy, zamiast grupy karbamiłowej występuje grupa 5-metylo-pirololo-2-karboksylowa.



Rycina 4. Wzory strukturalne antybiotyków kumarynowych: nowobiocyny, chlorobiocyny i kumermycyny A₁.

Kumermycyna składa się z dwóch połączonych rdzeni kumarynowych, których podstawniki cukrowe mają taki sam charakter jak w przypadku chlorobiocyny. Wszystkie te związki blokują syntezę bakteryjnego DNA poprzez inaktywację właściwości katalitycznych gyrazy. Niestety, ich terapeutyczne użycie jest ograniczone ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie, toksyczność i słabą przepuszczalność przez ściany komórek bakterii gram-dodatnich [12,38] (Ryc. 4).

Znaczący postęp w poznaniu mechanizmu działania antybiotyków kumarynowych wynika z identyfikacji i analizy sekwencji genów kodujących nowobiocynę, kumermycynę i chlorobiocynę. W przypadku nowobiocyny, geny znajdują się w skupisku genów o długości 25 kpz, obecnym w genomie *Streptomyces sphaeroides* [49]. Produkty tych genów stanowią enzymy o zarówno znanej, jak i nieznannej funkcji. Geny kodujące kumermycynę i chlorobiocynę znajdują się, odpowiednio, w genomach *Streptomyces rishiriensis* i *Streptomyces roseochromogenes*. Geny te wykazują znaczne podobieństwo sekwencyjne względem siebie, czego wynikiem jest zbliżona budowa tych związków [50].

W 1976 roku udowodniono, że nowobiocyna i kumermycyna blokują reakcję zmiany poziomu superskręcenia katalizowaną przez gyrazę [37]. Następnie dowiedziono, że te antybiotyki hamują ATPazową aktywność topoiizomeraz. Pomimo braku jakichkolwiek podobieństw między strukturą ATP a kumarynami zasugerowano, że nowobiocyna i kumermycyna działają jako inhibitory reakcji hydrolizy ATP [14]. Natura hamowania polega na współzawodnictwie antybiotyków z ATP o miejsce wiązania w enzymie. Fakt ten został udowodniony po przeanalizowaniu struktury kompleksu nowobiocyny z subdomeną 24 kDa gyrazy. Miejsca wiązania nowobiocyny i ATP zachodzą na siebie, co potwierdza powyższą hipotezę [34].

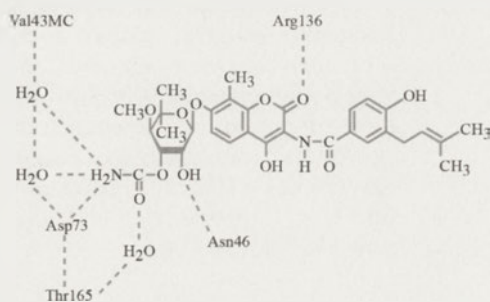
Zanim jednak opisano strukturę krystaliczną kompleksów antybiotyków kumarynowych z podjednostką GyrB, poznano pierwsze mutacje punktowe warunkujące oporność na antybiotyki. Najczęstszą mutacją nadającą oporność na kumaryny jest substytucja Arg¹³⁶ do Leu, Cys, His, Ser lub Ala, zlokalizowana w N-końcowej subdomenie GyrB. Co więcej, ten podstawnik jest zaangażowany w tworzenie kluczowego wiązania wodorowego pomiędzy białkiem a antybiotykiem. Ponadto, mutacja w pozycji 136 prowadzi do 8-16-krotnego obniżenia aktywności enzymatycznej, w porównaniu ze szczepem dzikim [51]. Wszystkie mutacje, mające niekorzystny wpływ na aktywność enzymu, znajdują się w regionie wiązania ATP. Mutacje prowadzące do zmian w pozycjach Asn⁴⁶ i Asp⁷³ powodują produkcję białka pozbawionego aktywności ATPazowej, bowiem podstawniki te są odpowiedzialne za wiązanie jonów Mg²⁺ i ATP [33].

W 1991 roku opisano strukturę krystaliczną podjednostki GyrB sprzężonej z AD-PNP, co pozwoliło na ostateczne potwier-

dzenie miejsc oddziaływań pomiędzy ATP a gyrą [35]. Późniejsze badania doprowadziły natomiast do poznania interakcji pomiędzy GyrB a nowobiocyną [12]. W przedstawionym modelu widoczny jest białkowy monomer wygięty na kształt litery V, którego domena N-końcowa kontaktuje się z powierzchnią nowobiocyny. Porównanie wyników obu prac pozwoliło wyciągnąć wnioski, że miejsca wiązania ATP i antybiotyków kumarynowych leżą blisko siebie [12].

Sklonowanie regionu DNA kodującego N-końcową subdomenę 24 kDa podjednostki GyrB *E. coli* dowiodło, że ten fragment białka może wiązać kumaryny równie mocno, co kompletna podjednostka 43 kDa i dało nowe perspektywy dla badań strukturalnych [52]. W 1996 roku została opisana struktura krystaliczna kompleksu subdomeny 24 kDa z nowobiocyną. Zachowanie się tego fragmentu jest identyczne jak w przypadku odpowiadającego mu regionu w podjednostce 43 kDa. Białko to jest monomerem zbudowanym z 8-łańcuchowej β -harmonijki, flankowanej przez 3 α -helisy i niezorganizowane pętle polipeptydowe. Związana nowobiocyna nie jest płaska lecz zagięta, co spowodowane jest wytworzeniem wiązania peptydowego pomiędzy pierścieniem kumarynowym a grupą hydroksybenzoesową, będącą w konformacji *cis*. Antybiotyk nie zajmuje tego samego miejsca co ATP, ale miejsca wiązania tych dwóch ligandów zachodzą na siebie. Część cukrowa nowobiocyny zajmuje miejsce, które pokrywa się z miejscem wiązania pierścienia adeniny z ATP [34]. Miejsce wiązania kumaryny ujawnia całą sieć wiązań wodorowych. Kluczowe wiązania wodorowe tworzą: Arg¹³⁶ z pierścieniem kumarynowym, Asp⁷³ z grupą karbamoilową cukru nowiozy oraz Asn⁴⁶ z grupą hydroksylową nowiozy. Mutacje tych trzech aminokwasów prowadzą do obniżenia zdolności wiązania antybiotyków, wpływają również negatywnie na aktywność samego enzymu (Ryc. 5) [33,38].

Antybiotyki kumarynowe mogą być także inhibitorami aktywności topoisomerazy IV w komórkach *E. coli*, jednak ich potencjał jest znacznie mniejszy w porównaniu z gyrą. W wyniku badań krystalograficznych udało się zlokalizować charakterystyczne podstawniki aminokwasowe, odpowiedzialne za wiązanie ATP oraz nowobiocyny w N-końcowej subdomenie 24 kDa ParE. Najważniejsze podstawniki biorące udział w wiązaniu ATP, to między innymi: Tyr⁵, Glu³⁸, Asn⁴², Glu⁴⁶, Asp⁶⁹, Met⁷⁴, Lys⁹⁹, Tyr¹⁰⁵, Thr¹⁶³, natomiast w wiązaniu antybiotyków główną rolę odgrywają reszty Glu⁴⁶, Asp⁶⁹, Arg⁷², Met⁷⁴, Asp⁷⁷, Ile⁹⁰, Arg¹³², Thr¹⁶³. W wyniku porównania struktur przestrzennych ParE i GyrB,



Rycina 5. Kluczowe wiązania wodorowe w stabilizowaniu kompleksu białkowego sprzężonego z antybiotykami kumarynowymi.

sprężonych odpowiednio z ADPNP i nowobiocyną, można zauważyć, że zarówno analog ATP, jak i antybiotyków, wiążą się z białkami w bardzo zbliżonej konformacji. Powyższy fakt wysokiego podobieństwa obu enzymów nie był oczywisty do czasu rozwiązania struktury krystalicznej podjednostki ParE, sprzężonej z ADPNP/nowobiocyną, bowiem z zestawienia sekwencji aminokwasowej obu białek wynika, że są one identyczne zaledwie w 35%, a podobne w 55% [21].

MECHANIZMY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI KUMARYNOWE

Za główną przyczynę wzrostu oporności bakterii na antybiotyki kumarynowe, uważa się mutacje prowadzące do modyfikacji miejsc wiązania ATP w podjednostce GyrB. Przy użyciu techniki ukierunkowanej mutagenety, zidentyfikowano reszty aminokwasowe w tej podjednostce, mające zasadnicze znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania enzymu *in vitro* i *in vivo*. Każdorazowa zmiana któregoś z tych aminokwasów na inny, powoduje znaczny wzrost oporności na nowobiocynę, przy jednoczesnym zachowaniu funkcji biologicznych enzymu *in vivo* [32].

Najczęstszą mutacją warunkującą wzrost oporności na nowobiocynę, jest substytucja Arg¹³⁶ do Cys, His, Leu lub Ser, notowana wśród wielu szczepów bakteryjnych, w tym także *Escherichia coli* [51]. W szczepie dzikim, Arg¹³⁶ tworzy bezpośrednie wiązanie wodorowe z nowobiocyną, a dokładnie, atom tlenu z cząsteczki nowobiocyny oddziałuje z resztami aminowymi guanidyny. Zamiana grupy guanidynowej na imidazolową, w przypadku substytucji Arg do His, charakteryzuje się utratą zdolności tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy antybiotykiem a enzymem, co jednoznacznie równa się ze wzrostem oporności na kumaryny. Zamiana Arg¹³⁶ na Cys, Ser lub Leu, prowadzi do jeszcze większego wzrostu oporności, co wynika z faktu, że im krótszy lub bardziej hydrofobowy jest łańcuch boczny aminokwasu, tym trudniej o wytworzenie wiązania wodorowego z antybiotykiem [32].

Aminokwas Asp w pozycji 73 odpowiada za tworzenie bezpośredniego wiązania z grupą karbamoilową cukru nowiozy [34]. Zamiana Asp⁷³ na Glu wydłuża łańcuch boczny aminokwasu o jeden atom węgla, przy zachowaniu funkcjonalnej grupy karboksylowej. Tak niewielka zmiana ma bardzo istotny wpływ na aktywność enzymu. Komórki charakteryzują się słabą przeżywalnością *in vivo*, natomiast wartość dawki nowobiocyny hamującej aktywność ATP-azową o 50% (ang. *inhibitory concentration*, IC₅₀) wzrasta 50-krotnie w stosunku do szczepu dzikiego [32].

Substytucja Gly⁷⁷ do Ser lub Ala prowadzi do ogromnego spadku aktywności enzymu. Reakcje zależne od ATP i zmiany topologiczne DNA zostają upośledzone w znaczny sposób, a objawia się to bardzo słabym wzrostem *in vivo*. Wartość IC₅₀ nowobiocyny dla reakcji ATP-azowej wśród mutantów wzrasta ponad 1000-krotnie, co prowadzi do wniosku, że zastąpienie atomu wodoru łańcuchem bocznym jest bardzo źle tolerowane. Dzieje się tak dlatego, że łańcuchy boczne prowadzą do deformacji szkieletu białko-

wego, co z kolei, przyczynia się do spadku powinowactwa nowobiocyny do podjednostki GyrB gyrazy [32].

Z danych krystalograficznych wynika, że łańcuch boczny Ile⁷⁸ znajduje się w pobliżu grupy metoksylowej podstawnika cukrowego nowobiocyny [34]. Zamiana Ile⁷⁸ na którąkolwiek z innych zachowanych w ewolucji reszt aminokwasów takich; jak Ala, Leu czy Met, prowadzi do utraty możliwości tworzenia wiązania hydrofobowego z cząsteczką nowobiocyny. Wartość IC₅₀ nowobiocyny wzrasta odpowiednio 30-, 14-, i 22-krotnie dla poszczególnych aminokwasów. Rozdzielenie hydrofobowego łańcucha bocznego w pozycji β-węgla, wydaje się mieć kluczowe znaczenie, zarówno dla aktywności enzymatycznej, jak i oddziaływania z antybiotykami [32].

Mutacja w pozycji 165, która pozbawia łańcuch boczny Thr grupy hydroksylowej, wpływa na wiązanie nowobiocyny poprzez zwiększenie wartości IC₅₀ dla aktywności ATP-azowej od 13 do 18 razy [32]. Struktura krystaliczna cząsteczki nowobiocyny sprzężonej z podjednostką GyrB dowodzi, że Thr¹⁶⁵ tworzy wodorowe wiązanie z grupą karbamiolową podstawnika cukrowego antybiotyku [34,53].

Jak wynika z danych literaturowych, topoizomeraza IV również może być celem dla antybiotyków kumarynowych i mutacje w podjednostce ParE, mogą prowadzić do wzrostu oporności bakterii na te antybiotyki. Wiadomo, że wartość IC₅₀ nowobiocyny dla topoizomerazy IV jest ok. 5-krotnie większa, niż w przypadku gyrazy [10]. Ta rozbieżność niewątpliwie wynika z kilku różnic w strukturze przestrzennej obu białek. Jedną z takich różnic jest obecność Met w pozycji 74 reszty aminokwasowej w podjednostce ParE, podczas gdy odpowiadający podstawnik w GyrB to Ile⁷⁸. W przypadku podjednostki GyrB, Ile⁷⁴ znajduje się w pobliżu atomu tlenu grupy metoksylowej cukru nowobiocyny, tworząc słabe wiązanie z cząsteczką antybiotyku [34]. Z kolei w kompleksie ParE – nowobiocyna, łańcuch boczny metioniny umiejscawia się w niemalże identycznej pozycji, jednak brakuje interakcji między węglem γ² a antybiotykiem, obserwowanej w przypadku izoleucyny. W wyniku przeprowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem techniki ukierunkowanej mutagenyzy udowodniono, że zamiana metioniny na izoleucynę w pozycji 74 podjednostki ParE, prowadzi do spadku wartości IC₅₀ nowobiocyny około 18-krotnie. Innymi słowy, zmutowany enzym jest 18-krotnie bardziej wrażliwy na działanie antybiotyku, w porównaniu w enzymem szczepu dzikiego. Spadek wartości IC₅₀ w przypadku substytucji Met⁷⁴ przez Ile w podjednostce ParE topoizomerazy IV, jest porównywalny do wzrostu wartości IC₅₀ w przypadku mutacji Ile⁷⁸ do Met dla GyrB gyrazy (22-krotny), wskazując na fakt, że łańcuchy boczne obu aminokwasów wykazują podobną zdolność wiązania nowobiocyny. Warto zaznaczyć, że spośród wielu podjednostek GyrB i ParE pochodzących z różnych szczepów bakteryjnych, izoleucyna występuje w tym regionie w znacznej większości podjednostek GyrB, natomiast obecność metioniny jest charakterystyczna dla odpowiadającego regionu w ParE [21, 32].

Inną zasadniczą różnicą w budowie aminokwasowej podjednostek ParE i GyrB, może być obecność w tej pierwszej kwasu asparaginowego w pozycji 77. Kwas asparaginowy

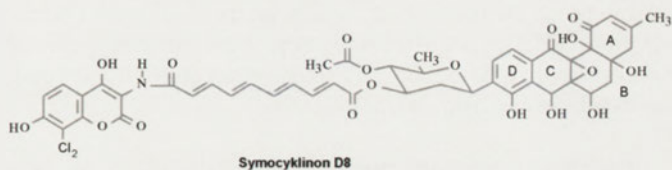
może tworzyć słabe wiązanie wodorowe z grupą hydroksybenzoesową nowobiocyny. Taka interakcja pomiędzy białkiem a antybiotykiem nie jest obserwowana w przypadku GyrB, ponieważ odpowiadający podstawnik to Gly⁸¹, nie mający zdolności tworzenia wiązania wodorowego z nowobiocyną. Jednak substytucja Gly⁸¹ do Asp w podjednostce GyrB prowadzi tylko do około 2-krotnego wzrostu wartości IC₅₀ nowobiocyny, dlatego też wnioskuje się, że podstawnik Asp⁷⁷ w podjednostce ParE ma niewielki wpływ na wartości IC₅₀ dla aktywności topoizomerazy IV [21].

Z kolei Hardy i Cozzarelli skonstruowali mutantę niosącą mutację w genie *parE*, odzwierciedlającą najczęściej występującą mutację w genie *gyrB*, warunkującą oporność na nowobiocynę. Zamieniając argininę w pozycji 132 na cysteinę, doprowadzili do 40-krotnego wzrostu oporności *in vitro* na antybiotyk. Szczepy niosące substytucję Arg¹³² do Cys wykazywały zdolność relaksowania pozytywnych superskrętów *in vivo*, a wartość IC₅₀ nowobiocyny była 20-krotnie wyższa, w porównaniu ze szczepem dzikim. Wynika z tego, że istotnie, topoizomeraza IV jest drugorzędowym celem dla nowobiocyny w komórkach *E. coli* oraz, że mechanizm hamowania aktywności enzymu przez nowobiocynę jest prawdopodobnie taki sam, jak w przypadku gyrazy, a mianowicie poprzez blokowanie dostępu ATP do miejsca wiązania w enzymie [54].

NOWA KLASA INHIBITORÓW BAKTERYJNEJ GYRAZY

W ostatnim czasie, ze szczepu *Streptomyces antibioticus* wyizolowano nowy typ antybiotyków o nazwie symocyklinony [55]. Antybiotyki należące do tej klasy charakteryzują się podobną budową do znanych już antybiotyków kumarynowych, jednak mechanizm ich działania jest zasadniczo różny i niepodobny do żadnego dotąd poznanego wśród inhibitorów gyrazy. Należący do tej klasy związek o nazwie D8, zawiera rdzeń 3-amino-4,7-dihydroksykumarynowy z podstawnikiem arylowym, przyłączonym do grupy aminowej. W odróżnieniu od kumaryny, symocyklinony nie zawierają cukru nowiozy w pozycji 7 pierścienia aminokumarynowego. Podstawnikiem cukrowym jest tu D-oliwioza przyłączona do grupy arylowej za pomocą wiązania estrowego. Symocyklinon D8, podobnie jak chlorobiocyna, zawiera atom chloru w pozycji 8 pierścienia kumarynowego (Ryc. 6) [56].

Analiza sekwencji genów kodujących symocyklinony ujawniła wiele podobieństw do genów kodujących nowobiocynę, chlorobiocynę czy kumermycinę A₁, wskazując na podobieństwo ewolucyjne obu grup [57]. Ponadto, obecność pierścienia kumarynowego wśród naturalnych antybiotyków jest niezwykle rzadka, co bezpośrednio wskazywało na fakt, że potencjalnym celem ich działania jest gyraza.



Rycina 6. Wzór strukturalny symocyklinonu D8.

Wykazano bardzo silne działanie bakteriobójcze tych antybiotyków przeciw bakteriom gram-dodatnim, natomiast znikome przeciw bakteriom gram-ujemnym. Posiadają one również aktywność cytostatyczną w stosunku do komórek nowotworowych człowieka [56].

Z przeprowadzonych badań nad aktywnością zmiany stanu superskręcenia DNA wynika, że symocyklinony są antybiotykami o nieznacznie lepszych właściwościach blokujących, w porównaniu z kumarynami. Jednak, w odróżnieniu od kumaryn, symocyklinony nie zaburzają ATP-zależnych etapów działania gyrazy, a w związku z tym ATP-azowa domena podjednostki GyrB nie jest miejscem ich oddziaływania. Kolejne badania pokazały, że symocyklinony nie stabilizują również tworzenia kompleksu przecinalnego gyraza – DNA, co wskazuje na odmienny mechanizm w porównaniu do innej klasy inhibitorów topoizomeraz, a mianowicie chinolonów. Mimo, że molekularny mechanizm działania symocyklinonów nie jest znany, to przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że oddziałują one na podjednostkę GyrA gyrazy, trwale się z nią łącząc i nie dopuszczając do związania enzymu z DNA. Alternatywnie, symocyklinony mogą tak wpływać na konformację podjednostki GyrB, że ta nie jest w stanie związać dupleksu nici DNA. Z kolei antybiotyk pozbawiony podstawnika aminokumarynowego, jest całkowicie niefunkcyjnym inhibitorem gyrazy, co wskazuje na fakt, że jego obecność odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu symocyklinonów [56].

PODSUMOWANIE

Badania nad topoizomerazami jednoznacznie dowiodły, że enzymy te mogą być efektywnymi celami dla leków przeciwbakteryjnych, ponieważ znacząco różnią się od eukariotycznych topoizomeraz typu II, a także są zachowywanymi w ewolucji enzymami, pośród różnych szczepów bakteryjnych, ważnych z klinicznego punktu widzenia. Szczególnie użycie techniki krystalografii pozwoliło odpowiedzieć na wiele pytań, a także uczyniło możliwym syntezę antybiotyków w oparciu o budowę i strukturę celu molekularnego. Fragment 24 kDa gyrazy i topoizomerazy IV, pełniący funkcje katalityczne, wydaje się być idealnym celem dla tego typu związków. Jak wiadomo gyraza i topoizomeraza IV są jednakowo istotne dla prawidłowego wzrostu komórek bakteryjnych. Oba białka posiadają wiele podobieństw w swoich aktywnych miejscach, przestrzennej organizacji podjednostek, a także wrażliwości na niektóre antybiotyki. Te podobieństwa wskazują na fakt, że związki chemiczne blokujące owe aktywne miejsca, mogłyby inaktywować jednocześnie oba enzymy należące do klasy II topoizomeraz DNA. Takie właściwości przyszłych antybiotyków, dla których celem byłaby w równym stopniu gyraza i topoizomeraza IV, mogłyby okazać się bardzo korzystne z uwagi na fakt ograniczenia możliwości nabywania oporności przez drobnoustroje, bowiem aby powstał szczep oporny na działanie zastosowanego leku, niezbędne byłyby dwie niezależne mutacje.

Innym z podejmowanych kroków mającym na celu wynalezienie nowych inhibitorów topoizomeraz, może być modyfikowanie szlaków biosyntezy antybiotyków

kumarynowych czy też symocyklinonów na drodze inżynierii genetycznej. Obecnie znana jest sekwencja genów kodujących białka biosyntezy nowobiocyny, chlorobiocyny, kumermycyny i symocyklinonów. Daje to podstawy do konstrukcji nowych szlaków biosyntezy, prowadzących do uzyskania skuteczniejszych leków hybrydowych [58].

Kolejnym czynnikiem niezbędnym dla produkcji lepszych antybiotyków jest dokładne określenie lokalizacji topoizomeraz w komórce. Sugeruje się, że u *Salmonella* (prawdopodobnie również u innych bakterii) topoizomeraza IV związana jest z błoną komórkową [59]. Z kolei gyraza w przeważającej większości (ok. 90%) występuje w całej objętości cytoplazmy, natomiast pozostałe cząsteczki występują w bezpośrednim sąsiedztwie nukleoidu [60]. Relatywnie luźne rozmieszczenie gyrazy w całej komórce, z jednoczesnym dostępem do genomu, w porównaniu z ograniczonym dostępem topoizomerazy IV ze względu na asocjacje z błoną komórkową, może mieć ogromny wpływ na aktywność i potencjał obecnych, jak i przyszłych leków przeciwbakteryjnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Vologodskii AV, Zhang W, Rybenkov VV, Podtelezhnikov AA, Subramanian D, Griffith JD, Cozzarelli NR (2001) Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3045-3049
2. Zechiedrich EL, Khodursky AB, Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM, Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 8103-8113
3. Wang JC (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65: 635-692
4. Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70: 369-413
5. Roca J, Wang JC (1992) The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 71: 833-840
6. Roca J, Wang JC (1994) DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 77: 609-616.
7. Reece RJ, Maxwell A (1991) DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 335-375
8. Levine C, Hiasa H, Marians KJ (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1400: 29-43
9. Peng H, Marians KJ (1995) The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J Biol Chem* 270: 25286-25290
10. Peng H, Marians KJ (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* 268: 24481-24490
11. Reece RJ, Maxwell A (1991) The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 19: 1399-1405
12. Maxwell A, Lawson DM (2003) The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr Top Med Chem* 3: 283-303
13. Marians KJ, Hiasa H (1997) Mechanism of quinolone action. A drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. *J Biol Chem* 272: 9401-9409
14. Sugino A, Higgins NP, Brown PO, Peebles CL, Cozzarelli NR (1978) Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4838-4842
15. Higgins NP, Cozzarelli NR (1982) The binding of gyrase to DNA: analysis by retention by nitrocellulose filters. *Nucleic Acids Res* 10: 6833-6847

16. Gellert M, Fisher LM, O'Dea MH (1979) DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6289-6293
17. Sugino A, Higgins NP, Cozzarelli NR (1980) DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 8: 3865-3874
18. Hiasa H, Marians KJ (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* 271: 21529-21535
19. Deibler RW, Rahmati S, Zechiedrich EL (2001) Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev* 15: 748-761
20. Smith CV, Maxwell A (1998) Identification of a residue involved in transition-state stabilization in the ATPase reaction of DNA gyrase. *Biochemistry* 37: 9658-9667
21. Bellon S, Parsons JD, Wei Y, Hayakawa K, Swenson LL, Charifson PS, Lippke JA, Aldape R, Gross CH (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1856-1864
22. Dutta R, Inouye M (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25: 24-28
23. Roca J, Berger JM, Harrison SC, Wang JC (1996) DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4057-4062
24. Williams NL, Howells AJ, Maxwell A (2001) Locking the ATP-operated clamp of DNA gyrase: probing the mechanism of strand passage. *J Mol Biol* 306: 969-984
25. Baird CL, Harkins TT, Morris SK, Lindsley JE (1999) Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13685-13690
26. Rybenkov VV, Ullsperger C, Vologodskii AV, Cozzarelli NR (1997) Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science* 270: 690-693
27. Maxwell A, Gellert M (1984) The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J Biol Chem* 259:14472-14480
28. Kampranis SC, Maxwell A (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8414-8419
29. Bates AD, Maxwell A (1989) DNA gyrase can supercoil DNA circles as small as 174 base pairs. *EMBO J* 8: 1861-1866
30. Kampranis SC, Maxwell A (1998) Hydrolysis of ATP at only one GyrB subunit is sufficient to promote supercoiling by DNA gyrase. *J Biol Chem* 273: 26305-26309
31. Jackson AP, Maxwell A (1993) Identifying the catalytic residue of the ATPase reaction of DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11232-11236
32. Gross CH, Parsons JD, Grossman TH, Charifson PS, Bellon S, Jernee J, Dwyer M, Chambers SP, Markland W, Botfield M, Raybuck SA (2003) Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1037-1046
33. Kampranis SC, Gormley NA, Tranter R, Orphanides G, Maxwell A (1999) Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase. *Biochemistry* 38: 1967-1976
34. Lewis RJ, Singh OM, Smith CV, Skarzynski T, Maxwell A, Wonacott AJ, Wigley DB (1996) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J* 15: 1412-1420
35. Wigley DB, Davies GJ, Dogson EJ, Maxwell Dogson G (1991) Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* 351: 624-629
36. Brino L, Urzhumtsev A, Mousli M, Bronner C, Mitschler A, Oudet P, Moras D (2000) Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J Biol Chem* 275: 9468-9475
37. Gellert M, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa J (1976) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 4474-4478
38. Maxwell A (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol* 5: 102-109
39. Sugino A, Peebles CL, Kreuzer KN, Cozzarelli NR (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4767-4771
40. Pierrat OA, Maxwell A (2003) The action of the bacterial toxin microcin B17. Insight into the cleavage-religation reaction of DNA gyrase. *J Biol Chem* 278: 35016-35023
41. Kampranis S.C., Maxwell A (1998) The DNA gyrase-quinolone complex. ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *J Biol Chem* 273: 22615-22626
42. Barrett JF, Sutcliffe JA, Gootz TD (1990) In vitro assays used to measure the activity of topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1-7
43. Willmott CJ, Maxwell A (1993) A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 126-127
44. Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozzarelli NR (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11801-11805
45. Yorgey P, Lee J, Kordel J, Vivas E, Warner P, Jebaratnam D, Kolter R (1994) Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4519-4523
46. Nakada N, Shimada H, Hirata T, Aoki Y, Kamiyama T, Watanabe J, Arisawa M (1993) Biological characterization of cyclothialidine, a new DNA gyrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2656-2661
47. Stieger M, Angehrn P, Wohlgensinger B, Gmünder H (1996) *GyrB* mutations in *Staphylococcus aureus* strains resistant to cyclothialidine, coumermycin, and novobiocin. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1060-1062
48. Oram M, Dosanjh B, Gormley NA, Smith CV, Fisher LM, Maxwell A, Duncan K (1996) Mode of action of GR122222X, a novel inhibitor of bacterial DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 473-476
49. Steffensky M, Muhlenweg A, Wang ZX, Li SM, Heide L (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1214-1222
50. Wang ZX, Li SM, Heide L (2000) Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3040-3048
51. Contreras A, Maxwell A (1992) *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol Microbiol* 6: 1617-1624
52. Gilbert EJ, Maxwell A (1994) The 24 kDa N-terminal sub-domain of the DNA gyrase B protein binds coumarin drugs. *Mol Microbiol* 12: 365-373
53. Holdgate GA, Tunnicliffe A, Ward WH, Weston SA, Rosenbrock G, Barth PT, Taylor IW, Pauptit RA, Timms D (1997) The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* 36: 9663-9673
54. Hardy CD, Cozzarelli NR (2003) Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 941-947
55. Schimana J, Fiedler HP, Groth I, Sussmuth R, Beil W, Walker M, Zeek A (2000) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tu 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot* 53: 779-787
56. Flatman RH, Howells AJ, Heide L, Fiedler HP, Maxwell A (2005) Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1093-1100
57. Trefzer A, Pelzer S, Schimana J, Stockert S, Bihlmaier C, Fiedler HP, Welzel K, Vente A, Bechthold A (2002) Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1174-1182

58. Galm U, Dessoy MA, Schmidt J, Wessjohann LA, Heide L (2004) *In vitro* and *in vivo* production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic, and synthetic approach. *Chem Biol* 11: 173-183
59. Luttinger AL, Springer AL, Schmid MB (1991) A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *New Bio* 3: 687-697
60. Thornton M, Armitage M, Maxwell A, Dosanjh B, Howells AJ, Norris V, Sigeo DC (1994) Immunogold localization of GyrA and GyrB proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* 140: 2371-2382

Bacterial type II topoisomerases as targets for antibacterial drugs

Michał Pietrusiński¹, Paweł Stączek²✉

¹Department of Medical Genetics, Medical University of Łódź, 1/3 Sterlinga St., 91-425 Łódź, Poland

²Department of Genetics of Microorganisms, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

✉ e-mail: pstaczek@biol.uni.lodz.pl

Key words: DNA gyrase, topoisomerase IV, coumarins, quinolones, simociclinon D8

ABSTRACT

Bacterial type II DNA topoisomerases are essential enzymes for correct genome functioning and cell growth. Gyrase is responsible for maintaining negative supercoiling of bacterial chromosome, whereas topoisomerase IV acts in disentangling daughter chromosomes following replication. Type II DNA topoisomerases possess an ATP binding site, which can be treated as a target for antibacterial drugs. Resolving crystal structures of protein fragments consisting of an ATP binding site complexed with ADPNP/antibiotics have proven to be valuable for the understanding of the mode of action of existing antibacterial agents and presented new possibilities for novel drug design. Coumarins, quinolones and cyclothialidines are diverse group of antibiotics that interfere with type II DNA topoisomerases, however their mode of action is different. Recently a new class of antibiotics, simociclinones, was characterized. Their mechanism of action towards gyrase is entirely distinct from already known modes of action, therefore demonstrating the potential for development of novel anti-bacterial agents.

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP – kluczowe znaczenie w regulacji metabolizmu

STRESZCZENIE

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) działa jak czujnik energii regulujący szlaki sygnałowe prowadzące do utrzymania równowagi energetycznej zarówno na poziomie pojedynczej komórki jak też całego organizmu. W zdrowych komórkach enzym ten może być aktywowany przez stres metaboliczny, który prowadzi do wzrostu stężenia AMP. Aktywowana AMPK „wylacza” szlaki anaboliczne takie jak synteza kwasów tłuszczowych i białek, a „włącza” szlaki kataboliczne takie jak glikoliza i utlenianie kwasów tłuszczowych, co przywraca fizjologiczny poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Leptyna i adiponektyna, hormony tkanki tłuszczowej aktywują AMPK w tkankach obwodowych, zwiększając wydatkowanie przez nie energii. Odpowiadając na sygnały hormonalne i pokarmowe AMPK w podwzgórzu reguluje także odczucie głodu i sytości. Stosowane w terapii cukrzycy leki imitujące działanie insuliny powodują aktywację AMPK. Wyjaśnienie roli jaką odgrywa aktywacja AMPK w terapeutycznym działaniu tych leków wymaga dalszych badań.

WPROWADZENIE

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) ma istotne znaczenie w utrzymaniu homeostazy energetycznej komórki. Po aktywacji enzym ten włącza w komórce część procesów anabolicznych prowadzących do zużycia ATP (jak np. biosyntezy lipidów czy białek), a uaktywnia procesy kataboliczne dostarczające ATP. AMPK reguluje metabolizm zarówno na poziomie już istniejącego białka, jak też poprzez aktywację ekspresji genów i syntezy białek [1]. Enzym ten został odkryty dzięki swojej zdolności do inaktywacji reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA (reduktazy HMG-CoA) [2] i karboksylazy acetylo-CoA [3]. W 1980 roku zauważono, że aktywność kinazy karboksylazy acetylo-CoA jest stymulowana przez 5'-AMP i zasugerowano, że spadek ładunku energetycznego prowadzi do hamowania syntezy kwasów tłuszczowych [4]. Pięć lat później zaobserwowano, że także aktywność kinazy reduktazy HMG-CoA jest stymulowana przez AMP [5]. Nieco później praca zespołu Grahama Hardie'ego wykazała, iż ta sama kinaza jest odpowiedzialna za obydwie powyższe obserwacje [6]. Ponieważ wkrótce okazało się, że omawiana kinaza może mieć fizjologicznie wiele różnych substratów, ostatecznie nazwano ją kinazą białkową aktywowaną przez AMP [7]. W ciągu ostatnich trzech lat stało się jasne, że AMPK odpowiadając zarówno na sygnały hormonalne jak i stężenie substratów energetycznych w ośrodkowym układzie nerwowym oraz tkankach obwodowych pełni istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego na poziomie całego organizmu, modulując zarówno pobieranie pokarmu jak też wykorzystanie energii.

BUDOWA AMPK

Enzym ten jest heterotrimerem, złożonym z katalitycznej podjednostki α i regulatorowych β i γ . Podjednostki α i β są kodowane, każda przez dwa różne geny (α -1, α -2, β -1, β -2), a podjednostka γ przez trzy geny (γ -1, γ -2, γ -3), co w sumie daje możliwość połączenia się w 12 różnych heterotrimericznych kompleksów. AMPK występuje w prawie wszystkich tkankach ssaków, a ekspresja odpowiednich podjednostek jest tkankowo-specyficzna. [8,9]. Podjednostka α zawiera w części N-końcowej domenę kinazy serynowo/treoninowej. Bezpośrednio pod nią, ale już w połowce C-końcowej znajduje się domena regulatorowa zawierająca region autoinhibitorowy hamujący aktywność kinazową pod nieobecność AMP, a blisko C-końca znajduje się region wiążący się do podjednostki β [10]. Izoformy α -1 i α -2 występują niemal we wszystkich tkankach, jednak ich udział w całkowitej aktywności AMPK jest tkankowo specyficzny [11]. Podjednostka β zawiera w C-końcowej części domeny tworzące kompleksy z podjednostkami α i γ [12]. U wszystkich *Eukariota* podjednostki β zawierają także domeny wiążące węglowodany. Podobną budowę wykazują domeny występujące w enzymach metabolizujących rozgałęzienia α 1-6 w glukanach zawierających wiązania α 1-4 takich jak skrobia czy glikogen [12,13]. Funkcja tych domen nie jest do końca

Robert Jarzyna[✉]

Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

[✉]Instytut Biochemii UW, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: rjarzyna@biol.uw.edu.pl, tel.: (022) 554 32 04

Artykuł otrzymano 10 stycznia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 20 kwietnia 2006 r.

Słowa kluczowe: Kinaza białkowa aktywowana przez AMP, ładunek energetyczny, adipokiny, cukrzyca, regulacja łaknienia.

Wykaz skrótów: ACC – Karboksylaza acetylo-CoA; Akt/PKB – kinaza Akt/białkowa kinaza B; AMPK (ang. *AMP activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; CaMKK (ang. *calmodulin-dependent protein kinase kinase*) – kinaza kinazy zależnej od kalmoduliny; eNOS (ang. *endothelial nitric oxide synthase*) – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; HMG-CoA – 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA; LKB1 – kod nadany przez Chugai Pharmaceuticals kinazie STK11 (zob. poniżej); PEPCK – karboksylkinaza fosfoenolopirongronowa; PI-3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptor, którego aktywacja indukuje proliferację peroksisomów; MAPKs (ang. *mitogen activated protein kinases*) – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny; PDK1 (ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*) – kinaza zależna od fosfoinozytydów 1; STK11 (ang. *serine/threonine kinase 11*) – kinaza serynowo-treoninowa 11

Podziękowania: Pani prof. dr hab. Jadwidze Bryle dziękuję za cenne uwagi podczas pisania tej pracy, a dr Rafałowi Derlaczowi za wykonanie rysunków

jasna chociaż wiadomo, że wysoka zawartość glikogenu w komórce hamuje aktywność AMPK [14,15]. Podjednostka γ zawiera cztery fragmenty o powtarzającej się sekwencji nazywane domenami CBS, które biorą udział w wiązaniu AMP lub ATP w sposób wzajemnie się wykluczający [16]

KONTROLA ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO PRZEZ AMPK

W komórce większość egzoergicznych procesów metabolicznych zachodzi z bezpośrednim lub pośrednim wykorzystaniem enzymatycznej hydrolizy wiązań bezwodnikowych cząsteczki ATP (Reakcje 1 i 2).

- (1) ATPazy: $ATP \rightarrow ADP + P_i$
- (2) ligazy: $ATP \rightarrow AMP + PP_i$
- (3) syntazy ATP: $ADP + P_i \rightarrow ATP$
- (4) kinaza adenylanowa: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$

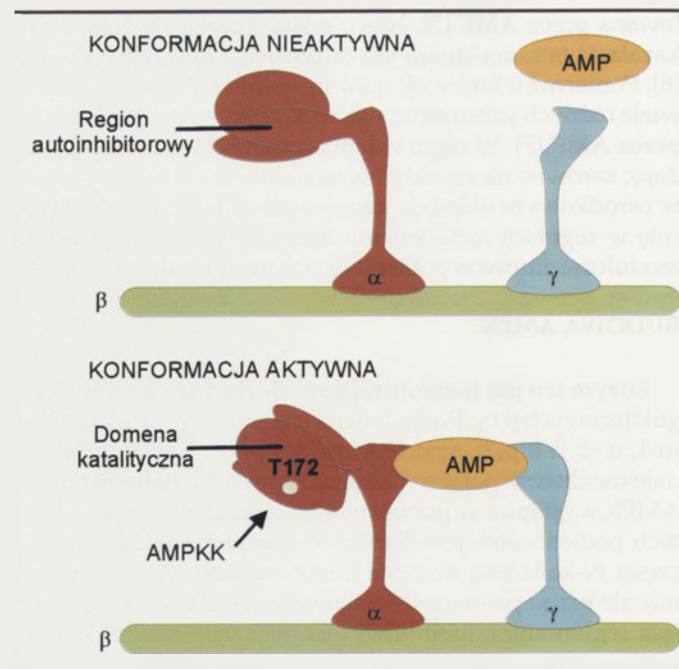
Stosunek substratów i produktów dwóch pierwszych reakcji w zdrowych komórkach jest daleki od stanu równowagi, a dostarczenie energii pochodzącej z hydrolizy ATP jest czynnikiem warunkującym ich przebieg. Dlatego też, jednym z najważniejszych parametrów charakteryzujących zdrową komórkę jest wysoki stosunek ATP do ADP. Z kolei ATP powstaje w wyniku reakcji katabolicznych bądź w procesie fotosyntezy (Reakcja 3).

Kluczową rolę w utrzymaniu właściwych proporcji między stężeniami odpowiednich nukleotydów adenylowych wewnątrz komórki spełnia kaskada sygnałowa zainicjowana przez kinazę aktywowaną przez AMP [17,18]. Wniosek Atkinsona [19], że nukleotydy mogą stanowić sygnał decydujący o ich zawartości w komórce, został sformułowany na podstawie badań kinetyki enzymów allosterycznych regulowanych przeciwnie przez ATP i AMP. Na początku lat 60-tych znanych było kilka enzymów, które regulowane są allosterycznie przez nukleotydy adeninowe w ten sposób, iż AMP działa przeciwnie do ATP. Wg Atkinsona stosunek stężeń nukleotydów adeninowych (nazwany przez niego ładunkiem energetycznym) decyduje o kierunku przemian metabolicznych w komórce [20]. Hipoteza Atkinsona spotkała się początkowo ze sporym zainteresowaniem. Jednakże z powodu odkrycia niewielkiej liczby enzymów regulowanych bezpośrednio przez nukleotydy adenylowe stopniowo traciła na atrakcyjności, aż do czasu odkrycia kinazy białkowej aktywowanej przez AMP. Dlaczego właśnie AMP wydaje się być cząsteczką regulatorową? Otóż w komórkach eukariotycznych aktywnie działa kinaza adenylanowa – enzym, który katalizuje wzajemne przemiany nukleotydów (Reakcja 4). Reakcja ta w warunkach fizjologicznych bliska jest stanu równowagi. W idealnych warunkach dzięki licznym reakcjom katalizowanym głównie przez kluczowe enzymy procesu glikolizy i mitochondrialną syntazę ATP, zdrowe komórki utrzymują stosunek stężeń ADP do ATP w okolicach 1:10. W takich warunkach kinaza adenylanowa (Reakcja 4) działa w kierunku syntezy ADP, utrzymując stężenie AMP na bardzo niskim poziomie ($AMP:ATP = 1:100$). Jeżeli pod wpływem zwiększonego zapotrzebowania energetycznego komórki zużycie ATP przekroczy jego produkcję i wzrośnie stężenie ADP, reakcja katalizowana przez kinazę adenylanową

będzie przebiegać w drugą stronę, generując ATP i AMP. Kiedy stosunek $ADP:ATP$ wzrośnie 5 krotnie, to stosunek AMP do ATP wzrośnie 25 krotnie. Właśnie dlatego zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia AMP znacznie wyraźniej odzwierciedlają procesy zachodzące w komórce niż zmiany stężeń ATP czy ADP [21]. Z tego też powodu system monitorowania energii w komórce jest raczej nastawiony na zmiany stężeń AMP (bądź stosunek AMP/ATP) niż ADP lub stosunku ADP/ATP .

REGULACJA AKTYWNOŚCI AMPK

Wzrost aktywności enzymu jedynie pod wpływem aktywacji allosterycznej jest stosunkowo niewielki [6]. Jak każde białko o aktywności kinazy, AMPK wymaga obecności ATP, jednak wysokie (milimolowe) stężenia ATP znoszą aktywację wywołaną przez AMP, prawdopodobnie na skutek współzawodnictwa o miejsce regulatorowe [22]. Kluczową rolę w aktywacji enzymu wydaje się mieć fosforylacja treoniny (Thr 172) w „pętli aktywacyjnej” domeny kinazowej podjednostki α . Fosforylacja ta powoduje ponad stukrotny wzrost aktywności enzymatycznej. Dołączenie AMP w miejscu allosterycznym wymusza konformację enzymu umożliwiającą jego fosforylację (Ryc. 1). Co więcej, w obecności AMP spada podatność AMPK na działanie fosfataz. Tak więc AMP aktywuje AMPK na trzy sposoby, co sprawia, że cały układ jest niezwykle wrażliwy na niewielkie zmiany stężeń AMP [23]. Pomimo, że odkryto również dwa inne miejsca fosforylacji podjednostki α i jedno podjednostki β , to jednak najistotniejsza dla aktywności wydaje się być fosforylacja Thr 172, ponieważ ukierunkowana mutageneza



Rycina 1. Model zmian konformacji AMPK pod wpływem AMP. Podjednostka β stanowi rusztowanie wiążące podjednostki α i γ . W konformacji nieaktywnej domena katalityczna podjednostki α jest zablokowana w wyniku wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania z regionem autoinhibitorowym. W konformacji aktywnej, w obecności AMP, podjednostka γ wypiera region autoinhibitorowy z oddziaływania z domeną katalityczną podjednostki α . AMP ułatwia utrzymanie takiej konformacji poprzez stabilizację oddziaływań α - γ . W konformacji aktywnej, domena katalityczna może ulec dodatkowej aktywacji w wyniku fosforylacji przez kinazę AMPK (AMPKK).

zmieniająca ten aminokwas na alaninę powodowała niemal całkowitą utratę aktywności enzymatycznej [24].

Do niedawna enzym odpowiedzialny za fosforylację AMPK pozostawał nieznanym i był określany enigmatycznie jako kinaza AMPK (AMPKK). W chwili obecnej wydaje się, że nie jest to jeden enzym ale co najmniej dwa: rolę AMPKK pełni LKB1 znana także pod nazwą STK11 [25] oraz kinaza kinazy zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny (CaMKK) [26]. Wiele wskazuje na to, że drugi z wymienionych enzymów pełni dominującą rolę w fosforylacji AMPK przede wszystkim w tkance nerwowej [26]. Aktywność AMPK jest także regulowana przez wewnątrzkomórkowe stosunki stężeń: NAD^+ /NADH [27] oraz fosfokreatyna/kreatyna [28], a także przez zawartość glikogenu [29]. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione czynniki wpływające na aktywację AMPK wydaje się logiczne, że stres fizjologiczny powstający w pracujących mięśniach, prowadzący do wzrostu zawartości AMP, spadku poziomu fosfokreatyny i NADH musi prowadzić do uaktywnienia AMPK. Enzym ten może być także aktywowywany przez stres patofizjologiczny obserwowany w warunkach spadku dostępności glukozy, ischemii, hipoksji czy stresu oksydacyjnego. Farmakologiczne ograniczenie produkcji ATP [np. przy użyciu inhibitorów cyklu kwasów trikarboksylowych (arsenin), łańcucha oddechowego (azydek, antymycyna A), mitochondrialnej syntazy ATP (oligomycyna) lub związków rozprzęgających oksydacyjną fosforylację (DNP)] również prowadzi do aktywacji AMPK [30,31].

Aktywność AMPK regulowana jest przez hormony i cytokiny takie jak adiponektyna, leptyna, rezystyna i grelina. Molekularny mechanizm regulacji AMPK przez te związki nie jest do końca wyjaśniony. Co więcej, leptyna hamuje aktywność tego enzymu w podwzgórzu, natomiast aktywuje w mięśniach szkieletowych [31].

Dane dotyczące udziału poszczególnych enzymów w szlakach sygnałowych przebiegających z wykorzystaniem AMPK są rozbieżne. I tak np. Zou i wsp. [32] proponują, że fosforylacja karboksylazy acetylo-CoA przez AMPK wymaga w szlaku powyżej tej kinazy obecności kinazy 3-fosfatydyloinozitolowej (PI-3K), którą aktywuje białko sygnałowe c-Src, aktywowane pośrednio przez syntazę tlenu azotu (eNOS). Z kolei grupa Kennetha Walsha [33] proponuje w szlaku aktywacji angiogenezy przez adiponektynę, następującą kolejność fosforylacji: AMPK → PI-3K → Akt (PKB) → eNOS. Kontrowersje dotyczą także stopnia zaangażowania kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (MAPKs) w szlakach regulowanych przez AMPK [34,35].

FIZJOLOGICZNA ROLA AMPK

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP wyłącza w komórce procesy anaboliczne prowadzące do zużycia ATP (jak np. biosyntezę lipidów czy białek) i uaktywnia procesy kataboliczne dostarczające ATP, modulując aktywność już istniejących białek, jak też aktywując ekspresję wybranych genów i syntezę odpowiadających im białek. I tak np. aktywacja AMPK w mięśniach szkieletowych powoduje zwiększone pobieranie glukozy przez tę tkankę w wyniku translokacji transporterów GLUT 4 do błony komórkowej oraz indukcji transkrypcji genu GLUT4. W wątrobowych liniach komórko-

wych hamuje ekspresję dwóch genów kodujących enzymy glukoneogenezy (karboksylazy fosfoenolopirogronianowej i glukozo-6-fosfatazy), wyjaśniając mechanizm hamowania glukoneogenezy w wątrobie przez adiponektynę. Tak więc na skutek aktywacji AMPK następuje zwiększone zużycie glukozy w mięśniach i zmniejszona produkcja glukozy w wątrobie [1]. Aktywowana AMPK hamuje syntezę glikogenu. Mechanizm tego zjawiska nie został w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że w podjednostce β enzymu występuje domena wiążąca glikogen, natomiast mutacje w podjednostce γ prowadzą do patologicznego gromadzenia się glikogenu w mięśniach [29]. W wyniku istnienia 12 różnych heterotrimerycznych kompleksów działanie AMPK może być tkankowo specyficzne. I tak np. w niedotlenionym mięśniu sercowym aktywacja enzymu prowadzi do zwiększenia szybkości procesu glikolizy [36], podczas gdy w komórkach śródbłonna naczyń po aktywacji AMPK glikoliza ulega zahamowaniu z jednoczesnym wzrostem utleniania kwasów tłuszczowych [37].

AMPK jest także „przełącznikiem” metabolizmu lipidów. Aktywacja tego enzymu wyłącza natychmiast syntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu w wątrobie na skutek fosforylacji karboksylazy acetylo-CoA i reduktazy HMG-CoA oraz ograniczenia transkrypcji genów kodujących karboksylazę acetylo-CoA i syntazę kwasów tłuszczowych. Z kolei w mięśniach stymuluje pobieranie kwasów tłuszczowych przez transporter FAT/CD36 i zwiększa szybkość utleniania kwasów tłuszczowych na skutek fosforylacji ACC-2 (izoformy karboksylazy acetylo-CoA), prowadząc do spadku stężenia malonylo-CoA (inhibitora palmitoilotransferazy karnitynowej I – transportera kwasów tłuszczowych do mitochondriów) i w konsekwencji wzrostu szybkości transportu kwasów tłuszczowych do mitochondriów [1].

Zwiększona masa tkanki tłuszczowej wiąże się z rozwojem oporności na insulinę i rozwojem cukrzycy typu 2. Wiadomo, że aktywność fizyczna i niskokaloryczna dieta zapobiega wystąpieniu chorób metabolicznych takich jak cukrzyca typu 2, otyłość czy zespół metaboliczny. Zarówno zwiększona aktywność fizyczna jak też restrykcje kaloryczne prowadzą do aktywacji AMPK, co powoduje przyspieszone utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach i komórkach śródbłonna naczyń, a także zahamowanie syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu w wątrobie. Tak więc kinaza aktywowana przez AMP odgrywa istotną rolę w zapobieganiu rozwojowi otyłości, cukrzycy i miażdżycy [38]. Jednym z ważniejszych osiągnięć ostatniej dekady w zrozumieniu metabolizmu było odkrycie, iż tkanka tłuszczowa jest organem endokrynnym, syntetyzującym znaczne ilości hormonów, cytokin i lipidów, które wywierają ogólnoustrojowe działania na procesy takie jak: homeostaza glukozy i lipidowa, regulacja masy ciała i funkcji immunologicznych [39]. Hormony wydzielane przez tkankę tłuszczową nazywamy adipokinami. Wiadomo, że AMPK pośredniczy w działaniu co najmniej trzech z nich: leptyny, adiponektyny i rezystyny.

Leptyna pełni znaczącą rolę w regulacji pobierania pokarmu, masy ciała, wydatkowania energii i funkcji neuroendokrynnych [40]. Hormon ten stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych [41], pobieranie glukozy [42] i zapobiega odkładaniu się tłuszczu w tkankach innych niż tkanka tłuszczowa [43]. Leptyna aktywuje szlak Jak-Stat i w następstwie

wpływa na transkrypcję określonych genów. Jednak wiele ważnych efektów metabolicznych leptyny obserwowanych jest w zbyt krótkim okresie aby można było brać pod uwagę aktywację czynników transkrypcyjnych. Hormon ten selektywnie stymuluje fosforylację podjednostki alfa 2 AMPK w mięśniach szkieletowych. Działanie leptyny jest zarówno krótko- jak też długoterminowe w wyniku natychmiastowej ale krótkotrwałej fosforylacji AMPK w mięśniu oraz późniejszej ale trwającej co najmniej 6 godzin, indukowanej za pośrednictwem sympatycznego układu nerwowego (Ryc. 2) [41]. Aktywacji AMPK towarzyszy hamowanie ACC2 przez leptynę – stąd stymulacja utleniania kwasów tłuszczowych. Aktywacja AMPK jest czynnikiem warunkującym wpływ leptyny na zwiększoną szybkość utleniania kwasów tłuszczowych przez mięśnie [41].

Wydzielana przez adipocyty adiponektyna występuje w osoczu w postaci oligomerycznych kompleksów molekularnych. Przyspiesza ona utlenianie kwasów tłuszczowych i pobieranie glukozy, hamuje glukoneogenezę, chroni przed arteriosklerozą w wyniku bezpośredniego działania na układ naczyniowy [44]. Adiponektyna stymuluje fosforylację AMPK w mięśniach i wątrobie zarówno *in vitro* jak też *in vivo* [45]. W mięśniach aktywacja AMPK pośredniczy w działaniu adiponektyny na utlenianie kwasów tłuszczowych oraz transport glukozy proporcjonalnie do stężenia AMP. Natomiast w wątrobie aktywacja AMPK prowadzi do spadku syntezy PEPCK i glukozo-6-fosfatazy powodując obniżenie szybkości glukoneogenezy [45]. Adiponektyna aktywuje również AMPK w izolowanych adipocytach ale biologiczny efekt tego zjawiska nie jest jasny [46]. Jak widać, aktywacja szlaku sygnałowego AMPK jest niezbędna w metabolicznym i uwrażliwiającym na insulinę działaniu adiponektyny i leptyny.

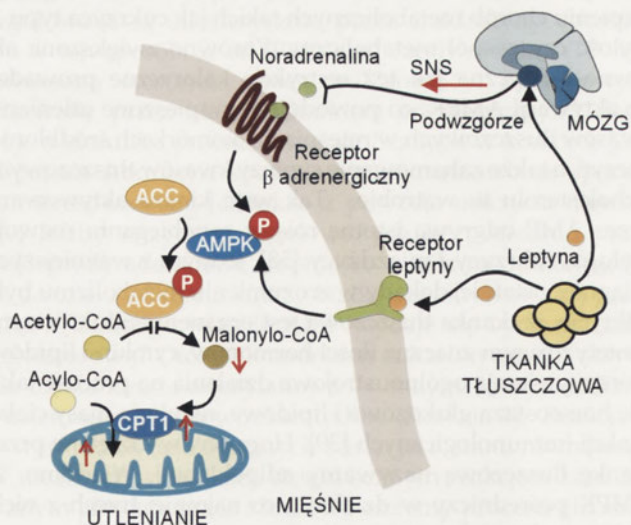
Rezystyna jest hormonem wydzielanym przez adipocyty u gryzoni i prawdopodobnie u człowieka. Znosi indukowa-

ne przez insulinę hamowanie glukoneogenezy w wątrobie. Rezystyna zmniejsza także stopień fosforylacji AMPK w wątrobie [47]. Nie jest jednoznaczne czy jest to niezbędny etap aby znieść działanie insuliny ograniczające glukoneogenezę w tym organie.

Jednym z ciekawszych odkryć 2004 roku była obserwacja, że AMPK odgrywa niezwykle ważną rolę w powstawaniu odczucia głodu lub sytości w podwzgórzu [48]. Głodzenie prowadzi do zwiększenia aktywności AMPK w podwzgórzu, podczas gdy po posiłku jej aktywność spada. Za zmiany aktywności enzymu mogą być odpowiedzialne zmiany poziomu insuliny i glukozy, ponieważ hiperglikemia i hiperinsulinemia wpływają na obniżenie aktywności podwzgórzowej AMPK. Podobne działanie wykazuje także leptyna. Spadek aktywności enzymu prowadzi do ograniczenia pobierania pokarmu. Podobny efekt wywołuje także nadekspresja genu o cechach dominującej mutacji negatywnej na AMPK w podwzgórzu. Hamowanie aktywności AMPK jest niezbędne do tego aby leptyna mogła działać w podwzgórzu. Z kolei konstytutywnie aktywna AMPK w podwzgórzu całkowicie blokuje działanie leptyny [48].

POTENCJALNE ZNACZENIE AMPK W CUKRZYCY

Cukrzyca typu 2 jest chorobą występującą u około 150 milionów ludzi i przewiduje się, że do roku 2025 liczba ta podwoi się. Jeżeli te prognozy sprawdzą się, leczenie cukrzycy może stać się głównym zadaniem medycyny XXI wieku [49]. Choroba ta charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią, spowodowaną zarówno insulinopornością jak też dysfunkcją komórek β trzustki. Uważa się, że jej rozwój jest skutkiem nowoczesnego stylu życia charakteryzującego się z jednej strony nadmierną konsumpcją wysokoenergetycznych pokarmów, a z drugiej ograniczeniem aktywności fizycznej. Potencjalna rola AMPK w cukrzycy została dostrzeżona przy próbach zidentyfikowania molekularnych mechanizmów, dzięki którym ćwiczenia fizyczne wywierają korzystny wpływ na stan zdrowia. Jak opisano powyżej, aktywacja tego enzymu (zachodząca również podczas ćwiczeń fizycznych) prowadzi do wzrostu pobierania i wykorzystywania glukozy oraz kwasów tłuszczowych przez mięśnie, co mogłoby być korzystne podczas leczenia cukrzycy [50]. Jako potencjalny lek przeciw cukrzycowy przetestowano syntetyczny aktywator AMPK: rybozyd 5-aminoimidazo-4-karboxamidu (AICAR). Związek ten wchodzi do komórek poprzez transportery dla adenozyiny, a następnie jest fosforylowany przez kinazę adenozyiny w wyniku czego powstaje analog AMP. U zwierząt z cukrzycą typu 2 traktowanych AICAREm obserwowano spadek hiperglikemii i hipertriglicydemii [1]. Ostatecznym dowodem na to, że AMPK jest dobrym celem dla leków przeciw cukrzycowych okazały się odkrycia, że dwa leki, które już są stosowane w praktyce klinicznej do leczenia typu 2 cukrzycy: metformina [51] i tiazolidinediony [52,53] powodują aktywację tego enzymu. Proponowany mechanizm działania metforminy zakłada aktywację szlaku $c\text{-Src} \rightarrow \text{PI-3K} \rightarrow \text{PDK-1}$, a następnie w dalszym etapie LKB1, która fosforylowałaby AMPK. Jednak hipoteza ta wydaje się słabo udokumentowana [32]. Tiazolidinediony zwiększają stężenie wewnątrzkomórkowego AMP [52]. Co więcej, tiazolidinediony aktywują także receptory PPAR γ , wpływając na zwiększenie stężenia adiponektyny we krwi [54], co w spo-



Rycina 2. AMPK stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach. Aktywacja AMPK w mięśniu (hormonalna lub będąca efektem aktywności fizycznej) prowadzi do fosforylacji i zahamowania aktywności karboksylazy acetylo-CoA (ACC). W rezultacie spada poziom malonylo-CoA, co skutkuje zwiększoną aktywnością palmitoilo transferazy karnitynowej 1 (CPT 1) i w efekcie przyspieszonym transportem i utlenianiem długocząściowych kwasów tłuszczowych w mitochondriach. Leptyna aktywuje mięśniową AMPK na dwa sposoby: poprzez wiązanie receptorów błonowych oraz poprzez aktywację osi podwzgórze – sympatyczny układ nerwowy i receptory α adrenergiczne.

sób pośredni także prowadzi do aktywacji AMPK. Ze względu na to, że aktywacja AMPK w mięśniach szkieletowych prowadzi do pobierania glukozy w sposób niezależny od insuliny, istnieje domniemanie, że szlaki sygnałowe indukowane przez insulinę i te, w których uczestniczy AMPK, gdzie się zbiegają. Jednak dostępne obecnie dane doświadczalne są rozbieżne co do punktu wspólnego obu szlaków [55,56]. Myszy z rozbitym genem (knockout) kodującym podjednostkę regulatorową α -2 AMPK charakteryzują się łagodną insulinopornością, a także obniżonym wydzielaniem insuliny, co świadczy o tym, że AMPK może uczestniczyć w rozwoju cukrzycy zarówno typu 1 jak i 2 [57,58].

PODSUMOWANIE

Kinaza białkowa stymulowana przez AMP jest ewolucyjnie konserwowanym białkiem, działającym jak regulator kierunku przemian metabolicznych, zarówno na poziomie komórki, jak i całego organizmu. Jej aktywność odgrywa kluczową rolę w regulacji utrzymania optymalnej wagi, a także homeostazy glukozowej i lipidowej. W dwudziestym pierwszym wieku liczba publikacji dotyczących tego enzymu zaczęła przyrastać logarytmicznie. Mimo to, kilka kwestii nadal pozostaje niejasnych. Nie zidentyfikowano dotychczas białek, umiejscowionych zarówno powyżej jak i poniżej AMPK w szlaku sygnałowym odpowiedzialnym za regulację pobierania pokarmu przez podwzgórze. Wydaje się, że określenie dokładnej roli AMPK w kaskadzie sygnału insulinowego mogłoby przyczynić się do zrozumienia patogenezy cukrzycy i otyłości, a następnie do stworzenia skutecznej terapii. Idealny lek powinien aktywować AMPK w tkankach obwodowych (zwiększając pobieranie i wykorzystanie glukozy, a także kwasów tłuszczowych) i jednocześnie hamować jej aktywność w podwzgórze (redukując w ten sposób pobieranie pokarmu i masę ciała).

PIŚMIENNICTWO

- Hardie DG (2004a) AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 117: 5479-5487
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 54: 1362-1369
- Carlson CA, Kim KH (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248: 378-80
- Yeh LA, Lee KH, Kim KH (1980) Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 255: 2308-2314
- Ferrer A, Caelles C, Massot N, Hegardt FG (1985) Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 132: 497-504
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223: 217-22
- Hardie DG, Carling D, Sim ATR (1989) The AMP activated protein kinase – a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 14: 20-23
- Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JR, Kemp BE, Witters LA (1996) Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 8675-8681

- Woods A, Cheung PC, Smith FC, Davison MD, Scott J, Beri RK, Carling D (1996) Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem* 271: 10282-10290
- Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA (1998) Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273: 35347-35354
- Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG (1998) AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J* 334: 177-187
- Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13: 861-866
- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D (2003) AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13: 867-871
- Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA (2002) Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* 51: 284-292
- Wojtaszewski JF, MacDonald C, Nielsen JN, Hellsten Y, Hardie DG, Kemp BE, Kiens B, Richter EA (2003) Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E813-822
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113: 274-284
- Ataullakhanov FI, Vitvitsky VM (2002) What determines the intracellular ATP concentration. *Biosci Rep* 22: 501-511
- Hardie DG, Carling D (1997) The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246: 259-273
- Atkinson DE (1965) Biological feedback control at the molecular level. *Science* 150: 851-857
- Atkinson DE, Chapman AG (1979) The adenylate energy charge in the study of enzymes *in vitro*. *Methods Enzymol* 55: 229-235
- Krebs H (1963) The Croonian lecture – gluconeogenesis. *Proc Roy Soc Lond B* 159: 545-564
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229: 558-565
- Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP (1999) AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J* 338: 717-722
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345: 437-443
- Carling D (2005) AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 87: 87-91.
- Birnbaum MJ (2005) Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Mol Cell* 19: 289-290
- Rafaeloff-Phail R, Ding L, Conner L, Yeh WK, McClure D, Guo H, Emerson K, Brooks H (2004) Biochemical regulation of mammalian AMP-activated protein kinase activity by NAD and NADH. *J Biol Chem* 279: 52934-52939
- Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998) Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J* 17: 1688-1699
- Carling D, Fryer LG, Woods A, Daniel T, Jarvie SL, Whitrow H (2003) Bypassing the glucose/fatty acid cycle: AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 31: 1157-1160
- Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29: 18-24

31. Hardie DG (2004b) The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487
32. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH (2004) Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279: 43940-43951
33. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 1304-1309
34. Pelletier A, Joly E, Prentki M, Coderre L (2005) Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 146: 2285-2294
35. Dokladda K, Green KA, Pan DA, Hardie DG (2005) PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not *via* inhibition of the MAP kinase pathway. *FEBS Lett* 579: 236-240
36. Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH (2004) AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114: 495-503
37. Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K, Ido Y (1999) The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 112-115
38. Fryer LG, Carling D (2005) AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochem Soc Trans* 33: 362-366
39. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556
40. Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770
41. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343
42. Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T (1999) Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48: 1706-1712
43. Unger RH (2002) Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53: 319-336
44. Goldstein BJ, Scalia R (2004) Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2563-2568
45. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295
46. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52: 1355-1363
47. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherrer PE, Rossetti L (2004) Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114: 232-239
48. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574
49. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787
50. Winder WW, Hardie DG (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277: E1-10
51. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174
52. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D (2002) The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 25226-25232
53. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB (2004) Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 580-585
54. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR α , PPAR γ , and their combination. *Diabetes* 54: 3358-3370
55. Barnes BR, Zierath JR (2005) Role of AMP-activated protein kinase in the control of glucose homeostasis. *Curr Mol Med* 5: 341-348
56. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25
57. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF (2004) Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279: 1070-1079
58. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloan A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98

AMP-activated protein kinase – the key role in metabolic regulation

Robert Jarzyna

Institute of Biochemistry, Warsaw University, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warszawa, Poland

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

Słowa kluczowe: AMP-activated protein kinase, energy charge, adipokines, diabetes mellitus, regulation of food intake

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase (AMPK) is the central component of a protein kinase cascade that acts as an energy sensor maintaining the energy balance at the cellular as well as at the whole body level. Within the healthy cell, metabolic stress leading to an increase in AMP concentration results in AMPK activation. Once activated, AMPK "switches off" many anabolic pathways e.g. fatty acid and protein synthesis while "switches on" catabolic pathways such as fatty acid oxidation or glycolysis which serve to restore intracellular ATP level. Adipocyte derived hormones leptin and adiponectin activate AMPK in peripheral tissues increasing energy expenditure. AMPK also regulates food intake due to response to hormonal and nutrient signals in hypothalamus. Antidiabetic drugs that mimic the action of insulin activate the AMPK signaling pathways. Further studies are needed to clarify the importance of the AMPK activation for therapeutic effects of this drugs.

Odpowiedź na stres komórkowy i ekspresja genów *Hsp70* w męskich komórkach rozrodczych

STRESZCZENIE

Apoptoza odgrywa szczególną rolę w spermatogenezie, zarówno jako proces „fizjologiczny”, regulujący proporcje ilościowe pomiędzy komórkami somatycznymi i rozrodczymi, jak i „patologiczny”, indukowany przez stres komórkowy. Komórki plemnikotwórcze reagują na stres komórkowy (np. podwyższoną temperaturę) w odmienny sposób niż komórki somatyczne. W komórkach somatycznych aktywny czynnik transkrypcyjny HSF1 indukuje syntezę cytoprotekcyjnych białek HSP (głównie HSP70i), co prowadzi do naprawy lub usunięcia uszkodzonych białek i przeżycia komórki. W męskich komórkach meiotycznych i post-meiotycznych indukcja genów *Hsp70i* pod wpływem stresu jest zablokowana, natomiast obecne są konstitutywne białka HSP70 swoiste dla tych komórek. Białka te są niezbędne dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy, jednak nie chronią przed szkodliwym wpływem podwyższonej temperatury. Aktywacja HSF1 w spermatocytach wywołuje apoptozę zależną od kaspazy-3 i komórki rozrodcze są aktywnie eliminowane. Ekspresja swoistego dla spermatocytów genu *Hsp70.2/Hst70* ulega zahamowaniu po aktywacji HSF1 i w rezultacie spermatocyty ulegające apoptozie pozbawione są białka HSP70.2/HST70. Apoptoza indukowana przez stres komórkowy jest ważnym mechanizmem kontrolnym eliminującym uszkodzone męskie komórki rozrodcze.

ROLA APOPTOZY W PROCESIE SPERMATOGENEZY

Spermatogeneza jest procesem, w którym w wyniku podziałów oraz różnicowania męskich komórek gametogenicznych, dochodzi do powstania plemników. U gryzoni proces ten rozpoczyna się kilka dni po urodzeniu podziałem pierwotnych komórek rozrodczych (gonocytów) zasiedlających sznury płciowe, z których w miarę dojrzewania jąder powstają kanaliki nasienne. Kolejne stadia rozwojowe gamet (otoczone przez somatyczne komórki Sertolego, pełniące funkcje podporowe i odżywcze) przemieszczają się od błony podstawnej w stronę osi kanalika. Z gonocytów powstają dzielące się mitotycznie spermatogonia, z których część przekształca się w spermatocyty. Spermatocyty preleptotenowe przechodzą ostatnią podczas spermatogenezy fazę S i rozpoczynają mejozę. Podczas długiej (kilka-kilkanaście dni) profazy pierwszego podziału meiotycznego w spermatocytach I rzędu dochodzi do kondensacji chromatyny, utworzenia kompleksu synaptonemalnego, parowania chromosomów homologicznych i rekombinacji materiału genetycznego. Powstające po pierwszym podziale spermatocyty II rzędu szybko dzielą się ponownie (bez replikacji DNA), przekształcając się w spermatydy okrągłe (wczesne). Powstanie wczesnych spermatyd rozpoczyna proces spermiogenezy, w którym poprzez etapy spermatyd kondensujących i wydłużających się dochodzi do odrzucenia nadmiaru cytoplazmy w formie ciałek resztkowych i powstania plemników uwalnianych do światła kanalika. Istotną cechą podziałów męskich komórek rozrodczych są niekompletne cytokinezy – pozostające mostki cytoplazmatyczne umożliwiają m.in. zsynchronizowanie podziałów komórkowych (proces spermatogenezy przedstawiony jest schematycznie na (Ryc. 1) [1].

Prawidłowość przebiegu spermatogenezy uzależniona jest od ekspresji wielu specyficznych dla jąder genów [2,3]. Zaburzenia ekspresji genów i inne nieprawidłowości w rozwoju komórek spermatogenicznych prowadzą zwykle do śmierci na drodze apoptozy. Apoptoza (inaczej programowana śmierć komórki) jest kontrolowanym genetycznie procesem autodestrukcyjnym, który eliminuje niepotrzebne, nieprawidłowe lub uszkodzone komórki. Ogólne informacje na temat apoptozy można znaleźć w licznych pracach przeglądowych, publikowanych również w języku polskim [4-6]. Spermatogeneza jest szczególnym przykładem znaczenia apoptozy dla procesów rozwoju i różnicowania. Szacuje się, że do 75% komórek, które mogłyby powstać w wyniku podziałów spermatogonii i utworzyć dojrzałe plemniki usuwanych jest na drodze apoptozy [7,8]. Szczególne nasilenie tego procesu obserwuje się podczas pierwszego w rozwoju postnatalnym podziału meiotycznego, kiedy osiągnięta jest właściwa proporcja pomiędzy ilością komórek plemnikotwórczych i wspomagających komórek Ser-

Wiesława Widlak

Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Gliwice

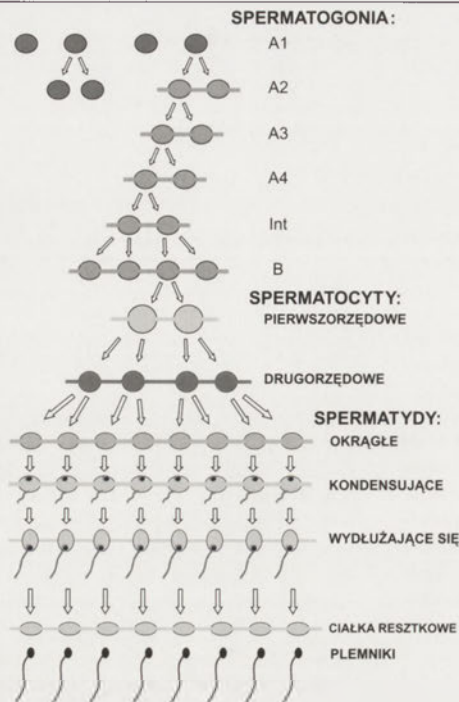
Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: wwidlak@io.gliwice.pl, tel. (032) 278 96 69

Artykuł otrzymano 2 listopada 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 6 marca 2006 r.

Słowa kluczowe: spermatogeneza, białka stresu komórkowego, regulacja ekspresji, apoptoza

Wykaz skrótów: HSE (ang. *Heat Shock Element*) – element promotora wiążący czynnik transkrypcyjny HSF; HSF (ang. *Heat Shock transcription Factor*) – czynnik transkrypcyjny genów stresu komórkowego; HSP (ang. *Heat Shock Protein*) – białka szoku termicznego (stresu komórkowego); HSP70i – indukowalne HSP o masie 70kDa; *Hst70* (ang. *Heat shock testis-specific*) – gen z rodziny *Hsp70* ulegający swoistej ekspresji w jądrach, odpowiednik genu *Hsp70.2* myszy i *HspA2* człowieka; pz – para zasad

Podziękowanie: Niektóre badania własne cytowane w niniejszej pracy były finansowane z grantu KBN 3 P04A 033 23



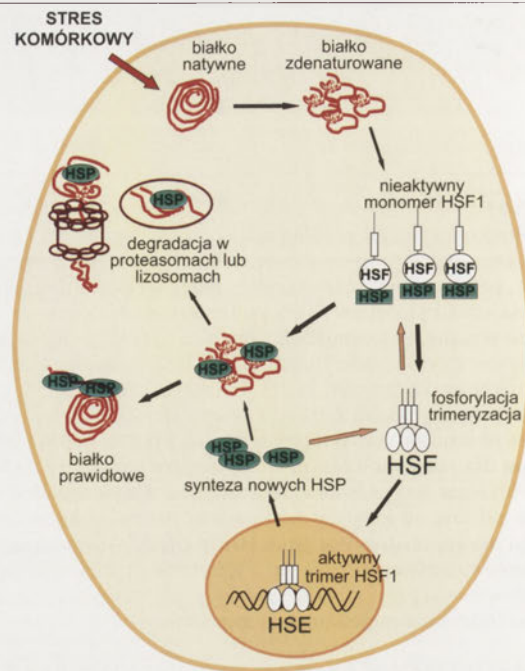
Rycina 1. Schemat spermatogenezy (opis w tekście).

tolego. Natomiast w późniejszym okresie spermatogenezy apoptoza umożliwia usuwanie komórek mających uszkodzenia DNA i zaburzenia chromosomowe. Ograniczone jest dzięki temu powstawanie nieprawidłowych plemników, a w efekcie zdeformowanych zarodków [9,10].

Osobliwością spermatogenezy jest to, że u większości ssaków zachodzi w temperaturze niższej niż temperatura wnętrza ciała (jądra znajdują się w mosznie). Natomiast w wyniku silnego i/lub długotrwałego działania bodźca termicznego dochodzi do trwałej degeneracji nabłonka plemnikotwórczego i ograniczenia płodności [11], co skutkuje obniżeniem jakości spermy i obumieraniem zarodków [12]. Komórkami najbardziej wrażliwymi na działanie podwyższonej temperatury są spermatocyty w stadium pachytenu i wczesne spermatydy; wzrost temperatury indukuje w nich proces apoptozy [13,14]. Wysoka wrażliwość komórek spermatogenicznych na podwyższoną temperaturę związana jest z nietypowym mechanizmem odpowiedzi na stres.

MECHANIZM KOMÓRKOWEJ ODPOWIEDZI NA STRES TERMICZNY

Wzrost temperatury i inne bodźce powodujące utratę prawidłowej struktury białek wewnątrzkomórkowych prowadzą, w większości typów komórek, do syntezy i nagromadzenia białek HSP (ang.: *Heat Shock Proteins*). Indukowana ekspresja białek HSP jest wynikiem aktywacji czynnika transkrypcyjnego HSF1 (ang.: *Heat Shock transcription Factor 1*). W warunkach fizjologicznych HSF1 występuje jako nieaktywny monomer w kompleksach z białkami HSP, natomiast w warunkach stresu monomery HSF1 są uwalniane z kompleksów i tworzą homotrimery, które wiążą się z sekwencjami HSE (ang.: *Heat Shock Element*) obecnymi w promotorach genów *Hsp*. W rezultacie dochodzi do aktywacji transkrypcji i do syntezy białek HSP (Ryc. 2) [15,16]. Przedstawiony mechanizm regulacji dotyczy głównie tzw.



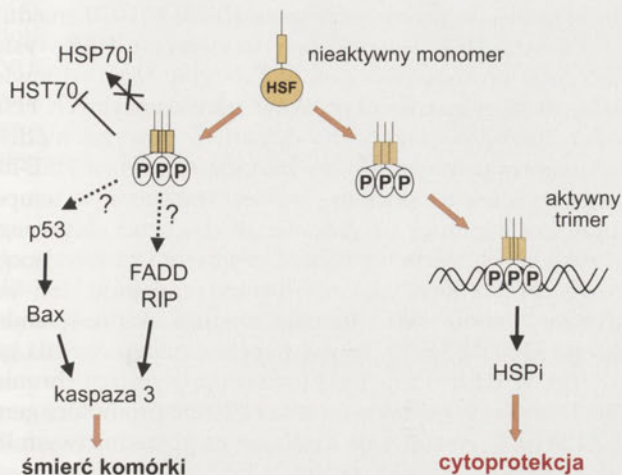
Rycina 2. Mechanizm aktywacji czynnika HSF1 i indukcji białek HSP (objaśnienia w tekście).

indukowalnych HSP (ang.: *inducible HSP*, HSPi). Akumulacja białek HSPi w komórce umożliwia przeżycie w niekorzystnych warunkach i jest ważnym czynnikiem cytoprotekcyjnym. HSP funkcjonują jako białka opiekuńcze (ang.: *molecular chaperones*), które umożliwiają innym białkom uzyskiwanie prawidłowej konformacji, chronią je przed denaturacją lub też kierują je do degradacji (jeśli naprawa jest niemożliwa) [17-24] (Ryc. 2). W komórce występuje kilka rodzin białek HSP (o masach molekularnych od 20 do 110 kDa). Tylko część białek HSP jest indukowana w warunkach stresu, inne obecne są w komórce konstytutywnie. Mnogość i zróżnicowana ekspresja białek HSP odzwierciedla ich różnorodne funkcje fizjologiczne – oprócz ochrony prawidłowej konformacji białek biorą one udział w transporcie polipeptydów przez błony komórkowe, prezentacji antygenów, regulacji receptorów steroidowych, apoptozie i wielu innych procesach [25-28]. Funkcje białek HSP realizowane są dzięki zdolności do oddziaływania z substratami białkowymi. Proces jest kontrolowany poprzez cykliczne wiązanie ATP, hydrolizę i wymianę nukleotydu. Aktywność ATPazy zlokalizowana jest w konserwatywnej domenie N-końcowej białek HSP70 i HSP90, natomiast wiązanie substratu zachodzi w ich domenie C-końcowej. Cykliczne wiązanie i zwalnianie substratu prowadzi w efekcie do uzyskania przez niego prawidłowej struktury. Efektywność reakcji jest kontrolowana przez dodatkowe kofaktory i białka pomocnicze (np. zawierające domenę J białka HSP40) [29].

Głównymi czynnikami regulującymi ekspresję genów *Hsp* są białka HSF [30]. U kręgowców, oprócz HSF1, są to HSF2, HSF3 i HSF4. Każdy z nich jest odmiennie regulowany i w odmienny sposób wpływa na transkrypcję (nie tylko genów *Hsp*). Podczas gdy HSF1 uruchamia ekspresję *Hsp* w warunkach stresu, HSF2 funkcjonuje w trakcie wzrostu i różnicowania (m.in. w czasie rozwoju embrionalnego i spermatogenezy) [31]. HSF3 występuje jedynie u ptaków, a funkcja HSF4 nie jest dokładnie znana – występuje tyl-

KOMÓRKI PLEMNIKOTWÓRCZE

KOMÓRKI SOMATYCZNE



Rycina 3. Porównanie szlaków przekazywania sygnału po aktywacji czynnika HSF1 w komórkach somatycznych i plemnikotwórczych.

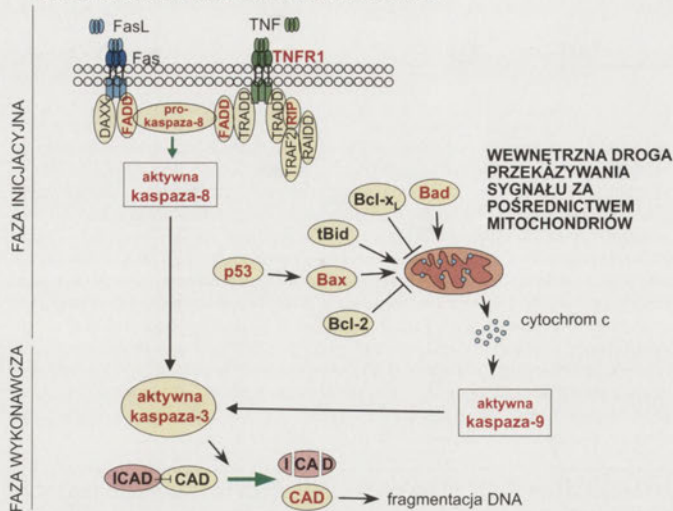
ko w niektórych narządach (np. w rozwijającej się soczewce oka [32]) i prawdopodobnie działa jako negatywny regulator transkrypcji [17,30]. Wydaje się, że HSF1 i HSF2 działają synergistycznie zarówno w czasie stresu, jak i w warunkach fizjologicznych [33-37]. Widoczne jest to np. w czasie spermatogenezy u myszy: delecja genu *Hsf1* nie zaburza spermatogenezy [38], delecja genu *Hsf2* nieznacznie zaburza płodność samców [39,40], natomiast usunięcie obu genów prowadzi do niepłodności [37]. Mimo, że współdziałanie HSF1 i HSF2 jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy, aktywacja HSF1 pod wpływem stresu komórkowego jest czynnikiem wywołującym apoptozę w męskich komórkach meiotycznych [41,42].

Efekt działania czynnika HSF1 w komórkach plemnikotwórczych jest całkowicie odmienny od obserwowanego w komórkach somatycznych (Ryc. 3). Białka HSP70i należą do najważniejszych białek indukowanych w komórkach somatycznych przez HSF1 w wyniku stresu komórkowego. Białka HSP70 wykazują aktywność anti-apoptotyczną; mechanizm ich działania polega między innymi na blokowaniu aktywacji apoptosomu, kompleksu aktywującego kaspazy [28,43]. Natomiast w spermatocytach i spermatydach indukowana przez HSF1 synteza HSP70i jest całkowicie zablokowana [44-46]. W komórkach tych, po aktywacji HSF1 dochodzi do wzrostu ekspresji białek pro-apoptotycznych związanych zarówno z zewnętrznymi („receptorowymi”; np. FADD, RIP), jak i wewnętrznymi („mitochondrialnymi”; np. p53, Bax, Bad) szlakami przekazywania sygnału apoptotycznego. W efekcie końcowym, po aktywacji kaspazy 3, inicjowana jest fragmentacja chromatyny katalizowana przez nukleazę CAD/DFF40 [46] (Ryc. 4).

BIAŁKA HSP70 SWOISTE DLA KOMÓREK PLEMNIKOTWÓRCZYCH

HSP70 są najliczniejszą i najsilniej zachowaną w ewolucji rodziną białek HSP [47, 48]. Oprócz omówionych wyżej indukowalnych HSP70i (które np. u myszy kodowane są przez dwa geny *Hsp70.1* i *Hsp70.3*), do rodziny tej zalicza się

ZEWNĘTRZNA DROGA PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU ZA POŚREDNICTWEM RECEPTORÓW BŁONOWYCH

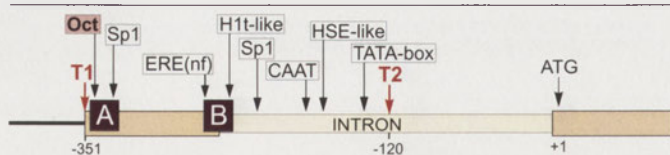


Rycina 4. Uproszczony schemat szlaków przekazywania sygnałów w apoptozie. Kolorem czerwonym zaznaczono wzrost ekspresji obserwowany w komórkach plemnikotwórczych po aktywacji HSF1 (na podstawie wyników publikowanych w [46]). Strzałki oraz tępo zakończone linie oznaczają odpowiednio aktywację bądź hamowanie sygnału proapoptotycznego. Skróty będące akronimami nazw angielskich: CAD – Caspase Activated DNase; DAXX – Death Domain Associated Protein XX; FADD – Fas-Associated Death Domain Protein; ICAD – Inhibitor of CAD; RAIDD – RIP Associated ICH-1/CED-3 homologous Death Domain protein; RIP – Receptor-Interacting Protein; TNF – Tumor Necrosis Factor; TNFR – Tumor Necrosis Factor Receptor; TRADD – TNF Receptor Associated Death Domain protein; TRAF – TNF Receptor Associated Factor.

również białka obecne w komórce konstytutywnie: HSC70 (ang.: *Heat Shock Cognate protein*) w cytoplazmie, czy GRP75 i GRP78 (ang.: *Glucose Regulated Proteins*) w mitochondriach i siateczce endoplazmatycznej. W komórkach plemnikotwórczych, w temperaturze fizjologicznej, aktywne są dwa dodatkowe geny z tej rodziny: *Hsp70.2* i *Hsc70t* [49-51]. Gen *Hsp70.2* myszy (odpowiednik genu *Hst70* szczura i *HspA2* człowieka) jest najsilniej transkrybowanym genem wśród genów *Hsp* ulegających ekspresji w jądrach. Jego transkrypt wykrywany jest w największej ilości w spermatocytach podczas pachytenu pierwszego podziału meiotycznego oraz we wczesnych spermatydach [52]. Ilość transkryptu *Hsp70.2/Hst70* spada gwałtownie w spermatydach wydłużających się (o około 80%), jednak jest go wciąż więcej od transkryptu *Hsc70t*, który pojawia się we wczesnych spermatydach [53]. Mechanizm regulacji *Hsc70t* i funkcje kodowanego przez ten gen białka są bardzo słabo poznane i nie będą omówione w tej pracy.

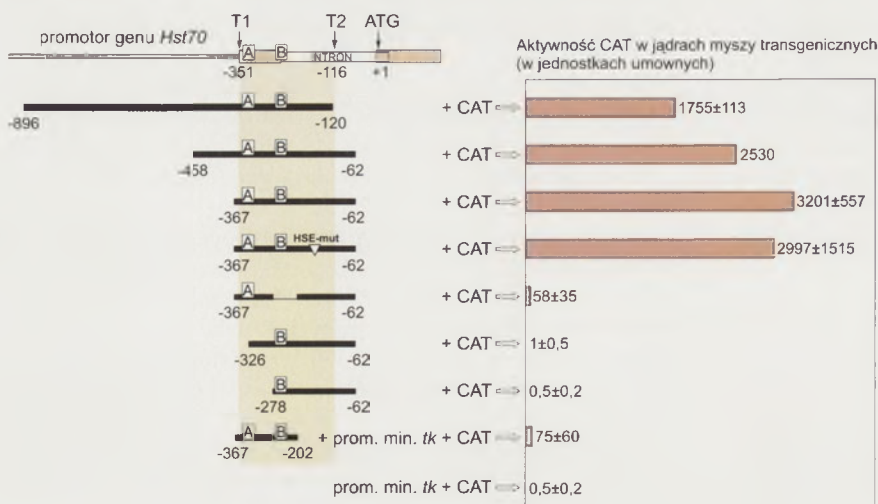
REGULACJA EKSPRESJI GENU *HSP70.2/HST70*

Podobieństwo sekwencji kodujących genów *Hsp70.2* myszy, *Hst70* szczura i *HspA2* człowieka wynosi około 92%. Większe różnice występują w rejonie promotora, obecne są tu jednak dwa niemal identyczne dwudziestokilku-nukleotydowe bloki sekwencji (blok A i blok B). W rejonie promotora najbardziej istotnym dla zachowania swoistości ekspresji genów *Hsp70.2* i *Hst70* (przedstawionym schematycznie na Ryc. 5) podobieństwo wynosi 87%. Organizacja jednostki transkrypcyjnej obu genów jest niemal identyczna (zwykle stosowane są terminy „gen *Hsp70.2/Hst70*” i „białko *HSP70.2/HST70*”). Transkrypcja genu *Hsp70.2/Hst70* inicjowana jest z dwóch głównych miejsc: T1 i T2. Gen zawiera



Rycina 5. Struktura promotora genu *Hsp70* szczura. Zaznaczono położenie sekwencji o potencjalnym znaczeniu regulacyjnym: Oct – odwrócona sekwencja oktameroza wiążąca czynniki transkrypcji Oct poprzez ich domenę POU; Sp1 – sekwencje bogate w pary GC, potencjalne miejsce wiązania uniwersalnego czynnika transkrypcji Sp1; ERE(nf) – ang. *Estrogen Responsive Element*, nieaktywna w testach transfekcyjnych *in vitro* sekwencja różniąca się jednym nukleotydem od konsensusu sekwencji wiążącej receptory estrogenów; H1t-like – sekwencja podobna do sekwencji regulatorowej *cis* obecnej w promotorze genu *H1t* szczura kodującego wariant jądrowy histonu H1; CAAT – miejsce wiązania uniwersalnego czynnika transkrypcji CTF-1; HSE-like – sekwencja podobna do konsensusu sekwencji wiążącej czynniki transkrypcji HSF; TATA-box – miejsce wiązania czynnika transkrypcji TBP (ang. *TATA-box Binding Protein*). T1 i T2 – główne miejsca startu transkrypcji. A i B – sekwencje konserwowane ewolucyjnie w promotorach homologicznych genów ssaków. ATG – kodon metioniny, miejsce startu translacji.

intron o długości 239 pz w nie ulegającym translacji regionie 5' (5'UTR). Intron obecny jest tylko w transkrypcie pierwotnym inicjowanym z miejsca T1. Drugie miejsce startu transkrypcji zlokalizowane jest w intronie [54]. Tylko miejsce T2 poprzedzone jest przez sekwencję TATA-box. Jednak transkrypty inicjowane z miejsca T2 nie są swoiste dla spermatocytów: są wykrywane w jądrach myszy jeszcze przed rozpoczęciem spermatogenezy – przed pojawieniem się pierwszych spermatocytów i długo przed pojawieniem się białka HSP70.2/HST70. Natomiast synteza białka zbiega się czasowo z rozpoczęciem pierwszej mejozy i pojawieniem się transkryptów inicjowanych w miejscu T1 (co związane jest z uwolnieniem hipotetycznego represora z sekwencji Oct znajdującej się w sąsiedztwie T1) [55]. Szczegółową analizę funkcjonalną promotora genu *Hsp70.2/Hst70* przeprowadzono na modelu myszy transgenicznym, u których ekspresja genu wskaźnikowego CAT (acetylotransferazy chloramfenikolu) kontrolowana była przez różnej długości fragmenty promotora genu *Hst70* szczura. Analiza wykazała, że sekwencje DNA zawarte pomiędzy T1 i T2 (między innymi bloki A i B) są niezbędne i wystarczające dla zachowania swoistej tkankowo i wydajnej ekspresji transgeny (Ryc. 6) [56]. Co ciekawe, włączenie do transgeny sekwencji S/MAR (ang.: *scaffold/matrix attached region*) znajdujących się kilkaset pz powyżej T1 powoduje obniżenie aktywności promotora [57].



Białko HSP70.2/HST70 pełni różnorodne funkcje jako białko opiekuńcze w komórkach plemnikotwórczych. Jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy, a samce myszy pozbawionych genu *Hsp70.2* są nieplodne. Spermatogeneza zatrzymuje się u

Rysunek 6. Analiza aktywności promotora genu *Hst70* szczura w jądrach myszy transgenicznym. Przedstawiono strukturę promotora genu *Hst70* z miejscami startu transkrypcji T1 i T2 (odpowiednio 351 i 116 pz powyżej miejsca startu translacji w kodonie ATG, gdzie A oznacza +1) i położeniem bloków A i B. Poniżej przedstawiono strukturę genów hybrydowych *Hst70-CAT*, których aktywność testowano w jądrach myszy transgenicznym. Po prawej stronie przedstawiono poziom aktywności genu wskaźnikowego CAT (acetylotransferazy chloramfenikolu). W jednym z konstruktów sekwencje znajdujące się bezpośrednio powyżej miejsca T2 zastąpiono promotorem minimalnym kinazy tyminy (prom. min. tk). HSE-mut – zmutowana sekwencja HSE-like. Na podstawie prac [54-56,58].

Struktura promotora genu *Hsp70.2/Hst70*, zapewniająca regulację ekspresji w trakcie rozwoju komórek plemnikotwórczych, jest inna niż struktura typowych genów *Hsp*. Tym niemniej, w promotorze genu *Hsp70.2/Hst70* znajduje się sekwencja HSE-like, podobna do elementu HSE występującego w promotorach genów z rodziny *Hsp* i odpowiedzialnego za wiązanie czynników transkrypcyjnych HSF. Badania przeprowadzone na opisanym powyżej modelu transgenicznym wykazały, że mutacja sekwencji HSE-like nie ma wpływu na poziom ekspresji transgeny w temperaturze fizjologicznej. Co ciekawe, w obecności aktywnego czynnika HSF1 spada wydajność promotora zawierającego zarówno prawidłową jak i zmutowaną sekwencję HSE-like. Aktywny czynnik HSF1 hamuje również ekspresję endogennego *Hsp70.2/Hst70*, co jest zupełnie nietypowe dla genów *Hsp*. W badaniu metodą immunoprecypitacji chromatywny nie wykryto jednak wiązania HSF1 do promotora genu *Hsp70.2/Hst70*, co sugeruje działanie za pośrednictwem innych czynników transkrypcyjnych [58].

WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKA HSP70.2/HST70/HSPA2

Białka HSP70.2/HST70 gryzoni i HSPA2 człowieka są bardzo podobne (powyżej 98% homologii) [59]. Białka te (oraz kodujące je geny) różnią się jednak wzorem ekspresji. U gryzoni białko HSP70.2/HST70 jest wykrywalne poza jądrami jedynie w niektórych obszarach mózgu (i rozwijającym się układzie nerwowym u zarodków), chociaż śladowe ilości transkryptu obecne są także w innych narządach somatycznych (dodatkowo są tu wykrywane transkrypty antysensowe) [60,61]. Natomiast transkrypty genu *HspA2* są łatwo wykrywalne w większości narządów człowieka [59]. Szczególnie liczne są w komórkach nowotworowych, gdzie stanowią do kilkunastu procent wszystkich transkryptów genów z rodziny *Hsp70* [62]. Również niewielkie ilości białka HSPA2 wykrywane są w komórkach somatycznych [63]. Chociaż rola białka HSPA2 w prawidłowych komórkach somatycznych nie jest znana, białko to jest niezbędne do wzrostu komórek nowotworowych, a wyciszenie jego ekspresji za pomocą RNAi powoduje zahamowanie wzrostu w fazie G1 i śmierć (efektu takiego nie obserwuje się w szybko rosnących prawidłowych komórkach nabłonkowych) [64].

nich na etapie późnego pachytenu pierwszego podziału meiotycznego, a spermatocyty ulegają apoptozie [65]. Podczas prawidłowo przebiegającej spermatogenezy białko HSP70.2 obecne jest w obrębie kompleksu synaptonemalnego i prawdopodobnie bierze udział w jego dysocjacji [66,67]. Wykazano również, że białko HSP70.2 jest niezbędne dla powstania funkcjonalnego kompleksu kinazy CDC2 z cykliną B1 – tak zwanego czynnika MPF (ang. *mitosis-promoting factor*), niezbędnego dla przejścia z fazy G2 do M [68].

Aktywność ATPazowa HSP70.2 jest prawdopodobnie modulowana przez pojawiające się swoiście w spermatydach białka pomocnicze MSJ-1 i DjA4 zawierające domenę J [69, 70]. W obrębie domeny ATPazowej białka HSP70.2 myszy zlokalizowano dodatkowo region wiążący sulfogalaktolipidy [71]. Znaczenie fizjologiczne takiej „adhezyjnej” aktywności nie jest dotychczas znane, choć pojawiły się sugestie, że mogłaby ona odgrywać rolę przy zapłodnieniu. Białko HSP70 szczura może tworzyć funkcjonalną jednostkę z dwoma białkami z rodziny HSP100 (APG-1 i APG-2). Kompleks taki towarzyszy kalmodulinie w komórkach na etapie od spermatocytów pachytenowych do wczesnych spermatyd [72]. Za wiązanie z kalmoduliną odpowiada przypuszczalnie 21-aminokwasowy region w obrębie domeny N-końcowej obecny w większości białek HSP70 [73]. Poza tym ludzkie białko HSPA2 zidentyfikowano jako swoistą dla plemników izoformę M kinazy kreatynowej. Szereg danych wskazuje, że konsekwencją niskiego poziomu białka HSPA2 jest nieprawidłowy rozwój spermy [74].

Badane *in vitro* właściwości biochemiczne białek HSP70.2 i HSP70i są bardzo podobne [70]. Również *in vivo*, w czasie stresu komórkowego, oba białka mają podobną lokalizację w jądrze komórkowym [58,75]. Jednak ekspresja tych dwóch białek w warunkach stresu komórkowego (po aktywacji HSF1) jest odmienna – ilość HSP70i w komórkach somatycznych gwałtownie przyrasta, natomiast ekspresja HSP70.2 w spermatocytach ulega represji [58]. Prawdopodobnie jest to jeden z mechanizmów ułatwiających indukowaną przez stres komórkowy apoptozę komórek plemnikotwórczych.

UWAGI KOŃCOWE

Komórki rozrodcze stanowią szczególny typ komórek – są linią nieśmiertelną, przekazującą materiał genetyczny następnym pokoleniom. Od jakości gamet zależy „jakość” osobników potomnych, dlatego też uszkodzone komórki nie są naprawiane, lecz aktywnie eliminowane. Osiągane jest to w zaskakująco prosty sposób: ten sam czynnik transkrypcyjny (HSF1), który w komórkach somatycznych jest elementem systemu cytoprotekcji, w komórkach rozrodczych indukuje apoptozę. Dzieje się tak tylko w męskich komórkach rozrodczych, produkowanych w dużych ilościach i bardziej narażonych na uszkodzenia niż gamety żeńskie. Mechanizm molekularny takiego pro-apoptotycznego działania HSF1 jest ciągle niejasny. Nie wiadomo jakie geny są podstawowymi celami HSF1 w spermatocytach, ani jakie białka modulują jego aktywność. Poznanie szczegółowych mechanizmów regulacji i działania czynnika HSF1 i białek HSP w komórkach spermatogenicznych powinno uzupełnić wiedzę o przyczynach bezpłodności oraz sposobach

jej diagnozowania i leczenia. Co ważniejsze, z odkryciem pro-apoptotycznego mechanizmu działania HSF1 wiążą się nadzieje na opracowanie nowych technik terapeutycznych umożliwiających eliminację komórek nowotworowych.


PIŚMIENNICTWO

1. Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52: 198-236
2. Rossi P, Dolci S, Sette C, Capolunghi F, Pellegrini M, Loiarro M, Di Agostino S, Paronetto MP, Grimaldi P, Merico D, Martegani E, Geremia R (2004) Analysis of the gene expression profile of mouse male meiotic germ cells. *Gene Expr Patterns* 4: 267-281
3. Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi P (2004) Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction* 128: 5-12
4. Grądzka I (2000) Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Postepy Biochem* 46: 2-16
5. Nalepa G, Żukowska-Szzechowska E (2002) Kaspazy i apoptoza: umrzyj i pozwól żyć. *Wiad Lek* 55: 100-6
6. Smolewski P (2003) Rola kaspaz w procesie apoptozy. *Postepy Hig Med Dosw* 57: 335-54
7. Print CG, Loveland KL (2000) Germ cell suicide: new insight into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22: 423-430
8. Baum JS, St George JP, McCall K (2005) Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 16: 245-59
9. Brash DE (1996) Cellular proofreading. *Nature Med* 2: 525-526
10. Matsui Y (1998) Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *APMIS* 106: 142-148
11. Moore CR, Chase HD (1923) Heat application and testicular degeneration. *Anat Rec* 26: 344-403
12. Setchell BP, D'Occhio MJ, Hall MJ, Laurie MS, Tucker MJ, Zupp JL (1998) Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? *J Reprod Fertil* 82: 567-574
13. Chowdhury AK, Steinberger E (1970) Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J Reprod Fertil* 22: 205-12
14. Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgentaler A (1997) Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Andrology*, 18:159-165
15. Voellmy R (2004) On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones* 9: 122-33
16. Fernandes M, O'Brien T, Lis JT (1994) Structure and regulation of heat shock gene promoters. W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos G (red) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Press, str. 375-391
17. Krawczyk Z, Lisowska K (2000) Regulacja ekspresji genów szoku termicznego *hsp70i*. *Postepy Biochem* 46: 24-37
18. Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ (2002) Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 30: S43-50.
19. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 7: 736-741
20. Macario AJ, Conway de Macario E (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med* 353: 1489-501
21. Lee C, Yu MH (2005) Protein folding and diseases. *J Biochem Mol Biol* 38: 275-80
22. Lee S, Tsai FT (2005) Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* 38: 259-65
23. Soti C, Pal C, Papp B, Csermely P (2005) Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol* 17: 210-5
24. Borges JC, Ramos CH (2005) Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett* 12: 257-61

25. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P (2004) The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64: 442-51
26. Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40: 41-58
27. Gullo CA, Teoh G (2004) Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 94: 1-10
28. Beere HM (2004) 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Science* 117: 2641-2651
29. Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366
30. Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131
31. Loones MT, Rallu M, Mezger V, Morange M (1997) HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci* 53: 179-90
32. Somasundaram T, Bhat SP (2004) Developmentally dictated expression of heat shock factors: exclusive expression of HSF4 in the postnatal lens and its specific interaction with α B-crystallin heat shock promoter. *J Biol Chem* 279: 44497-44503
33. Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI (1994) Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* 14: 2087-99
34. Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S, Morimoto RI (2001) Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21: 7163-7171
35. He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A, Gong J, Brown SA, Kingston RE, Calderwood SK (2003) Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J Biol Chem* 278: 35465-75
36. Paslaru L, Morange M, Mezger V (2003) Phenotypic characterization of mouse embryonic fibroblasts lacking heat shock factor 2. *J Cell Mol Med* 7: 425-435
37. Wang G, Ying Z, Jin X, Tu, Zhang Y, Phillips M, Moskophidis D, Mivechi NF (2004) Essential requirement for both *hsf1* and *hsf2* transcription activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis* 38: 66-80
38. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J* 18: 5943-5952
39. Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* 21: 2591-2601
40. Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF (2003) Targeted disruption of the heat shock transcription factor (*hsf2*)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects and reduced spermatogenesis. *Genesis* 36: 48-61
41. Nakai A, Suzuki M, Tanabe M (2000) Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19: 1545-1554
42. Widlak W, Benedyk K, Vydra N, Glowala M, Ściegłńska D, Małusecka E, Nakai A, Krawczyk Z (2003) Expression of a constitutively active mutant of heat shock factor 1 under the control of testis-specific *hst70* gene promoter in transgenic mice induces degeneration of seminiferous epithelium. *Acta Biochim Polon* 50: 535-541
43. Sreedhar AS, Csermely P (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 101: 227-57
44. Huang L, Mivechi NF, Moskophodos D (2001) Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the *hsp70.1* or *hsp70.3* gene. *Mol Cell Biol* 21: 8575-8591
45. Izu H, Inouye S, Fujimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A (2004) Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanism's in male germ cells. *Biol Reprod* 70:18-24
46. Vydra N, Małusecka E, Jarzab M, Lisowska K, Glowala-Kosińska M, Benedyk K, Widlak P, Krawczyk Z, Widlak W (2006) Spermatocyte-specific expression of constitutively active Heat Shock Factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death Differ* 13: 212-222
47. Lisowska K, Krawczyk Z (1998) Rodzina genów stresu *hsp70* ssaków. *Postepy Biochem* 44: 179-182
48. Mayer MP, Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-84
49. Sarge KD, Cullen KE (1997) Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 53: 191-197
50. Krawczyk Z (1999) Swoista ekspresja genów szoku termicznego (*hsp*) w procesie spermatogenezy. *Post Biol Kom* 26: 167-172
51. Christians ES, Zhou Q, Renard J, Benjamin IJ (2003) Heat shock proteins in mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 14: 283-90
52. Krawczyk Z, Mali P, Parvinen M (1988) Expression of testis-specific *hsp70* gene-related RNA in defined stages of rat seminiferous epithelium. *J Cell Biol* 107: 1317-1323
53. Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B (2001) Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis. *Biol Reprod* 65: 119-27
54. Ściegłńska D, Widlak W, Konopka W, Poutanen M, Rahman N, Huhtaniemi I, Krawczyk Z (2001) Structure of the 5' region of the *hst70* gene transcription unit: presence of an intron and multiple transcription initiation sites. *Biochem J* 359: 129-137
55. Ściegłńska D, Vydra N, Krawczyk Z, Widlak W (2004) Location of promoter elements necessary and sufficient to direct testis-specific expression of the *Hst70/Hsp70.2* gene. *Biochem J* 379: 739-47
56. Widlak W, Markkula M, Krawczyk Z, Kananen K, Huhtaniemi I (1995) A 252 bp upstream region of the rat spermatocyte-specific *hst70* gene is sufficient to promote expression of the *hst70*-CAT hybrid gene in testis and brain of transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 1264: 191-200
57. Widlak W, Widlak P (2004) MAR/SAR elements flank the rat *hst70* gene transcription unit. *Cell Mol Biol Lett* 9: 123-33
58. Widlak W, Vydra N, Małusecka E, Dudaladava V, Ściegłńska D, Krawczyk Z, Widlak P, dane nie publikowane.
59. Bonnycastle LLC, Yu Ch-E, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD (1994) Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (*HspA2*). *Genomics* 23: 85-93
60. Murashov AK, Wolgemuth DJ. (1996) Distinct transcripts are recognized by sense and antisense riboprobes for a member of the murine HSP70 gene family, HSP70.2, in various reproductive tissues. *Mol Reprod Dev* 43: 17-24
61. Ściegłńska D, Widlak W, Rusin M, Markkula M, Krawczyk Z (1997) Expression of the testis-specific *hsp70*-related gene (*hst70* gene) in somatic non-testicular rat tissues revealed by RT-PCR and transgenic mice analysis. *Cell Biol Int* 21: 813-821
62. Dugaard M, Jaattela M, Rohde M (2005) Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 4: 877-80
63. Son W-Y, Hwang S-H, Han C-T, Lee J-H, Kim S, Kim YC (1999) Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod* 12: 1122-1126
64. Rohde M, Dugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 19:570-82
65. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM (1996) Targeted gene disruption of *hsp70.2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 16: 3264-3268
66. Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, Poorman-Allen P, Dresser ME, Eddy EM (1996) HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 104: 414-421.
67. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PR, Goulding EH, Strong BD, Eddy EM (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic

- prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124: 4595-603
68. Zhu D, Dix DJ, Eddy EM (1997) HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 124: 3007-3014
69. Berruti G, Martegani E (2001) MSJ-1, a mouse testis-specific DnaJ protein, is highly expressed in haploid male germ cells and interacts with the testis-specific heat shock protein Hsp70-2. *Biol Reprod* 65: 488-95
70. Hafizur RM, Yano M, Gotoh T, Mori M, Terada K (2004) Modulation of chaperone activities of Hsp70 and Hsp70-2 by a mammalian DnaJ/Hsp40 homolog, DjA4. *J Biochem* 135: 193-200
71. Mamelak D, Lingwood C (2001) The ATPase domain of hsp70 possesses a unique binding specificity for 3'-sulfogalactolipids. *J Biol Chem* 276: 449-56
72. Moriya M, Ochiai M, Yuasa HJ, Suzuki N, Yazawa M (2004) Identification of Ca²⁺-dependent calmodulin-binding proteins in rat spermatogenic cells as complexes of the heat-shock proteins. *Mol Reprod Dev* 69: 316-24
73. Stevenson MA, Calderwood SK (1990) Members of 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved calmodulin-binding domain. *Mol Cell Biol* 10:1234-1238
74. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L (2000) Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Rep* 63: 925-932
75. Ellis S, Killender M, Anderson RL (2000) Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 48: 321-32

The heat shock response and *HSP70* gene expression in male germ cells

Wiesława Widlak 

Department of Tumor Biology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, 15 Wybrzeże Armii Krajowej St., 44-101 Gliwice, Poland

e-mail: wwidlak@io.gliwice.pl

Key words: spermatogenesis, heat shock proteins, regulation of gene expression, apoptosis

ABSTRACT

Apoptosis of spermatogenic cells is an essential process that allows to maintain correct proportion between somatic and germ cells. In addition, apoptosis induced by cellular stress is an important checkpoint mechanism that eliminates damaged male germ cells. The response to cellular stress (e.g. hyperthermia) in somatic cells includes activation of the heat shock transcription factor 1 (HSF1) leading to induction and accumulation of the heat shock proteins (HSPs), mainly HSP70i, which allows cell survival. In major contrast, in meiotic and post-meiotic germ cells *Hsp70i* genes are not induced in elevated temperature. Instead, activation of HSF1 leads to caspase-3-dependent apoptosis and spermatogenic cells are actively eliminated. Although HSP70i proteins are repressed in spermatocytes and spermatids, another HSP70 proteins are specifically expressed in those cells, which are necessary for spermatogenesis. However, *Hsp70.2/Hst70* gene, the major testis-specific *Hsp70* expressed mostly in spermatocytes, is down-regulated by HSF1 and spermatogenic cells undergoing stress-induced apoptosis lack HSP70.2/HST70 protein.

Michał Jasiński

Marek Figlerowicz

Institut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Institut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; e-mail: jasiński@ibch.poznan.pl, tel: (061) 852 85 03 wew. 150

Artykuł otrzymano 25 stycznia 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 8 marca 2006 r.

Słowa kluczowe: transportery ABC, oporność wielolekowa, transport aktywny, dystrybucja metabolitów

Wykaz skrótów: transportery ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*) – białka z charakterystycznym i zachowawczym rejonem wiążącym ATP, aktywne m.in. w procesie transportu poprzez błony biologiczne, MDR (ang. *multidrug resistance*) – wielolekowa oporność, MRP (ang. *multidrug resistance associated proteins*) – białka powiązane z opornością wielolekową, PDR (ang. *pleiotropic drug resistance*) – białka, których aktywność powiązana jest z fenotypem pleiotropowej oporności, TMD (ang. *transmembrane domain*) – domena transblonowa, NBD (ang. *nucleotide binding domain*) – domena wiążąca nukleotydy, NBF (ang. *nucleotide binding fold*) – rejon wiążący ATP w obrębie NBD

Podziękowania: Praca powstała w ramach Grantu Unii Europejskiej: MERG-CT-2005-016182. Michał Jasiński dziękuje pani mgr Halinie Pospiszyl za pierwsze ABC biologii

STRESZCZENIE

Transportery ABC obecne u wszystkich organizmów żywych znane są głównie w kontekście zjawiska zwanego opornością wielolekową. Stały się one obiektem intensywnych badań u ssaków jako białka powodujące brak wrażliwości komórek rakowych na leki stosowane w chemioterapii. Jak dotąd, stosunkowo mało wiemy o roślinnych transporterach ABC. Rosnąca w ostatnich latach ilość publikacji dotyczących ich roli w wielu procesach fizjologicznych, świadczy o zainteresowaniu także i tymi białkami. Szczególnie dobrze poznane zostały tzw. wakuolarnie transportery ABC, aktywne w procesie transportu egzogennych toksyn (np. herbicydów), a także produktów endogenego metabolizmu takich jak pochodne chlorofilu do wakuoli. Inne zlokalizowane w błonie komórkowej są transporterami metabolitów wtórnych czy fitohormonów. Białka ABC są także obecne w organelach komórkowych gdzie wpływają np. na proces β oksydacji. Praca ta poświęcona została krótkiej charakterystyce transporterów ABC, uwzględniającej typowe cechy ich budowy oraz fizjologiczne aspekty funkcjonowania w komórce roślinnej.

WPROWADZENIE

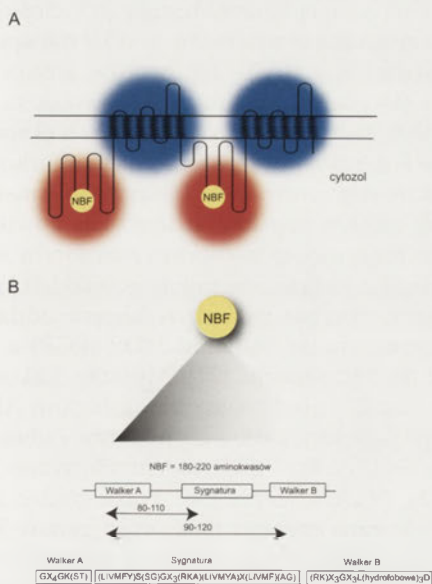
Białka znane jako transportery ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*) możemy znaleźć w każdym typie żywej komórki, u przedstawicieli wszystkich znanych gatunków. Jako pierwsze poznano bakteryjne białka ABC, określane mianem permeaz periplazmatycznych, które odpowiedzialne są za pobieranie ze środowiska składników odżywczych, takich jak cukry czy aminokwasy [1]. U pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* aż 5% genomu stanowią geny kodujące białka ABC. Szacuje się, iż w genomie człowieka jest ich około 50. Podobna liczba tych genów jest obecna w takich organizmach modelowych jak nicien *Caenorhabditis elegans* (58) czy muszka owocowa *Drosophila melanogaster* (51) [2]. Nieco mniej, bo 30 genów kodujących transportery ABC zidentyfikowano u drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* [3].

Transportery ABC wykorzystują hydrolizę ATP do transportu, poprzez błony biologiczne, szeregu różnych związków chemicznych. Aktywność ta jest podstawą zjawiska zwanego opornością wielolekową (MDR ang. *multidrug resistance*). Pierwotnie zaobserwowano ją w ssących komórkach rakowych opornych na chemioterapeutyki takie jak daunorubicyna czy winkrystyna. Oporność wielolekowa stała się siłą napędową badań, prowadzących do poznania pierwszego transportera ABC u człowieka znanego jako glikoproteina-p (MDR1) [4]. Dodatkowo zainteresowanie tą klasą białek potęgowały doniesienia świadczące, że dysfunkcja niektórych transporterów ABC powoduje szereg groźnych schorzeń takich jak mukowiscydoza (białko CFTR) [5], adrenoleukodystrofia (białko ABCD1) [6] czy wrodzony hiperinsulinizm (białko SUR) [7]. Warto zaznaczyć, że wśród białek ABC znajdują się również takie, które funkcjonują jako kanały jonowe (CFTR) [5] lub białka regulatorowe (RLI) [8]. Identyfikacja drożdżowych endogennych transporterów takich jak PDR5 [9], Snq2 [10] czy Yor1 [11] oraz poznanie ich właściwości umożliwiło dokładniejszą analizę zjawiska MDR. Drożdże piekarnicze stały się wygodnym systemem ekspresyjnym pozwalającym na szczegółowe badania ssących transporterów ABC. Pozwolił on także na identyfikację nowych genów kodujących transportery ABC u innych organizmów, włączając w to patogenne grzyby np. *Candida albicans* [12]. W systemie drożdżowym analizowano również funkcje szeregu transporterów ABC zidentyfikowanych u roślin. W przeciwieństwie do ssaków czy drożdży, badania roślinnych białek ABC nabierają dopiero rozpędu. Intrygującym wydaje się fakt, że rośliny są wyjątkowo bogate w geny kodujące transportery ABC. Przykładem może być rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), którego genom zawiera aż 129 takich genów [13]. Liczba ta jest znacząco wyższa niż u wspomnianych wyżej organizmów, nie tylko w odniesieniu do wielkości genomu, ale również w porównaniu z całkowitą ilością genów kodujących białka biorące udział w procesach transportu. U *Arabidopsis* jest ich około 700, jednocześnie wspomniany *Caenorhabditis* ma ich około 650 a *Drosophila* 600. Z tego porównania można więc wyciągnąć wniosek, że *Arabidopsis* ma pra-

wie dwa razy tyle transporterów ABC co *Caenorhabditis* czy *Drosophila*. Badania roślinnych transporterów ABC można zasadniczo podzielić na takie, które charakteryzują proces transportu, jego mechanizm i specyficzność substratową oraz te dotyczące identyfikacji genów i białek oraz sposobów ich regulacji. Uzyskane informacje dotyczą roli transporterów ABC w sekrecji lub też wewnątrzkomórkowej kompartmentacji toksycznych związków zarówno egzogennych (np. herbicydy), jak i endogennych produktów katabolizmu (np. degradacji chlorofilu). Poniższa praca ma na celu zaprezentowanie zwięzłej charakterystyki transporterów ABC, ich struktury i właściwości enzymatycznych, ze szczególnym uwzględnieniem obecnego stanu wiedzy o ich funkcji w komórkach roślinnych.

BUDOWA ORAZ MECHANIZM TRANSPORTU

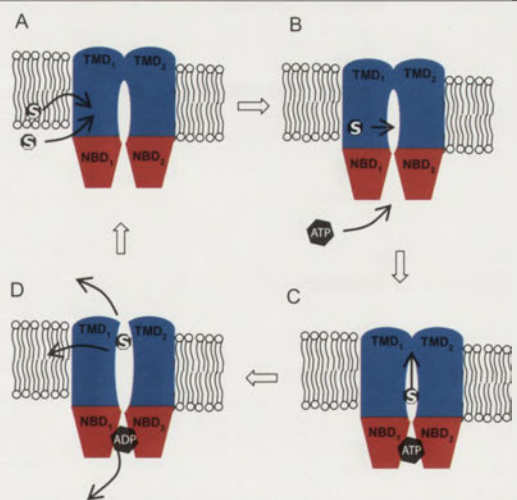
Transportery ABC posiadają specyficzną budowę modułową, opartą na dwóch typach domen: transbłonowej, hydrofobowej (TMD, ang. *transmembrane domain*), złożonej zazwyczaj z sześciu α helis oraz hydrofilowej, cytosolowej (NBD, ang. *nucleotide binding domain*), zawierającej konserwatywny rejon biorący udział w wiązaniu ATP, tzw. NBF (ang. *nucleotide binding fold*) (Ryc. 1). Domeny transbłonowe determinują specyficzność substratową i odpowiedzialne są za transport molekuł poprzez błonę komórkową lub pomiędzy jej warstwami [14,15]. Obecny w obrębie domeny cytosolowej rejon wiążący ATP to jeden z najbardziej charakterystycznych motywów białek ABC. Składa się on z około 200 aminokwasów i wykazuje blisko 40% identyczności wśród wszystkich znanych obecnie transporterów ABC. W obrębie NBF wyróżnić można szczególnie zachowawcze sekwencje, tzw: Walker A ($GX_4GK[ST]$) i Walker B ($[RK]X_3GX_3I[hydrofobowe]_3D$) [16] oddzielone około 120 aminokwasami zawierającymi rejon ABC (określany także jako sygnatura), mający sekwencję $[LIVMFY]S[SG]GX_3[RKA][LIVMYA]X[LIVFM][AG]$ [17,18] (Ryc. 1). Warto dodać, że rejon ten jest



Rycina 1. Budowa ABC transporterów. A. Schematyczny model transportera ABC. Część hydrofobowa, transbłonowa (TMD) utworzona z α helis (kolor niebieski). Część cytosolowa (NBD) w kolorze czerwonym zawierająca zachowane w ewolucji rejonu NBF (żółte) wiążące ATP. B. Organizacja rejonu NBF. Układ motywów Walker A i B oraz sygnatury.

unikalny dla białek ABC [19], tymczasem motywy Walkera są obecne także w innych białkach wiążących nukleotydy, takich jak: P-,F- oraz V-ATPazy lub fosfofruktokinaza [16]. U bakterii każdą domenę tworzy oddzielny, stosunkowo nieduży peptyd [19,20], stąd bakteryjne białka ABC były jednymi z pierwszych, których struktury wyższego rzędu zostały poznane. W przeciwieństwie do bakteryjnych białek ABC ich eukariotyczne odpowiedniki kodowane są zazwyczaj jako pojedyncze polipeptydy.

Obecnie znanych jest kilka struktur krystalograficznych bakteryjnych rejonów wiążących ATP, np.: HisP [21], MalK [22], jak również kompletnych transporterów, takich jak MsbA [23,24] i BtuCD [25] z *Escherichia coli*. Pierwszy jest transporterem lipidu A, jednego ze składników zewnętrznej błony bakteryjnej, drugi witaminy B12. Poznanie tych struktur pozwoliło odpowiedzieć na kluczowe pytania dotyczące zmian konformacyjnych, jakim ulegają poszczególne domeny białka w procesie transportu oraz ustalić czy pojedyncza domena NBD tworzy funkcjonalnie niezależną jednostkę wystarczającą do hydrolizy ATP. Model stworzony w oparciu o BtuCD pokazuje, że dwie domeny NBD blisko oddziałują ze sobą tworząc miejsce wiążące ATP [25]. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami biochemicznymi, wskazującymi na kooperatywność NBD [26] oraz z nowymi danymi strukturalnymi uzyskanymi dla kompleksów MsbA-ADP [24]. Pomimo, że szczegółowe badania kinetyki cyklu enzymatycznego nie zostały jeszcze zakończone, zgromadzone dane biochemiczne i krystalograficzne pozwalają zaproponować następujący mechanizm transportu: (i) wiązanie substratu, (który może mieć naturę hydrofilową i pochodzić np. bezpośrednio z cytosolu lub hydrofobową i kontaktować się z białkiem ABC na poziomie błony) inicjuje zmiany strukturalne transportera umożliwiające przyłączenie ATP i dimeryzację rejonów NBD; (ii) dimeryzacja, połączona z hydrolizą ATP, powoduje przesunięcie związku przez błonę [24]; (iii) uwolnienie ADP i reszty fosforanowej pozwala na powrót białka do stanu wyjściowego (Ryc. 2).



Rycina 2. Proponowany mechanizm funkcjonowania transportera ABC. Schemat przedstawia pełny transporter ABC z czterema domenami. A. Substrat (S) pochodzi z cytosolu lub błony i wiąże się z określonym miejscem domeny transbłonowej (TMD). B. Wiązanie ATP (jedna cząsteczka ATP-jedna NBD; rysunek pokazuje tylko jedno ATP). C. Przyłączenie i hydroliza ATP pociąga za sobą zmiany strukturalne powodujące przemieszczenie substratu przez błonę. D. Dysocjacja ADP i reszty fosforanowej, uwolnienie substratu - białko powraca do stanu wyjściowego. Kolorem niebieskim zaznaczono domeny transbłonowe, kolorem czerwonym domeny cytosolowe.

KLASYFIKACJA BIAŁEK ABC

Podstawową cechą braną pod uwagę podczas klasyfikacji białek ABC jest ich budowa. Białka złożone z dwóch domen hydrofobowych i dwóch hydrofilowych określa się mianem pełnych transporterów ABC (ang. *full size ABC transporters*), w odróżnieniu od białek posiadających tylko jedną domenę TMD i jedną NBD, które określane są jako połowiczne transportery ABC (ang. *half size ABC transporters*). Dodatkowym kryterium podziału na poszczególne typy jest wzajemna orientacja domen względem siebie oraz pewne modyfikacje ich struktury (Ryc. 3). Warto podkreślić, że nazewnictwo poszczególnych podrodzin wynika często z roli, jaką zidentyfikowane wcześniej białka odgrywają we wspomnianym zjawisku oporności wielolekowej lub z efektu fenotypowego, jaki ich dysfunkcja powoduje. Pierwsza systematyczna klasyfikacja roślinnych białek ABC przeprowadzona została u *Arabidopsis thaliana* [13]. Podzielono je na 12 podrodzin, wśród których wyróżnić można pełne transportery ABC takie jak: MDR (homologi ssaczych białek MDR), MRP (białka związane z MDR, ang. *multidrug resistance associated proteins*), PDR (homologi drożdżowych białek PDR ang. *pleiotropic drug resistance*), AOH (homologi ABC1 człowieka) oraz połowiczne transportery ABC nazwane: PMP (białka peroksyosomów), WBC (homologi białek ABC u *Drosophila*, których aktywność wpływa na kolor oczu), ATH (homologi ABC2), ATM (mitochondrialne białka ABC), TAP (homologi białek transportujących, peptydy biorące udział w odpowiedzi immunologicznej). Istnieją również transportery ABC pozbawione domeny transbłonowej, tj. RLI (homologi inhibitora RNAzy), GCN (homologi białka GCN20 drożdży) oraz SMC (ang. *structural maintenance of chromosomes*). Ich funk-

cja najprawdopodobniej nie jest bezpośrednio związana z aktywnością transportową. Dodatkową podrodzinę stanowią heterogenne białka NAP, wykazujące małą homologię względem siebie, jak i białek ABC z innych organizmów. Ukończony niedawno projekt sekwencjonowania genomu ryżu pozwolił także sklasyfikować pełne transportery ABC u tej rośliny [27].

CHARAKTERYSTYKA NIEKTÓRYCH PODRODZIN

Do najlepiej poznanych roślinnych białek ABC należą przede wszystkim pełne transportery. Wiedza ta jest wynikiem szeregu doświadczeń przeprowadzonych na *Arabidopsis*, która ze względu na poznanie kompletnej sekwencji genomu oraz istnienie szeregu linii mutantów insercyjnych jest najpowszechniej stosowanym modelowym organizmem roślinnym. Coraz częściej jednak pojawiają się nowe doniesienia dotyczące białek ABC pochodzących z roślin uprawnych.

BIAŁKA MDR

Jednym z pierwszych poznanych genów kodujących roślinne transportery ABC był *MDR1* z *Arabidopsis* [28]. Obecnie u *Arabidopsis* znane są 22 geny kodujące białka ABC typu MDR. Aktywność niektórych z nich, określanych również jako białka PGP (ze względu na homologię do glikoproteiny-p człowieka) jest związana z transportem auksyn [29-32]. Transgeniczne rośliny *Arabidopsis* z wyciszonym genem *MDR1* (znanym również jako *AtPGP19*), mutanty insercyjne tego genu oraz innych jego homologów takich jak *AtPGP1*, charakteryzuje karłowatość oraz zaburzona morfologia korzeni. Na podstawie tych obserwacji wysunięto hipotezę o udziale niektórych transporterów typu MDR w dystrybucji auksyn. Potwierdzają to badania takich genów jak *PGP1*, *PGP19* oraz *PGP4* u *Arabidopsis* [31,33,34]. Białko PGP4 bierze udział w transporcie auksyn w wierzchołku wzrostu korzenia oraz epidermie korzenia i najprawdopodobniej ma wpływ na rozwój korzeni bocznych i włosników. PGP1 i PGP19 uczestniczą w zależnym od ATP transporcie kwasu indolilo-3-octowego (IAA), zarówno w izolowanych protoplastach, jak i całych roślinach. Aktywność ta została potwierdzona w heterologicznych modelach ekspresji, jakimi są drożdże *S.cerevisiae* oraz ssacze linie komórkowe [31]. Badania te stanowią cenny wkład w poznanie mechanizmów dystrybucji auksyn *in planta*, uzupełniają bowiem obowiązujący wcześniej model transportu hormonów oparty jedynie na dyfuzji i białkach nośnikowych takich jak PIN [35]. Proponowany obecnie, zakłada wzajemne oddziaływania i współpracę pomiędzy białkami MDR (PGP) a PIN, celem ścisłej kontroli transportu [31]. Mutanty kukurydzy (*br2*) czy sorgo (*dw3*) z nieaktywnymi ortologami *AtPGP1*, charakteryzuje podobny karłowaty fenotyp i obniżony transport IAA [36]. Białka MDR zidentyfikowano również w ziemniaku [37] i jęczmieniu [38]. Warto dodać, że karłowatość powodowana mutacją niektórych genów MDR, może znaleźć zastosowanie w rolnictwie w uprawach jęczmienia czy kukurydzy. Niższe rośliny mają korzystniejsze właściwości mechaniczne niż typ dziki. Na uwagę zasługuje także białko CjMDR1, jedyny jak dotąd importer w podrodzinie MDR, biorący udział w akumulacji alkaloidu berberyny w kłączach *Coptis japonica* [39].



Rycina 3. Różnorodny układ domen tworzących białka ABC. Domey transbłonowe (TMD) w kolorze niebieskim. Domeny cytosolowe (NBD) kolor czerwony. Białka (TMD-NBD)₂, (NBD-TMD)₂ i TMD(TMD-NBD)₂ to przedstawiciele pełnych transporterów ABC, podczas gdy (TMD-NBD) i (NBD-TMD) to połowiczne transportery ABC. NBD-NBD i NBD to przedstawiciele rozpuszczalnych białek ABC. Przedstawiono reprezentanta każdej z grup. Dwie litery poprzedzające nazwę odpowiadają kolejno: At – *Arabidopsis thaliana*, Hs – *Homo sapiens*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*, Np – *Nicotiana plumbaginifolia*, Dm – *Drosophila melanogaster*. Kolorem czarnym zaznaczono dodatkową domenę hydrofobową, kolorem zielonym domenę regulatorową charakterystyczne dla białek MRP.

BIAŁKA MRP

Druga pod względem wielkości (15 genów) podrodzina ABC u *Arabidopsis* to białka MRP. Pionierskie badania transportu koniugatów-GS (kompleksów glutationu z takimi związkami jak dinitrofenol czy metolachlor) do roślinnych wakuol oraz pęcherzyków wakuolarnych wykazały, że proces ten zachodzi analogicznie jak w komórkach ssaczych [40]. Obserwacja ta stanowiła jedną z pierwszych przesłanek, przemawiających za udziałem roślinnych białek MRP w transporcie/magazynowaniu egzo- bądź endogennych toksyn w wakuoli. Zgodnie z panującym obecnie przekonaniem, detoksyfikacja z udziałem koniugatów-GS jest procesem kilku etapowym. Pierwsza jego faza zachodzi przy udziale monoooksygenaz zależnych od cytochromu P450 i polega na modyfikacji potencjalnych substratów. Następnie są one łączone z cząsteczkami o charakterze hydrofilowym, np. z glutationem czy glukozą. Dopiero w tej formie toksyczne substraty są aktywnie transportowane do wakuoli. Warto podkreślić, że transport takich związków jak metolachlor do wakuoli sprawia, iż rośliny stają się bardziej odporne na ten herbicyd. Ponadto roślinne białka MRP transportują produkty endogenego metabolizmu, np. związki powstające w wyniku degradacji chlorofilu (tetrapiole) czy metabolity wtórne (izoflawonoidy) [41,42]. W wakuoli gromadzone są również antocyjany, warunkujące m.in. barwę kwiatów. Prace nad mutantami *bz2* u kukurydzy (o zmienionej barwie nasion) pokazują, że i w tym w wypadku może być wykorzystywany transport zachodzący przy udziale koniugatów-GS. Ciągłe jednak trwają dyskusje dotyczące natury oraz obecności tego typu kompleksów *in planta* [2]. Jedną z najefektywniej transportowanych biomolekuł (najniższe K_m i najwyższe V_{max}) jest medikarpina [43]. Związek ten zaliczany jest do izoflawonoidów. Występuje między innymi w lucernie, jako fitoaleksyna odgrywająca istotną rolę w reakcjach obronnych rośliny. Badania mechanizmu transportu koniugatów-GS prowadzone były u takich roślin jak jęczmień oraz fasola. Istnieją również doniesienia świadczące o istnieniu tego typu transportu u kukurydzy. Najlepiej scharakteryzowane molekularnie są białka MRP z *Arabidopsis*. Pięć spośród nich (AtMRP1-5) funkcjonuje jako pompy koniugatów-GS. Jak dotąd, tylko w przypadku białka AtMRP2 jednoznacznie pokazana została lokalizacja komórkowa. Potwierdzono, iż występuje ono w tonoplaście.

AtMRP3 jest bliskim homologiem drożdżowego genu YCF1. Delecja genu YCF1 u drożdży powoduje ich nadwrażliwość na kadm, gdyż białko YCF1 funkcjonuje jako pompa-GS odkładająca kompleksy kadmu w wakuoli. Heterologiczna ekspresja AtMRP3 w takich szczepach drożdżowych przywraca ich odporność na jony metali ciężkich [42]. Świadczy to nie tylko o strukturalnym, ale także funkcjonalnym podobieństwie obu białek. Znalazło to odzwierciedlenie w serii prac poświęconych ich wykorzystaniu w procesie fitoremediacji [44]. Wakuola roślinna, mogąca niekiedy stanowić aż 90% objętości komórki jest niezwykle pojemnym magazynem. Zwiększenie wydajności odkładania kompleksów np. kadmu w wakuoli, przy udziale tego typu transporterów, przyczynia się do wzrostu odporności roślin na jony metali ciężkich i jednocześnie pozwala na ich efektywne usuwanie z gleby. Białka MRP obecne są nie tylko w wakuoli. AtMRP4 jest pierwszym białkiem MRP zlokalizo-

wanym w błonie komórkowej. Inaktywacja genu AtMRP4 u *Arabidopsis* zaburza prawidłowe funkcjonowanie aparatów szparkowych, przyczynia się do większej utraty wody na drodze transpiracji, co prowadzi do szybszego więdnienia. Potencjalne substraty dla AtMRP4 nie zostały jak dotąd poznane. Wykorzystując metotreksat, tj. związek hamujący zarówno otwieranie aparatów szparkowych jak i syntezę folianów, wykazano, że efekt jego działania u *Arabidopsis* zależy od obecności AtMRP4. Mutanty insercyjne, T-DNA genu AtMRP4 *Arabidopsis* nie są wrażliwe na metotreksat. Co więcej, w heterologicznym układzie drożdżowym, AtMRP4 aktywnie transportuje ten związek [45].

Wydaje się, że na prawidłowe funkcjonowanie aparatów szparkowych wpływa także aktywność białka AtMRP5. Badania insercyjnych T-DNA mutantów genu AtMRP5 wykazały, że dysfunkcja AtMRP5 powoduje brak reakcji aparatów szparkowych na światło oraz utratę wrażliwości na hormony regulujące stopień ich rozwarcia, takie jak kwas abscysynowy. W konsekwencji mutanty AtMRP5 mają fenotyp odwrotny do obserwowanego dla AtMRP4, są więc bardziej odporne na wysychanie [46,47]. Interesującym wydaje się fakt, że białka z rodziny MRP (AtMRP4, AtMRP5) mogą kompleksowo koordynować pracę aparatów szparkowych, chociaż szczegóły tego procesu nie są jasne. Mutanty insercyjne T-DNA AtMRP4, w odróżnieniu od AtMRP5, reagują na kwas abscysynowy, co świadczyć może, iż aktywność tych dwóch białek jest regulowana w różny sposób. Udział AtMRP5 w prawidłowym funkcjonowaniu aparatów szparkowych jest wciąż obiektem intensywnych badań. Nie wiadomo czy aktywność tego enzymu stanowi sygnał w kaskadzie zdarzeń zachodzących podczas zamykania/otwierania aparatów szparkowych, czy jest ona kluczowym elementem składowym tego procesu. Obniżona wrażliwość na suszę budzi zainteresowanie badaczy i rolników. W tym kontekście warto dodać, że wiele białek MRP z roślin uprawnych ma wysoki stopień homologii i podobną strukturę organizacyjną do zidentyfikowanych u *Arabidopsis* [27,48].

BIAŁKA PDR

Jak dotąd, przedstawiciele tej podrodziny zidentyfikowano tylko u drożdży i roślin. Roślinne białka PDR są jeszcze słabo poznane. Jednym z pierwszych było TUR2 z wodnej spirodeli wielokorzeniowej (*Spirodela polyrhiza*). Ekspresja genu TUR2 jest regulowana kompleksowo przez takie czynniki środowiskowe jak niska temperatura, zasolenie czy obecność kwasu abscysynowego (indukującego tworzenie zimujących pąków). Wysłunięto hipotezę, że TUR2 uczestniczy w ogólnej odpowiedzi rośliny na stres środowiskowy [49].

Innym przedstawicielem podrodziny PDR jest białko NpABC1 (znane obecnie jako NpPDR1) występujące w błonie komórkowej tytoniu *Nicotiana plumbaginifolia* [50]. Stwierdzono, iż jego synteza może być indukowana sklareolem, terpenoidem pełniącym funkcje obronne (antygrzybicze i antibakteryjne) [51]. Analiza immunologiczna wskazuje na lokalizację NpABC1 w epidermie liści i jej wytworach. Wykazano również, że NpABC1 bierze udział w transporcie analogów sklareolu. Wraz z akumulacją tego białka we frakcjach błony komórkowej, maleje wewnątrzkomórkowe stężenie znakowanego terpenoidu (sklareolidu). Można więc sądzić, że

NpABC1 uczestniczy w jego sekrecji na zewnątrz komórek. Uzyskane wyniki wskazują na istotne znaczenie NpABC1 w reakcjach obronnych tytoniu, powiązanych z wydzielaniem terpenoidów na powierzchnię liści. Przypuszczenie to wydają się potwierdzać eksperymenty, podczas których synteza NpABC1 indukowana była przez patogeny (np. *Pseudomonas*) [52]. Ponadto rośliny, z wyciszonym genem *NpABC1* są bardziej podatne na zakażenia patogennymi grzybami takimi jak *Botrytis cinerea*. Dodatkowo zaobserwowano, że ekspresja *NpABC1* jest indukowana przez kwas jasmonowy, który jest aktywatorem wielu genów zaangażowanych w odpowiedź roślin na różne czynniki stresowe [52,53]. Warto podkreślić, że białko NpABC1 jest także obecne w innych organach, np. w korzeniu czy kwiecie. Poziom białka NpABC1 w korzeniu nie zależy od obecności mikroorganizmów, jednak organ ten charakteryzuje pewien stały poziom metabolitów wtórnych (np. terpenów) pełniących rolę antybakteryjną [54]. Funkcja, jaką może pełnić NpABC1 w kwiecie nie jest znana, choć wiele związków zapachowych to również terpenoidy [55]. Nie wykluczona jest również różna specyficzność substratowa NpABC1 stwierdzona u innych przedstawicieli białek PDR [56]. NpABC1 jest bliskim homologiem TUR2 (69% zgodności aminokwasowej). Transkrypcja genu *TUR2* jest również indukowana sklareolem, a jego heterologiczna ekspresja podnosi odporność *Arabidopsis* na toksyczne stężenia sklareolu [57].

Homologii NpABC1 obecne są także u barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) [58], tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*) [59] *Arabidopsis* [60] i ryżu [61]. Na poziom ekspresji tych genów mają wpływ takie czynniki jak: elicytory bakteryjne i grzybowe, kwas jasmonowy, kwas salicylowy i jasmonian metylu. Dodatkowo ekspresja *OsPDR9* z ryżu indukowana jest obecnością jonów metali ciężkich. Uzyskane wyniki pozwalają wysunąć hipotezę, że przynajmniej część roślinnych białek typu PDR bierze udział w szeroko rozumianych mechanizmach obronnych. Aktywność tych białek, jak pokazuje przykład NpABC1, może przyczyniać się do sekrecji metabolitów wtórnych. Interesujący jest fakt, że heterologiczna ekspresja drożdżowych białek PDR w roślinie, wykazała ich aktywny udział w transporcie roślinnych metabolitów wtórnych. Nadekspresja drożdżowego genu *PDR5* z *Saccharomyces cerevisiae* w tytoniu powodowała obniżenie toksyczności nikotyny, która była wydzielana na zewnątrz komórek roślinnych. Jest to kolejny argument przemawiający za dużą elastycznością substratową przynajmniej części białek PDR. Poznanie roli białek typu PDR w mechanizmach obronnych opartych na sekrecji, pozwala nie tylko zrozumieć to zjawisko, ale i wykorzystać zdobytą wiedzę do ulepszania systemów stosowanych do produkcji metabolitów wtórnych. Niska wydajność produkcji tych związków, wynika często z ich naturalnej toksyczności względem wytwarzających je komórek. Istotnym problemem jest więc optymalizacja dystrybucji produktu końcowego w określonych organelach, jak np. wakuola czy sekrecja na zewnątrz komórki.

POŁOWICZNE TRANSPORTERY ABC

Genom *Arabidopsis* koduje prawie taką samą liczbę połowicznych (51) jak pełnych (52) transporterów ABC. Niestety nasza wiedza na temat tych pierwszych jest dużo mniejsza i tylko kilka kodujących je genów zostało dotychczas bliżej

scharakteryzowanych. Warto wspomnieć tutaj *AtPMP2*, którego aktywność transportowa wpływa na proces β oksydacji w peroksysomach. Badania mutantów *AtPMP2*, u *Arabidopsis* ujawniły zaburzenia importu kwasów indolo-3-masłowego i 2,4 dichlorofenoksymasłowego do peroksysomów, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w syntezie hormonów takich jak auksyny czy kwas dichlorofenoksyoctowy [62].

Kolejnym połowicznym transporterem, u *Arabidopsis* jest *AtATM3*, mitochondrialne białko będące ortologiem *ATM1* z drożdży *S. cerevisiae*. Aktywność *AtATM3* warunkuje najprawdopodobniej prawidłową syntezę cytosolowych białek posiadających kompleksy żelazowo-siarkowe. Jak pokazują badania drożdżowego *ATM1*, centra Fe-S są eksportowane z mitochondriów do cytosolu by stać się częścią składową szeregu białek. Mutacja genu *ATM1* uniemożliwia ten proces i zaburza gospodarkę żelazowo-siarkową. Heterologiczna ekspresja *AtATM3* w mutantach drożdżowych komplementuje ten defekt, co świadczyć może o funkcjonalnym podobieństwie obu białek [63]. Połowiczne białka ABC zidentyfikowano również u innych roślin. Przykładem może być *NtWBC1* z tytoniu *Nicotiana tabacum*. Gen *NtWBC1* ulega ekspresji w słupku kwiatowym. Nie jest jednak znana rola, jaką może on pełnić np. w procesie rozmnażania rośliny [64].

BIAŁKA ABC POZBAWIONE DOMEŃY TRANSBŁONOWEJ

Kolejną interesującą grupę stanowią pozbawione domeń transbłonowej, tzw. rozpuszczalne białka ABC. Genom *Arabidopsis* posiada 26 kodujących je genów. Ich przedstawicielem jest między innymi *AtNAP1*. Białka NAP są pozostałością po prokariotycznych transporterach ABC, a dokładniej po podjednostkach wiążących ATP. Są małe (około 290 aminokwasów) i zazwyczaj stanowią część większych kompleksów białkowych. *AtNAP1* jest zlokalizowany w wewnętrznej błonie osłonki chloroplastu, gdzie najprawdopodobniej wchodzi w skład kompleksu transportującego protoporfirynę IX do stromy chloroplastów [2].

PODSUMOWANIE

Z przedstawionych informacji wynika, iż badania roślinnych transporterów ABC znajdują się dopiero w stadium początkowym. Szacuje się, że nasza wiedza dotyczy mniej niż 10% całkowitej liczby tych białek. Dotychczasowe prace koncentrowały się głównie na roślinie modelowej, jaką jest *Arabidopsis*. To właśnie białka ABC *Arabidopsis*, jako pierwsze doczekały się systematycznej klasyfikacji [13]. Poza głębokim aspektem poznawczym, prowadzone badania ujawniają liczne możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników. Warto tu raz jeszcze przypomnieć karłowaty fenotyp mutantów *AtPGP1*, zdolność *AtMRP3* do odkładania jonów metali ciężkich w wakuoli (fitoremediacja) oraz obniżoną wrażliwość na suszę, będącą konsekwencją dysfunkcji białka *AtMRP5*. Obecnie, coraz częściej obiektem badań stają się rośliny uprawne takie jak tytoń, ryż, jęczmień, kukurydza. Występują u nich nie tylko homologi białek *Arabidopsis*, których inaktywacja pociąga za sobą opisane wcześniej zmiany fenotypowe (np. *br2* u kukurydzy), ale także nowe, gatunkowo specyficzne transportery, np. metabolitów wtórnych (*NpABC1*), które odgrywają ważną rolę w interakcjach roślin

ze środowiskiem. Ze względu na swoje unikalne właściwości, metabolity wtórne są obiektem zainteresowania wielu laboratoriów farmakologicznych, medycznych i biotechnologicznych. Alkaloidy są stosowane jako cytostatyki, flawonoidy jako antyoksydanty, antocyjany to znane roślinne pigmenty a terpenoidy to substancje zapachowe. W wysokim stężeniu związki te są toksyczne również dla produkujących je roślin. Ich usuwanie z komórki wymaga istnienia sprawnie działających mechanizmów transportu i neutralizacji. Transportery ABC mogą więc łatwo znaleźć praktyczne zastosowanie także i w procesie wytwarzania produktów naturalnych. Sprawia to, iż roślinne transportery ABC stają się tak samo interesującymi obiektami badań jak ich homologi obecne u ssaków czy drożdży.

PIŚMIENNICTWO

- Ames GF (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu Rev Biochem* 55: 397-425
- Rea PA, Sánchez-Fernández R, Chen S, Peng M, Klein M, Geisler M, Martinoia E (2003) The plant ABC transporter superfamily: the functions of a few and identities of many. W: Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF (red) ABC Proteins – from Bacteria to Man. New York, Academic Press, str. 335-355
- Decottignies A, Goffeau A (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15: 137-145
- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3004-3008
- Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29: 777-807
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993) Putative X-Linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with abc transporters. *Nature* 361: 726-730
- Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J (1995) Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268: 426-429
- Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* 270: 13308-13317
- Balzi E, Wang M, Leterme S, Van Dyck L, Goffeau A (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J Biol Chem* 269: 2206-2214
- Servos J, Haase E, Brendel M (1993) Gene Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169-KDa protein homologous to Atp-dependent permeases. *Mol Gen Genet* 236: 214-218
- Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, Moye-Rowley WS (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 6875-6883
- Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27: 320-329
- Sánchez-Fernández R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily: a complete inventory. *J Biol Chem* 276: 30231-30244
- Shapiro AB, Corder AB, Ling V (1997) P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer. *Eur J Biochem* 250: 115-121
- Shapiro AB, Ling V (1998) Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 254: 181-188
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951
- Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ames GF (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* 266: 18714-18719
- Bairoch A (1992) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res* 20: 2013-2018
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113
- Dean M, Allikmets R (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 779-785
- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396: 703-707
- Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonrhein C, Boos W, Welte W (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J* 19: 5951-5961
- Chang G, Roth Ch (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293: 1793-1799
- Reyes CL, Chang G (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP. Vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 308: 1028-1031
- Locher KP, Lee AT, Rees DC (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a frame-work for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296: 1091-1098
- Azzaria M, Schurr E, Gros P (1998) Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol* 9: 5289-5297
- Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M (2003) The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1169-1177
- Dudler R, Hertig C (1992) Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. *J Biol Chem* 267: 5882-5888
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 13: 2441-2454
- Geisler M, Kolukisaoglu HU, Bouchard R, Billion K, Berger J, Saal B, Frangne N, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Dudler R, Blakeslee JJ, Murphy AS, Martinoia E, Schulz B (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol Biol Cell* 14: 4238-4249
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, Ejendal KF, Smith AP, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna CA, Dudler R, Murphy AS, Martinoia E (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44:179-194
- Luschnig C (2002) Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends Plant Sci* 7: 329-332
- Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Duchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M (2005) MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett* 579: 5399-5406
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F, Yazaki K (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17: 2922-2939
- Friml J, Palme K (2002) Polar auxin transport—old question and new concepts? *Plant Mol Biol* 49: 273-284
- Multani DS, Briggs SP, Chamberlin MA, Blakeslee JJ, Murphy AS, Johal GS (2003) Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. *Science* 302: 81-84

37. Wang W, Takezawa D, Poovaiah BW (1996) A potato cDNA encoding a homologue of mammalian multidrug resistant P-glycoprotein. *Plant Mol Biol* 31: 683-687
38. Davies TG, Theodoulou FL, Hallahan DL, Forde BG (1997) Cloning and characterisation of a novel P-glycoprotein homologue from barley. *Gene* 199: 195-202
39. Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 751-756
40. Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
41. Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* 10: 267-282
42. Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E (1998) An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13: 773-780
43. Li Z-S, Alfenito M, Rea PA, Walbot V, Dixon RA (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry* 45: 689-693
44. Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 21: 914-919
45. Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* 39: 219-236
46. Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Muller A, Ansoerg M, Becker D, Mamnun Y, Kuchler K, Schulz B, Mueller-Roeber B, Martinoia E (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J* 20: 1875-1887
47. Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C (2003) The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant J* 33: 119-129
48. Kolukisaoglu HU, Bovet L, Klein M, Eggmann T, Geisler M, Wanke D, Martinoia E, Schulz B (2002) Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 107-119
49. Smart CC, Fleming AJ (1996) Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem* 271: 19351-19357
50. Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M (2001) A plant plasma membrane ABC-type transporter is involved in antifungal terpenoid excretion. *The Plant Cell* 13: 1095-1107
51. Bailey JA, Carter GA, Burden RS, Wain RL (1975) Control of rust diseases by diterpens from *Nicotiana glutinosa*. *Nature* 255: 328-329
52. Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* 139: 341-352
53. Grec S, Vanham D, de Ribaucourt JC, Purnelle B, Boutry M (2003) Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of NpABC1, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes. *Plant J* 35: 237-250
54. Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Wani MC, Wall ME (2001) Bioactive constituents of the roots of *Licania inra petiolaris*. *J Nat Prod* 64: 497-501
55. Dudareva N, Pichersky E (2000) Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol* 122: 627-633
56. Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, Soumilion JP, Konings WN, Goffeau A (1996) Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* 271: 31543-31548
57. van den Brule S, Muller A, Fleming AJ, Smart CC (2002) The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J* 30: 649-662
58. Cannieux M, Droual AM, Andreu F, Chenieux JC, Rideau M, Hamdi S (2000) Hormonal control of a gene encoding a putative PDR5-like ABC transporter in periwinkle. *Acta Bot Gall* 147: 215-224
59. Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* 518: 164-168
60. Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, Penninckx IAMA, Anderson JP, Maclean DJ, Cammue BPA, Ebert PR, Manners JM (2003) Pathogen responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1467-1479
61. Moons A (2003) Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Lett* 553: 370-376
62. Zolman BK, Silva ID, Bartel B (2001) The *Arabidopsis pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol* 127: 1266-1278
63. Kushnir S, Babychuk E, Storozhenko S, Davey M, Papenbrock J, De Rycke RR, Engler G, Stephan U, Lange H, Kispal G, Lill R, Van Montagu MM (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant stark. *Plant Cell* 13: 89-100
64. Otsu CT, daSilva I, de Molfetta JB, da Silva LR, de Almeida-Engler J, Engler G, Torraca PC, Goldman GH, Goldman MH (2004) NtWBC1, an ABC transporter gene specifically expressed in tobacco reproductive organs. *J Exp Bot* 55: 1643-1654

Plant ABC transporters – the family with tradition

Michał Jasiński[✉], Marek Figlerowicz

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 12/14 Z. Noskowskiego St., 61 704 Poznań, Poland
✉e-mail: jasiniski@ibch.poznan.pl

Key words: ABC transporters, multidrug resistance, active transport, metabolite distribution

ABSTRACT

ATP binding cassette (ABC) transporters, which are found in all species, are known mainly for their ability to confer drug resistance. They have been thoroughly studied in mammals, where they became the center of interest for clinical reasons related to the resistance of tumor cells to chemotherapy treatment. Less is known about plant members of the ABC family, however, growing number of reports on their role in different physiological processes attract attention. The vacuolar ABC transporters in plants characterized to date are involved in the intracellular sequestration of cytotoxins (e.g. herbicides), as well as the products of endogenous metabolism like chlorophyll catabolites. Others localized within plasma membrane are active in the transport of secondary metabolites or phytohormones. Finally certain transporters are present in cell organelles and play a role in such processes as β oxidation. Here, we briefly introduce these proteins, and describe structural characteristic and physiological aspect of their activity in a plant cell.

STRESZCZENIE

Białka 14-3-3 należą do zachowawczej rodziny białek, występującej w każdym organizmie eukariotycznym, tj. zarówno w grzybach, roślinach jak i u zwierząt. Regulują one wiele procesów zachodzących w komórce rozpoznając zachowane w ewolucji, w większości ufosforylowane motywy białka-partnera. Wpływ białek 14-3-3 na inne białka może dotyczyć zmiany ich aktywności katalitycznej, lokalizacji komórkowej, stabilności oraz zmian w oddziaływaniu białek-partnerów z innymi białkami. Natywne białka 14-3-3 są homo- lub heterodimerami. Za specyficzną oddziaływania poszczególnych izoform tych białek oraz za ich zróżnicowaną lokalizację komórkową jest odpowiedzialny najbardziej zmienny strukturalnie N- i C-koniec cząsteczek. W komórce roślinnej białka 14-3-3 zaangażowane są między innymi w regulację aktywności kluczowych enzymów metabolizmu azotu i węgla, a także kanałów i pomp jonowych; uczestniczą również w przekazywaniu sygnału oraz w procesie ekspresji genów.

WPROWADZENIE

Białka 14-3-3 odkrył po raz pierwszy w komórkach mózgu wołu Moore i Perez [1] w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Trzycyfrowa nazwa białek powstała na podstawie oznaczeń ich zawartości w kolejnych frakcjach, podczas oczyszczania chromatograficznego oraz na podstawie migracji w żelu agarozowym. Oznaczenie to, pomimo iż nie przekazuje żadnych informacji o ich budowie czy funkcji utrwaliło się, chociaż stwarza problemy z nazewnictwem izoform tych białek. Białka 14-3-3 scharakteryzowano jako kwaśne, rozpuszczalne białka o masie cząsteczkowej od 25 do 32 kDa. Wiadomo już, że są one obecne w każdym przedziale komórki eukariotycznej oraz, że pełnią zróżnicowane funkcje.

Najwięcej danych dotyczących udziału tych białek w procesach komórkowych zebrano dla organizmów zwierzęcych. Pierwszą opisaną funkcją białek 14-3-3 był ich udział w aktywowaniu hydroksylaz tryptofanu i tyrozyny [2]. Białka 14-3-3 zwierząt biorą udział między innymi w transporcie między jądrem a cytoplazmą, w regulacji cyklu komórkowego, w przekazywaniu sygnału, w procesach transkrypcji i replikacji [3,4] oraz w apoptozie [5,6]. Stwierdzono również, że białka te wiążą się ze strukturą krzyżową DNA [7]. Białka 14-3-3 zlokalizowano w jądrze [8], w cytoplazmie komórki [9,10] w chloroplastach [11], a także w mitochondriach [12].

W roślinach białka 14-3-3 mają wpływ na przebieg podstawowych procesów asymilacji azotu i węgla; odgrywają też pomocniczą rolę w regulacji syntezy skrobi, produkcji ATP, detoksyfikacji nadtlenu wodoru oraz, oddziałując z białkami sygnałowymi, w modulacji przebiegu kilku innych procesów biochemicznych. Sądzi się, że procesy kiełkowania nasion i rozwoju rośliny znajdują się pod kontrolą czynników oddziałujących z białkami 14-3-3 oraz, że oddziaływania te wpływają zasadniczo na aktywność badanych czynników [13]. W cytoplazmie komórki roślinnej, białka 14-3-3 tworzą kompleksy z białkami kierowanymi do chloroplastów i uczestniczą w ich imporcie. Dotyczy to również mitochondriów zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. Zidentyfikowano już kilka białek 14-3-3 wewnątrz chloroplastów, które prawdopodobnie są zaangażowane w wbudowywanie białek do tylakoidów [13]. Wyniki uzyskane z badań roślin transgenicznych sugerują, że rodzina tych białek odgrywa istotną rolę w kontroli procesu starzenia się rośliny jak również w metabolizmie węglowodanów [14] tłuszczu [15] i aminokwasów [16] oraz w regulacji cyklu Krebsa [17]. Cząsteczki białek 14-3-3 są też ważnymi regulatorami białek zlokalizowanych w błonie. W sposób pośredni lub bezpośredni modulują pracę wielu kanałów i pomp jonowych [18]. Obecność dużej i zróżnicowanej rodziny białek 14-3-3 wydaje się być niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania roślin w warunkach złożonych zmian środowiskowych i rozwojowych organizmu [13]. Istotną cechą białek 14-3-3 wykazujących tak szerokie spektrum aktywności jest ich oddziaływanie z innymi białkami.

Sabina Janicka[✉]

Halina Augustyniak

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

[✉]Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul.
Międzychodzka 5, Poznań; e-mail: sabjanic@
amu.edu.pl, tel.: (061) 829 27 36

Artykuł otrzymano 6 stycznia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 6 czerwca 2006 r.

Słowa kluczowe: białka 14-3-3, oddziaływanie typu białko-białko, komórka roślinna

Wykaz skrótów: ATP (ang. *adenosinetriphosphate*) – adenozy-5'-trifosforan; EST (ang. *expressed sequence tag*) – znaczniki sekwencji ulegających ekspresji; FC (ang. *fuscococcin*) – fitotoksyna roślin; GS (ang. *glutamine synthetase*) – syntaza glutaminianowa; H⁺-ATPaza (ang. *H⁺-ATPase*) – białko błonowe; hTAF_{II}32 (ang. *human TBP-associated factor*) – czynnik związany z TBP człowieka; NR (ang. *nitrate reductase*) – reduktaza azotanowa; RGS3 (ang. *regulator of G protein signalling*) – regulator sygnału przenieszonego przez białko G; RSG (ang. *Repression of Shoot Growth*) – czynnik hamujący kiełkowanie; SPS (ang. *sucros e-phosphate synthase*) – syntaza fosfosacharozy; SSIII (ang. *starch synthase*) – syntaza skrobi III; SV (ang. *slow-activating vacuolar channel*) – wolne aktywujące się kanały typu SV; TBP (ang. *TATA-binding protein*) – białka wiążące się z sekwencją TATA

STRUKTURA BIAŁEK 14-3-3

Poznanie struktury krystalicznej kilku kompleksów zwierzęcych białek 14-3-3 z białkami-partnerami [19,20] oraz struktury krystalicznej roślinnego białka 14-3-3 [21] pozwoliło ustalić, które motywy sekwencji oraz, które aminokwasy odgrywają podstawową rolę w cząsteczce oraz w oddziaływaniu z białkiem-partnerem. Obecnie przyjmuje się, że wszystkie białka 14-3-3 wykazują podobną strukturę trzeciorzędową. Ustalenie, że sekwencje izoform białek zwierzęcych wykazują wysoką homologię z sekwencjami izoform roślinnych wskazuje na zachowawczość struktur białek 14-3-3 wśród eukariotów.

Białka 14-3-3 występują w postaci homo- lub heterodimerów. Każdy monomer składa się z 9 α -helis ułożonych w przeciwnych kierunkach i tworzących dwie domeny: domenę N-kończową (cztery helisy) oraz domenę C-kończową (pięć helis). Każda helisa oddzielona jest krótką pętlą. W procesie dimeryzacji dochodzi do wzajemnego oddziaływania domen N-kończowych dwóch monomerów ułożonych względem siebie w przeciwnych kierunkach, co wytwarza dwa rejony kontaktu. Proces ten umożliwia oddziaływanie dwóch helis (pierwszej i drugiej) jednego monomeru z dwoma helisami (trzecią i czwartą) łańcucha przeciwnego monomeru białka 14-3-3 [22]. Jak wynika z analizy jednej z izoform białka 14-3-3 ssaków, eliminacja pierwszych trzech helis monomeru uniemożliwia powstawanie dimeru z partnerem o pełnej długości, gdyż w procesie dimeryzacji niezbędna jest obecność dwóch rejonów kontaktu [23]. Reszty aminokwasowe zaangażowane w ten proces są w większości hydrofobowe i silnie zachowawcze wśród wszystkich izoform białek 14-3-3. Delecja lub substytucja reszt aminokwasowych zlokalizowanych w N-kończowej części białka, które są krytyczne w procesie dimeryzacji prowadzi do jej całkowitego zahamowania, powodując powstawanie monomeru.

Forma dimeryczna białka 14-3-3 ma kształt siodła, którego wklęsły, wewnętrzny kanał zawiera zachowawcze reszty aminokwasowe i zdolny jest do wiązania białek-partnerów, podczas gdy reszty niezachowawcze ułożone są na zewnętrznej powierzchni białka. Każdy z monomerów dimeru tworzy taki centralny kanał, a jego rozmiar i kształt pozwala pomieścić ufosforylowaną cząsteczkę białka-partnera wchodzącą w oddziaływanie z białkiem 14-3-3 [24,25]. Oba monomery dimeru mogą przyłączać dwa różne białka lub dwie różne domeny tego samego białka. Sprzyja to oddziaływaniu z białkiem-partnerem dzięki modyfikacji jego struktury [26] lub w wyniku utworzenia przez białka 14-3-3 „rusztowania” dla oddziałujących ze sobą białek-partnerów.

Domena C-kończowa białek 14-3-3 jest zaangażowana w oddziaływanie z komponentami komórkowymi [27,28]. Jej długość jest zróżnicowana. Na przykład zwierzęce izoformy, w przeciwieństwie do izoform drożdżowych lub roślinnych posiadają krótszy C-koniec [29]. Elastyczny rejon C-kończowy cząsteczki białka, stanowi tzw ruchliwą „czapkę”, która reguluje dostęp do centralnego rowka dimeru białka 14-3-3. Sugeruje się [27], że w nieobecności ufosforylowanych białek-partnerów, domena C-kończowa białek 14-3-3 może służyć jako inhibitor oddziaływania z przypad-

kowym białkiem lub współzawodniczyć o miejsce wiązania w obecności nieufosforylowanych białek-partnerów. Chroniłoby to cząsteczkę białka 14-3-3 przed niepożądanymi oddziaływaniami.

W roślinach potwierdzono dotychczas tylko jeden przypadek, w którym domena C-kończowa uczestniczyła w procesie dimeryzacji cząsteczki białka [23]. Badania prowadzone z izoformą białka GF14 rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) ujawniły, że do prawidłowej dimeryzacji niezbędna jest piąta helisa. Wskazywałoby to, iż niektóre sekwencje na C-końcu cząsteczki mogą odgrywać bezpośrednią rolę w tym procesie. Okazało się również, że zahamowanie procesu dimeryzacji białka GF14 może nastąpić tylko w przypadku oddziaływania domeny C-kończowej z jonami Ca^{2+} .

Jak wynika z badań biochemicznych, białka 14-3-3 wiążą jony metali dwuwartościowych (Me^{2+}) w miejscu łączącym dwie ostatnie helisy, czyli w rejonie pętli pomiędzy helisą nr 8 i 9. Wiązanie się dwuwartościowych kationów metali może zmieniać pozycję rejonu C-kończowego białka [30], a nawet wpływa na strukturę i funkcję C-kończowej domeny cząsteczki białka [31]. Domena wiążąca jony metali jest typowa dla wszystkich białek 14-3-3 roślin. Stanowi również element rozróżniający roślinne izoformy białek 14-3-3 od zwierzęcych oraz roślinne między sobą. Ostatnie dane [32] sugerują, że również poliaminy, a szczególnie spermidyna³⁺ i spermina⁴⁺, „naśladują” działanie dwuwartościowych kationów metali gdyż w ich obecności białka 14-3-3 hamują na przykład reduktazę azotanową (NR). Wskazywałoby to, że poliaminy wiążą się do tego samego miejsca cząsteczki białka 14-3-3 co Me^{2+} i sugeruje, że białka 14-3-3 mają miejsce wiążące polikationy [32].

Homo- i heterodimery białek 14-3-3 mogą spełniać różne funkcje. Sugeruje się [33], że homodimery poszczególnych izoform spełniają rolę chaperonów wobec wiązanych białek, podczas gdy heterodimery z większym prawdopodobieństwem działają jako białka adaptorowe, modulując oddziaływanie dwóch różnych białek. Każde z tych białek asocjuje specyficznie z jednym izomerem heterodimeru. Wiązanie się białek z izoformami 14-3-3 prowadzi do ich aktywacji, stabilizacji lub inaktywacji; dla wielu z nich izoformy białka 14-3-3 odgrywają rolę organizacyjną, działając jako „rusztowanie” (Tabela 1).

IZOFORMY BIAŁEK 14-3-3.

Różnorodność izoform białek 14-3-3 i pełnionych przez nie funkcji w obrębie jednego organizmu, sprzężona jest z ogromną ich liczbą, co wymaga stosowania skomplikowanego nazewnictwa tych białek. W przypadku izoform białek 14-3-3 każde z nich oznaczone jest dodatkowo grecką literą. Rozróżnienie między białkami zwierzęcymi i roślinnymi polega na zastosowaniu liter od początku alfabetu dla izoform zwierzęcych, natomiast dla izoform roślinnych od jego końca.

Porównania filogenetyczne oparte na sekwencji aminokwasowej rodziny białek 14-3-3 wykazały, że w ewolucji miało miejsce oddzielenie izoform roślinnych od zwierzęcych. Po zestawieniu 82 sekwencji genów izoform, wyod-

Tabela 1. Podobieństwa i różnice w strukturze zwierzęcych i roślinnych białek 14-3-3.

Niektóre cechy białek 14-3-3	Zwierzęta	Rośliny
rejon odpowiedzialny za dimeryzację	trzy pierwsze helisy N-końca	czwarta helisa N-końca
miejsce wiązania z białkiem-partnerem	helisa 7 i 8	helisa 7 i 8
motyw podobny do dłoni – EF	nie występuje	występuje na C-końcowej domenie
wiązanie metali Me^{2+}	nie występuje	występuje
Oddziaływanie z Ca^{2+}	nie występuje	występuje

robniono dwie grupy ewolucyjne: epsilonową i nieepsilonową. Taki podział ma zastosowanie zarówno dla roślin jak i zwierząt, co wskazuje, że dywergencja genów białek 14-3-3 jest procesem wczesnym ewolucyjnie. Obie grupy: epsilonowa i nieepsilonowa dzielą się na podgrupy odpowiadające kolejnym wyodrębnionym izoformom. Sugeruje się występowanie co najmniej 5 różnych podgrup genów: cztery z nich są prawdopodobnie wynikiem wczesnej duplikacji genów i zróżnicowania funkcjonalnego, natomiast grupa 5 koduje białka występujące w roślinach jednoliściennych [34].

Geny grupy nieepsilonowej wykazują bardzo zachowawczą budowę; zbudowane są z 4 egzonów i 3 intronów. Kodowane przez te geny białka zawierają motyw sekwencji podobny do dłoni (ang. *EF-hand like*), który jest odpowiedzialny za wiązanie jonów Ca^{2+} . Geny należące do drugiej grupy – epsilonowej – wykazują odmienną od grupy nieepsilonowej kolejność połączenia egzon-intron oraz zawierają 2 dodatkowe introny na 5'końcu. Okazuje się, że różne domeny białka 14-3-3 mogą być kodowane przez różne egzony, a także, że najbardziej zróżnicowany rejon cząsteczki białka (C-końcowy) jest kodowany przez oddzielny egzon [35]. W głównej linii drzewa filogenetycznego białek 14-3-3 roślin można wyodrębnić izoformy specyficzne dla poszczególnych rodzin lub gatunków. Są one wynikiem duplikacji genów, która nastąpiła po utworzeniu się izoform dla rodzin i gatunków. Trzy dodatkowe, wczesne duplikacje genów, spowodowały powstanie trzech subgroup oznaczonych jako ω , κ , ψ [34]. Białka 14-3-3 izolowano z wielu gatunków roślin takich jak: rzodkiewnik, kukurydza, jęczmień, tytoń, ziemniak i pomidor. Zsekwencjonowanie genomu rzodkiewnika dostarczyło wielu cennych danych o ilości i różnorodności członków rodziny białek 14-3-3. Zidentyfikowano co najmniej 15 domniemanych genów białek i potwierdzono, że 12 z nich ulega ekspresji [36-38]. Dziesięć z nich - ω , ϕ , χ , ψ , ν , ν , μ , λ , κ , i ϵ - zostało poznanych jako EST. Trzy następne - ρ , ρ , i π - zidentyfikowano na podstawie dużej homologii tych izoform ze znanymi sekwencjami białek 14-3-3 rzodkiewnika. Okazało się również, że około 20 % proteomu tej rośliny stanowią białka będące potencjalnymi partnerami dla białek 14-3-3 [35]. Dane te wyjaśniają dużą liczebność ich izoform.

Duża zachowawczość sekwencji aminokwasowej białek 14-3-3 w obrębie rejonów odpowiadających za wiązanie białek-partnerów, może sugerować niewielką specyficzność izoform białek 14-3-3. Uważa się [20], że wiele obserwowanych specyficznych funkcji poszczególnych izoform wynika raczej z lokalizacji subkomórkowej i regulacji na poziomie transkrypcji, niż z zakodowanych w genach różnic, które wpływałyby na zdolność wiązania poszczególnych białek-partnerów. Czynnikiem, który w istotny sposób może

regulować specyficzność oddziaływania poszczególnych izoform białek 14-3-3 z białkami-partnerami może być regulacja ekspresji ich genów będąca wynikiem specyficznej budowy promotora. Wykazano między innymi, że promotory białek 14-3-3 ziemniaka różnią się między sobą rejonami sekwencji odmiennie reagującymi na czynniki środowiskowe [39,40].

Z kolei wzrost ilości izoform białek 14-3-3 obserwowany w *Arabidopsis thaliana* może być jak się sugeruje, wynikiem alternatywnego splicingu RNA lub modyfikacji potranslacyjnych białek 14-3-3, podobnych do tych, jakie występują w białkach jęczmienia [41]. Prace prowadzone na zarodkach jęczmienia wykazały, że izoformy białek 14-3-3 we frakcjach cytosolowych i mikrosomalnych komórki, podlegają proteolitycznemu cięciu w niezachowawczej pętli C-końcowej. Dotychczas jednak nie zbadano biochemicznego efektu tego procesu. Sugeruje się, że odcinanie C-końcowego rejonu izoform białek 14-3-3 może być charakterystyczne dla roślin i drożdży [29]. Zmiany potranslacyjne mogą być również spowodowane fosforylacją białka 14-3-3 lub wiązaniem się jonów Me^{2+} .

Analiza pełnej długości izoform białek 14-3-3 wykazała około 42% identyczność sekwencji aminokwasowej, przy czym centralny rejon cząsteczek białka, odpowiedzialny za wiązanie białek-partnerów, wykazywał 98% homologii. Ponieważ 58% sekwencji aminokwasowej dotyczy zmienno rejonu, jest on zatem potencjalnie odpowiedzialny za funkcjonalną specyficzność białek. Aminokwasy występujące w tym rejonie podzielono na trzy kategorie: stabilizujące, dimeryzujące oraz aktywujące, to jest oddziałujące z białkowymi partnerami lub ulegające ufosforylowaniu [42].

W badaniach przeprowadzonych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, wykazano pewne preferencje w wiązaniu białek-partnerów przez poszczególne izoformy oraz w regulacji podstawowych dla komórki roślinnej enzymów takich jak: reduktaza azotanowa (NR) [43], białko H^+ -ATPaza błony komórkowej [44], syntaza fosfosacharozy (SPS) [28], a także kanału SV [45]. Wskazuje to, że różne izoformy białek 14-3-3 mogą zawierać unikalne strukturalnie rejon, takie jak – silnie zróżnicowane końce czy mniej zachowawcze struktury pętli. Przyczynia się to do specyficzności wiązania białko 14-3-3/białko-partner [31].

Uważa się, że większość oddziaływań specyficznych pomiędzy białkami 14-3-3 a ich ufosforylowanymi partnerami może wynikać z przestrzennych i czasowych różnic w lokalizacji izoform. Dodatkowo rozmieszczenie izoform białek 14-3-3 może być modulowane przez rozmieszczenie białek-partnerów [46].

Z kolei testy komplementacji wykonane z niektórymi zwierzęcymi oraz roślinnymi izoformami białek 14-3-3 w heterologicznym układzie drożdżowym wykazały, że badane izoformy zachowują swoją funkcję [47,48]. Sugeruje to, iż ewolucyjnie odrębne izoformy białek 14-3-3 mogą spełniać w różnych organizmach tę samą rolę. Potwierdza to również ich ograniczoną specyficzność substratową.

Ostatnio [49] wykazano wyraźną współzależność pomiędzy poziomem białek 14-3-3 i aktywnością oddziałujących z nimi enzymów oraz zawartością metabolitów w roślinie. Zaobserwowano znaczący wzrost aktywności NR, SPS oraz SSIII w odpowiedzi na obniżenie syntezy białek 14-3-3. Sugeruje się, że pracę tych enzymów kontroluje raczej całkowita zawartość białek 14-3-3 w roślinie, niż ilość indywidualnych izoform tych białek. Okazało się przy tym, że funkcje poszczególnych izoform mogą być zastępowane przez inne izoformy białek 14-3-3 oraz, że ich promotory precyzyjnie regulują przestrzenne i czasowe zróżnicowanie ekspresji genów białek 14-3-3.

REGULACJA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ BIAŁEK-PARTNERÓW WYNIKAJĄCA Z ODDZIAŁYWANIA Z BIAŁKAMI 14-3-3

Wiele z białek wiążących się z białkami 14-3-3 zawiera jeden lub dwa motywy konsensusowe R(S/Ar)(+)pSXP i RX(Ar)(+)pSXP [50], gdzie pS – oznacza fosfoserynę, Ar – resztę aromatyczną – szczególnie Y lub F, natomiast (+) – oznacza zasadowy aminokwas. Reszta X występująca po fosfoserynie to zwykle E, L, A lub M. Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 białek potencjalnych partnerów dla rodziny białek 14-3-3 [43]. U większości z nich, w motywie wiążącym występuje fosfoseryna lub fosfotreonina. Oprócz wyżej wymienionych motywów występują też inne motywy, na przykład RSXpS i RX_{1,2}pSX_{2,3}pS oraz takie motywy, które nie wymagają fosforylacji, aby związać się z białkami 14-3-3 [22]. Białka-partnerzy nie posiadający ufosforylowanych reszt pS lub pT, wyposażone są w reszty o charakterze kwasowym, które „naśladują” ujemny ładunek jonów fosforanowych. Oddziaływania między białkami 14-3-3 a

białkami-partnerami regulowane są przez kinazy i fosfatazy, które fosforylują lub defosforylują serynę lub treoninę (Tabela 2).

Białko-partner zawiera zwykle kilka miejsc wiążących białka 14-3-3. Komplikuje to poznanie struktury kompleksu białko 14-3-3/białko-partner tym bardziej, że zarówno wiązanie jak i regulacja mogą stanowić dwa oddzielne zdarzenia. Na podstawie wyników badań biochemicznych połączeń białko 14-3-3/ białko-partner ustalono pięć głównych sposobów (mechanizmów) regulacji białek-partnerów.

- Białka 14-3-3 mogą wywierać efekt stabilizujący lub osłaniający związane białko-partner chroniąc je przed dostępem proteaz i fosfataz. Przykładowo w roślinach, oddziaływanie z białkiem 14-3-3 umożliwia reduktazie azotanowej (NR) ochronę przed degradacją proteolityczną [53,54] lub ochronę przed defosforylacją miejsca wiążącego białka 14-3-3 w cząsteczce tego enzymu [55]. W przypadku błonowego białka H⁺-ATPazy, utworzenie kompleksu białko 14-3-3/enzym chroni ten ostatni przed proteolizą.

Sugeruje się [35,53], że białka 14-3-3 muszą najpierw odysocjować od kompleksu, aby białko-partner mogło być dostępne dla proteaz lub dla fosfataz. Efektem proteolizy nie jest degradacja, ale raczej proste odcięcie tej części białka, która zawiera sekwencję wiążącą je z białkami 14-3-3. Ochrona przed proteolizą może zapewniać zarówno aktywację jak i deaktywację białka-partnera.

- Białka 14-3-3 mogą modyfikować podział białek-partnerów na jądrowe i cytoplazmatyczne [56]. Białka 14-3-3 ingerując w sekwencję lokalizacji białka-partnera powodują wzrost jego eksportu z jądra lub zahamowanie jądrowego importu. Podstawy molekularne tych zjawisk nie są znane, chociaż istnieją hipotezy wyjaśniające obydwa procesy. Pierwsza z nich zakłada, że sygnał eksportu z jądra występuje w cząsteczce białka 14-3-3 i orientuje wiążące się z nim białko-partner na zewnątrz jądra [19]. Druga hipoteza zakłada, że wiązanie się białka 14-3-3 z białkiem-partnerem posiadają-

Tabela 2. Przykładowe motywy w białkach-partnerach wiążące białka 14-3-3 zwierząt i roślin.

Komórka zwierzęca		Komórka roślinna		
Białko	Motyw	Białko	Motyw	Występowanie
a) kinazy białkowe – PKC μ (PKD)	RLpS ²⁰⁵ NVS ²⁰⁸ RTSpS ²¹⁹ AELpS ²²³	Syntaza ATP – podjednostka β	RFLSQP	kalafior
b) enzymy fosfataza tyrozynowa hydroksylaza tyrozyny	RSLpS ³⁵⁹ VE RRAVpS ¹⁹ ELD	H ⁺ -ATPaza	YpTV	rzodkiewnik, komelina pospolita, kukurydza
c) receptory, białka G receptor interleukiny 9 (IL-9R)	RpS ⁵¹⁹ WpT ⁵²¹ F	CDPK2- kinaza Ca ²⁺ -zależna	RTESKP	kalafior
d) białka regulujące apoptozę – BAD	RHSpS ¹¹² YP RSRpS ¹³⁶ AP RRMpS ⁵⁵ DFE	reduktaza azotanowa	KKxSTP	rzodkiewnik
e) czynniki transkrypcyjne acetylaza histonowa koaktywator transkrypcji z domeną wiążącą PZD	RKTApS ²⁵⁹ E PRSHpS ⁸⁹ SP	peroksydaza askorbinianowa	nie oznaczono	rzodkiewnik

Informacje zawarte w tabeli opracowano na podstawie prac [33,51,52]

cym wewnętrzny sygnał lokalizacji jądrowej eliminuje lub maskuje ten sygnał wykluczając tym samym import białka-partnera do jądra [57]. Białka 14-3-3 odpowiadają zatem za wykluczenie białka-partnera z jądra i jego zatrzymanie w cytoplazmie [58].

- Wiązanie się białek 14-3-3 może zarówno hamować jak i zwiększać aktywność katalityczną białek-partnerów. Przykładowo w organizmach zwierzęcych w następstwie związania się białek 14-3-3 do ufosforylowanej przez kinazę kalmoduliny hydroksylazy tryptofanu i tyrozyny, aktywność tych enzymów wielokrotnie wzrasta lub spada [59].
- Wiązanie się białek 14-3-3 z białkiem-partnerem może zmieniać zdolność tego ostatniego do oddziaływania z innymi białkami. W tym przypadku białka 14-3-3 mają wpływ na tworzenie połączeń typu białko-białko [59].
- Białka 14-3-3 w postaci ufosforylowanej mogą odgrywać rolę białek adaptorowych, stanowiąc wówczas „rusztowanie” do związania się dwóch białek-partnerów i ich ewentualnego oddziaływania. Funkcja „rusztowania” pełniona przez białka 14-3-3 jest niezwykle istotna w procesach przenoszenia sygnałów. Białka, które nie są zdolne do wchodzenia w interakcje bezpośrednio, oddziałują ze sobą poprzez wiązanie się z dimerem białka 14-3-3 [60].

Wiele białek oddziałujących z białkami 14-3-3 zawiera dwa miejsca wiążące i obydwa mogą być niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu. Sądzi się, że jedno z tych miejsc jest dominujące i działa jako „gatekeeper” [26]. Jest ono niezbędne do trwałego oddziaływania, podczas gdy drugie miejsce wiążące „wzmocnia” oddziaływanie, ale jest niewystarczające do samodzielnego związania białka 14-3-3. Jeżeli brakuje dominującego miejsca lub jest ono nieufosforylowane, drugie miejsce wiążące w białku-partnerze ma zbyt słabe powinowactwo do białka 14-3-3 aby

promować stabilne oddziaływanie. Jeżeli natomiast miejsce „gatekeeper” jest ufosforylowane i związane z monomerym 14-3-3, kolejne miejsce zdolne jest do oddziaływania z drugim monomerym tej samej cząsteczki białka 14-3-3 (Ryc. 1) [26].

Jak wynika z powyższego modelu, białka 14-3-3 są allosterycznym modulatorem zmian konformacyjnych wiązanych białek-partnerów, co prowadzi często do zmian w aktywności enzymów. Domeny funkcjonalne białka-partnera ulegają albo prostej zmianie konformacji lub takiemu „ustawieniu”, które pozwoliłoby na wiązanie się białek 14-3-3 w wielu miejscach [29]. Zmiany konformacyjne są reakcjami energochłonnymi, napędzanymi hydrolizą ATP lub modyfikacjami potranslacyjnymi takimi jak fosforylacja. Czasami jednak fosforylacja białek jest niewystarczająca do zmiany kształtu cząsteczki, a tym samym do zmian w jej aktywności. Białka 14-3-3 wydają się w tej sytuacji zapewniać strukturalną „platformę” do utrwalenia określonej konformacji wiązanych białek-partnerów (Ryc. 2) [61].

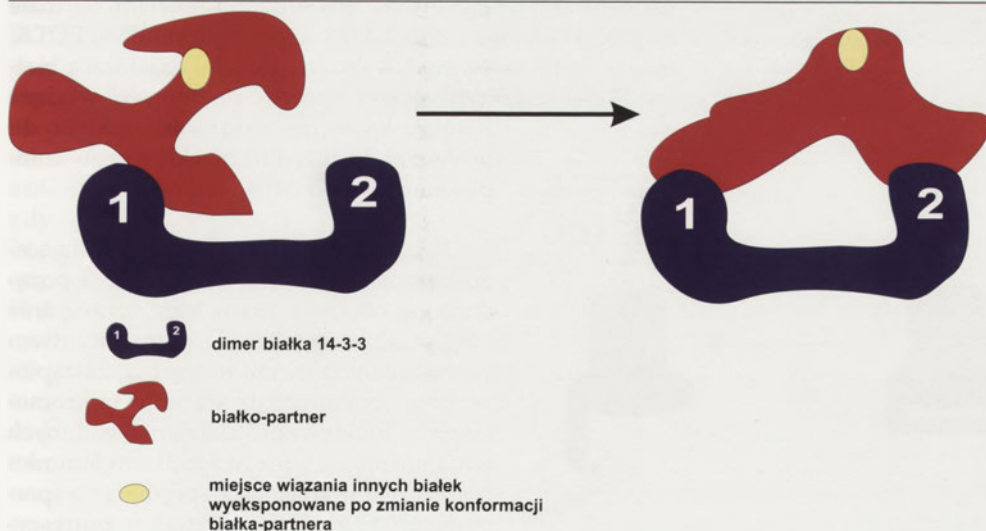
WPLYW BIAŁEK 14-3-3 NA DZIAŁANIE NIEKTÓRYCH ENZYMÓW

BIAŁKA BŁONOWE

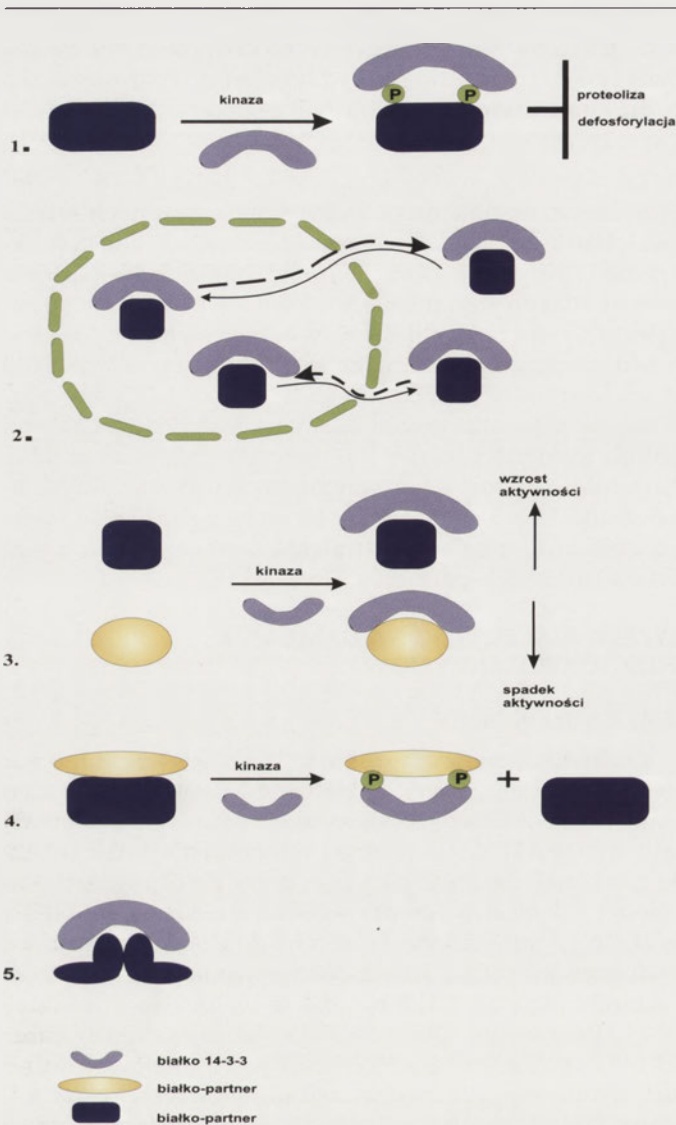
Do białek błonowych roślin, których aktywność jest pozytywnie regulowana przez białka 14-3-3 należy H^+ -ATPaza (ang. *PM H^+ -ATPase*). Wykorzystuje ona energię uwolnioną z hydrolizy ATP do transportu protonów na zewnątrz błony komórkowej, działając jako tzw. pompa elektrogena. Pomiedzy C-końcową domeną tego enzymu i białkami 14-3-3, wykazującymi duże powinowactwo do fitotoksyny roślinnej – fusicociny (FC), stwierdzono występowanie bezpośrednich oddziaływań [51]. Prowadzi to do aktywacji roślinnej H^+ -ATPazy *in vivo*. Obecność FC stabilizuje oddziaływanie H^+ -ATPazy/białko 14-3-3 powodując, że endogenne fosfatazy 2A nie mogą usunąć grup fosforanowych z reszty treoniny [51]. W rezultacie dochodzi do fosforylacji większej ilości H^+ -ATPazy, co z kolei przyspiesza wiązanie się białek 14-3-3. Prowadzi to do nieodwracalnej aktywacji wszystkich pomp protonowych w komórce.

Miejscem wiązania białek 14-3-3 z enzymem jest nietypowy motyw YTV o charakterze anionowym. Do wiązania konieczne jest ufosforylowanie przedostatniej reszty aminokwasowej, którą stanowi silnie zachowawcza treonina [21]. Stwierdzono, że białka 14-3-3 wiążą się również do nieufosforylowanego peptydu, odpowiadającego 34 resztom aminokwasowym zlokalizowanym w C-końcowej domenie enzymu [62,63].

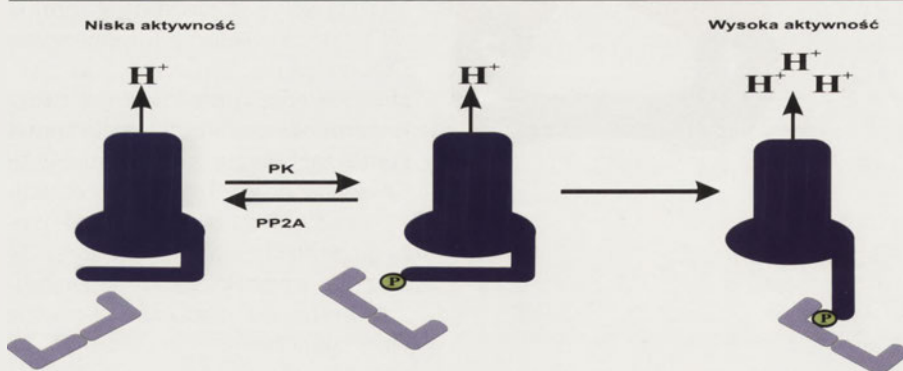
Teoretycznie jest więc możliwe występowanie dwóch oddzielnych i różnych strukturalnie miejsc wiążących białka 14-3-3 z C-końcową domeną H^+ -ATPazy. Jedno miejsce



Rycina 1. Model „gatekeeper” (zmieniono wg [26]). Wiązanie się białka-partnera z białkiem 14-3-3 polega na oddziaływaniu miejsca „gatekeeper” z monomerym białka 14-3-3. Oddziaływanie jednego lub większej ilości słabszych miejsc „drugorzędowych” umożliwia zmianę konformacji białka-partnera. Po związaniu z białkiem 14-3-3 białko-partner występuje w takiej konformacji, która umożliwia ekspozycję jednego lub więcej rejonów białka, niedostępnych w wolnej formie. Kolorem fioletowym zaznaczono dimer białka 14-3-3, kolorem czerwonym- białko-partner, kolorem żółtym- miejsce wiązania innych białek wyeksponowane po zmianie konformacji.



Rycina 2. Sposoby regulacji białek-partnerów przez białka 14-3-3 (zmieniono wg [59,60]). 1. ochrona przed proteolizą lub defosforylacją białko-partnera; 2. modulacja importu lub eksportu z jądra; 3. hamowanie lub aktywacja białko-partnera; 4. modulacja zdolności białko-partnera do oddziaływania z innym białkiem; 5. funkcja adaptorowa białko 14-3-3 lub "rusztowania". Białko-partner zaznaczono kolorem żółtym i ciemnofioletowym, białko 14-3-3 kolorem jasnofioletowym.



Rycina 3. Regulacja błonowej H⁺ATPazy przez białka 14-3-3 (zmieniono wg [51]). Fosforylacja zachowawczej reszty treoniny znajdującej się na C-końcu domeny H⁺ATPazy generuje miejsce wiązania cząsteczki białka 14-3-3. Utworzenie kompleksu białko 14-3-3/enzym powoduje przemieszczenie się C-końcowej domeny H⁺ATPazy i aktywację enzymu. PK – kinaza białkowa; PP2A – fosfataza 2A. Białko 14-3-3 (w formie dimerycznej) zaznaczono kolorem jasnofioletowym

wiązania, które angażuje motyw YpTV jest zależne od fosforylacji i występuje w pozycji 946, drugie natomiast obejmuje reszty aminokwasowe leżące powyżej podstawowego motywu. Są one odpowiedzialne za wiązanie niezależne od fosforylacji. Wiązanie się białek 14-3-3 do treoniny w pozycji 924 niezależnie od fosforylacji, wymaga równoczesnego wiązania się z ufosforylowanym motywem ⁹⁴⁶YpTV. Sugeruje się, że fosforylacja dominującego motywu odgrywa rolę stabilizującą w oddziaływaniu pomiędzy białkami 14-3-3 a kilkoma resztami C-końcowej domeny H⁺-ATPazy (Ryc. 3) [62].

ENZYMY ROŚLINNE ZWIĄZANE Z METABOLIZMEM AZOTU I WĘGLA

Przykładem enzymu podlegającego regulacji przez białka 14-3-3 jest reduktaza azotanowa (NR). NR odgrywa decydującą rolę w wbudowywaniu nieorganicznego azotu do aminokwasów i kwasów nukleinowych. Aktywność NR podlega zmianom w zależności od intensywności fotosyntezy. Jeżeli roślina jest hodowana na świetle, ma miejsce asymilacja azotu, ponieważ enzym znajduje się w stanie aktywnym zdefosforylowanym. W warunkach braku dostępu światła, NR jest fosforylowana i znajduje się w stanie nieaktywnym. Jak wykazano u rzodkiewnika jak i w szpinaku [54], jedynym miejscem w natywnej cząsteczce NR oddziałującym z białkiem 14-3-3 jest zachowawcza reszta seryny w pozycji 543. Sekwencja aminokwasowa otaczająca Ser-543 zawiera typowy, konserwatywny motyw RSXpSXP, wiążący białka 14-3-3, gdzie X – dotyczy dowolnego aminokwasu, a pS – fosfoseryny. Okazało się, że sama fosforylacja seryny nie wpływa na aktywność enzymu, a enzym ulega inaktywacji dopiero, gdy utworzy się kompleks z białkiem 14-3-3. Zahamowanie aktywności enzymu jest odwracalne gdyż po oddysocjowaniu białka 14-3-3 i kolejnej defosforylacji Ser-543 przy udziale fosfataz typu 2A [54], enzym staje się aktywny.

Sugeruje się, że defosforylacja nie jest jedynym mechanizmem aktywującym NR. Stwierdzono bowiem, że małe cząsteczki nieorganiczne takie jak jony fosforanowe, EDTA, oraz 5'AMP aktywują NR *in vitro* [55]. W cząsteczce białka 14-3-3 zidentyfikowano specyficzne miejsce wiążące 5'AMP, które po związaniu nukleotydu prowadzi do rozpadu nieaktywnego kompleksu pNR:14-3-3 [64].

Okazało się również, że dla powstającego kompleksu enzym/białko 14-3-3 pożądana jest obecność jonów Me²⁺, szczególnie Mg²⁺ w stężeniu milimolarnym. Jony dwuwartościowych metali mogą być zastąpione przez poliaminy w stężeniu mikromolarnym. Efektywność działania badanych poliamin spada wraz ze spadkiem ładunku polikationu w kolejności: spermina⁴⁺ >>> spermidyna³⁺ >>> kadawerdyna²⁺ ≈ putrescyna²⁺ co wskazuje, że efektywne kompleksy z białkami 14-3-3 muszą zawierać dwie pierwszorzędowe aminy lub przynajmniej jedną drugorzędową aminę [32,65].

Innym enzymem wiążącym się z białkiem 14-3-3 jest cytosolowa izoforma syntazy glutaminianowej (GS) [64]. Pełni ona kluczową rolę w mobilizacji azotu w dojrzałych liściach. Przemiana światło/ciemność promuje fosforylację GS, a w konsekwencji wiązanie białek 14-3-3, prowadząc do aktywacji enzymu. Aktywacja GS w ciemności wydaje się być zależna od stosunku ATP/AMP w komórce. W dojrzałych liściach proces fotosyntezy przebiega mniej intensywnie, wzrasta stosunek ATP/AMP, co prowadzi do fosforylacji GS i w konsekwencji jej aktywacji, wzmagając tym samym mobilizację azotu [66].

Kluczowy enzym metabolizmu węgla- syntaza fosfosacharozy (SPS) jest także regulowany przez białka 14-3-3. Wpływ wiązania się białka 14-3-3 na aktywność enzymu pozostaje wciąż niejasny. Stwierdza się zarówno częściową aktywację SPS [67] jak i jego hamowanie [17]. Uważa się, że wiązanie się białka 14-3-3 z SPS może w pewnym stopniu modulować degradację proteolityczną enzymu [53].

WPLYW BIAŁEK 14-3-3 NA TRANSKRYPCJĘ

Dotychczas nie wyjaśniono, w jaki sposób białka 14-3-3 wnikają do jądra, skoro nie posiadają sekwencji zawierającej sygnał lokalizacji jądrowej. Niewielki rozmiar tych białek pozwala co prawda na ich bierną dyfuzję; można również założyć, że białka 14-3-3 asocjują z białkami zawierającymi sygnał lokalizacji jądrowej. Stwierdzono, że białka 14-3-3 wchodzą w skład kompleksu białek wiążących się z G-box-em, który stanowi wspólny element regulacyjny promotorów wielu genów [60]. W kukurydzy i rzodkiewniku zidentyfikowano między innymi izoformę białka 14-3-3 oznaczoną jako GF14, która jest składnikiem kompleksu transkrypcyjnego GBF wiążącego się z G-box-em. Jak dotąd niewiadomo jaką pełni one funkcję w tym kompleksie [51,60]. Z badań prowadzonych nad dojrzewaniem nasion ryżu i kukurydzy wynika, że białka 14-3-3 oddziałują również z czynnikami transkrypcyjnymi VVIPA-ROUS 1 (VP1) i Em-BINDING PROTEIN1 (EmBP1) zaangażowanymi w ekspresję genów regulowanych przez kwas abscysynowy [10]. Sugeruje się, że czynniki transkrypcyjne oddziałują z domeną N-końcową białek 14-3-3 odpowiedzialną za proces ich dimeryzacji. Byłby to przykład unikalnego mechanizmu oddziaływania białko-białko, gdyż wszystkie dotychczas scharakteryzowane połączenia 14-3-3/białko-partner angażowały domenę C-końcową cząsteczki białka 14-3-3. Wykazano też, że rodzina białek PHDf-HD pełniących funkcję regulatorów transkrypcji w roślinach, wchodzi w oddziaływanie z białkami 14-3-3. Ta klasa czynników transkrypcyjnych zawiera różnego typu motywy palców cynkowych połączonych z motywem suwaka leucynowego, który pośredniczy w tworzeniu połączeń typu białko-białko. Sugerowałoby to, że białka 14-3-3 uczestniczą także w regulacji aktywności transkrypcyjnej czynników PHDf-HD [68].

Uważa się, że białka 14-3-3 mogą odgrywać istotną rolę w regulacji procesu transkrypcji, gdyż wykazują zdolność oddziaływania z białkami wiążącymi się z sekwencją TATA w rzodkiewniku, a u człowieka z czynnikiem

hTAF_{II}32 (ang. *human TBP-associated factor*) oraz wiążą się z czynnikiem transkrypcyjnym – TFIIB [69]. Niewykluczone więc, że białka 14-3-3 pośredniczą w oddziaływaniu między pre-inicjacyjnym kompleksem transkrypcyjnym a czynnikiem specyficznie rozpoznającym promotor genu. Oddziaływania z białkami TBP i TFIIB nie angażują znacznego motywu zawierającego fosfoserynę, rozpoznawanego przez białka 14-3-3 i nie wymagają udziału formy dimerycznej tych białek. Badania prowadzone *in vitro* sugerują, że jeżeli białka 14-3-3 wchodzą w skład kompleksu wiążącego się z DNA, mogą pełnić funkcję aktywatorów lub koaktywatorów transkrypcji [69]. Ostatnie doniesienia potwierdziły także, że białka 14-3-3 mogą również regulować transkrypcję genu kontrolując wewnątrzkomórkową lokalizację czynników transkrypcyjnych. Regulator czynnika transkrypcyjnego bZIP zaangażowanego w kontrolę syntezy giberelin – RSG, jest zdolny do przemieszczania się z jądra do cytoplazmy i z powrotem. Wiązanie się RSG z białkiem 14-3-3 moduluje negatywnie aktywność RSG, utrzymując go w cytoplazmie [70].

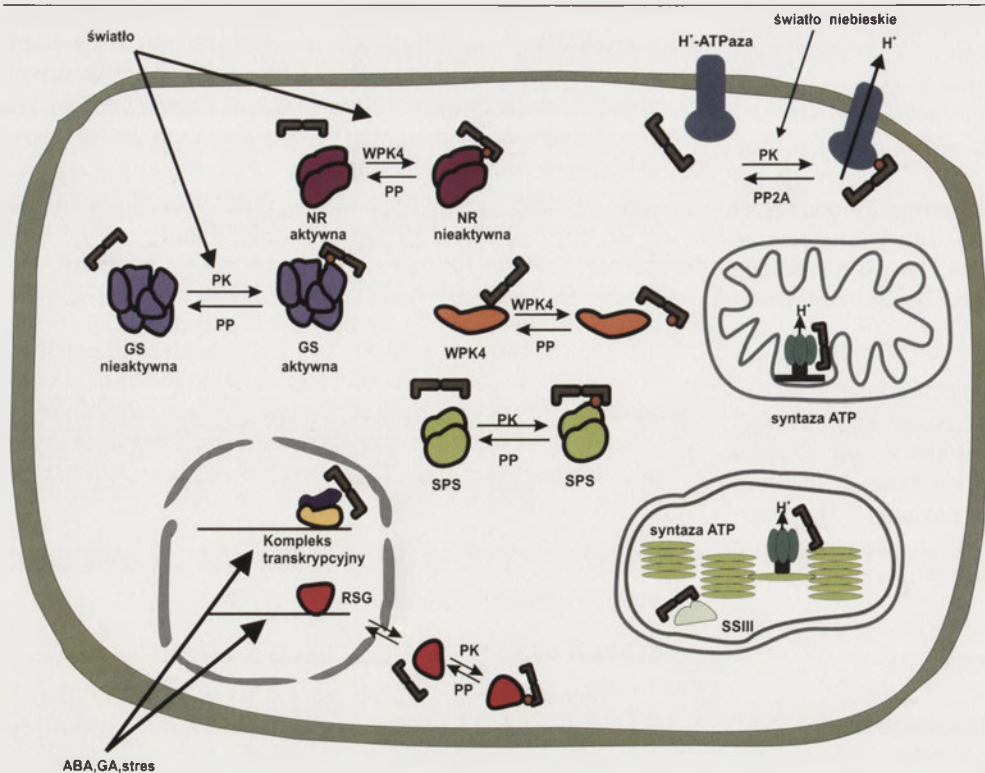
BIAŁKA 14-3-3 W ORGANELLACH ROŚLIN

Problem udziału białek 14-3-3 w kierowaniu białek-partnerów do chloroplastów i oddziaływania z nimi był przedmiotem wielu badań [71]. Białka 14-3-3 wiążą się do zachowawczego, ufosforylowanego motywu zawartego wewnątrz sekwencji prekursorowej białka, kierującej je do chloroplastów. Pomimo braku w białkach 14-3-3 sygnału importu wykazano, że są one obecne zarówno w chloroplastach jak i mitochondriach. W chloroplastach białka 14-3-3 zlokalizowano w stromie i tylakoidach, a w mitochondriach wykryto je w matrix i po wewnętrznej stronie błony wewnętrznej [12].

W chloroplastach białka 14-3-3 wydają się być zaangażowane w regulację syntezy skrobi, gdyż stwierdzono ich połączenie z ziarnami skrobi [72]. W roślinach transgenicznym rzodkiewnika obniżony poziom białek 14-3-3 wyzwał wzrost poziomu skrobi. Efekt ten wydaje się wynikać raczej ze wzmocnienia jej syntezy sugerując, że białka 14-3-3 działają hamująco na metabolizm skrobi. W tym przypadku prawdopodobnym białkiem-partnerem białek 14-3-3 wydaje się być syntaza skrobi III (SSIII). Ta klasa enzymów zawiera zachowawczy motyw stanowiący miejsce wiązania białek 14-3-3 [72].

Białka 14-3-3 wiążą się również do chloroplastowej formy syntazy glutaminianowej (GS). Jak dotąd, nie wyjaśniono czy enzym ten jest regulowany wewnątrz chloroplastów w wyniku wiązania się białek 14-3-3, czy do regulacji enzymu dochodzi podczas importu GS do plastydów [73].

Wykazano także, że zarówno w mitochondriach jak i chloroplastach białka 14-3-3 wiążą się z białkiem błonowej syntazy ATP, która należy do kluczowych enzymów metabolizmu roślin. Stwierdzono, że ufosforylowane białka 14-3-3 oddziałują bezpośrednio z podjednostką βF_1 syntazy ATP. Regulacja aktywności syntazy ATP przez białko 14-3-3 wpływa na adaptację roślin do zmian środowiskowych takich jak: przemiana światło/ciemność, anoxia w korzeniach i fluktuacje azotu. W chloroplastach gwałtowne obniżenie



Rycina 4. Niektóre funkcje białek 14-3-3 w komórce roślinnej (zmieniono wg [51]). NR – reduktaza azotanowa; GA – gibbereliny; GS – syntaza glutaminianowa; ABA – kwas absycynowy; PK – kinaza białkowa; PP – fosfataza; SPS – syntaza fosfosacharozy; SSIII – syntaza skrobi; RSG – (ang. *repression of shoot growth*); WPK4 – kinaza białkowa 4.

aktywności ATPazy w warunkach braku dostępu światła zostało zahamowane w obecności białek 14-3-3 (Ryc. 4) [18,12].

UDZIAŁ BIAŁEK 14-3-3 W TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Oddziaływanie białek 14-3-3 z ufosforylowanym białkiem-partnerem jest ważnym etapem w procesie przekazywania sygnału w komórce i koniecznym do wywołania pełnej zmiany w ich aktywności. Sama fosforylacja cząsteczki białka-partnera nie zawsze jest czynnikiem wystarczającym do jego uaktywnienia. Odkrycie, że kinazy i fosfatazy mogą być wiązane i regulowane przez białka 14-3-3 sprawia, że te ostatnie stają się integralnymi składnikami ścieżki transdukcji sygnału. W procesie przekazywania sygnału z udziałem białek 14-3-3 kluczowe są dwa etapy: zmiana stanu aktywności białka-partnera w wyniku wiązania się białka 14-3-3 oraz indukcja kaskady sygnałowej spowodowana utworzeniem kompleksu białko 14-3-3/białko-partner. Regulacja procesu przekazywania sygnału jest zależna od stężenia białka 14-3-3 w komórce, obecności kinaz i fosfataz działających na cząsteczkę białka-partnera oraz dwuwartościowych jonów metalu.

Okazało się, że w rzodkiewniku białka 14-3-3 modulują aktywność wielu kinaz takich jak kinaza białkowa C i zależna od Ca^{2+} kinaza białkowa CPK-1. Białka 14-3-3 mają zdolność wiązania się do C-końca cząsteczki WPK4-kinazy białkowej pszenicy, która jest między innymi odpowiedzialna za fosforylację reduktazy azotanowej (NR), co z kolei jest konieczne do wiązania się cząsteczki białka 14-3-3 do enzymu. Oprócz oddziaływania z kinazami, białka 14-3-3 wiążą się z innymi czynnikiemami ścieżek sygnałowych, jak na przykład

z czynnikiem RGS3, który jest negatywnym regulatorem sygnału przenoszonego przez białka G. To oddziaływanie wpływa na modulację szlaku sygnałowego indukowanej obecnością białek G [64]. Białka 14-3-3 są zaangażowane także w indukowane przez etylen i ABA procesy sygnałowe, które odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu rośliny [53,67]. Wiązanie się białek 14-3-3 do tak różnych białek-partnerów sugeruje, że pełnią one funkcję integrującą wiele szlaków sygnałowych w komórkach. Jest również prawdopodobne, że białka 14-3-3 mogą pośredniczyć w zjawisku „cross-talk” pomiędzy różnymi szlakami przekazywania sygnału.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach osiągnięto wielki postęp w zrozumieniu funkcji białek 14-3-3 w komórce roślinnej. Zidentyfikowano wiele białek wiążących się z rodziną białek 14-3-3 zlokalizowanych w różnych przedziałach komórkowych. Uzyskana wiedza, pozwo-

liła w wielu przypadkach na ustalenie ich roli w oddziaływaniu białko 14-3-3:białko-partner oraz leżących u podstaw tych oddziaływań mechanizmów molekularnych.

W regulacji oddziaływania pomiędzy białkami 14-3-3 i białkami-partnerami, istotną rolę odgrywa fosforylacja samych białek 14-3-3, obecność endogennych efektorów takich jak AMP, a także występowanie specyficznych izoform białek 14-3-3 rozmieszczonych w różnych przedziałach komórki. Istotnym mechanizmem kontrolującym stężenie białek 14-3-3 w komórce roślinnej oraz ich fluktuację jest poziom ekspresji izoform tych białek. Ilość białek 14-3-3 w cytosolu, organellach oraz w połączeniach z białkami błon wpływa regulacyjnie na szlaki przekazywania sygnału oraz całkowity metabolizm rośliny.

Poznanie czynników kontrolujących rozmieszczenie i aktywność białek 14-3-3 w komórce pozwoli lepiej zrozumieć wzajemne zależności szlaków przekazywania sygnału. Wyjaśnienia wymaga również rola, jaką odgrywają monomery białek 14-3-3. Poznanie sekwencji coraz większej liczby genomów roślinnych, pozwala na porównanie zróżnicowania izoform białek i ustalenie specyficzności ich działania [74]. Występowanie białek 14-3-3 w większości (jeśli nie we wszystkich) komórek eukariotycznych, daje możliwość poznania wczesnych etapów ewolucji tej rodziny białek.

PIŚMIENNICTWO

1. Moore BW, Perez VJ (1967) Specific acidic proteins of the nervous system. W: Carlton F (red), *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice Hall, str. 343-359

2. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H. (1987) Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monoxygenase and tyrosine 3-monoxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett* 219: 79-82.
3. Zannis-Hadjopoulos M, Novac O, Alvarez D, Price GB (2002) 14-3-3s are DNA-replication proteins. *Bioch Soc Trans* 30: 397-401
4. Dougherty MK, Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 117: 1875-1884
5. Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H, Fu H (2002) Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Bioch Soc Trans* 30: 360-364
6. Subramanian R, Zhang H, Wang H, Ichijo H, Miyashita T, Fu H (2004) Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp Cell Res* 294: 581-591.
7. Novac O, Alvarez D, Pearson CE, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (2002) The human cruciform-binding protein CBP, is involved in DNA replication and associates *in vivo* with mammalian replication origins. *J Biol Chem* 277: 11174-11183
8. Bihn EA, Paul AL, Wang SW, Erdos GW, Ferl RJ (1997) Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of Arabidopsis and maize. *Plant J* 12: 1439-45
9. Chung HJ, Sehnke PC, Ferl RJ (1999) The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci* 4:367-371.
10. Roberts MR (2000) Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 3: 400-405
11. Sehnke PC, Henry R, Cline K, Ferl RJ (2000) Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiol* 122: 235-242
12. Bunney TD, Van Walraven HS, De Boer AH (2001) 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *PNAS* 98: 4249-4254
13. Fulgosi H, Soll J, de Faria Maraschin S, Korthout HA, Wang M, Testerink C (2002) 14-3-3 proteins and plant development. *Plant Mol Biol* 50: 1019-1029
14. Szopa J, Wróbel M, Matysiak-Kata I, Świedrych A (2001) The metabolic profile of the 14-3-3 repressed transgenic potato tubers. *Plant Sci* 161: 1075-1082
15. Presha A, Świedrych A, Biernat J, Szopa J (2001) The increase in lipid content in potato tubers modified by 14-3-3 gene overexpression. *J Agric Food Chem* 49: 3638-3643
16. Świedrych A, Presha A, Matysiak-Kata I, Biernat J, Szopa J (2002) The repression of 14-3-3 affects the amino acid mineral composition of potato tubers. *J Agric Food Chem* 50: 2137-2141
17. Zuk M, Skala J, Szopa J (2003) Repression of six 14-3-3 protein isoforms resulting in the activation of the nitrogen and carbon fixation key enzymes from transgenic potato plants. *Plant Science* 165: 731-741
18. Bunney TD, van den Wijngaard PW, de Boer AH (2002) 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol Biol* 50: 1041-1051
19. Rittinger K, Budman J, Xu J, Volinia S, Cantley LC, Smerdon SJ, Gambelin SJ, Yaffe M (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4: 153-166
20. Ferl RJ (2004) 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiol Plant* 120: 173-178
21. Wurtele M, Jelich-Ottman C, Wittinghofer A, Oecking C (2003) Structural view of fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J* 22: 987-994
22. Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647
23. Abarca D, Madueño F, Martínez-Zapater JM, Salinas J (1999) Dimerisation of Arabidopsis 14-3-3 proteins: structural requirements within the N-terminal domain and effect of calcium. *FEBS Lett* 462: 377-382
24. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambelin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91: 961-71
25. Petosa C, Masters SC, Bankston LA, Pohl J, Wang B, Fu H, Liddington RC (1998) 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem*. 273: 16305-16310
26. Yaffe MB (2002) How do 14-3-3 proteins work? – gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513: 53-57
27. Truong A.B, Masters S.C, Yang H, Fu H, (2002) Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* 49: 321-325
28. Bornke F (2005) The variable C-terminus of 14-3-3 proteins mediates isoform-specific interaction with sucrose-phosphate synthase in the yeast two-hybrid system. *J Plant Physiol* 162: 161-8
29. Testerink C, Van Zeijl MJ, Drumm K, Palmgren MG, Collinge DB, Kijne JW, Wang M (2002) Post-translational modification of barley 14-3-3A is isoform-specific and involves removal of the hypervariable C-terminus. *Plant Mol Biol* 50: 535-542
30. Athwal GS, Huber JS, Huber SC (1998) Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 118: 1041-1048
31. Sehnke PC, Laughner B, Cardasis H, Powell D, Ferl RJ (2006) Exposed loop domains of complexed 14-3-3 proteins contribute to structural diversity and functional specificity. *Plant Physiol* 140: 647-60
32. Athwal GS, Huber SC (2002) Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant J* 29: 119-129
33. Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A, Zemlickova E (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc* 30: 351-360
34. Piotrowski M, Oecking K (1998) Five new 14-3-3 isoforms from *Nicotiana tabacum* L.: implications for the phylogeny of plant 14-3-3 proteins. *Planta* 204: 127-130
35. Sehnke PC, De Lille JM, Ferl RJ (2002) Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell* 3: 339-354
36. DeLille JM, Sehnke PC, Ferl RJ (2001) The *Arabidopsis* family of signaling regulators. *Plant Physiol* 126: 35-38
37. Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, Sommarin M (2001) Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated of two out of five novel genes. *Plant Physiol* 127: 142-149
38. Sehnke PC, Rosenquist M, Alsterfjord M, De Lille J, Sommarin M, Larsson C, Ferl RJ (2002) Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol* 50: 1011-1018
39. Szopa J, Łukaszewicz M, Korobczak A, Aksamit A, Kwiatkowska D (2003) Structural organization, expression, and promoter analysis of a 16 R isoform of 14-3-3 protein gene from potato. *Plant Physiol Biochem* 41: 417-423
40. Aksamit A, Korobczak A, Skala J, Łukaszewicz M, Szopa J (2005) The 14-3-3 gene expression specificity in response to stress is promoter-dependent. *Plant Cell Physiol* 46: 1635-45
41. Van Zeijl MJ, Testerink C, Kijne JW, Wang M (2000) Subcellular differences in post-translational modification of barley 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* 473: 292-296
42. Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J Mol Evol* 51: 446-458
43. Sinnige MP, Roobeek I, Bunney TD, Visser AJ, Mol JN, de Boer AH (2005) Single amino acid variation in barley 14-3-3 proteins leads to functional isoform specificity in the regulation of nitrate reductase. *Plant J* 44: 1001-1009
44. Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsson H, Svanenlid F, Rosenquist M, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C (2004) Plasma membrane H^+ -ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/ H^+ -ATPase interaction. *Plant Cell Physiol* 45: 1202-1210

45. Sinnige MP, Ten Hoopen P, Van den Wijngaard PWJ, Roobeek I, Schoonheim PJ, Mol JNM, De Boer AH (2005) The barley two-pore K⁺-channel HvKCO1 interacts with 14-3-3 proteins in an isoform specific manner. *Plant Sci* 169: 612-619
46. Paul AL, Sehnke PC, Ferl RJ (2005) Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seems to be driven by client interactions. *Mol Biol Cell* 16: 1735-1743
47. Kuromori T, Yamamoto M (2000) Members of the *Arabidopsis* 14-3-3 gene family trans-complement two types of defects in fission yeast. *Plant Sci* 158: 155-116
48. Vasara T, Keranen S, Penttila M, Saloheimo M (2002) Characterization of two 14-3-3 genes from *Trichoderma reesei*: interactions with yeast secretory pathway components. *Biochim Biophys Acta* 1590: 27-40
49. Zuk M, Weber R, Szopa J (2005) 14-3-3 protein down-regulates key enzyme activities of nitrate and carbohydrate metabolism in potato plants. *J Agric Food Chem* 53: 3454-3460
50. Yaffe MB, Elia AE (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* 13: 131-138
51. Aducci P, Camoni L, Marra M, Visconti S (2002) From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *IUBMB Life* 53: 49-55
52. Finnie C, Borch J, Collinge DB (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol* 40: 545-554
53. Cotellet V, Meek SE, Provan F, Milne FC, Morrice N, Mackintosh C (2000) 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J* 19: 2869-7286.
54. Mackintosh C, Meek SE (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 58: 205-214
55. Kaiser WM, Huber SC (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: Mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52: 1981-1989
56. Muslin AJ, Xing H (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* 12: 703-709
57. Yang J, Winkler K, Yoshida M, Kornbluth S (1999) Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J* 8: 174-183
58. Tzivion G, Shen YH, Zhu J (2001) 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 20: 6331-6338
59. Tzivion G, Avruch J (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 3061-3064
60. Roberts MR (2003) 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signaling. *Trends Plant Sci* 8: 218-223
61. Mackintosh C (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 381: 329-342
62. Fuglsang AT, Borch J, Bych K, Jahn TP, Roepstorff P, Palmgren MG (2003) The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase: involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J Biol Chem* 278: 42266-42272
63. Jelich-Ottmann C, Weiler EW, Oecking C (2001) Binding of regulatory 14-3-3 proteins to the C-terminus of the plant plasma membrane H⁺-ATPase involves part of its autoinhibitory region. *J Biol Chem* 276: 39852-39857
64. Comparot S, Lingiah G, Martin T (2003) Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J Exp Bot* 54: 595-604
65. Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998) Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 118: 1041-1048
66. Finnemann J, Schjoerring JK (2000) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J* 24: 171-181
67. Moorhead G, Douglas P, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, Mackintosh C (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J* 18: 1-12
68. Halbach T, Scheer N, Weer W (2000) Transcriptional activation by the PHD finger is inhibited through an adjacent leucine zipper that binds 14-3-3s. *Nucleic Acids Res* 28: 3542-3550
69. Pan S, Sehnke PC, Ferl RJ, Gurley WB (1999) Specific interactions with TBP and TFIIB *in vitro* suggest that 14-3-3 may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *Plant Cell* 11: 1591-1602
70. Igarashi D, Ishida S, Fukazawa J, Takashi Y (2001) 14-3-3s regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *Plant Cell* 13: 2483-2497
71. May T, Soll J (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12: 53-63
72. Sehnke PC, Chung H, Wu K, Ferl RJ (2001) Regulation of starch accumulation by granule associated plant 14-3-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 765-770
73. Riedel J, Tischner R, Mack G (2001) The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* 213: 396-401
74. Ferl RJ, Manak MS, Reyes MF (2002) The 14-3-3s. *Genome Biol* 3: 3010.1- 3010.7

Multifunctional 14-3-3 proteins of plant cell

Sabina Janicka[✉], Halina Augustyniak

Department of Molecular and Cellular Biology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, 5 Miedzzychodzka St., Poznań, Poland

[✉]e-mail: sabjanic@amu.edu.pl

Key words: 14-3-3 proteins, protein-protein interactions, plant cell

ABSTRACT

The 14-3-3 proteins are a family of highly conserved proteins found in all eukaryotes - from the yeasts to mammals. They regulate several cellular processes recognizing unique conservative, mostly phosphorylated motif of partner proteins. Binding of the 14-3-3 proteins regulates their partners through a variety of mechanisms, such as altering their catalytic activity, subcellular localization, stability or altering their interactions with other protein molecules. The native 14-3-3 proteins are present in form of homo- and hetero-dimers. The most structurally variable N- and C-termini are responsible for isoform specific protein-protein interactions, and cellular localization. In plant cell, 14-3-3 proteins appear to play an important role in regulation of key enzymes of carbon and nitrogen metabolism, modulation ion pumps and channels. They are also involved in signal transduction pathways and even in gene expression.

Receptory opioidowe i ich selektywne ligandy peptydowe

STRESZCZENIE

Receptory opioidowe typu μ , δ i κ należą do dużej grupy receptorów związanych z białkiem G. Receptory opioidowe pełnią ważną fizjologiczną rolę. Stymulacja receptorów opioidowych wywołuje działanie przeciwbólowe, wpływa również na układ pokarmowy, powodując kurczenie mięśni zwieraczy oraz hamowanie perystaltyki jelit. Odkrycie peptydów opioidowych, będących endogennymi ligandami receptorów opioidowych, do których należą δ -selektywne enkefaliny, κ -selektywne dynorfiny i μ -selektywne endomorfiny, zapoczątkowało badania zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną. W ciągu ostatnich 30 lat zsyntetyzowano setki analogów peptydów opioidowych w poszukiwaniu związków o większej aktywności, selektywności i odporności na biodegradację niż ma to miejsce w przypadku endogennych ligandów. Do ich otrzymania użyto wielu nienaturalnych aminokwasów, a także różnorodnych metod cyklizacji, usztywniających konformację peptydową. W wyniku tych badań otrzymano analogi o bardzo dużej selektywności i powinowactwie w stosunku do receptorów μ , δ i κ , zarówno o właściwościach agonistycznych jak i antagonistycznych, które są niezwykle przydatne w dalszych badaniach nad rolą receptorów opioidowych w organizmie.

WPROWADZENIE

Opium, wysuszony sok z niedojrzałych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), jest prawdopodobnie najstarszym farmaceutykiem znanym człowiekowi i stosowanym już ponad 2000 lat temu jako środek przeciwbólowy. Opium jest mieszaniną około 25 alkaloidów. Głównym składnikiem opium, odpowiedzialnym za jego przeciwbólowe i narkotyczne działanie, jest morfina, nazwana tak od imienia starożytnego boga snu – Morfeusza. Morfina, która do dziś jest używana jako najskuteczniejszy środek do zwalczania silnego bólu, przy długotrwałym stosowaniu wywołuje bardzo poważne efekty uboczne, takie jak uzależnienie, tolerancję i depresję oddechową.

W 1972 r. na Międzynarodowym Kongresie Farmakologicznym w San Francisco Collier po raz pierwszy postulował istnienie w organizmach ssaków „endogennej morfiny” oraz specyficznych dla niej receptorów, poprzez które może działać również morfina. Już w rok później obecność w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków trzech typów receptorów opioidowych została wykazana niezależnie przez trzy grupy badawcze. Dalsze intensywne badania doprowadziły do wyizolowania z mózgu ssaków endogennych ligandów tych receptorów, nazwanych peptydami opioidowymi lub opioidami, w odróżnieniu od opiatów, który to termin używany jest w stosunku do alkaloidów pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwbólowych i narkotycznych, takich jak morfina czy heroina.

Endogenne peptydy opioidowe są niskocząsteczkowymi związkami wytwarzanymi w ośrodkowym układzie nerwowym oraz w różnych gruczołach, takich jak przysadka czy nadnercza. Opioidy są odpowiedzialne za różnorodne efekty fizjologiczne. Do najbardziej znanych należy ich działanie przeciwbólowe, ale mają też wpływ na układ pokarmowy.

Odkrycie peptydów opioidowych obudziło nadzieje na znalezienie nowych środków przeciwbólowych, pozbawionych niekorzystnych efektów ubocznych morfiny. Ale mimo, że w ciągu 30 lat jakie minęły od odkrycia pierwszych opioidów zsyntetyzowano i zbadano setki ich analogów, poszukiwanie nowych związków o coraz lepszym profilu farmakologicznym ciągle trwa, a morfina jest nadal najczęściej używanym środkiem uśmierzającym silny ból, stosowanym w szpitalach.

Mariola Katarzyna
Piestrzeniewicz

Jakub Michna

Anna Janecka

Zakład Chemii Biomolekularnej, Katedra Chemii Biomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

Zakład Chemii Biomolekularnej, Katedra Chemii Biomedycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: ajanecka@zdn.umed.lodz.pl, tel.: (042) 678 42 77

Artykuł otrzymano 29 września 2005 r.
Artykuł zaakceptowano 6 marca 2006 r.

Słowa kluczowe: receptory opioidowe, peptydy opioidowe, ligandy antagonistyczne, ligandy agonistyczne

TYPY RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH

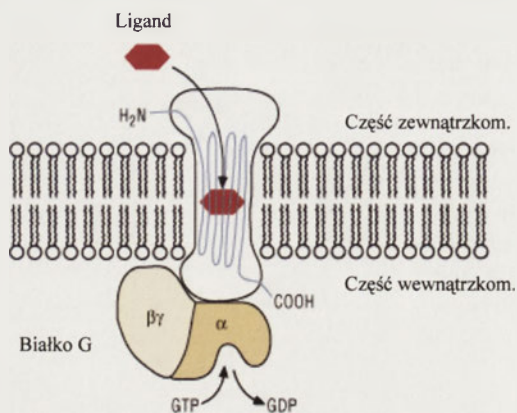
Obecność trzech typów receptorów opioidowych, μ , δ i κ , w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków została wykazana w 1973 r. przez zespoły badawcze Snydera, Simona i Tereniusa [1-3] na podstawie badań farmakologicznych z użyciem morfiny, ketazocyny i N-allilnormetazocyny oraz nieselektywnego antagonisty opioidowego naloksonu. Prace prowadzone w laboratoriach na całym świecie w ciągu następnych lat pozwoliły na dokładne scharakteryzowanie tych trzech typów receptorów oraz stwierdzenie ich obecności nie tylko w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, ale również w wielu tkankach obwodowych [4]. Sklonowanie genów kodujących białka tych receptorów [5-8] oraz porównanie sekwencji aminokwasowych receptorów μ , δ i κ wykazało ich znaczne podobieństwo strukturalne, a także pozwoliło na zakwalifikowanie ich do grupy receptorów związanych z białkiem G [9].

Szczegółowe badania receptorowe doprowadziły do zidentyfikowania podtypów receptorów opioidowych. Istnienie dwóch podtypów receptorów μ , μ_1 i μ_2 , potwierdziły badania *in vivo*, w których naloksazon hamował działanie przeciwbólne morfiny, ale nie blokował wywołanego przez nią uzależnienia [10,11]. Podział receptorów δ na podtypy δ_1 i δ_2 oraz receptorów κ na trzy podtypy: κ_1 (o wysokim powinowactwie), κ_2 (o niskim powinowactwie) oraz κ_3 został dokonany na podstawie badań farmakologicznych *in vivo* [12-17].

Postulowane jest istnienie jeszcze innych typów receptorów opioidowych (σ , ϵ , λ i ι), ale nie zostały one jeszcze w pełni scharakteryzowane.

RECEPTORY ZWIĄZANE Z BIAŁKIEM G

Receptory opioidowe należą do dużej grupy receptorów związanych z białkiem G (GPCR, ang. *G-protein-coupled receptors*). Sygnały przenoszone przez endogenne ligandy, takie jak hormony i neurotransmitery, a także przez egzogenne stymulatory (zapach, światło) są odbierane przez komórki dzięki obecności tych receptorów. Receptory GPCR zbudowane są z N-końcowej części zewnątrzkomórkowej, siedmiu hydrofobowych α -helikalnych fragmentów przechodzących przez błonę komórkową oraz C-końcowej części wewnątrzkomórkowej (Ryc. 1).



Rycina 1. Schemat budowy receptora związanego z białkiem G.

Białka G składają się z trzech podjednostek: G_α , mającej zdolność wiązania nukleotydów guaninowych (guanozyno-5'-difosforanu, GDP i guanozyno-5'-trifosforanu, GTP) oraz dwóch innych, połączonych w jedną większą podjednostkę $G_{\beta\gamma}$. Badania molekularne wykazały, że istnieją cztery główne typy podjednostek G_α : G_s , G_i , G_q i G_{12} .

W stanie nie pobudzonym podjednostka G_α tworzy nieaktywny kompleks z GDP. Przyłączenie liganda do zewnątrzkomórkowej części receptora wywołuje zmiany konformacyjne całej cząsteczki białka receptorowego. Prowadzi to do aktywacji białek G poprzez zapoczątkowanie wymiany GDP na GTP. Aktywne białko G dysocjuje na dwie podjednostki: G_α -GTP i $G_{\beta\gamma}$, z których głównie pierwsza jest odpowiedzialna za przeniesienie sygnału na układy efektorowe, prowadząc do metabolicznych i/lub jonowych zmian wewnątrz komórki [18]. Podjednostka G_α posiada wewnętrzną aktywność GTP-azową, w wyniku której jej aktywna postać ulega inaktywacji przez hydrolizę GTP do GDP. Nieaktywna podjednostka G_α łączy się następnie z podjednostką $G_{\beta\gamma}$.

Do układów efektorowych, aktywowanych lub blokowanych w wyniku oddziaływania ligand-receptor związany z białkiem G, zaliczamy cyklazę adenylanową (podjednostki G_s i G_i), fosfolipazę C (G_q), fosfodiesterazę cGMP oraz kanały jonowe [18]. Receptory opioidowe należą do grupy receptorów związanych z białkiem G_i/G_o . Bezpośredni efekt wywołany przez ligandy opioidowe to hamowanie aktywności cyklazy adenylanowej, aktywacja kanałów potasowych oraz hamowanie aktywności kanałów wapniowych (typu N,P,Q i R).

FUNKCJE RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH

Receptory opioidowe pełnią ważną fizjologiczną rolę. Stymulacja receptorów opioidowych, przede wszystkim receptorów μ , wywołuje działanie przeciwbólne. Receptory opioidowe są również zaangażowane w regulację temperatury, ciśnienia krwi, czynności układu oddechowego, pokarmowego oraz procesów odpornościowych.

ENDOGENNE PEPTYDY OPIOIDOWE

„Typowe” endogenne peptydy opioidowe, do których zaliczamy enkefalinę, β -endorfinę i dynorfinę, wywodzą się z trzech prekursorów, pro-enkefaliny, pro-opiomelanokortyny i pro-dynorfiny, syntetyzowanych w komórkach układu nerwowego i tkankach obwodowych [19-22]. Peptydy należące do tej grupy zawierają N-końcową sekwencję Tyr-Gly-Gly-Phe. „Typowe” endogenne peptydy opioidowe są mało selektywne. Enkefaliny ([Leu]-enkefalina i [Met]-enkefalina) mają wysokie powinowactwo do receptora δ i niskie do receptora μ . β -Endorfina wiąże się w jednakowym stopniu z receptorami μ i δ , dynorfiny A i B głównie z receptorem κ oraz, w mniejszym stopniu, z receptorami μ i δ .

Do grupy endogennych peptydów opioidowych zaliczamy również endomorfina-1 i endomorfina-2. Oba te peptydy wywodzą się prawdopodobnie z jednego prekursora, o nieznanym sekwencji i miejscu syntezy [23]. Sekwencja aminokwasowa endomorfina jest odmienna od sekwencji

Tabela 1. Endogenne peptydy opioidowe ssaków.

Prekursor	Peptyd	Sekwencja	Powinowactwo
Pro-enkefalina	[Leu]enkefalina [Met]enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu Tyr-Gly-Gly-Phe-Me	δ, μ ($\delta >> \mu$)
Pro-opiomelanokortyna	β -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser- -Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn- -Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly- -Glu	μ, δ ($\mu = \delta$)
Pro-dynorfina	dynorfina A dynorfina A(1-8) dynorfina B α -neoendorfina β -neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro- -Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys- -Val-Val-Thr Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro	κ, μ, δ ($\kappa >> \mu$ i δ)
Nieznanym	endomorfina-1 endomorfina-2	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂ Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	μ

„typowych” peptydów opioidowych, ponieważ są krótsze, zawierają resztę Pro w pozycji 2 i mają amidowany C-końiec (Tabela 1).

„NIETYPOWE PEPTYDY OPIOIDOWE”

„Nietypowe” peptydy opioidowe zostały wyizolowane zarówno z mózgu i różnych płynów ustrojowych ssaków, jak i ze skóry płazów. Wywodzą się one z wielu różnych białek prekursorowych i mają zróżnicowane sekwencje aminokwasowe. Ich wspólną cechą jest obecność N-końcowej Tyr [24] oraz co najmniej czteroaminokwasowej sekwencji.

Pierwszą wyodrębnioną grupą „nietypowych” peptydów opioidowych były β -kazomorfiny, otrzymane przez hydrolytyczną fragmentację białka mleka β -kazeiny [25] oraz ich pochodna morficeptyna. Peptydy z grupy hemorfin wyodrębniono przez trawienie enzymatyczne białek krwi. W późniejszym czasie hemorfiny wyizolowano również z mózgu, osocza i płynu mózgowo-rdzeniowego [26]. Ważną grupę „nietypowych” peptydów opioidowych stanowią związki otrzymane z wydzieliny skóry płazów: μ -selektywna dermorfina oraz δ -selektywne dermenkefalina i deltorfina I i II, charakteryzujące się bardzo wysokim powinowactwem do

receptorów opioidowych ssaków [27,28]. Do grupy „nietypowych” peptydów opioidowych zaliczamy również dwa peptydy wyizolowane z mózgu, Tyr-MIF-1 i Tyr-W-MIF-1 [29-31] (Tabela 2).

SELEKTYWNE LIGANDY RECEPTORÓW OPIOIDOWYCH

Odkrycie receptorów opioidowych oraz wyizolowanie pierwszych peptydów opioidowych prawie 30 lat temu zapoczątkowało intensywne badania mające na celu wyjaśnienie ich roli i mechanizmu działania w organizmie. Ustalenie funkcjonalnych różnic pomiędzy poszczególnymi typami receptorów opioidowych i ich fizjologicznej roli wymaga metod pozwalających na aktywację tylko jednego typu receptora. Do tego celu niezbędne są analogi agonistyczne i antagonistyczne o wysokiej selektywności w stosunku do receptorów μ, δ i κ . Różnorodne modyfikacje chemiczne znanych, naturalnych peptydów doprowadziły do otrzymania analogów o zwiększonym powinowactwie i/lub selektywności w stosunku do poszczególnych typów receptorów opioidowych. Obecnie znane są już bardzo selektywne analogi o właściwościach zarówno agonistycznych jak i antagonistycznych dla trzech głównych typów receptorów opioidowych.

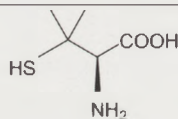
Tabela 2. „Nietypowe” peptydy opioidowe.

Pochodzenie	Peptyd	Sekwencja	Powinowactwo
β -Kazeina	β -kazomorfina bydlą (1-7)	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	μ
	β -kazomorfina człowieka (1-7)	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile	μ
	morficeptyna	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂	μ
Hemoglobina	hemorfina-4	Tyr-Pro-Trp-Thr	μ
Skóra płazów	dermorfina	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	μ
	dermenkefalina	Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-AspNH ₂	δ
	deltorfina I	Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂	δ
	deltorfina II	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂	δ
Podwzgórze bydlą Kora mózgowia człowieka	Tyr-MIF-1	Tyr-Pro-Leu-Gly-NH ₂	μ
Podwzgórze bydlą Kora mózgowia człowieka	Tyr-W-MIF-1	Tyr-Pro-Trp-Gly-NH ₂	μ

LIGANDY RECEPTORA Δ

Leu-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) i Met-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) były pierwszymi endogennymi peptydami opioidowymi wyizolowanymi z mózgu [32]. Wykazują one umiarkowane powinowactwo i selektywność do receptora δ i ulegają szybkiej biodegradacji. W wyniku modyfikacji sekwencji enkefalin, polegających na wstawianiu reszt aminokwasowych o konfiguracji D lub wydłużeniu łańcucha peptydowego, otrzymano analogi syntetyczne o zwiększonej δ -selektywności: DADLE (Tyr- D-Ala-Gly-Phe- D-Leu) [33], DSLET (Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr) [34] i DTLET (Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr) [35]. Peptydy te są szeroko wykorzystywane do charakteryzacji receptora δ oraz badania jego fizjologicznej roli i rozmieszczenia w tkankach [35-38].

Wprowadzenie penicyloaminy (Pen, β,β -dimetylocysteina) do sekwencji enkefalin pozwoliło na otrzymanie dwóch cyklicznych analogów: DPDPE [Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen)] i DPLPE [Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-Pen)], wykazujących dużą selektywność w stosunku do receptora δ [39-41]. Usztywnienie cząsteczek tych peptydów było wymuszone przez obecność mostka disulfidowego pomiędzy atomami siarki w łańcuchach bocznych Pen jak również przez obecność geminalnych grup metylowych w tym aminokwasie.



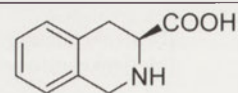
Pen

Pod koniec lat 80-tych ze skóry płazów wyizolowano serię peptydów o zadziwiająco wysokim powinowactwie do receptorów opioidowych ssaków [27]. Dermenkefalina (Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH₂), deltorfina I (Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂) i deltorfina II (Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂) okazały się wyjątkowo selektywne w stosunku do receptora δ . Związki te, jak również μ -selektywna dermorfina, są pierwszymi endogennymi peptydami pochodzenia zwierzęcego, które posiadają w swej sekwencji resztę aminokwasową o konfiguracji D. Ten fenomen jest wynikiem post-translacyjnej enzymatycznej konwersji chiralności [42]. Obecność w sekwencji D-aminokwasu, występującego zawsze w pozycji 2 decyduje o wysokim powinowactwie tych peptydów do receptorów opioidowych oraz ich dużej odporności na biodegradację [27, 42-45].

Spośród peptydów wyizolowanych ze skóry płazów deltorfina II posiada największą selektywność w stosunku do receptora δ , a dermenkefalina jest najmniej selektywna. Zarówno powinowactwo jak i selektywność deltorfin i dermenkefalin do receptora δ są o 2-3 rzędy wielkości większe w porównaniu z enkefalinami. Z tego względu peptydy pochodzące ze skóry płazów są szeroko wykorzystywane w różnych testach biochemicznych oraz, w znakowanej izotopowo formie, jako ligandy w badaniach receptorowych.

W 1992 r. Schiller i wsp. [46] otrzymali serię antagonistów receptora δ dzięki wprowadzeniu do sekwencji peptydów

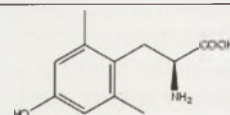
opiodowych kwasu 1,2,3,4-tetrahydroizochinolilo-3-karboxylowego (Tic).



Tic

Użycie Tic pozwoliło na usztywnienie cząsteczki peptydu i wprowadzenie dodatkowego pierścienia aromatycznego, co spowodowało zwiększenie hydrofobowości. Dwa prototypowe peptydy otrzymane przy użyciu Tic, będące selektywnymi antagonistami receptora δ , to Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) i Tyr-Tic-Phe-Phe-NH₂ (TIPP-NH₂). Ich synteza stanowiła przełom w poszukiwaniach antagonistów receptora δ o budowie peptydowej. TIPP wykazuje nanomolewowe powinowactwo i wyjątkową selektywność w stosunku do receptora δ [45]. Jego amid, TIPP-NH₂, był pierwszym otrzymanym peptydem, będącym jednocześnie μ -agonem i δ -antagonem. Peptydy opioidowe o mieszanych właściwościach μ -agonistycznych/ δ -antagonistycznych są uważane za potencjalne środki farmakologiczne o działaniu przeciwbólowym, nie powodujące tolerancji i uzależnienia, tak jak typowe opioidy [46].

Dalsza modyfikacja TIPP, polegająca na zastąpieniu Tyr nowym nienaturalnym aminokwasem, 2,6-dimetylotyrozyną (Dmt) [47], pozwoliła na otrzymanie analogu o wyjątkowo dużym powinowactwie do receptora δ i stała się przełomem w syntezie analogów peptydów opioidowych [48]. Zastąpienie Tyr¹ przez Dmt w różnych grupach peptydów opioidowych pozwoliło otrzymać związki o niezwykle wysokiej aktywności [49-54].



Dmt

LIGANDY RECEPTORA μ

Morfina była pierwszym poznany egzogennym ligandem receptora μ , natomiast przez prawie 30 lat nie był znany żaden endogenne ligand tego receptora, pochodzący z organizmu ssaków.

Wczesne próby otrzymania analogów selektywnych w stosunku do receptora μ polegały na modyfikowaniu enkefalin. Jednym z pierwszych i jednocześnie najbardziej μ -selektywnych analogów tej grupy był DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol) [33].

Dermorfina (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂), otrzymana ze skóry południowo-amerykańskiego gatunku żaby *Phyllomedusa sauvagei* [27] jest zaliczana do ligandów receptora μ o wyjątkowo dużym powinowactwie. W przeciwieństwie do znanych peptydów pochodzących z organizmów ssaków, dermorfina zawiera w pozycji 2 resztę aminokwasową o konfiguracji D (tak jak δ -selektywne deltorfina i dermenkefalina), co czyni ją odporną na degradację enzymatyczną [55].

Przez wiele lat poszukiwania w mózgu i innych tkankach ssaków endogennego liganda receptora μ nie dawały oczekiwanych rezultatów. Dopiero w latach dziewięćdziesiątych efektem tych poszukiwań było wyizolowanie z mózgu dwóch peptydów: Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂) i Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂) o wysokiej selektywności, ale niskim powinowactwie do receptora μ [29-31]. Systematyczne podstawianie naturalnych aminokwasów w pozycje 1, 2 i 3 tych peptydów dało tylko nieaktywne analogi. W 1997 r. Zadina i wsp. [23] zsyntetyzowali serię pochodnych Tyr-W-MIF-1, podstawionych w pozycji 4 kolejno wszystkimi naturalnymi aminokwasami. Jeden z otrzymanych peptydów, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, charakteryzował się niezwykłym powinowactwem (0,36 nM) i selektywnością do receptora μ , a także silnymi własnościami przeciwbólowymi. Ten nowy peptyd, nazwany endomorfina-1, został następnie wyizolowany z mózgu wraz z drugim peptydem, endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂), różniącym się tylko resztą aminokwasową w pozycji 3. Endomorfina-1 i endomorfina-2, ze względu na ich niezwykle wysoką selektywność (stosunek δ/μ odpowiednio 4000 i 12000) i lokalizację w mózgu, zostały uznane za endogenne ligandy receptora μ .

Sekwencja aminokwasowa endomorfiny-1 i -2 różni się od sekwencji typowych peptydów opioidowych, zawierających N-końcowy fragment Tyr-Gly-Gly-Phe i wolny kwas na C-końcu. Taka sama jak w endomorfinie-1 sekwencja trzech pierwszych reszt aminokwasowych (Tyr-Pro-Trp) znajduje się również w Tyr-W-MIF-1, ale powinowactwo tego peptydu do receptora μ jest o 2 rzędy wielkości mniejsze. Identyczną jak w endomorfinie-2, N-końcową sekwencję Tyr-Pro-Phe, zawiera morficeptyna, ale jej powinowactwo do receptora μ jest również znacznie niższe.

Peptydowe analogi o własnościach antagonistycznych w stosunku do receptora μ zostały odkryte nie, jakby się tego należało spodziewać, poprzez modyfikacje peptydów opioidowych, ale poprzez modyfikacje somatostatyny, która jak wykazano, wiąże się w niewielkim stopniu z receptorami opioidowymi w mózgu [56]. Hruba i wsp. [57] zsyntetyzowali serię analogów somatostatyny, zmodyfikowanych w kierunku zwiększenia ich powinowactwa do receptora μ z jednoczesnym obniżeniem powinowactwa do receptorów somatostatynowych. Jeden z otrzymanych analogów, CTP [D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen)-Thr-NH₂], pochodna analogu somatostatyny RC-121, wykazywał dużą selektywność do receptora μ i odporność na biodegradację [57-59]. Dalsze modyfikacje pozwoliły na otrzymanie dwóch najbardziej μ -selektywnych antagonistów w tej grupie, CTAP [D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen)-Thr-NH₂] i CTOP [D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen)-Thr-NH₂].

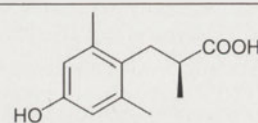
Modyfikacje peptydów opioidowych również doprowadziły do otrzymania ligandów receptora μ o właściwościach antagonistycznych [60,61].

LIGANDY RECEPTORA κ

Dynorfina A (Dyn A, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln) była pierwszym

wyizolowanym endogennym ligandem receptora κ -opioidowego [62]. W późniejszych badaniach odkryto kolejne peptydy z tej grupy, dynorfinę B oraz α - i β -neoendorfiny [63,64]. Dyn A charakteryzuje się niezbyt wysoką selektywnością w stosunku do receptora κ , wiąże się bowiem również, choć w mniejszym stopniu, z receptorami μ i δ . Sekwencja Dyn A jest dość niezwykła, jej N-końcowy segment stanowi cząsteczka Leu-enkefaliny, zwraca też uwagę obecność dużej liczby reszt aminokwasowych o charakterze zasadowym.

Agonistyczne analogi ligandów receptora κ mają obiecujące właściwości jako potencjalne środki przeciwbólowe nie powodujące uzależnienia, natomiast analogi antagonistyczne mogą okazać się przydatne w leczeniu uzależnienia. Przez długi czas próby otrzymania selektywnych antagonistów tego receptora nie dawały oczekiwanych rezultatów. Lu i wsp. [65] otrzymali ciekawe wyniki, wstawiając w pozycję 1 do sekwencji Dyn A(1-11)-NH₂ nowy nienaturalny aminokwas kwas (2S)-2-metylo-3-(2,6-dimetylo-4-hydroksy



(2S)-Mdp

fenylo)propionowy [(2S)-Mdp].

W otrzymanym analogu, nazwanym dynantyną, N-końcowa grupa aminowa, obdarzona ładunkiem dodatnim, została zastąpiona przez grupę metylową. Dynantyna jest pierwszym peptydowym antagonistycznym analogiem receptora κ [66].

PODSUMOWANIE

Prowadzone od dziesięcioleci poszukiwania środka uśmierzającego silny ból, który mógłby zastąpić morfinę, a jednocześnie byłby bezpieczny dla organizmu, nie powodujący uzależnienia i aktywny przy podaniu doustnym, jak dotąd nie zakończyły się sukcesem. Przyczyniły się jednak do intensywnych badań nad receptorami opioidowymi i do odkrycia endogennych ligandów tych receptorów. Badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną peptydów opioidowych, możliwe dzięki otrzymaniu setek syntetycznych analogów, pozwoliły na wyselekcjonowanie związków o wysokim powinowactwie w stosunku do poszczególnych typów receptorów opioidowych. Dostępność tych analogów umożliwia dalsze szczegółowe badania nad rolą i sposobem działania opioidów w organizmie i może w przyszłości doprowadzić do znalezienia bezpiecznego odpowiednika morfiny.

PIŚMIENNICTWO

1. Pert CB, Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014
2. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1947-1949
3. Terenius L (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 32: 317-320

4. Wittert G, Hope P, Pyle D (1996) Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 877-881
5. Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955
6. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12048-12052
7. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44: 8-12
8. Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 329: 291-295
9. Law P-Y, Loh HH (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 607-624
10. Ling GS, MacLeod JM, Lee S, Lockhart SH, Pasternak GW (1984) Separation of morphine analgesia from physical dependence. *Science* 226: 462-464
11. Ling GS, Spiegel K, Lockhart SH, Pasternak GW (1985) Separation of opioid analgesia from respiratory depression: evidence for different receptor mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 149-155
12. Jiang Q, Takemori AE, Sultana M., Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI, Porreca F (1991) Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala²,Leu⁵,Cys⁶]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyante: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 1069-1075
13. Sofuoglu M, Portoghese S, Takemori AE (1991) Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 676-680
14. Mattia A, Vanderah T, Mosberg HI, Porreca F (1991) Lack of antinociceptive cross-tolerance between [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin and [D-Ala²]deltorphin II in mice: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 583-587
15. Attali B, Gouarderes C, Mazarguil H, Audigier Y, Cros J (1982) Evidence for multiple "Kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides* 3: 53-64
16. Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A (1988) Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4061-4065
17. Clark JA, Liu L, Price M, Hersh B, Edelson M, Pasternak G W (1989) Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 461-468
18. Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 383-387
19. Hollt V (1986) Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26: 59-77
20. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278: 423-427
21. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298: 245-249
22. Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295: 202-206
23. Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386: 499-502
24. Teschemacher H (1993) *Handbook of experimental Pharmacology* 104/1, wyd. Herz A, Akil JH, Simon EJ, Springer, Berlin, str. 499-528
25. Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F (1979) Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1211-1216
26. Nyberg F, Sanderson K, Glamsta EL (1997) The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* 43: 147-156
27. Montecucchi PC, de Castiglione R, Piani S, Gozzini L, Erspamer V (1981) Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 17: 275-283
28. Lazarus LH, Bryant SD, Cooper PS, Salvadori S (1999) What peptides these deltorphins be. *Prog Neurobiol* 57: 377-420
29. Horvath A, Kastin AJ (1990) Evidence for presence of Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂) in human brain cortex. *Int. J Pept Protein Res* 36: 281-284
30. Erchevyi J, Kastin AJ, Zadina JE (1992) Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human brain cortex: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂ (Tyr-W-MIF-1). *Peptides* 13: 623-631
31. Hackler L, Kastin AJ, Erchevyi J, Zadina JE (1993) Isolation of Tyr-W-MIF-1 from bovine hypothalami. *Neuropeptides* 24: 159-164
32. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-580
33. Kosterlitz HW, Lord JAH, Paterson SJ, Waterfield AA (1980) Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu- and delta-receptors. *Br J Pharmacol* 68: 333-348
34. Zajac JM, Roques BP (1985) Differences in binding properties of mu and delta opioid receptor subtypes from rat brain: kinetic analysis and effects of ions and nucleotides. *J Neurochem* 44: 1605-1614
35. Zajac JM, Gacel G, Petit F, Dodey P, Rossignol P, Roques BP (1983) Deltakephalin, Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Thr: a new highly potent and fully specific agonist for opiate delta-receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 111: 390-397
36. Quirion R, Zajac JM, Morgat JL, Roques BP (1983) Autoradiographic distribution of mu and delta opiate receptors in rat brain using highly selective ligands. *Life Sci* 33, Suppl. 1: 227-230
37. Delay-Goyet P, Zajac JM, Javoy-Agid F, Agid Y, Roques BP (1987) Regional distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in human brains from controls and Parkinsonian subjects. *Brain Res* 414: 8-14
38. Petit F, Hamon M, Fournie-Zaluski M-C, Roques BP, Glowinski J (1986) Further evidence for a role of delta-opiate receptors in the presynaptic regulation of newly synthesized dopamine release. *Eur J Pharmacol* 126: 1-9
39. James IF, Goldstein A (1984) Site directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. *Mol Pharmacol* 25: 337-342
40. Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5871-5874
41. Corbett AD, Gillan MGC, Kosterlitz HW, McKnight AT, Paterson SJ, Robson LE (1984) Selectivities of opioid peptide analogues as agonists and antagonists at the delta receptor. *Br J Pharmacol* 83: 271-279
42. Mor A, Amiche M, Nicolas P (1992) Enter a new post-translational modification: D-amino acids in gene-encoded peptides. *Trends Biochem Sci* 17: 481-485
43. Kreil G, Barra D, Simmaco M, Erspamer V, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Severini C, Corsi R, Melchiorri P (1989) Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 162: 123-128
44. Amiche M, Sagan S, Mor A, Delfour A, Nicolas P (1989) Dermenkephalin (Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH₂): a potent and fully specific agonist for the delta opioid receptor. *Mol Pharmacol* 35: 774-779
45. Barra D, Mignogna G, Simmaco M, Pucci P, Severini C, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Erspamer V (1994) [D-Leu²]deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian Hyliid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. *Peptides* 15: 199-202

46. Schiller PW, Nguyen TM, Weltrowska G, Wilkes BC, Marsden BJ, Lemieux C, Chang NN (1992) Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly delta-selective peptide antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11871-11875
47. Sasaki Y, Suto T, Ambo A, Ouchi H, Yamamoto Y (1999) Biological properties of opioid peptides replacing Tyr at position 1 by 2,6-dimethyl-Tyr. *Chem Pharm Bull* 47: 1506
48. Salvadori S, Attila M, Balboni G, Bianchi C, Bryant SD, Crescenzi O, Guerrini R, Picone D, Tancredi T, Temussi PA (1995) Delta opioid-mimetic antagonists: prototypes for designing a new generation of ultra-selective opioid peptides. *Mol Med* 1: 678-689
49. Chandrakumar NS, Yonan PK, Stapelfeld A, Savage M, Rorbacher E, Contreras PC, Hammond D (1992) Preparation and opioid activity of analogues of the analgesic dipeptide 2,6-dimethyl-L-tyrosyl-N-(3-phenylpropyl)-D-alaninamide. *J Med Chem* 35: 223-233
50. Hansen DW Jr, Stapelfeld A, Savage MA, Reichman M, Hammond DL, Haaseth RC, Mosberg HI (1992) Systemic analgesic activity and delta-opioid selectivity in [2,6-dimethyl-Tyr¹,D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin. *J Med Chem* 35: 684-687
51. Pitzele BS, Hamilton RW, Kudla KD, Tsymbalov S, Stapelfeld A, Savage MA, Clare M, Hammond DL, Hansen DW Jr (1994) Enkephalin analogs as systemically active antinociceptive agents: O- and N-alkylated derivatives of the dipeptide amide L-2,6-dimethyltyrosyl-N-(3-phenylpropyl)-D-alaninamide. *J Med Chem* 37: 888-896
52. Schiller PW, Weltrowska G, Schmidt R, Nguyen TMD, Berezowska I, Lemieux C, Chung NN, Carpenter KA, Wilkes BC (1995) Four different types of opioid peptides with mixed mu agonist/delta antagonist properties. *Analgesia* 1: 703-706
53. Schiller PW, Schmidt R, Weltrowska G, Berezowska I, Nguyen TMD, Dupuis S, Chung NN, Lemieux C, Wilkes BC, Carpenter KA (1998) Conformationally constrained opioid peptide analogs with novel activity profiles. *Lett Pept Sci* 5: 209-214
54. Wang C, McFadyen IJ, Traynor JR, Mosberg HI (1998) Design of a high affinity peptidomimetic opioid agonist from peptide pharmacophore models. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 2685-2688
55. Erspamer V, Melchiorri P (1980) Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacol Sci* 1: 391-395
56. Terenius L (1976) Somatostatin and ACTH are peptides with partial antagonist-like selectivity for opiate receptors. *Eur J Pharmacol* 38: 211-213
57. Pelton JT, Gulya K, Hrubby VJ, Duckles SP, Yamamura HI (1985) Conformationally restricted analogs of somatostatin with high mu-opiate receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 236-239
58. Pelton JT, Kazmierski W, Gulya K, Yamamura HI, Hrubby VJ (1986) Design and synthesis of conformationally constrained somatostatin analogues with high potency and specificity for mu opioid receptors. *J Med Chem* 29: 2370-2375
59. Shook JE, Pelton JT, Lemcke PK, Porreca F, Hrubby VJ, Burks TF (1987) Mu opioid antagonist properties of a cyclic somatostatin octapeptide in vivo: identification of mu receptor-related functions. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 1-7
60. Sasaki Y, Chiba T (1995) Novel deltorphin heptapeptide analogs with potent delta agonist, delta antagonist, or mixed mu antagonist/delta agonist properties. *J Med Chem* 38: 3995-3999
61. Kruszynski R, Fichna J, do-Rego JC, Chung NN, Schiller PW, Kosson P, Costentin J, Janecka A (2005) Novel endomorphin-2 analogs with mu-opioid receptor antagonist activity. *J Pept Res* 66: 125-131
62. Chavkin C, James IF, Goldstein A (1982) Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 215: 413-415
63. Fischli W, Goldstein A, Hunkapiller MW, Hood LE (1982) Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5435-5437
64. Lemaire S, Chouinard L, Denis D, Panico M, Morris HR (1982) Mass spectrometric identification of various molecular forms of dynorphin in bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 51-58
65. Lu Y, Weltrowska G, Lemieux C, Chung NN, Schiller PW (2001) Stereospecific synthesis of (2S)-2-methyl-3-(2',6'-dimethyl-4'-hydroxyphenyl)-propionic acid (Mdp) and its incorporation into an opioid peptide. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 323-325
66. Lu Y, Nguyen TM-D, Weltrowska G, Berezowska I, Lemieux C, Chung NN, Schiller PW (2001) [2',6'-dimethyltyrosine]Dynorphin A(1-11)-NH₂ analogues lacking an n-terminal amino group: potent and selective kappa opioid antagonists. *J Med Chem* 44: 3048-3053

Opioid receptors and their selective ligands

Mariola Katarzyna Piestrzeniewicz, Jakub Fichna, Anna Janecka

Laboratory of Biomolecular Chemistry, Institute of Biomedical Chemistry, Medical University of Łódź, 6/8Mazowiecka St., 92-215 Łódź, Poland

✉ e-mail: ajanecka@zdn.umed.lodz.pl

Key words: opioid receptors, opioid peptides, agonists, antagonists

ABSTRACT

Opioid receptors (μ , δ , and κ) belong to a large family of G protein-coupled receptors and play an important physiological role. Stimulation of these receptors triggers analgesic effects and affects the function of gastrointestinal tract. The discovery of opioid peptides, which are endogenous ligands of opioid receptors, including δ -selective enkephalins, κ -selective dynorphins, and μ -selective endomorphins, initiated their structure-activity relationship studies. For the last 30 years, hundreds of analogs of opioid peptides have been synthesized in an effort to obtain the compounds more active, selective, and resistant to biodegradation than the endogenous ligands. Different unnatural amino acids, as well as cyclisation procedures, leading to conformationally restricted analogs, were employed. All these modifications resulted in obtaining very selective agonists and antagonists with high affinity at μ -, δ -, and κ -opioid receptors, which are extremely useful tools in further studies on the pharmacology of opioid receptors in a mammalian organism.

Irena Baranowska-Bosiacka 

Dariusz Chlubek

Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; e-mail: ika@univ.szczecin.pl

Artykuł otrzymano 20 lutego 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 6 czerwca 2006 r.

Słowa kluczowe: ołów (Pb^{2+}), neurotoksyczność ołowiu, receptory glutaminergiczne, próg bezpieczeństwa

Wykaz skrótów: AMPA (ang. *2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid*) – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolo-propionowy; CNP (ang. *2',3'-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase*) – fosfodiesteraza 2',3' cyklicznych nukleotydów (białko Wolfgroma); CRAC (ang. *Ca²⁺ release activated calcium channels*) – kanały aktywowane przez uwolnienie jonów wapnia; CREB (ang. *cAMP responsive element binding protein*) – białko wiążące elementy odpowiedzi na cAMP; DCT1 (ang. *divalent cations transporter 1*) – transporter kationów dwuwartościowych; LTP (ang. *long-term potentiation*) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne; LTD (ang. *long-term depression*) – długotrwałe osłabienie synaptyczne; NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*) – kwas N-metylo-D-asparaginowy; NR2A, NR2B (ang. *NMDA subunit*) – podjednostka receptora NMDA; Pb-B – stężenie ołowiu we krwi pełnej; VDCC (ang. *voltage-dependent calcium channels*) – zależne od potencjału kanały wapniowe

STRESZCZENIE

Prezentowana praca przedstawia ostatnie wyniki badań dotyczących neurotoksyczności ołowiu (Pb^{2+}), celem zwrócenia uwagi na ten problem i podjęcia w Polsce działań, które zainicjowałyby program całkowitego 'wyeliminowania' skutków zatrucia ołowiem, szczególnie u dzieci. W pracy dyskutowane są następstwa narażenia na ołów w dawkach niższych niż przyjęte obecnie za 'bezpieczne'. Omówiono szlak przenikania ołowiu do mózgu, skutki akumulacji w neuronach, oligodendrogleju i astrogleju. Przedstawiono wpływ, jaki ołów wywiera na mózg powodując zaburzenia funkcji poznawczych i zdolności uczenia się skutkiem oddziaływania na trzy główne systemy neurotransmisji: dopaminergiczny, cholinergiczny i glutaminergiczny. Zaprezentowano najnowsze wyniki badań dotyczące mechanizmów neurotoksyczności ołowiu, jak: wpływ na receptory, uwalnianie neurotransmiterów, białka synaptyczne.

WPROWADZENIE

Skażenie środowiska ołowiem (Pb^{2+}) stanowi dla współczesnej cywilizacji jeden z najważniejszych problemów ekologicznych [1,2]. Pojazdy mechaniczne, przemysł, nowe technologie z zastosowaniem ołowiu oraz odpady przemysłowe powodują utrzymywanie się zawartości ołowiu w biosferze na wysokim poziomie. Aktualnie emitowany z różnych źródeł, wciąż dodawany jest do już istniejącego depozytu i nie podlega praktycznie biodegradacji. Trafiając do środowiska ołów utrzymuje się w formie aktywnej biologicznie, gdzie za pośrednictwem powietrza, wody i gleby jest łatwo włączany w łańcuchy troficzne [3,4]. Pomimo, że wiele krajów wysokorozwiniętych wprowadziło programy zmierzające do obniżenia zawartości ołowiu w środowisku, przede wszystkim poprzez wyeliminowanie ołowiu z benzyny, to problem przewlekłego działania ołowiu w niskich dawkach wciąż pozostaje aktualny [1,2,3].

Prezentowana praca przedstawia ostatnie wyniki badań dotyczących neurotoksyczności ołowiu, celem zwrócenia uwagi na ten problem i podjęcia w Polsce działań, które zainicjowałyby program mający na celu całkowite wyeliminowanie zatrucia ołowiem, szczególnie u dzieci.

OŁÓW JAKO NIEBEZPIECZNA TRUCIZNA ŚRODOWISKOWA

Pomimo, że w 1991 American Center for Disease Control (CDC, United States Department of Health and Human Services) obniżyło próg bezpiecznego stężenia ołowiu w pełnej krwi do wartości 9,94 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [4,5], to wiele danych wskazuje, że nawet przy stężeniu niższym niż dopuszczalne stanowi on zagrożenie dla zdrowia.

Badania dotyczące toksyczności ołowiu prowadzone są w licznych ośrodkach na świecie od wielu lat. Wiadomo, że ołów zaburza metabolizm komórkowy znacznie wcześniej niż pojawią się objawy ogólnoustrojowe [6,7]. Szereg mechanizmów toksycznego działania zostało już w znacznej części wyjaśnionych (np. wpływ na hemopozę); wiele innych stanowi aktualnie przedmiot badań (wpływ ołowiu na narządy wydzielania wewnętrznego, nadciśnienie tętnicze, występowanie kardiomiopatii czy niepłodności męskiej) [1,3,6,7].

Ostatnio najwięcej uwagi poświęca się neurotoksycznemu działaniu ołowiu, przy czym szczególnie dyskutowane są następstwa narażenia na ołów w dawkach niższych niż przyjęte obecnie za 'bezpieczne' [8,9,10].

DIAGNOZOWANIE ZATRUCIA OŁOWIEM

Immisja ołowiu do ustroju odbywa się głównie poprzez układ oddechowy i pokarmowy, a następnie ołów jest transportowany przez krew do wszystkich

tkanek. Z tego powodu pomiar stężenia ołowiu we krwi pełnej jest stosowany do diagnozowania zatruc oraz służy do określenia wielkości narażenia, zarówno w przypadku populacji, jak i osób zawodowo narażonych na ołów [4].

Coraz większa wiedza na temat toksycznego działania ołowiu doprowadziła do systematycznego obniżania dopuszczalnego stężenia ołowiu we krwi. W latach pięćdziesiątych za 'normalne', czy też nietoksyczne stężenie ołowiu we krwi uznawano 60–80 µg/dL, poziom ten był następnie wielokrotnie obniżany: do 40 µg/dL w 1971r, 30 µg/dL w 1975 r, 25 µg/dL w 1985r i w końcu do 9,94 µg/dL w 1991 [4]. To ostatnie obniżenie wartości uznawanej za bezpieczną zostało oparte na wspomnianej już opinii ekspertów CDC opublikowanej w 1991 roku [5]. W raporcie tym stwierdzono, że „naukowe dowody negatywnych skutków działania ołowiu u dzieci, nawet przy tak niskich stężeniach jak 10 µg/dL, są nie do odparcia i stać się to musi główną przesłanką działań zmierzających do wyeliminowania narażenia na ołów u dzieci”. Eksperti CDC stwierdzili także, że „niektóre badania sugerują niekorzystne działanie ołowiu nawet przy stężeniach mniejszych niż 10 µg/dL (0,48 µM). Jednak dotychczas zgromadzone dowody są niewystarczające i wymagają potwierdzenia; jak dotąd nie ustalono z całą pewnością stężenia ołowiu we krwi, które można by uznać za bezpieczne” [5]. W roku 2004 CDC powołała kolejną grupę ekspertów, których celem było przygotowanie raportu, w którym przeprowadzono krytyczną ocenę dotychczas zgromadzonych dowodów na temat skutków zdrowotnych ołowiu przy stężeniu Pb-B < 10µg/dL u dzieci [9]. Eksperti potwierdzili, że istnieją jasne pośrednie i bezpośrednie dowody potwierdzające związek między ołowiem we krwi u dzieci, a zaburzeniami pamięci, koncentracji, uczenia się oraz obniżonym IQ. Na podstawie tego raportu oraz innych doniesień w Stanach Zjednoczonych przyjęto program, który ma na celu całkowite wyeliminowanie zatruc ołowiem u dzieci do roku 2010 [10,11].

Przy diagnozowaniu zatruc ołowiem ogromne znaczenie ma fakt, że pomimo iż pomiar stężenia ołowiu we krwi jest dobrym wskaźnikiem bieżącego narażenia, to nie odzwierciedla on bezpośrednio stężenia ołowiu w mózgu [12]. Z wielu badań wynika, że stężenie Pb w płynie mózgowo-rdzeniowym może być znacznie wyższe niż stężenie Pb we krwi pełnej, np. przy stężeniu we krwi 10 µg/dL (0,48 µM), w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi ono 14,6 µg/dL (0,7 µM). Spowodowane jest to różnym czasem połowicznego okresu eliminacji ołowiu, który zależy od miejsca zdeponowania: we krwi wynosi około 35 dni, w mózgu około 2 lata, a w kościach od 1 roku nawet do 20–30 lat [12,13].

Jednocześnie, pomimo krótkiego okresu półtrwania ołowiu we krwi, jego stężenie może utrzymywać się na wysokim poziomie przez dłuższy czas, nawet po czasowym ustaniu ekspozycji, ze względu na mobilizację ołowiu 'zdeponowanego' w organizmie [14]. Ma to miejsce w przypadku, kiedy ołów zgromadzony w kościach dzieci może ponownie przenikać do krwi w wyniku ciągłego rozwoju szkieletu. W ten sposób przedłuża się czas, w którym ołów ma dostęp do innych tkanek. Dlatego krótkie ekspozycje skutkują 10 miesięcznym okresem półtrwania ołowiu we krwi pełnej, a przewlekłe nawet 20–38 miesięcznym okresem półtrwa-

nia [14]. Stężenie ołowiu w mózgu wydaje się również być zależne od wieku zwierzęcia [14,15], ale nie jest jasne czy jest zależne od regionu mózgu, czy też brak jest selektywnej kumulacji [16,17].

OŁÓW JAKO SILNA NEUROTOKSYNA

Ołów jest uważany za silną neurotoksynę, która zaburza funkcję neuronów i powoduje szeroki zakres długotrwałych niekorzystnych efektów [2,11,18]. Zmiany elektrofizjologiczne, neurochemiczne i behawioralne pojawiają się najwcześniej u dzieci, najbardziej wrażliwych na działanie ołowiu [2,17-19]. Zaburzenia funkcji poznawczych i zmiany zachowań, składające się na obraz dzieci 'mniej zdolnych', są obserwowane już przy stężeniu ołowiu we krwi 10–15 µg/dL. Stwierdzono także, że pre- i postnatalna ekspozycja na działanie ołowiu, nawet w bardzo niskich dawkach, prowadzi do zaburzeń w rozwoju neuropsychologicznym oraz obniżenia IQ w wieku szkolnym [11,20,21]. Mimo, że istnieją dane wskazujące na odwracalność niektórych zaburzeń [21], to terapia z zastosowaniem chelatorów ołowiu okazała się nieskuteczna przy leczeniu zaburzeń neuropsychologicznych, obserwowanych przy stężeniach ołowiu we krwi pełnej między 20–45 µg/dL u dzieci, a zaburzenia poznawcze obserwowano u dorosłych nawet w 50 lat po zatruciu ołowiem [22,23]. Ponadto uważa się, że procesy patologiczne utożsamiane z neurotoksycznym działaniem ołowiu, mogą odgrywać istotną rolę w etiologii zachowań społecznych [22].

Powyższe zależności pozwalają na umieszczenie ołowiu nie tylko na liście niebezpiecznych trucizn obecnych w środowisku [24,25], ale stawiają ołów pośród najbardziej niebezpiecznych neurotoksyn, które upośledzają wyższe funkcje centralnego układu nerwowego [9].

SZLAK PRZENIKANIA OŁOWIU DO MÓZGU

Zdolność przenikania ołowiu do płynu śródmiąższowego mózgu wynika z własności transportowych bariery krew-mózg, funkcjonalnej bariery utworzonej przez komórki śródbłonka naczyń włosowatych mózgu. Dzięki występowaniu specyficznych transporterów i wytworzeniu połączeń zamkniętych, kapilary mózgowe zapewniają selektywny transport cząsteczek hydrofilowych i jonów z krwi do płynu okołokomórkowego. Komórki śródbłonka naczyń włosowatych mózgu są szczególnie wrażliwe na uszkodzenia wywołane przez ołów i akumuluje go znacznie więcej, niż inne struktury mózgu, z wyjątkiem astrocytów będących również strukturalnym składnikiem bariery [26]. Stwierdzono, że hodowle astrocytów są bardziej wrażliwe na toksyczny wpływ ołowiu w niskich stężeniach niż hodowle śródbłonka naczyń włosowatych mózgu [20].

Przenikanie ołowiu poprzez barierę krew-mózg zachodzi stosunkowo szybko, z jednoczesnym silnym działaniem neurotoksycznym [26-28]. Wykazano, że bariera krew-mózg jest ważnym filtrem dla Pb²⁺ i jej niecałkowity rozwój czyni młode zwierzęta szczególnie wrażliwymi na neurotoksyczne działanie ołowiu. Zawartość Pb²⁺ w mózgu osiąga szczyt u szczurów około 15 dni po urodzeniu (PN 15) i następnie zaczyna spadać, sugerując, że po PN15

dojrzewanie bariery krew-mózg może ograniczać wnikanie Pb^{2+} do mózgu [15].

MECHANIZMY PRZENIKANIA OŁOWIU DO MÓZGU

Ponieważ większość metali ciężkich przedostała się do środowiska skutkiem ich wydobywania i procesów przemysłowych, wydaje się słusznym stwierdzenie, że wyspecjalizowane komórki naszego organizmu mogły nie rozwinąć faktycznej zdolności do rozpoznawania fizjologicznie ważnych i toksycznych pierwiastków. Te ostatnie zatem są zdolne do wiązania się ze swoistymi miejscami w białkach transportowych błony komórkowej, poprzez mechanizm naśladowania jonów [29]. Nieznany jest dokładnie mechanizm, za pomocą którego Pb^{2+} przechodzi przez śródbłonek bariery krew-mózg, ale wynikać on może w dużej mierze ze zdolności ołowiu do zastępowania wapnia (Ca^{2+}) i cynku (Zn^{2+}). Mechanizm naśladowania Ca^{2+} przez Pb^{2+} nie jest do końca jasny, ponieważ promień jonowy ołowiu jest 20% większy niż wapnia (odpowiednio 99 pm i 120 pm). Również struktura elektronowa tych dwóch pierwiastków jest różna; ołów ma większą zdolność do tworzenia wiązań koordynacyjnych, wapń tworzy głównie połączenia z tlenem, podczas gdy Pb^{2+} tworzy kompleksy również z innymi ligandami, szczególnie grupami sulfydrylowymi oraz jony kompleksowe z OH^- , Cl^- , NO_3^- , $(CO_3)^{2-}$ [29].

Jednak pomimo tych różnic, wyniki wielu prac eksperymentalnych wskazują na zdolność Pb^{2+} do zastępowania Ca^{2+} poprzez m.in.: (i) transport na szlakach specyficznych dla Ca^{2+} m.in. poprzez kanały aktywowane przez uwolnienie jonów wapnia – CRAC (ang. *Ca²⁺ release activated channels*) oraz zależne od potencjału kanały wapniowe VDCC [30,31]; (ii) wiązanie do wielu białek zależnych od Ca^{2+} [27,32] (Ryc. 1).

Niektóre badania wskazują także na możliwy pasywny mechanizm transportu ołowiu. Deane i Bradbury [33] podając szczerom ołów dożylnie, jak i perfundując naczynia jednej półkuli mózgu stwierdzili, że transport ołowiu przez barierę krew-mózg był niezależny od stężenia Ca^{2+} i Mg^{2+} oraz niewrażliwy na działanie blokerów kanału wapniowego i inhibitorów wymiennicy anionowych. Autorzy stwierdzili, że efekt depolaryzacji błony wywołany przez K^+ i pH wskazywać może, że ołów jest transportowany głównie jako małowartościowy kompleks $Pb(OH)^+$.

Gunshin i wsp. [34] zidentyfikowali u szczurów białko transportowe – DCT1 transporter kationów dwuwartościowych (ang. *divalent cations transporter 1*), które charakteryzuje się niezwykle szeroką swoistością substratową i może transportować Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} oraz Pb^{2+} . DCT1 pośredniczy w transporcie aktywnym, zależnym od potencjału błony komórkowej i sprzężonym z transportem protonów. Białko DCT1 należące do rodziny białek makrofagowych związanych z naturalną odpornością (ang. *natural-resistance-associated macrophage protein* – Nramp), składające się z 561 reszt aminokwasowych posiada przypuszczalnie 12 domen transbłonowych, a jego ekspresję stwierdzono we wszystkich komórkach. Ekspresja tego białka jest zwiększona przy niedoborze żelaza w diecie i przypuszcza się, że może być ono kluczowym pośred-

nikiem w absorpcji jelitowej żelaza. Należące do tej samej rodziny, niedawno zidentyfikowane białko-transporter 1 metali dwuwartościowych (ang. *divalent metal transporter 1*) – DMT1 (Nramp2/DCT1), pełniące ważną rolę w transporcie żelaza w mózgu [35], posiada również wysoką zdolność transportu ołowiu, kiedy ulega ekspresji w oocytach *Xenopus laevis* [34], drożdżach i fibroblastach człowieka [36].

Badania z zastosowaniem inhibitorów metabolicznych w tkankach zwierząt poddanych wcześniejszej ekspozycji na ołów wskazują na dużą rolę pompy Ca^{2+} zależnej od ATP w transporcie zwrotnym ołowiu [26,28].

AKUMULACJA OŁOWIU W ASTROGLEJU, OLIGODENDROGLEJU I NEURONACH

Przekroczenie bariery krew-mózg przez Pb^{2+} skutkuje znaczącą jego akumulacją w mózgu. Jednocześnie jego stężenie w mózgu nie zmienia się gwałtownie, nawet jeśli poziom ołowiu we krwi spada skutkiem ustania ekspozycji. Toksyczny wpływ ołowiu dotyczy nie tylko neuronów, ale również oligodendrogleju i astrogleju [37]. Ekspozycja na ołów opóźnia różnicowanie się glejowych komórek progenitorowych [38], stwierdzono także, że komórki progenitorowe oligodendrogleju *in vitro* są znacznie bardziej wrażliwe na ołów, niż hodowle dojrzałych oligodendrocytów [38].

ASTROGLEJ

Na podstawie wyników wielu badań prowadzonych na hodowlach neuronów, astrogleju oraz liniach neuroblastoma wysunięto hipotezę, że astrocyty mogą pełnić funkcję 'zbiornika' ołowiu w dojrzałym mózgu [38,39]. Poprzez kanały VDCC typu L [40], ołów może przenikać do wnętrza astrocytów, które gromadzą i izolują ołów poza mitochondriami, chroniąc nie tylko własne procesy oddechowe, ale znacznie wrażliwsze neurony [41]. Nie-dojrzały astroglej (w odróżnieniu od neuronów) w sposób uprzywilejowany gromadzi ołów. Różnica ta wywodzi się raczej z właściwości tych dwóch różnych typów komórek niż z cytoarchitektury mózgu [41]. Stwierdzono także znacznie wyższe stężenie ołowiu w astrocytach *in vitro*, niż w medium, jak również w młodszych astrocytach niż w starszych [39]. Jednakże zdolność astrocytów do gromadzenia ołowiu prawdopodobnie wzrasta wraz z ich dojrzewaniem i interakcją z neuronami [41]. Podczas gdy akumulacja ołowiu może początkowo chronić neurony przed toksycznym działaniem ołowiu, to przechowywany w komórkach glejowych ołów może być wciąż uwalniany i uszkadzać pobliskie neurony [42]. Dodatkowo wiele funkcji jakie pełnią astrocyty (sekrecja czynników wzrostu, transport neuroprzekazników) może być hamowanych przez ołów, co ma swój udział we wspomnianych wcześniej zaburzeniach pamięci i uczenia się [43]. Dodatkowo, astrocyty modulują aktywność synaptyczną i potencjalną ekscytotoksyczność poprzez pobieranie uwolnionego glutaminianu i przekształcanie w glutaminę dzięki aktywności syntetazy glutaminowej. Stwierdzono, że ołów w stężeniu 0,25-1,0 μM powoduje w hodowlach 7-21 dniowych zależny od dawki i czasu ekspozycji spadek aktywności tego enzymu [44].

OLIGODENDROGLEJ

Komórki oligodendrogleju odpowiadają na zatrucie ołowiem bezpośrednio lub pośrednio, co może uszkadzać funkcjonowanie mózgu. U dojrzałych szczurów z wykształconą barierą krew/mózg stwierdzono w warunkach przewlekłego zatrucia ołowiem (stężenie ołowiu we krwi – 38,2 µg/dL – co odpowiada Pb-B w środowiskowym narażeniu; w homogenatach mózgu – 0,03 µg/g mokrej masy i w mielinie 0,6 µg/g mokrej masy) nagromadzenie Pb w mielinie oraz powstanie zmian w obrazie morfologicznym osłonek mielinowych i oligodendrocytów [45]. Bezpośrednią przyczyną zmian w budowie mieliny był, wg autorów, wzrost płynności błon otoczek mielinowych. Przypuszczalny mechanizm zaburzenia płynności błony, a w konsekwencji zmian ich struktury, polega na blokowaniu białkowych grup -SH mieliny i tworzeniu wiązań typu S-Pb-S, wzrostu poziomu fosfatydyloetanolaminy i wzrostu stosunku fosfatydyloetanolaminy do fosfatydylocholino oraz obniżenia ekspresji i aktywności fosfodiesterazy 2', 3' cyklicznych nukleotydów (CNP, białko Wolfgrama) [46]. W ośrodkowym układzie nerwowym CNP obecna jest w oligodendrocytach i mielinie. Lokalizacja oraz występowanie w cząsteczce CNP domen charakterystycznych dla białek G wiążących GTP, sugeruje aktywny udział tego białka w przenoszeniu sygnałów wewnątrzkomórkowych. Umieszczenie w sąsiedztwie F-aktyny i mikrotubul w oligodendrocytach sugeruje także udział CNP w formowaniu cytoszkieletu [46]. Jednakże biologiczna rola aktywności enzymatycznej CNPazy jest niejasna, ponieważ dotychczas nie wykryto w mózgu 2', 3' nukleotydów – substratów dla CNPazy. Stwierdzono również, że CNP posiada dwie z trzech domen wiążących GTP, co su-

gerowałoby brak związku z miejscem katalitycznym tego enzymu, stąd rozważana jest hipoteza o innej niż enzymatyczna funkcji tego białka w mózgu [46].

NEURONY

Ołów również łatwo przenika do samych neuronów. Mazzolini i wsp. [31] badali z użyciem znacznika fluorescencyjnego fura-2 szlak wnikania ołowiu do komórek ziarnistych kory mózdzku pochodzących od 8-dniowych szczurów. Związanie Pb^{2+} przesunęło pik pobudzenia fura-2 w kierunku mniejszej długości fali o charakterystyce podobnej jak dla Ca^{2+} i Cd^{2+} , ponieważ powinowactwo Pb^{2+} do fura-2 jest 5 razy wyższe niż dla Ca^{2+} . Dalsze pobieranie ołowiu było znoszone przez mający zdolność przenikania przez błonę chelator metali ciężkich tetrakis(2-pyridylometylo)etylenodiaminę (TPEN), którego powinowactwo do ołowiu jest 10-krotnie wyższe niż dla Ca^{2+} i Mg^{2+} [47]. Badania te pozwoliły stwierdzić, że Pb^{2+} przenika błonę komórkową komórek ziarnistych kory mózdzku trzema głównymi szlakami: i) niespecyficznym- przy braku stymulatorów ii) poprzez kanały VDCC iii) poprzez kanały NMDA [47]. Na pobieranie Pb^{2+} nie wpływały nimodypina ani też BayK8644, ale pobieranie było osłabione w obecności ω-agatoksyny IVA, co wskazuje na zaangażowanie receptora VDCC typu nie-L, który dominuje w tych komórkach. W badanych komórkach Pb^{2+} w stężeniach ok. 10 µM powodował zależną od czasu, dawki i stymulatora saturację barwnika, co wskazuje, że wewnątrzkomórkowy Pb^{2+} łatwo osiąga w neuronach stężenia w zakresie mikromolarnym [47].

MOLEKULARNE MECHANIZMY NEUROTOKSYCZNOŚCI OŁOWIU

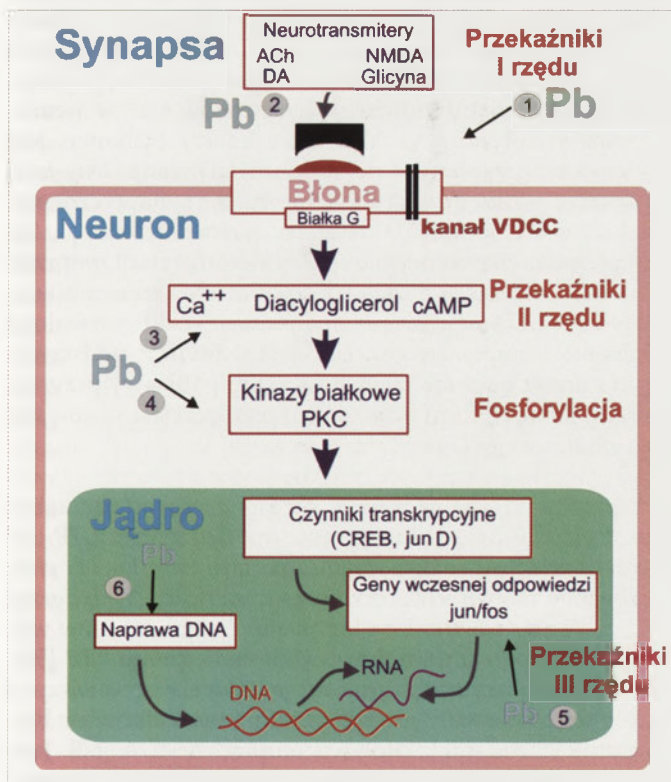
WPŁYW NA RECEPTORY

Wpływ, jaki ołów wywiera na mózg powodując zaburzenia poznawcze, jest związany z jego oddziaływaniem na trzy główne systemy neurotransmisji: dopaminergiczny, cholinergiczny i glutaminergiczny [17,48,49] (Ryc. 1).

W pobudzającym układzie glutaminergicznym stwierdzono istotny wzrost gęstości receptorów jonotropowych typu AMPA (kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) w mózgu szczurów, które poddano 2 tyg. ekspozycji na ołów i spadek gęstości tego receptora po przewlekłej ekspozycji [50]. Również gęstość receptora NMDA w mózgu dorosłych szczurów wzrastała po chronicznej ekspozycji na ołów – poczynając od urodzenia do uzyskania przez nie dojrzałości [49]. W hodowlach komórek dopaminergicznych śródmózgowia poddanych ciągłej ekspozycji na ołów w stężeniu 0,3 µM (6,25 µg/dL) zaobserwowano zmniejszone uwalnianie dopaminy; wzrost liczby martwych komórek, nekrozę i w mniejszej liczbie komórek apoptozę [51].

ROLA RECEPTORÓW NMDA W TOKSYCZNOŚCI OŁOWIOWEJ

Wyniki wielu prac wskazują na receptory NMDA jako główny cel oddziaływania ołowiu w neuronach CUN [11, 30,48,52]. Receptory te poprzez wpływ na funkcję związaną z nimi kanału jonowego przepuszczalnego dla Ca^{2+} ,



Rycina 1. Przypuszczalne miejsca działania ołowiu na neuron. Wpływ ołowiu na przekąźniki pierwszego, drugiego i trzeciego rzędu wg. Finkelstein i wsp. [88].

Na⁺, K⁺ odgrywają główną rolę w szybkim przekazywaniu synaptycznym i są kluczowe w procesach związanych z tworzeniem sieci neuronów, plastyczności synaptycznej, a w konsekwencji w procesach uczenia się i pamięci. Do aktywacji receptorów NMDA konieczna jest obecność dwóch koagonistów (kwasu glutaminowego i glicyny) oraz usunięcie blokady Mg²⁺ zachodzące skutkiem depolaryzacji błony komórkowej. Ponieważ kanał receptora jest przepuszczalny dla jonów Ca²⁺, jego otwarcie prowadzi w komórce do aktywacji wielu wapniowozależnych enzymów (kinaz, kalmoduliny, fosfolipaz, kalpainy). W konsekwencji zostają uruchomione procesy biochemiczne prowadzące do zmian czynnościowych synapsy. Nadmierna aktywacja tych receptorów może wywoływać niekontrolowany wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na⁺ i Ca²⁺, mogący prowadzić nawet do śmiertelnego uszkodzenia neuronów (ekscytotoksyczność) [49]. Ostatnie badania wskazują także, że wysoki poziom wewnątrzkomórkowego wapnia nie jest jedyną przyczyną toksyczności, w której pośredniczy receptor glutaminianowy. Podczas gdy długotrwała aktywacja synaptycznych receptorów glutaminianowych rozpoczyna szlak sygnalizacji jądrowej fosforylacji CREB (białko wiążące elementy odpowiedzi na cAMP – cAMP Responsive Element Binding protein) i aktywacji licznych genów, przenoszenie sygnału przez postsynaptyczny receptor glutaminianowy służy do blokowania reakcji umożliwiających przeżycie komórki [53] (Ryc. 1).

Receptory NMDA posiadają dużą liczbę odrębnych miejsc wiążących dla endogennych i egzogennych ligandów, które modyfikują ich funkcje i czynią je celem dla neurotoksycznych ksenobiotyków, takich jak ołów.

Stwierdzono, że kanały receptora są allosterycznie hamowane przez cynk (Zn²⁺) [54]. Proces ten ma przebieg dwufazowy. W niższych stężeniach (<10 μM) Zn²⁺ działa poprzez miejsce wiążące znajdujące się na zewnątrz kanału receptora, niezależnie od potencjału błonowego (interakcja allosteryczna z miejscem GLY_B, która wywołuje zmniejszenie powinowactwa do glicyny). W większych stężeniach Zn²⁺ blokuje kanał receptora bezpośrednio, a efekt ten jest niezależny od potencjału błonowego. Ostatnie badania wskazują, że może on sprawować kontrolę pobudliwości błony, w której pośredniczy glutaminian, zarówno tonicznie jak i fazowo [54].

Zewnątrzkomórkowy magnez (Mg²⁺) ma zdolność blokowania kanału receptora zależnie od potencjału. Usunięcie blokady magnezowej umożliwia dopiero odpowiednio duża depolaryzacja błony komórkowej. Stąd receptor może funkcjonować jako swoisty detektor statusu elektrycznego neuronów.

Wpływ innych metali na kanały jonowe receptora NMDA jest charakteryzowany jako podobny do działania Mg²⁺ (zależny od potencjału) lub Zn²⁺ (niezależny od potencjału). Interakcja dwuwartościowych kationów z receptorami glutaminianowymi wykazuje podobieństwo do innych czynników modulujących, jak poliaminy, fenyloetyloamina i protony, co sugeruje istnienie konwergencji podlegających modulacji miejsc receptorów NMDA [52].

W badaniach na szczurach stwierdzono, że ołów już w stężeniach mikromolarnych blokuje przepływ przez kanały jonowe receptorów NMDA [30,48,52]. Wspomniana wcześniej zdolność ołowiu do naśladowania Zn²⁺ może odgrywać kluczową rolę w tym procesie. Bezpośredni, niezależny od potencjału wpływ Pb²⁺ na receptor NMDA zachodzi prawdopodobnie poprzez miejsca wiążące dla cynku zlokalizowane na końcu aminowym łańcucha białkowego [54]. W przeciwieństwie do cynku, który hamuje kanały receptora NMDA (podjednostkę NR2A) z powinowactwem o kilka rzędów wielkości wyższym niż dla innych typów kanałów glutaminianowych, Pb²⁺ ma zbliżone powinowactwo do podjednostek NR2A i NR2B receptora NMDA. Ostatnie badania [55] pozwoliły na identyfikację miejsca wiążącego dla Zn²⁺ o niższym powinowactwie w części N-końcowej podjednostki NR2B, które wykazuje podobieństwa do miejsca wiążącego o wysokim powinowactwie Zn²⁺ w podjednostce NR2A. Dlatego jest możliwe, że w interakcji z jonami ołowiu biorą udział homologiczne reszty w tych dwóch podjednostkach, co prowadzi do zablokowania niezależnej od potencjału aktywności kanału i stabilizuje konfigurację zamkniętą kanału [56].

Szlaki, na których wszystkie te oddziaływania skutkują zmianami w rozwoju czynności poznawczych są wciąż częściowo nieznane, ale ostatnie doniesienia wskazują, że receptory neurotransmiterów oraz białka zależne od jonów wapniowych stanowią istotny cel działania jonów ołowiu [30,48,52].

WPŁYW NA PROCESY PLASTYCZNOŚCI SYNAPTYCZNEJ

Podstawowe znaczenie w procesach plastyczności mają zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych, mogące poprzez aktywacje odmiennych kaskad biochemicznych wzmacniać lub osłabiać transmisję synaptyczną. Krótkotrwałe, duże stężenie jonów Ca²⁺ w neuronie postsynaptycznym, aktywujące kinazy białkowe, jest warunkiem koniecznym do indukcji LTP (ang. *long-term potentiation* – długotrwałego wzmocnienia synaptycznego). Umiarkowany, lecz dłużej trwający wzrost stężenia jonów Ca²⁺ pobudza preferencyjnie reakcje defosforylacji (poprzez aktywację fosfataz) i prowadzi do osłabienia transmisji synaptycznej LTD (ang. *long-term depression* – długotrwałego osłabienia synaptycznego). LTP jest jednym z podstawowych zjawisk neuronalnych, leżących u podstawy przynajmniej niektórych form uczenia się i pamięci i jest stosowane jako ich model [57].

Wpływ, jaki wywiera ołów na mózg powodując zaburzenia poznawcze jest związany z upośledzeniem LTP i to zarówno w warunkach ostrego zatrucia *in vitro*, jak i *ex vivo*, z użyciem tkanek chronicznie ekspozowanych zwierząt [58,59]. W modelach *ex vivo* hipokampa szczurów ołów wywoływał spadek amplitudy i podniesienie progu LTP [59]. Mechanizm blokady LTP nie był jasny we wcześniejszych badaniach, ponieważ stężenie ołowiu, które całkowicie blokowało LTP nie miało wpływu na prąd NMDA [60]. Jednakże, nowsze badania wykazały znacząco niższą wartość IC₅₀, przy której ołów blokuje przepływ kanału związanego z receptorem NMDA [60]. W dodatku istnieją dowody na to,

że zależne od NMDA formy plastyczności synaptycznej są bardziej podatne na chroniczne narażenie na ołów, niż procesy niezależne od NMDA [61]. Oprócz tego mechanizmy związane z deficytem LTP u zwierząt narażonych na ołów wydają się zlokalizowane postsynaptycznie i pociągają za sobą hamowanie prądu NMDA.

Przewlekłe narażenie szczurów na niskie dawki ołowiu zmienia również LTD – zależny od aktywności spadek skuteczności synaptycznej (ang. *synaptic efficacy*), który zachodzi w neuronach CA1 hipokampa, jak również w innych częściach mózgu. Zjawisko to zostało zbadane *in vitro* w płatach hipokampa szczurów *ex vivo* eksponowanych na ołów [62,63]. Dwa komponenty LTD, to jest NMDA zależny i VDCC zależny, mogą być zmienione przez uprzednie narażenie na ołów zarówno w obszarze CA1 jak i zakrętu zębatego (ang. *dentate gyrus*), co jest zgodne ze specyficznym działaniem ołowiu wywieranym na kanały receptorów NMDA i VDCC [63].

WPŁYW NA UWALNIANIE NEUROTRANSMITERÓW

Ołów hamuje związane z Ca^{2+} uwalnianie neurotransmiterów: acetylocholiny, dopaminy, glutaminianu, GABA [64], ale również zwiększa podstawowe ich uwalnianie [27]. Pomimo, że mechanizm tego działania ołowiu nie jest znany, to wiadomo, że wpływa on na kanały presynaptyczne zaangażowane w uwalnianie neurotransmiterów [65]. Poprzez aktywację kinazy białkowej C (PKC) ołów może powodować wzrost puli uwalnianych pęcherzyków synaptycznych w komórkach chromafinowych [66], jednak synaptosomy wyizolowane z mózgow szczurów eksponowanych przez 3 miesiące na ołów miały mniejszą liczbę pęcherzyków synaptycznych i uszkodzone mitochondria [67]. Stwierdzono także wzrost aktywności Na^+/K^+ ATPazy oraz hamowanie Ca^{2+} ATPazy w synaptosomach [68].

W badaniach patch clamp neuronów hipokampa szczurów stwierdzono, że ołów wywierał podwójny wpływ na uwalnianie neurotransmiterów: zwiększał ich podstawowe uwalnianie (ang. *TTX-insensitive*) i upośledzał stymulowane uwalnianie neurotransmiterów (ang. *TTX-sensitive*) [69]. Jednocześnie stwierdzono, że jony ołowiu w stężeniu nawet tak niskim, jak 100 nM ułatwiają zależne od potencjału uwalnianie GABA i glutaminianu. Stosunkowo długi okres latencji i niezależność od jonów Ca^{2+} sugeruje, że mechanizm odpowiedzialny za ten proces jest uruchamiany przez interakcje ołowiu z wewnątrzkomórkowymi strukturami umiejscowionymi presynaptycznie [52]. Wykazano także wysoką zdolność ołowiu do zastępowania Ca^{2+} w uruchamianiu uwalniania katecholamin w pęcherzykach synaptycznych komórek chromafinowych [70]. Potencjalnym celem ołowiu w tej fazie zatrucia jest przypuszczalnie kilka białek synaptycznych, które biorą udział w regulacji uwalniania neurotransmiterów. Mechanizm hamowania stymulowanego uwalniania neurotransmiterów ma krótki okres latencji, co wskazuje na zewnątrzkomórkowe miejsce wiązania ołowiu i zależy od zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} [69]. Mechanizm ten jest odwracalny poprzez zastosowanie zewnętrznych chelatorów wapnia i posiada IC50 między 50 a 100 nM [71]. Wszystkie te fakty, w tym zakres stężenia, doprowadziły do wysunięcia hipotezy, że hamowanie stymulowanego

uwalniania może zachodzić dzięki zdolności ołowiu do blokowania kanałów VDCC [71]. Hamowanie kanałów VDCC wyjaśniałoby również spadek stymulowanego uwalniania neurotransmiterów u chronicznie narażonych zwierząt, mimo braku bezpośrednich dowodów [72].

Zdolność ołowiu do blokowania kanałów VDCC wykazano w hodowlach szczurzych neuronów pochodzących z korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (ang. *dorsal root ganglion cells*). W badaniach path clamp stwierdzono, że IC50 dla Pb^{2+} blokujące prąd wapniowy kanałów typu N i L wynosiło 0,64 μ M. Kanały typu T były nieco mniej wrażliwe na ołów (IC50 6 μ M). Stężenie ołowiu, które całkowicie blokowało kanał VDCC nie miało wpływu na kanały sodowy i potasowy, było natomiast wysoce zależne od napięcia i odwracalne. Stąd proponowany przez autorów mechanizm blokady kanału VDCC wydaje się polegać na wiązaniu się Pb^{2+} z miejscami wiążącymi dla wapnia wewnątrz kanału z większą siłą niż wapń, co uniemożliwia wnikanie Ca^{2+} [71].

WPŁYW NA BIAŁKA SYNAPTYCZNE

Neurotoksyczny wpływ Pb^{2+} nie ogranicza się tylko do specyficznych, pojedynczych białek, ale angażuje wiele białek i białkowych kompleksów. W synapsach glutaminergicznych zidentyfikowano struktury białkowe, które nazwano od ich obrazu w mikroskopie elektronowym: gęstości postsynaptyczne (ang. *postsynaptic densities*). Struktury te zawierają postsynaptyczne receptory i współdziałające z nimi cytoplazmatyczne białka, takie jak kinazy białkowe, które regulują funkcje receptora. Współdziałanie tych białek zostało scharakteryzowane w mózgu szczurów [73]. W ostatnich pracach receptory NMDA uważa się za część wielobiałkowych kompleksów sygnalizacyjnych [74], których rola w procesach przechowywania informacji, uczenia się i pamięci jest przedmiotem intensywnych badań. Ten olbrzymi kompleks sygnalizacyjny obejmuje różne typy białek, włączając receptory neurotransmiterów, enzymy, białka cytoszkieletu i inne [56]. Dlatego też wpływ Pb^{2+} na receptory NMDA, izoformy PKC, czy też inne białka synaptyczne nie może być rozpatrywany jako osobne zjawiska, ale jako część kompleksowego ataku na mechanizmy plastyczności synaptycznej. Może to skutkować długotrwałym uszkodzeniem, nawet w warunkach i na poziomie ekspozycji, przy której nie zachodzi bezpośredni efekt toksyczny [52].

Ołów i wapń współzawodniczą o miejsca wiążące w białkach posiadających dwa podobne miejsca wiążące Ca^{2+} , utworzone przez dwie helisy i łączącą je pętlę, znane jako motyw dłoni EF. Białka te stanowią olbrzymią rodzinę białek cytoplazmatycznych wiążących jony. Stwierdzono, że ołów w stężeniach nanomolarnych zastępuje wapń w aktywacji kalmoduliny, w wyższych stężeniach wydaje się hamować aktywność tego enzymu [32]. Dowiedziono także, że ołów w nanomolarnych stężeniach stymuluje uruchamianą przez kalmodulinę fosforylację i zależną od kalmoduliny aktywację fosfodiesterazy [32]. Ta interakcja mogłaby wystarczyć do zwiększenia gotowości pęcherzyków synaptycznych do uwalniania neurotransmiterów, w ten sposób zwiększając amplitudę spontanicznych prądów synaptycznych.

Jony ołowiu w stężeniu nanomolarnym mogą również zmieniać zdolność wiązania wapnia przez synaptogaminę [74,75]. W miejscu presynaptycznym, zależna od wapnia interakcja między synaptogaminą i fosfolipidami prowadzi do fuzji pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową. Nanomolarne stężenia ołowiu wywołują interakcję synaptogaminy z fosfolipidami liposomów [76], co sugeruje, że ołów może ingerować w mechanizm synaptyczny poprzez to białko.

WPLYW NA AKTYWNOŚĆ KINAZY BIAŁKOWEJ C

Ołów oddziałuje na izoenzymy kinazy białkowej C (PKC), prawdopodobnie przez różne miejsca wiążące. W stężeniach pikomolarnych jest on skutecznym aktywatorem kinazy białkowej C, ale hamuje ten enzym przy stężeniach mikromolarnych, prawdopodobnie poprzez inny mechanizm niż współzawodniczenie z Ca^{2+} [77,78]. Te wyraźnie pozostające w sprzeczności obserwacje doprowadziły do zaproponowania modelu, w którym ołów jest częściowym agonistą PKC, zdolnym zarówno do aktywacji, jak i hamowania tego enzymu [79].

Jak dotąd zostało opisanych więcej niż 10 form PKC [80]. Wśród nich formy 'konwencjonalne' (α , β , γ) są normalnie aktywowane przez modulatory zewnątrzkomórkowe (hormony, neurotransmitery, etc.) przez kaskadę reakcji zależnych od wapnia. Bezpośrednim aktywatorem wewnątrzkomórkowym jest diacyloglicerol, którego wpływ może być naśladowany np. przez estry forbolowe. Niedawno odkryte izoformy PKC (δ , θ , η , ϵ) są wrażliwe na diacyloglicerol, ale są niewrażliwe na wapń, podczas gdy atypowe formy ζ , μ są niezależnie zarówno od wapnia jak i diacyloglicerolu. Ołów działa prawdopodobnie poprzez współdziałanie z dwoma koordynującymi miejscami $Ca1$ i $Ca2$ wewnątrz domeny C2 PKC. Ołów częściowo aktywuje ten enzym, wykazując wysokie powinowactwo do miejsca $Ca2$ i inhibuje aktywność zależną od dwuwartościowych kationów poprzez interakcję (przy stężeniach nanomolarnych) z miejscem $Ca2$ w domenie C2. Dodatkowo, hamuje on podstawową aktywność kinazy poprzez interakcję z domeną katalityczną (w stężeniu mikromolarnym). W wyniku tego, ołów ma zdolność do zarówno aktywacji, jak i hamowania konwencjonalnych kinaz C; w przypadku niekonwencjonalnych i nietypowych podtypów PKC ma on tylko zdolność hamującą [80].

Aktywacja PKC ułatwia spontaniczne uwalnianie transmitterów w kilku obszarach mózgu. Zaobserwowano także, że ołów wywołuje sekrecję adrenaliny w komórkach chromafinowych, prawdopodobnie poprzez mechanizm uruchamiany przez PKC [79]. Ostatnie badania sugerują, że wywołane przez ołów zmiany w ekspresji genu i białka PKC γ są skorelowane z wywołanym przez ołów upośledzeniem w podtrzymywaniu (ale nie w indukcji) LTP i zmianami w uczeniu przestrzennym (ang. *spatial learning*) [81]. Zmiany w aktywności PKC mogą być skorelowane z modyfikacją ekspresji genów wczesnej odpowiedzi (ang. *Immediate Early Response Genes* – IERG) oraz zmianami ekspresji innych genów [75]. W komórkach PC12 i astrocytach człowieka ekspresja IERG była indukowana

przez ołów poprzez aktywację PKC δ i ϵ , ale nie poprzez α i β [82]. Stwierdzono również, że ołów podnosi poziom mRNA genów wczesnej odpowiedzi *fos* i *jun*, może także hamować naprawę DNA i wywierać pośredni genotoksyczny wpływ, działając jako komutagen wraz z promieniowaniem ultrafioletowym, czy też czynnikami alkilującymi [83]. Hamowanie naprawy DNA przez ołów jest związane z zaburzeniem etapów polimeryzacji i ligacji w procesie wycinania zasad [84] (Ryc. 1).

CZY ISTNIEJE BEZPIECZNY PRÓG STĘŻENIA OŁOWIU WE KRWI?

Według raportu CDC [5], za obecnie obowiązujący, dopuszczalny poziom ołowiu we krwi uważa się 9,94 $\mu\text{g}/\text{dL}$. Jednakże wyniki dotychczasowych badań sugerują, że nie można wskazać aktualnie bezpiecznego progu ołowiu we krwi, ponieważ istnieją poważne dowody toksycznego działania ołowiu w układzie nerwowym w stężeniach niższych niż 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [9,85].

Jak wspomniano już wcześniej, stosunkowo krótki okres półtrwania ołowiu we krwi (kilka tygodni) i czas, w którym można określić jego stężenie we krwi, może być znacznie krótszy niż jego toksyczne działanie w mózgu. Raz zdeponowany w tkance nerwowej jest eliminowany bardzo powoli, z powodu dwuletniego okresu półtrwania i dodatkowo nie może być również usunięty z mózgu przez czynniki chelatujące. Dlatego też, nawet jeśli stężenie ołowiu we krwi spada do zdawało by się nieznaczących poziomów, to ołów zdeponowany w mózgu wciąż wywiera swój neurotoksyczny wpływ. Co za tym idzie, gdy obserwujemy podwyższony poziom ołowiu we krwi, jest już zbyt późno by zapobiec jego szkodliwemu działaniu, przede wszystkim w rozwijającym się mózgu dziecka. W świetle przedstawionych wyników badań nie jest zaskakującym fakt, iż nie można określić progu bezpieczeństwa i jakiegokolwiek narażenia na ołów, szczególnie u dzieci, musi być uważane za potencjalnie szkodliwe dla rozwijającego się centralnego układu nerwowego [9].

Ramka 1. Szczególna wrażliwość rozwijającego się mózgu na ołów wynika z: 1. Wyższej absorpcji ołowiu drogą pokarmową (dorośli 10%, dzieci do 50%) i większej przenikalności bariery krew-mózg dla Pb^{2+} ; 2. Mniejszej depozycji ołowiu w kościach i zębach (dorośli ok. 90%, dzieci ok. 70%) i ciągłej „endogennej kontaminacji” skutkiem uwalniania ołowiu w czasie wzrostu i rozwoju szkieletu; 3. Większej wrażliwości na zaburzenia synaptyczne w kluczowym okresie tworzenia połączeń synaptycznych.

Ramka 2. Mechanizmy i skutki neurotoksycznego działania ołowiu: 1. współzawodniczenie o miejsca wiążące Ca^{+2} w białkach zależnych od wapnia; 2. kompetycyjne wiązanie Pb^{+2} w miejsce Zn^{+2} i Mg^{+2} ; 3. tworzenie kompleksów z grupami $-SH$, $-COOH$ białek; 4. zaburzenie regulacji transkrypcji; 5. stymulacja uwalniania Ca^{+2} z mitochondriów i zaburzenia homeostazy wapniowej; 6. bezpośrednie uszkodzenie mitochondriów i błony mitochondrialnej; 7. upośledzenie metabolizmu energetycznego komórek; 8. hamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych; 9. ułatwianie szerzenia się reakcji

wolnorodnikowych; 10. zaburzenie syntezy wtórnych przekazywaczy; 11. zaburzenia metabolizmu lipidów; 12. apoptoza; 13. ekscytotoksyczność; 14. upośledzenie procesów przechowywania i uwalniania neurotransmiterów; 15. zaburzenie gęstości receptorów neurotransmiterów; 16. upośledzenie rozwoju i metabolizmu oligodendrocytów; 17. upośledzenie procesów mielinizacji; 18. zaburzenie struktury i upośledzenie funkcji bariery krew-mózg; 19. obniżenie IQ; 20. upośledzenie zdolności uczenia się; 21. zaburzenia behawioralne.

PODSUMOWANIE

W wydanym w 1991 raporcie CDC zaproponowano system diagnozowania i leczenia zatruc ołowiem, powyżej stężenia ołowiu we krwi wynoszącego 9.94 µg/dL. Ostatnio zaproponowane poprawki sugerują rozpoczęcie działań prewencyjnych już przy stężeniu ołowiu we krwi 5 µg/dL [86]. W Stanach Zjednoczonych przyjęto wspomniany wcześniej program, który ma na celu całkowite wyeliminowanie zatruc ołowiem u dzieci do roku 2010 [11]. Niestety w Polsce dotychczas nie prowadzi się żadnych działań, które zmierzałyby do obniżenia, czy wyeliminowania zatruc ołowiem u dzieci. Jednocześnie zatrucia ołowiem mogą stanowić w Polsce istotny problem, ponieważ dane z 1996 wskazują, że średnie stężenie ołowiu we krwi dzieci na terenach uważanych za nieskażone wynosi ok. 15 µg/dL, a w badaniach nad stopniem ekspozycji noworodków na meta-le ciężkie stwierdzono wysoką zawartość ołowiu w mleku matek (5–20 µg/dL) [25,87]. Jednocześnie wzrasta też liczba dzieci, które mają trudności z koncentracją, uczeniem się, nadpobudliwością ruchową czy agresją. Dlatego wydaje się celowym postulowanie o uruchomienie w Polsce szeroko zakrojonego programu zmierzającego w pierwszej kolejności do zdiagnozowania aktualnego stężenia ołowiu we krwi dzieci w wieku szkolnym i młodszych, a następnie podjęcie działań zmierzających do obniżenia poziomu ołowiu we krwi poniżej 5 µg/dL, czy też całkowitego wyeliminowania zatruc ołowiem u dzieci.

PIŚMIENNICTWO

1. Tong S, von Schirmding YE, Prapamontol T (2000) Environmental lead exposure: a public health problem with global dimensions. *Bull World Health Organ* 78: 1068-1077
2. Markowitz M (2000) Lead poisoning: a disease for the next millennium. *Curr Probl Pediatr* 30: 62-70
3. IEP, Institute of Environmental Protection (2003) V International Scientific - Technical Conference, Warszawa
4. WHO (1995) Environmental Health Criteria 165, Inorganic lead, Genewa
5. CDC (1991) Centres for Disease Control, United States Department of Health and Human Services, Atlanta
6. Antonio MT, Leret LM (2000) Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. *Life Sci* 67: 635-642
7. Goyer RA (1993) Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect* 100: 177-187
8. Sharifi AM, Baniyasi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhshayesh M (2002) Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett* 329: 45-48
9. CDC (2004) Centres for Disease Control, United States Department of Health and Human Services, Atlanta <http://www.cdc.gov/nceh/lead/ACCLPP/meetingMinutes/lessThan10MtgMAR04.pdf>
10. CDC (2003) Centres for Disease Control, NCEH Publ 02-0716, Atlanta
11. Lidsky TI, Schneider JS (2003) Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain* 126: 5-19
12. Leggett RW (1993) An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect* 101: 598-616
13. Nilsson U, Attewell R, Chridtoffersson JO, Schutz A, Ahlgren L, Skerfving S, Mattsson S (1991) Kinetics of lead in bone and blood after end of occupational exposure. *Pharmac Toxicol* 69: 477-484
14. Roberts JR, Reigart JR, Ebeling M, Hulsey TC (2001) Time required for blood lead levels to decline in nonchelated children. *J Toxicol Clin Toxicol* 39: 153-160
15. Zhang XY, Liu AP, Ruan DY, Liu J (2002) Effect of developmental lead exposure on the expression of specific NMDA receptor subunit mRNAs in the hippocampus of neonatal rats by digoxigenin-labeled in situ hybridization histochemistry. *Neurotoxicol Teratol* 24: 149-160
16. Widzowski DV, Cory-Slechta DA (1994) Homogeneity of regional brain lead concentrations. *Neurotoxicology* 15: 295-307
17. Cory-Slechta DA, Virgolini MB, Thiruchelvam M, Weston DD, Bauter MR (2004) Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ Health Perspect* 112: 717-730
18. Canfield RL, Gendle MH, Cory-Slechta DA (2004) Impaired neuropsychological functioning in lead-exposed children. *Dev Neuropsychol* 26: 513-540
19. Needleman HL (1993) The current status of childhood low-level lead toxicity. *Neurotoxicology* 14: 161-166
20. Banks EC, Ferretti LE, Shucard DW (1997) Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioral, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicology* 18: 237-281
21. Dietrich KN, Ware JH, Salganik M, Radcliffe J, Rogan WJ, Rhoads GG, Fay ME, Davoli CT, Denckla MB, Bornschein RL, Schwarz D, Dockery DW, Adubato S, Jones RL (2004) Effect of chelation therapy on the neuropsychological and behavioral development of lead-exposed children after school entry. *Pediatrics* 114: 19-26
22. Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, Bornschein RL (2001) Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol* 23: 511-551
23. White RF, Diamond R, Proctor C, Morey C, Hu H (1993) Residual cognitive deficits 50 years after lead poisoning during childhood. *Br J Ind Med* 50: 613-622
24. Dutkiewicz T, Świądczak J (1993) Lead in the environment of Poland. *Med Pracy* 44: 53-75
25. Dutkiewicz T (1998) Raport Komisji Toksykologii Środowiskowej Komitetu Ekologii Człowieka PAN. *Brom Chem Toksyk* 21: 4-20
26. Bradbury MW, Deane R (1993) Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology* 14: 131-136
27. Bressler JP, Goldstein GW (1991) Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol* 41: 479-484
28. Kerper LE, Hinkle PM (1997) Lead uptake in brain capillary endothelial cells: activation by calcium store depletion. *Toxicol Appl Pharmacol* 146: 127-133
29. Clarkson T (1993) Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 545-571
30. Atchison WD (2003) Effects of toxic environmental contaminants on voltage-gated calcium channel function: from past to present. *J Bioenerg Biomembr* 35: 507-532
31. Mazzolini M, Traverso S, Marchetti C (2001) Multiple pathways of Pb(2+) permeation in rat cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 79: 407-416.
32. Kern M, Wisniewski M, Cabell L, Audesirk G (2000) Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. *Neurotoxicology* 21: 353-363
33. Dean R, Bradbury MW (1990) Transport of lead-203 at the blood-brain barrier during short cerebrovascular perfusion with saline in the rat. *J Neurochem* 54: 905-914

34. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488
35. Ke Y, Chang YZ, Duan XL, Du JR, Zhu L, Wang K, Yang XD, Ho KP, Qian ZM (2005) Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol Aging* 26: 739-748
36. Bannon D, Portnoy ME, Olivi L, Lees PS (2002) Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 978-984
37. Tang HW, Yan HL, Hu XH, Liang YX, Shen XY (1996) Lead cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells. *J Appl Toxicol* 16: 187-196
38. Deng W, Mc Kinnon RD, Poretz RD (2001) Lead exposure delays the differentiation of oligodendroglial progenitors *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 174: 235-244
39. Tiffany-Castiglioni E, Sierra EM, Wu JN, Rowles TK (1989) Lead toxicity in neuroglia. *Neurotoxicology* 10: 417-443
40. Legare ME, Barhouni R, Hebert E, Bratton G, Borghardt RC, Tiffany-Castiglioni E (1998) Analysis of Pb²⁺ entry into cultured astroglia. *Toxicol Sci* 46: 90-100
41. Lindahl LS, Bird L, Legare ME, Mikeska G, Bratton GR, Tiffany-Castiglioni E (1999) Differential ability of astroglia and neuronal cells to accumulate lead: dependence on cell type and on degree of differentiation. *Toxicol Sci* 50: 236-243
42. Struzyńska L (2000) The protective role of astroglia in the early period of experimental lead toxicity in the rat. *Acta Neurobiol Exp* 60: 167-173
43. Schousboe A (2003) Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res* 28: 347-352
44. Sierra EM, Tiffany-Castiglioni E (1991) Reduction of glutamine synthetase activity in astroglia exposed in culture to low levels of inorganic lead. *Toxicology* 65: 295-304
45. Dąbrowska-Bouta B, Sulkowski G, Bartosz G, Walski M, Rafałowska U (1999) Chronic lead intoxication affects the myelin membrane status in the central nervous system of adult rats. *J Mol Neurosci* 13: 127-139
46. Dąbrowska-Bouta B, Sulkowski G, Walski M, Struzyńska L, Lenkiewicz A, Rafałowska U (2000) Acute lead intoxication *in vivo* affects myelin membrane morphology and CNPase activity. *Exp Toxicol Pathol* 52: 257-263
47. Esposito A, Robello M, Pellistri F, Marchetti C. (2005) Two-photon analysis of lead accumulation in rat cerebellar granule neurons. *Neurochem Res* 8: 949-954
48. Nehru B, Sidhu P (2001) Behavior and neurotoxic consequences of lead on rat brain followed by recovery. *Biol Trace Elem Res* 84: 113-121
49. Lasley SM, Green MC, Gilbert ME (2001) Rat hippocampal NMDA receptor binding as a function of chronic lead exposure level. *Neurotoxicol Teratol* 23: 185-189
50. McCoy L, Richfield EK, Cory-Slechta DA (1997) Regional decreases in alpha-[3H]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid ([3H]AMPA) and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione ([3H]CNQX) binding in response to chronic low-level lead exposure: reversal versus potentiation by chronic dopamine agonist treatment. *J Neurochem* 69: 2466-2476
51. Scortegagna M, Hanbauer I (1997) The effect of lead exposure and serum deprivation on mesencephalic primary cultures. *Neurotoxicology* 18: 331-339
52. Marchetti C (2003) Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotoxicity Res* 5: 221-236
53. Hardingham GE, Bading H (2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 1600: 148-153
54. Guilarte TR, Miceli RC, Jett DA (1995) Biochemical evidence of an interaction of lead at the zinc allosteric sites of the NMDA receptor complex: effects of neuronal development. *Neurotoxicology* 16: 63-71
55. Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *Neurosci* 25: 308-17
56. Huggins DJ, Grant GH (2005) The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model* 23: 381-388
57. Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402: 421-425
58. Zhu ZW, Yang RL, Dong GJ, Zhao ZY (2005) Study on the neurotoxic effects of low-level lead exposure in rats. *J Zhejiang Univ Sci* 6B: 686-692
59. Ruan DY, Yan KF, Ge SY, Xu YZ, Chen JT, Wang M (2000) Effects of chronic lead exposure on short-term and long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus *in vivo*. *Chemosphere* 41: 165-171
60. Gavazzo P, Gazzoli A, Mazzolini M, Marchetti C (2001) Lead inhibition of NMDA channels in native and recombinant receptors. *Neuroreport* 12: 3121-3125
61. Gutowski M, Altmann L, Sveinsson K, Wiegand H (1998) Synaptic plasticity in the CA1 and CA3 hippocampal region of pre- and postnatally lead-exposed rats. *Toxicol Lett* 95: 195-203
62. Zhao WF, Ruan DY, Xu YZ, Chen JT, Wang M, Ge SY (1999) The effects of chronic lead exposure on long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus *in vitro*. *Brain Res* 818: 153-159
63. Sui L, Ruan DY, Ge S Y, Meng X M (2000) Age-related impairment of long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus following developmental lead exposure *in vitro*. *Neurotoxicol Teratol* 22: 741-749
64. Audesirk G (1993) Electrophysiology of lead intoxication: effects on voltage-sensitive ion channels. *Neurotoxicology* 14: 137-147
65. Lasley SM, Green MC, Gilbert ME (1999) Influence of exposure period on *in vivo* hippocampal glutamate and GABA release in rats chronically exposed to lead. *Neurotoxicology* 20: 619-629
66. Gillis KD, Mossner R, Neher E (1996) Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* 16: 1209-1220
67. Jabłońska L, Walski M, Rafałowska U (1994) Lead as an inductor of some morphological and functional changes in synaptosomes from rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 14: 701-709
68. Bettaiya R, Yallapragada PR, Hall E, Rajanna S (1996) *In vitro* effect of lead on Ca²⁺-ATPase in synaptic plasma membranes and microsomes of rat cerebral cortex and cerebellum. *Ecotoxicol Environ Saf* 33: 157-1562
69. Braga MF, Pereira EF, Marchioro M, Albuquerque EX (1999) Lead increases tetrodotoxin-insensitive spontaneous release of glutamate and GABA from hippocampal neurons. *Brain Res* 826: 10-21
70. Tomsig JL, Suszkiw JB (1993) Intracellular mechanism of Pb²⁺-induced norepinephrine release from bovine chromaffin cells. *Am J Physiol* 265: 1630-1636
71. Busselberg D, Evans ML, Haas HL, Carpenter DO (1993) Blockade of mammalian and invertebrate calcium channels by lead. *Neurotoxicology* 14: 249-258
72. Lasley SM, Gilbert ME (2002) Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol Sci* 66: 139-147
73. Linden AM, Vasanan J, Storvik M, Lakso M, Korpi ER, Wong G, Castren E (2001) Uncompetitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors alter the mRNA expression of proteins associated with the NMDA receptor complex. *Pharmacol Toxicol* 88: 98-105
74. Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature Neurosci* 3: 661-669
75. Bouton CM, Frelin LP, Forde CE, Godwin AH, Pevsner J (2001) Synaptotagmin I is a molecular target for lead. *J Neurochem* 76: 1724-1735

76. Bouton CM, Pevsner J (2000) Effects of lead on gene expression. *Neurotoxicology* 21: 1045-1055
77. Braga MF, Pereira EF, Mike A, Albuquerque EX (2004) Pb²⁺ *via* protein kinase C inhibits nicotinic cholinergic modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 700-710
78. Murakami K, Feng G, Chen SG (1993) Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 757-761
79. Tomsig JL, Suszkiw JB (1995) Multisite interactions between Pb²⁺ and protein kinase C and its role in norepinephrine release from bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 64: 2667-2673
80. Sun X, Tian X, Tomsig JL, Suszkiw JB (1999) Analysis of differential effects of Pb²⁺ on protein kinase C isozymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 40-45
81. Nihei MK, Mc Glothan JL, Toscano CD, Guilarte TR (2001) Low level Pb²⁺ exposure affects hippocampal protein kinase C gamma gene and protein expression in rats. *Neurosci Lett* 298: 212-216
82. Kim KA, Chakraborti T, Goldstein G, Johnston M, Bressler J (2002) Exposure to lead elevates induction of zif268 and Arc mRNA in rats after electroconvulsive shock: the involvement of protein kinase C. *Neurosci Res* 69: 268-277
83. Beyersman D (1994) Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol Lett* 72: 333-338
84. Asmuss M, Mullenders LH, Hartwig A (2000) Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicol Lett* 112-113: 227-231
85. Canfield RL, Henderson CR, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP (2003) Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med* 348: 1517-1526
86. Bellinger DC (2000) Effect modification in epidemiologic studies of low-level neurotoxicant exposures and health outcomes. *Neurotoxicol Teratol* 22: 133-140
87. Bellinger D (1996) Neurotoksyczność ołowiu u dzieci - problemy przyszłych badań naukowych. W: *Pediatrica Polska. Supl.* 4: 41-46
88. Finkelstein Y, Markowitz ME, Rosen JF (1998) Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res Rev* 27: 168-176

Biochemical mechanisms of neurotoxic lead activity

Irena Baranowska-Bosiacka[✉], Dariusz Chlubek

Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Pomeranian Medical University, 72 Powst. Wielkopolskich av., 70-111 Szczecin, Poland
[✉]e-mail: ika@univ.szczecin.pl

Key words: lead (Pb²⁺), lead neurotoxicity, glutamate receptor, safety threshold

ABSTRACT

This article presents the latest study results on lead (Pb²⁺) neurotoxicity, in order to draw attention of the Polish public to the issue and initiate a nation-wide programme eliminating lead contamination effects, especially in children. We discuss the after-effect of exposure to lead in concentrations lower than presently accepted as 'safe'. The pathway of lead transport to the brain, and the effects of lead accumulation in neurons, oligodendroglia and astroglia, are examined. We also present the impairing influence of lead on the cognitive brain functions and learning abilities as a result of affecting three main neurotransmission systems: dopaminergic, cholinergic and glutaminergic. The present knowledge on the influence of lead on receptors, neurotransmitter release and synaptic proteins.

Sabina Kędzierska 

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Katedra Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: kedzie@biotech.univ.gda.pl tel. (058) 301 57 41

Artykuł otrzymano 8 marca 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 6 maja 2006 r.

Słowa kluczowe: ATPazy AAA, białka adaptorowe, białka opiekuńcze, dezagregacja, proteoliza, proteazy

Wykaz skrótów: AAA (ang. *ATPases associated with various activities*) – ATPazy związane z różnymi procesami komórkowymi; *B. subtilis* – *Bacillus subtilis*; *E. coli* – *Escherichia coli*; ER – siateczka śródplazmatyczna; Hsps – białka szoku cieplnego; i-AAA, m-AAA – mitochondrialne proteazy AAA czyli proteazy typu FtsH; moduł AAA – domena wiążąca ATP; MD – środkowa domena ClpB; STC (ang. *strand transfer complex*) – kompleks transferowy powstający podczas replikacji genomu bakteriofaga Mu

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji grantu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji 2 P04A 054 30. Autorka pragnie podziękować Pani prof. dr hab. Barbarze Lipińskiej za cenne uwagi w trakcie pisania niniejszego artykułu

STRESZCZENIE

ATPazy AAA występują w komórkach wszystkich organizmów. Ich charakterystyczną cechą jest obecność zachowanej w ewolucji domeny AAA zwanej także modulem AAA, która jest odpowiedzialna za wiązanie i hydrolizę ATP. Domena AAA jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania ATPaz AAA. Składa się ona z 200–250 reszt aminokwasowych. Wśród tych reszt wyróżnić można dwa klasyczne motywy Walkera A (GX₃GKT) i B (hyd₄E). ATPazy AAA pełnią w komórkach różnorodne funkcje, m.in. biorą udział w regulacji cyklu komórkowego, degradacji i dezagregacji białek, biogenezie organelli oraz w transporcie wewnątrzkomórkowym. Niektóre z nich funkcjonują w komórkach jako białka opiekuńcze, podjednostki kompleksów proteolitycznych lub samodzielne proteazy (FtsH, Lon) oraz jako helikazy DNA i czynniki transkrypcyjne. W artykule jest opisana struktura, funkcja oraz mechanizmy działania najbardziej znanych ATPaz AAA.

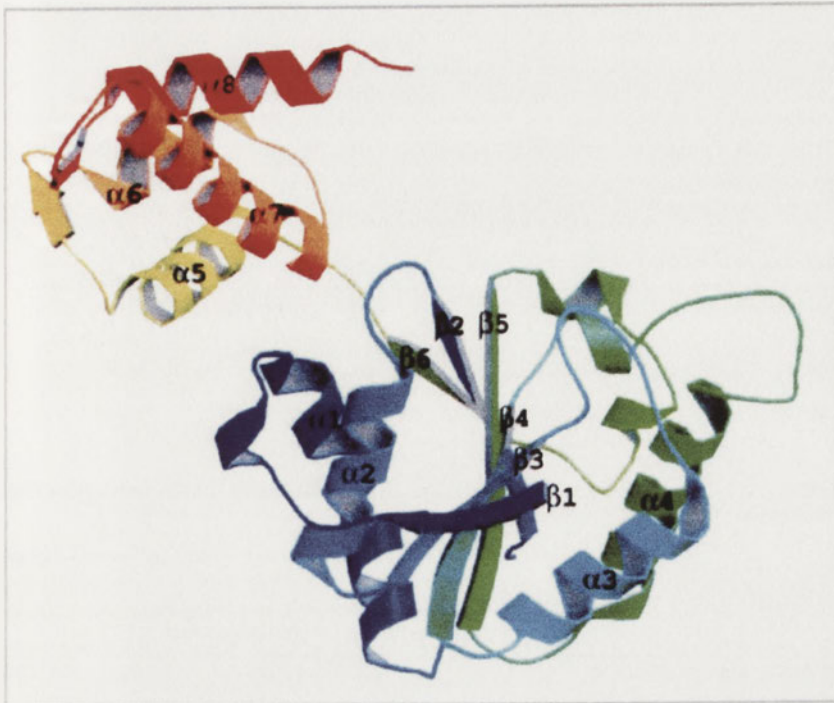
WPROWADZENIE

Białka AAA występują w komórkach wszystkich organizmów, i jak sugeruje ich angielska nazwa *ATPases associated with various activities* są one ATPazami, biorącymi udział w różnych procesach komórkowych takich jak: replikacja, naprawa i rekombinacja DNA, regulacja ekspresji genów, fuzje błonowe, czy termotolerancja u bakterii, grzybów i roślin. Wiele ATPaz AAA wchodzi także w skład potranslacyjnego systemu kontroli jakości białek, który reguluje stan fałdowania białek i zapewnia ich prawidłowe funkcjonowanie w komórkach. W związku z tym białka AAA są zaangażowane również w procesy proteolizy oraz dezagregacji i reaktywacji białek. Zainteresowanie białkami AAA ciągle rośnie. Szczególne zainteresowanie budzi ich skomplikowany mechanizm działania oraz współpraca z tzw. białkami adaptorowymi, które modulują i regulują ich aktywność.

ORGANIZACJA STRUKTURALNA ATPaz AAA

Białka AAA mogą posiadać jeden (AAA-1) lub dwa nieidentyczne moduły AAA (AAA-1, AAA-2). Każdy z nich zbudowany jest z dwóch subdomen: N-terminalnej, która stanowi rdzeń modułu i C-terminalnej. Rdzeń jest odpowiedzialny za wiązanie i hydrolizę nukleotydu. Składa się on z 200–250 aminokwasów, które tworzą charakterystyczną, zachowaną w ewolucji strukturę drugorzędową typu α - β - α (Ryc. 1) [1,2]. W obrębie rdzenia można wyróżnić dwa klasyczne motywy odpowiedzialne za wiązanie i hydrolizę nukleotydu, Walker A (GX₃GKT) i Walker B (hyd₄E). Wewnątrz modułu AAA można wyróżnić jeszcze dwa inne ważne motywy zwane sensorem 1 i sensorem 2. Motywy te związane są z ruchem domen, łączą one bowiem hydrolizę ATP ze zmianami konformacyjnymi w domenach wiążących substrat. Mutacje w obrębie sekwencji tych motywów potwierdzają ich udział zarówno w hydrolizie ATP, jak i w rozwijaniu substratu białkowego [3]. Z kolei domena C-terminalna, znajdująca się za rdzeniem modułu AAA, składa się przynajmniej z trzech helis α (stąd jej nazwa domena α -helikalna).

W zależności od liczby modułów AAA ATPazy AAA można podzielić na dwie klasy. Do klasy I należą te białka (np.: ClpA, ClpB/Hsp104, ClpC), które zawierają zarówno AAA-1, jak i AAA-2. ATPazy AAA tworzące klasę II (m.in. ClpX i ClpY) zawierają tylko jeden moduł AAA, który odpowiada AAA-2 [4]. Moduły AAA mają tendencję do oligomeryzacji, tworząc głównie struktury przypominające heksameryczne pierścienie, w których poszczególne podjednostki mają taką samą orientację [5,6]. Dzięki domenie α -helikalnej podjednostki heksamerycznego pierścienia mogą kontaktować się ze sobą i reagować zmianą konformacji po przyłączeniu nukleotydu. Z dotychczasowych badań wynika, że heksamery są biologicznie aktywnymi formami białek AAA. Heksameryczna konfiguracja nadaje białkom AAA unikalne właściwości.



Rycina 1. Struktura modułu AAA na podstawie krystalicznej struktury proteazy FtsH (144-398). Subdomena N-końcowa FtsH o charakterystycznej strukturze typu α - β - α została przedstawiona w odcieniach zielono-niebieskich, natomiast fragment białka w odcieniach żółto-pomarańczowych odpowiada subdomenie C-terminalnej (α -helikalnej). Rysunek przedrukowano z: Krzywdy S, Brzozowski M, Verma C, Karata K, Ogura T, Wilkinson AJ (2002) The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution. *Structure* 10: 1073-1083, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

W przypadku białek ClpB/Hsp104 i ClpC domena AAA-1 zawiera dodatkowy element strukturalny zwany środkową domeną (MD). Z analizy struktury krystalicznej białka ClpB pochodzącego z *Thermus thermophilus* wynika, że MD jest ruchliwym elementem o charakterystycznej strukturze (*ang. coiled coil*), który znajduje się na zewnątrz białka [7]. Usunięcie nawet niewielkiego fragmentu MD zaburza oligomeryzację białka ClpB i prowadzi do utraty jego aktywności [8].

W niektórych białkach AAA (ClpA-C) może występować niezależna domena N-terminalna (tzw. domena N), która poprzedza pierwszy moduł wiążący ATP. W wariantach pozbawionych domeny N obecne są inne wyspecjalizowane domeny. Na przykład w białku ClpY (HslU) występuje domena I zlokalizowana wewnątrz modułu AAA, pomiędzy motywami Walker A i B, zaś w białku ClpX, na jego końcu N obecne jest miejsce wiążące cynk, które prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w oligomeryzacji ATPazy [4]. W białku tym, podobnie jak w ClpA, występuje dodatkowo w obrębie modułu AAA-2 charakterystyczny motyw [LIV]-G-[FL] rozpoznawany przez peptydazę ClpP i odgrywający istotną rolę w tworzeniu ważnych systemów proteolitycznych. Z kolei w przypadku proteaz Lon i FtsH dodatkowym elementem strukturalnym jest domena peptydazowa znajdująca się w regionie C-terminalnym białka. Uważa się, że niezależna domena N lub inne, dodatkowe domeny zlokalizowane pomiędzy modułami AAA biorą udział w rozpoznawaniu i wiązaniu substratu, nie tylko poprzez bezpośrednie z nim oddziaływanie, ale także poprzez

oddziaływanie ze specyficznymi białkami adaptorowymi [3].

BIAŁKA ADAPTOROWE

Białka adaptorowe stanowią nową i ciekawą klasę białek z uwagi na ich powiązania z ATPazami AAA (Tab. 1). Białka te mają ogromny wpływ na dużą różnorodność funkcjonalną ATPaz AAA, wiążąc się do nich w różny sposób modyfikując specyficzność substratową i kontrolując aktywność białek AAA. Do tej pory białka adaptorowe zostały zidentyfikowane w bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*) i Gram-dodatnich (*B. subtilis*) oraz w drożdżach i w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych. Ich liczba ciągle wzrasta. Są one związane zarówno z degradacją białek, jak i z innymi procesami komórkowymi, m.in. z rekombinacją, naprawą i replikacją DNA, fuzją błonową, która towarzyszy rekonstrukcji aparatu Golgiego i błony jądrowej [9-14]. Regulują one także proces apoptozy i uczestniczą w regulacji ekspresji genów [3,15,16]. Za wiązanie białek adaptorowych przeważnie jest odpowiedzialna domena N-terminalna białka AAA. W ATPazach pozbawionych tej domeny, inne regiony mogą tworzyć kompleks z białkiem adaptorowym. Na przykład aktywność białka PspF (aktywatora σ^{54}), pozbawionego domeny

N, jest regulowana przez białko adaptorowe PspA, które specyficznie wiąże się do domeny AAA ATPazy [15,17]. W podobny sposób białko adaptorowe RuvA reguluje aktywność ATPazy RuvB. RuvA wiąże się do fragmentu domeny ATPazowej RuvB, który wyróżnia się charakterystyczną strukturą (*ang. β -hairpin*) [18,19].

Dzięki białkom adaptorowym komórka może w łatwy sposób kontrolować jedną z aktywności danego białka AAA bez oddziaływania na drugą jego aktywność. Najlepszym tego przykładem może być regulacja aktywności ATPazy p97 (homolog Cdc48 z drożdży) przez różne białka adaptorowe. Białko p97 pełni wielorakie i rozbieżne funkcje w komórce, zaangażowane jest w fuzję błonową, które są ważne w takich procesach, jak transport wewnątrzkomórkowy czy rekonstrukcja systemu Golgiego oraz ER [20-22]. Białko p97 bierze także udział w apoptozie, w regulacji cyklu komórkowego oraz w degradacji białek zależnej od ubikwityny [3,11]. Białka adaptorowe są odpowiedzialne za kierowanie aktywności p97 do różnych ważnych procesów komórkowych. Do białek adaptorowych współpracujących z p97 należą m.in. białko p47 oraz heterodimerski kompleks złożony z białek Ufd1 (degradacja białek fuzyjnych zależna od ubikwityny) i Npl4 (wymagane w transporcie jądrowym) [3]. Białko p47 stymuluje fuzję błonową z udziałem p97 związaną z rekonstrukcją aparatu Golgiego, zaś binarny kompleks Ufd1/Npl4 hamuje ten proces i kieruje aktywność p97 w stronę procesów związanych z powstawaniem zamkniętej błony jądrowej [3]. Prawdopodobnie białko p47

Tabela 1. ATPazy AAA i współpracujące z nimi białka adaptorowe [3,8-22]

Organizm	ATPaza AAA	Białko adaptorowe	Funkcja białka adaptorowego
<i>Escherichia coli</i>	ClpA	ClpS	ClpS hamuje degradację białek z „ogonkami” SsrA a stymuluje degradację zagregowanych białek
	ClpX	RssB	RssB jest niezbędne w procesie degradacji σ^S z udziałem ClpXP
	ClpX	SspB	SspB ułatwia degradację białek z „ogonkami” srA, w której udział bierze ClpXP
	RuvB	RuvA	RuvA wzmacnia aktywność RuvB i wraz z nim jest niezbędne w procesach rekombinacji, naprawy i replikacji DNA
	PspF	PspA	PspA hamując aktywność PspF zapobiega transkrypcji genów, która jest zależna od czynnika σ^{54}
<i>Bacillus subtilis</i>	ClpC	MecA	MecA wiąże się do ClpCP i pośredniczy w degradacji białek Spx oraz ComK, ComS
	ClpC	YpbH (homolog MecA)	YpbH jest odpowiedzialne za rozpoznawanie innych substratów ClpC
Wyższe Eukaryota	p97	p47	P47 bierze udział w fuzji mitotycznych fragmentów aparatu Golgiego
	p97	Ufd1/Npl4	kompleks Ufd1/Npl4 hamuje fuzję błonową związaną z rekonstrukcją aparatu Golgiego i stymuluje proces powstawania zamkniętej otoczki jądrowej
	CDC48 (homolog p97 z drożdży)	UFD2	UFD2 ze względu na posiadaną aktywność ligazy ubikwitynowo-białkowej E4 pośredniczy w degradacji białek zależnej od ubikwityny
	MAC-1	CED-4	CED-4 uczestniczy w regulacji apoptozy wiążąc się do Mac-1 hamuje ją
	Vsp4-A	Rnd2	Rnd2 pośredniczy w regulacji endocytozy (?)

i Ufd1/Npl4 konkurują o to samo miejsce wiążące zlokalizowane w obrębie domeny N-terminalnej p97.

FUNKCJE BIAŁEK AAA

Wyróżnić można trzy główne kategorie reakcji, w których biorą udział ATPazy AAA: (i) rozwijanie białek, będące jednym z fundamentalnych etapów proteolizy, (ii) „rozpuszczanie” agregatów białkowych czyli dezagregacja białek połączona z ich reaktywacją we współpracy z Hsp70/Hsp40 oraz (iii) rozkładanie kompleksów białkowych, które tworzą się w różnych procesach komórkowych.

BIAŁKA AAA I PROTEOLIZA BIAŁEK CYTOPLAZMATYCZNYCH: ROZPOZNAWANIE, ROZWIJANIE I TRANSLOKACJA SUBSTRATU

Z procesem degradacji białek są związani przede wszystkim przedstawiciele rodziny białek opiekuńczych Hsp100/Clp (rodzina białek kazeinolitycznych). Do rodziny tej należą białka ClpA, ClpX, ClpB, HslU (ClpY) z bakterii oraz białka Hsp104 i Hsp78 z drożdży będące homologami białka ClpB z bakterii. Hsp104 jest białkiem cytoplazmatycznym, zaś Hsp78 występuje w mitochondrium. Spośród wymienionych białek Hsp100 w proteolizie uczestniczą białka ClpA, ClpX oraz HslU (ClpY) [23,24]. Pozostałe białka, ClpB/Hsp104, biorą udział w procesie dezagregacji białek. Proces ten zostanie omówiony w dalszej części artykułu. ATPazy ClpA, ClpX oraz HslU (ClpY) współpracują z peptydazą ClpP lub HslV (ClpQ) i razem z nią tworzą cytopla-

zmatyczne systemy proteolityczne, zależne od ATP, zaangażowane w procesy degradacji szeregu białek komórkowych [1,8]. Asocjacja ATPaz Clp(A, ClpX) z peptydazą (ClpP) jest podyktowana obecnością tripeptydowego motywu IGF/L. Motyw ten występuje w pętli położonej C-terminalnie od sensora 1, w module AAA ATPaz ClpA, ClpX, natomiast nie występuje on w białku ClpB/Hsp104 zaangażowanym w procesy dezagregacji i reaktywacji białek [8].

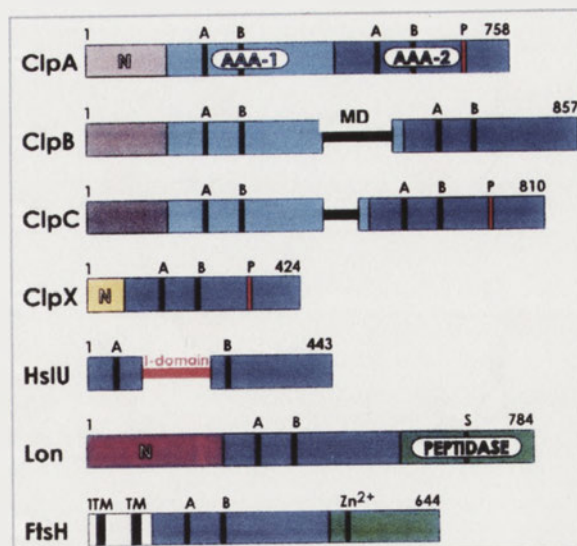
Udział ATPaz AAA w proteolizie sprowadza się do rozwinięcia substratu i dostarczenia go do centrum katalitycznego proteaz. Peptydazy ClpP, ClpQ mają kształt beczułki i są zbudowane z dwóch przylegających do siebie pierścieni. Pierścienie ClpP składają się z 7 proteolitycznych podjednostek, zaś ClpQ są 6-członowe [25-27]. ATPazy ClpA, ClpX i ClpY, które są heksamerami, wiążą się do jednego lub obu końców proteolitycznej beczułki ClpP lub ClpQ. ATPazy AAA w takich kompleksach proteazowych funkcjonują jako podjednostki regulatorowe proteaz, ponieważ kontrolują one aktywność zasocjowanej z nimi peptydazy i dostęp substratów do jej komory proteolitycznej. Ponadto, pośredniczą w rozpoznawaniu i wiązaniu substratów białkowych. Wobec tego, to ATPazy AAA warunkują specyficzność substratową proteaz. Jeżeli substrat jest większy niż otwór kanału prowadzącego do komory katalitycznej, to białka AAA dodatkowo biorą udział w jego rozwijaniu. Przynajmniej niektóre substraty po rozwinięciu są przeciągane przez centralny kanał ATPazy Clp, który prowadzi do wnętrza katalitycznej komory peptydazy. Otwieranie kana-

lu, rozwijanie i translokacja substratu stanowią fundamentalne etapy degradacji białek. Etapy te wymagają nakładu energii. Pochodzi ona z hydrolizy ATP, którą właśnie katalizują ATPazy AAA. Wobec tego, białka AAA są kluczowymi podjednostkami bakteryjnych systemów proteolitycznych. ATPazy ClpA i ClpX mogą także funkcjonować niezależnie od ClpP jako białka opiekuńcze, modulujące substraty białkowe [28,29]. ATPazy AAA są istotne także w procesie degradacji białek eukariotycznych z udziałem proteasomu 26S. Wchodzą one w skład tzw. podstawy kompleksu regulacyjnego 19S a ich rola jest taka sama, jak ATPaz Clp [1].

UDZIAŁ BIAŁEK AAA W DEGRADACJI BIAŁEK BŁONOWYCH

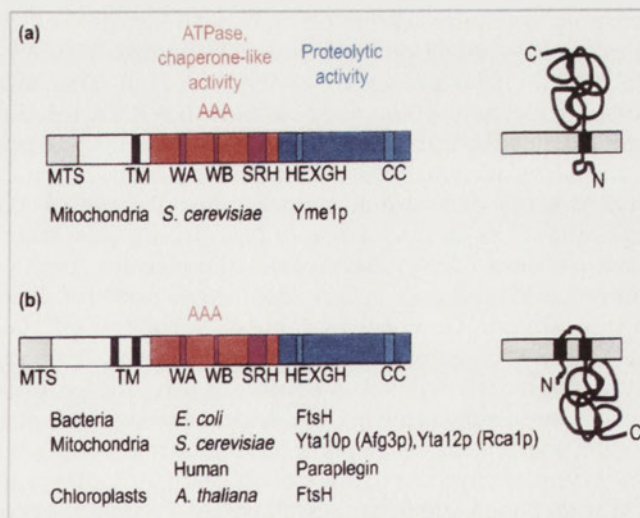
ATPazy AAA uczestniczą nie tylko w degradacji białek zlokalizowanych w cytoplazmie, ale także odgrywają one istotną rolę w degradacji białek zasocjowanych z błonami. Istnieje kilka szlaków prowadzących do selektywnej destrukcji białek błonowych [30,31]. Białka błonowe ER przeważnie są transportowane do cytosolu w wyniku tzw. retrotranslokacji i tam są przekazywane do proteasomu, który je degradowuje [1,32]. Proces ten nazywany jest degradacją ERAD (ang. *ER* – *associated degradation*). W degradacji ERAD uczestniczą niektóre z białek AAA. Ich udział w proteolizie polega dodatkowo na ekstrakcji białek z błon. Istotną rolę w degradacji ERAD odgrywa cytoplazmatyczna ATPaza AAA p97/VCP [1,32]. Białko to oddziałuje z białkiem błonowym Derlin, które prawdopodobnie wchodzi w skład kanału retrotranslokacyjnego. Dokładny mechanizm promowania retrotranslokacji przez p97 jest nieznan. W niektórych przypadkach retrotranslokację mogą indukować/stymulować ATPazy wchodzące w skład podjednostki regulatorowej 19S proteasomu [1]. Z kolei białka błonowe mitochondriów, chloroplastów i bakterii są degradowane przez tzw. proteazy AAA, czyli proteazy typu FtsH [33]. W bakteriach oraz w chloroplastach występuje tylko jedna proteaza FtsH. Natomiast mitochondria posiadają aż dwie tego typu proteazy zakotwiczone w błonie wewnętrznej, *i*-AAA i *m*-AAA. Ich miejsca katalityczne są zlokalizowane po przeciwnych stronach wewnętrznej błony mitochondrium [33]. Centrum katalityczne proteazy *i*-AAA znajduje się w przestrzeni perymitochondrialnej, zaś centrum katalityczne *m*-AAA jest eksponowane po stronie błony bezpośrednio graniczącej z matrix mitochondrium.

W większości systemów proteolitycznych domeny AAA i peptydazowa są zlokalizowane na oddzielnych polipeptydach tak, jak w przypadku omawianych wcześniej kompleksów ClpXP, ClpAP, HslUV (ClpYQ) (Ryc. 2) i proteasomu 26S. W proteazach AAA obie aktywności występują w obrębie tego samego polipeptydu (Ryc. 2, 3). Poza tym, w regionie N-terminalnym proteazy występuje jeden lub dwa dodatkowe segmenty transbłonowe [33] (Ryc. 3). Uważa się, że proteaza FtsH bakterii *E. coli* tworzy homoooligomeryczne kompleksy w błonie cytoplazmatycznej. Mechanizm degradacji integralnych białek błonowych z udziałem proteaz AAA nie jest w pełni poznany. Proponowane są dwa modele destrukcji białek błonowych z udziałem proteaz AAA (Ryc. 4) [33]. Według jednego z nich (ang. *the shedding model*) proteazy AAA odcinają eksponowane segmenty białka znajdujące się na zewnątrz błon i w ten sposób destabilizują

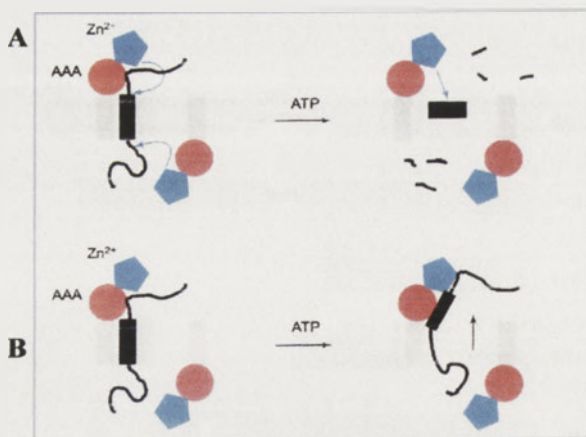


Rycina 2. Strukturalna organizacja białek AAA+. AAA-1, AAA-2- domeny wiążące ATP; A – motyw Walker A (GX₂GKT); B – motyw Walker B (hyd₂E), gdzie X oznacza dowolną resztę aminokwasową, hyd – aminokwas hydrofobowy; P – motyw ([LIV]-G[FL]) w obrębie AAA-2 odpowiedzialny za asocjację ATPaz ClpA, ClpC, ClpX z peptydazą ClpP; MD – środkowa domena obecna w białkach ClpB i ClpC należąca do AAA-1; I-domain – domena I występująca w białku HslU (ClpY); N – domena N-końcowa; TM – regiony transbłonowe charakterystyczne dla proteazy FtsH; peptidase – domena peptydazowa występująca w proteazach Lon i FtsH. Zn²⁺ – motyw (¹¹⁷HEAGH⁴²¹) występujący w FtsH, odpowiedzialny za wiązanie jonów cynku. Liczby oznaczają numery reszt aminokwasowych. Rycinę przedrukowano z: Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B (2002) AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. FEBS Lett 529: 6-10, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

hydrofobowe segmenty białka tkwiące w błonie (Ryc. 4A). Model alternatywny (ang. *the pulling model*) zakłada, że białka błonowe w pierwszej kolejności są ekstrahowane z błony



Rycina 3. Struktura domenowa proteaz AAA. W zależności od ilości regionów transbłonowych (TM) wyróżnić można dwie klasy proteaz AAA: klasę I i II. Podano przedstawicieli obu klas. AAA – domena ATPazowa odpowiedzialna za wiązanie ATP; CC – region helikalny (ang. *coiled-coil*) o nieznanej funkcji obecny w regionie C-końcowym; HEXGH – miejsce wiązania jonów metali występujące w centrum proteolitycznym; MTS – mitochondrialna sekwencja sygnałowa; SRH – drugi region homologii czyli zachowana w ewolucji sekwencja aminokwasowa obecna w regionie C-końcowym proteaz AAA; WA – Walker A; WB – Walker B. Rycinę przedrukowano z: Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. Trends Biochem Sci 25: 247-251, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.



Rycina 4. Modele działania proteaz AAA. Proteazy AAA mogą odcinać segmenty białek eksponowane na zewnątrz błon i w ten sposób destabilizować ich segmenty hydrofobowe znajdujące się w błonie (A). Drugi model (B) sugeruje, że białka błonowe są w pierwszej kolejności ekstrahowane z błony dzięki domenie ATPazowej proteazy, po czym są degradowane przez hydrofilową domenę proteazową. AAA — domena ATPazowa proteazy; Zn^{2+} — domena proteolityczna. Strzałkami niebieskimi zaznaczono miejsca ataku proteazy na substrat białkowy, natomiast strzałka czarna pokazuje kierunek działania siły, dzięki której białko błonowe zostaje wyekstrahowane (wyciągnięte) z błony. Rycinę przedrukowano z: Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. Trends Biochem Sci 25: 247-251, za zgodą autorów i wydawnictwa Elsevier.

ny dzięki domenie ATPazowej proteazy, a dopiero potem są degradowane przez hydrofilową domenę peptydazową (Ryc. 4B). Substratami FtsH są także cytoplazmatyczne białka regulacyjne o krótkim okresie półtrwania takie, jak: σ^{32} , LpxC, λ CII i CIII.

SYGNAŁY INDUKUJĄCE DEGRADACJĘ BIAŁEK

Jednym z najlepiej poznanych motywów, decydujących o rozpoznawaniu prokariotycznych białek i kierowaniu ich do proteolizy, jest 11-aminokwasowy peptyd AANDENY-ALAA znany jako znacznik/ogonek SsrA [1,8]. Znacznik ten jest kodowany przez mały stabilny 10S RNA i dodawany do niedokończonych produktów translacji, które pojawiają się w wyniku nagłego zatrzymania się rybosomu. Następnie tak naznaczone polipeptydy odłączają się od rybosomów i są degradowane *in vivo* przede wszystkim przez proteazę ClpXP. Aktywność kompleksu ClpXP w tym procesie moduluje białko adaptorowe SspB [9]. Białko to wiążąc się zarówno do domeny N białka ClpX, jak i sekwencji SsrA substratu białkowego, raczej zmienia kinetykę degradacji białek występujących w fuzji z SsrA niż specyficzność substratów ClpX. Innym białkiem adaptorym, które także ma wpływ na degradację polipeptydów wyposażonych w ogonek SsrA, jest ClpS. Białko to tworzy stabilne kompleksy z ATPazą ClpA (także w obecności ClpP). Wiązanie się ClpS do domeny N białka ClpA nie tylko zapobiega degradacji białek naznaczonych przez peptyd SsrA, ale także powoduje uwolnienie związanego z proteazą substratu [9,34]. ClpS w przeciwieństwie do innych znanych białek adaptorowych (np. SspB) posiada podwójną aktywność w kompleksie z ClpA, ponieważ dodatkowo wzmacnia rozpoznawanie przez ClpA zagregowanych białek i ułatwia ich degradację. Prawdopodobnie ClpS modyfikuje substraty ClpA [9].

Innym sygnałem decydującym o degradacji białka zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych jest rodzaj reszty aminokwasowej występującej na końcu aminowym łańcucha polipeptydowego [35]. Reszty silnie destabilizujące, takie jak: arginina lub leucyna stymulują proces degradacji białek, zaś reszty stabilizujące, takie jak metionina lub prolina nie sprzyjają temu procesowi (zasada końca N). Substraty białkowe, do których stosuje się zasadę końca N, są rozpoznawane w komórkach eukariotycznych przez ligazę ubikwityno-białkową (E3), która pośredniczy w ich degradacji zależnej od ubikwityny. Natomiast w komórkach bakteryjnych *E. coli* (pozbawionych ubikwityny) tego rodzaju substraty są rozpoznawane przez białko adaptorowe ClpS, które następnie przekazuje je kompleksowi proteolitycznemu ClpAP w celu degradacji [36]. ClpS bezpośrednio wiąże się do destabilizującej reszty aminokwasowej obecnej na końcu N substratu białkowego. Innym charakterystycznym motywem stanowiącym sygnał degradacji białek jest sekwencja bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę (sekwencja PEST).

Istnieją też takie motywy sekwencji substratów, które są eksponowane i rozpoznawane przez ATPazy Clp wyłącznie w określonych okolicznościach. Na przykład w środkowym regionie represora transkrypcji LexA są zlokalizowane dwa motywy, które rozpoznaje ClpX, ale dopiero po uszkodzeniu DNA [37]. Ze strony białek AAA istotną rolę w tworzeniu oddziaływań ze substratami białkowymi przypisuje się przede wszystkim domenie N. Także elementy domeny ATPazowej mogą oddziaływać z substratami, zwłaszcza w przypadku ATPaz pozbawionych domeny N-końcowej [8].

DEZAGREGACJA I REAKTYWACJA BIAŁEK

Drugim ważnym typem reakcji katalizowanej przez ATPazy AAA jest solubilizacja czyli dezagregacja białek połączona z procesem reaktywacji. W procesie tym fundamentalną rolę odgrywają białka opiekuńcze ClpB/Hsp104 należące do Hsp100. Ich rola w reaktywacji zagregowanych białek została szczegółowo opisana w pracy przeglądowej [38]. ClpB/Hsp104 (Hsp100) współpracują z systemem DnaK/DnaJ/GrpE (Hsp70/Hsp40) w procesie reaktywacji zagregowanych białek i współpraca ta jest specyficzna, bowiem zachodzi tylko pomiędzy białkami opiekuńczymi pochodzącymi z tego samego organizmu [39-41].

Sposób oddziaływania ClpB/Hsp104 ze zagregowanymi substratami, podobnie jak mechanizm współpracy ClpB/Hsp104 z systemem Hsp70/Hsp40, pozostaje niewyjaśniony. Istnieje kilka modeli, niektóre przeciwstawne, opisujące ten mechanizm. Według obecnie przyjętego modelu, opartego na doświadczeniach z wariantem ClpB zasocjowanym z proteazą ClpP, do dezagregacji białek z udziałem ClpB/Hsp104 może dochodzić w wyniku translokacji pojedynczych polipeptydów przez centralny kanał ClpB (mechanizm translokacyjny) [42]. Aktywność translokacyjna białka ClpB w tym przypadku przypomina aktywność ATPaz Clp współpracujących z podjednostką proteolityczną, zaś system Hsp70/Hsp40 jest niezbędny do zapoczątkowania procesu rozwijania polipeptydów czyli wyekstrahowania ich z dużych agregatów. Rozwinięte polipeptydy po przej-

ściu przez kanał ClpB/Hsp104 stają się substratami systemów Hsp70/Hsp40 oraz Hsp60/Hsp10, które pośredniczą w ich poprawnym zwijaniu [42]. Do niedawna uważano, że ClpB/Hsp104 poprzedza działanie systemu Hsp70/Hsp40 w dezagregacji dużych agregatów białkowych. Jednak wyniki ostatnich doświadczeń Ziętkiewicza i wsp. [43,44] oraz Weibezahn i wsp. [42] wskazują na to, że system Hsp70/Hsp40 poprzedza działanie ClpB/Hsp104 i jest niezbędny do zapoczątkowania procesu dezagregacji białek.

Dotychczas nie zidentyfikowano homologów białek ClpB/Hsp104 u ssaków. Prawdopodobnie w komórkach ssaków inni przedstawiciele rodziny AAA pełnią funkcje Hsp104. Pod uwagę bierze się przede wszystkim te ATPazy AAA, które wchodzi w skład nierozpuszczalnych agregatów białkowych tworzących się w chorobach neurodegeneracyjnych. Zatem ATPazami AAA ssaków zdolnymi do cofania zaistniałej agregacji mogłyby być następujące białka: VCP/p97, torsyna A oraz kompleks proteasomalny 19S, którego kluczowym składnikiem jest sześć różnych ATPaz AAA.

DYSOCJACJA KOMPLEKSÓW BIAŁKOWYCH

Rozkładanie (dysocjacja) kompleksów białkowych, które tworzą się w różnych procesach komórkowych, jest kolejnym typem reakcji z udziałem białek AAA. Wydawać by się mogło, że ta funkcja nie pasuje do aktywności dezagregacyjnych i rozwijających białek AAA, które wcześniej zostały omówione. Okazuje się jednak, że mechanizmy reakcji są podobne. Ta sama „siła”, która jest potrzebna w procesie rozwinięcia białka może przejściowo lub częściowo rozwijać komponenty stabilnych kompleksów białkowych i prowadzić do ich rozbitcia. Potwierdzeniem tej idei może być fakt, że te same białka AAA, które dostarczają substraty proteolitycznej podjednosce ClpP mogą działać samodzielnie jako białka rozkładające czy rozbijające kompleksy białkowe. Przypuszcza się, że kompleksy białkowe są rozkładane w wyniku modelowania i być może rozwijania ich składników.

Replikacja genomu faga Mu podczas rozwoju litycznego zachodzi w wyniku transpozycji DNA. Ważnym etapem w tym procesie jest tworzenie się transpozosomu, czyli kompleksu złożonego z transpozazy MuA i dwóch końców genomu faga. Stabilność transpozosomu zwiększa się wraz z postępującą transpozycją. Powstaje bardzo stabilny potranspozycyjny kompleks transferowy (STC), który wiąże się do DNA i hamuje jego replikację. Rdzeń kompleksu STC składa się z 4 podjednostek MuA i jest odporny na temperaturę do 75°C, wysokie stężenie soli i 6M mocznik. ATPaza ClpX jest czynnikiem odpowiedzialnym za destabilizację kompleksu STC i uruchomienie replikacji DNA [29]. W tej reakcji ClpX działa niezależnie od ClpP, i wykorzystuje hydrolizę ATP do destabilizacji tetramerów MuA. ClpX wiąże się do dziesięciu C-terminalnych reszt MuA i rozwija podjednostki tetramery, czego efektem jest uwolnienie monomerów z kompleksu STC, destabilizacja i rozpad STC.

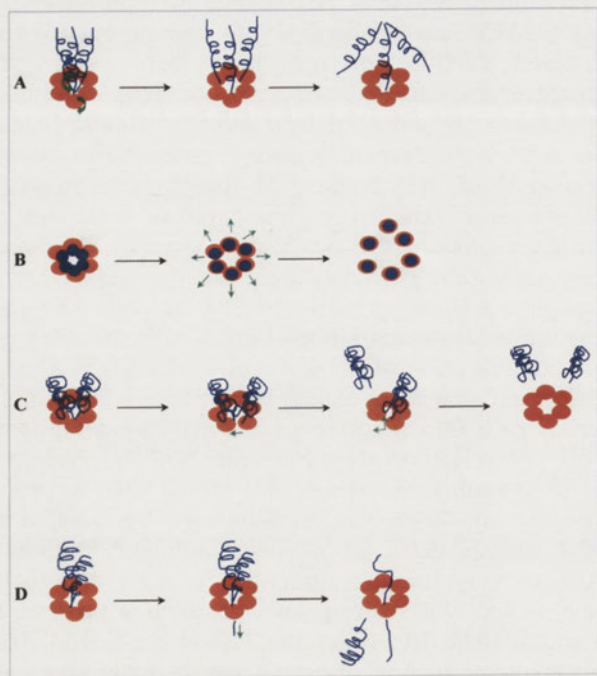
Wewnątrzkomórkowy proces fuzji błon wymaga udziału helikalnych białek zasocjowanych z błonami, znanych jako SNARE. Białka te tworzą bardzo stabilne kompleksy,

które indukują fuzję błon. Po zakończonym procesie kompleksy SNARE są rozkładane w celu zregenerowania wolnych białek SNARE, które będą mogły być wykorzystane w następnej reakcji. Spontaniczna dysocjacja kompleksu SNARE zachodzi wolno, dlatego komórki uzależniły ją od białka AAA NSF i współpracującego z nim białka adaptorowego α -SNAP [45]. Białko NSF tworzy heksameryczny cylinder złożony z dwóch przylegających do siebie pierścieni. Każdy protomer NSF składa się z domeny N i dwóch domen AAA, które posiadają różne aktywności [22]. Pierwsza domena ATPazowa białka NSF hydrolizuje ATP i jest niezbędna w dysocjacji kompleksu SNARE, podczas gdy druga domena pośredniczy w oligomeryzacji NFS. Obecne modele przedstawiające reakcję fuzji błon z udziałem NFS sugerują, że białko adaptorowe α -SNAP otacza kompleks SNARE i przyciąga do niego heksamer NSF [46]. Następnie α -SNAP stymuluje aktywność ATPazową NFS, co prowadzi do rozpadu kompleksu białkowego. Przypuszcza się, że NSF rozwija jeden lub więcej składników kompleksu SNARE, co wywołuje jego destabilizację i rozkład. Jednakże sposób, w jaki NSF realizuje swoją funkcję w procesie fuzji błon pozostaje do wyjaśnienia. Nawet jeżeli rozkładanie kompleksów przez NSF obejmuje reakcję rozwijania, która jest podobna do reakcji katalizowanych przez ClpX, ClpA i ClpB, to jest mało prawdopodobne aby NSF przeciągało substraty wyłącznie przez centralny kanał, ze względu na geometryczne ograniczenia błony.

ClpA podobnie jak ClpX uczestniczy w rozkładaniu kompleksów białkowych. Na przykład ClpA uczestniczy w przemianie nieaktywnego dimera plazmidowego białka replikacyjnego RepA w aktywny monomer [28]. Prawdopodobnie rozpad dimeru RepA zachodzi bez rozwijania całego białka RepA, na co wskazuje tylko jedna runda hydrolizy ATP. Z kolei ClpB we współpracy z systemem Hsp70/Hsp40 bierze udział w aktywacji plazmidowego białka inicjacji replikacji TrfA [47]. Aktywacja ta polega na przekształceniu nieaktywnego dimera TrfA w aktywny monomer.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ATPAZ AAA

Proponowanych jest kilka modeli działania białek AAA (Ryc. 5) [2,3]. Jeden z nich (Ryc. 5A) sugeruje mechanizm rozwijający, według którego skręcające ruchy występujące pomiędzy domenami AAA-1 i AAA-2 albo między domenami N i AAA-1 prowadzą do rozwinięcia helikalnych kłębków substratów białkowych. Prawdopodobnie w taki sposób jest rozkładany kompleks błonowy SNARE. Kolejny model (Ryc. 5B), przedstawiający mechanizm rozrywający, zakłada istnienie stabilnych oddziaływań pomiędzy komponentami substratu i oddzielnymi podjednostkami AAA. Wskutek rozejścia się podjednostek AAA, ich szarpnięcia, dochodzi do dysocjacji substratu. Prawdopodobnie w ten sposób dochodzi do rozpadu mikrotubuli. Następny model działania ATPaz AAA (Ryc. 5C) proponuje mechanizm rozciągający/rozchylający. W tym przypadku zależne od nukleotydu zmiany konformacji białka AAA wprowadzają naprężenia w jego pierścieniu. Dochodzi wówczas do odchylenia się podjednostek ATPazy i odepchnięcia związanych z nimi podjednostek substratu, czego efektem jest rozpad substratu na poszczególne podjednostki. Prawdopodobnie w taki sposób działają ATPazy wchodzące w



Rycina 5. Proponowane mechanizmy działania białek AAA. A – mechanizm rozwijający; B – mechanizm rozrywający; C – mechanizm rozciągający/rozchylający; D – mechanizm przeciągający (translokacyjny). Kolorem pomarańczowym przedstawiono ATPazę AAA, z kolei kolor niebieski odpowiada substratowi białkowemu ATPazy. Rycinę przygotowano na podstawie schematu zamieszczonego w pracy [3].

skład kompleksów replikacyjnych (ang. *DNA clamp loader*). Przypuszcza się, że strukturalne zmiany tych kompleksów zachodzące po związaniu ATP pozwalają jego podjednostkom związać się i otworzyć utworzone przez nie kółko, do którego następnie wślizguje się DNA, oraz że konformacyjne zmiany towarzyszące hydrolizie ATP mogą prowadzić do dysocjacji poszczególnych podjednostek kompleksu. Ostatnim z proponowanych (Ryc. 5D) jest mechanizm przeciągający, który odnosi się przede wszystkim do działania ATPaz Clp, w tym także dezagregazy ClpB. W pierwszej kolejności substrat jest rozwijany z jednego końca, po czym jest on przeciągany (ulega translokacji) przez centralny kanał znajdujący się w pierścieniu ATPazy. Podczas translokacji zostaje zniszczona drugorzędowa struktura substratu czyli ulega on rozwinięciu. Ruch łańcucha polipeptydowego wewnątrz kanału może być efektem powtarzających się cykli wiązania i uwalniania substratu przez ATPazę.

Z przedstawionych mechanizmów działania ATPaz AAA wynika, że modelowanie docelowego substratu białkowego zachodzi w wyniku zamiany energii pochodzącej z hydrolizy ATP w mechaniczną „siłę”. Istotną rolę w tej zamianie odgrywa moduł AAA uznawany za chemiczno-mechaniczny konwerter. Wiązanie i/lub hydroliza ATP wywołują zmiany konformacyjne w większości białek AAA, które są przenoszone na substrat białkowy.

CHOROBY POWODOWANE PRZEZ ZABURZENIA W FUNKCJONOWANIU ATPAZ AAA

Ze względu na istotną rolę białek AAA w różnych procesach komórkowych można było spodziewać się, że zaburzenia w ich funkcjonowaniu będą przyczyną wielu chorób

człowieka. Jedną z pierwszych chorób, która została powiązana z nieprawidłowym funkcjonowaniem białek AAA, był syndrom Zellwegera [48]. Syndrom ten charakteryzuje się redukcją lub brakiem peroksysomów (małych organelli komórkowych związanych głównie z metabolizmem kwasów tłuszczowych i usuwaniem toksycznych substancji) w komórkach wątroby, nerek i mózgu. Brak peroksysomów uniemożliwia przeprowadzanie β -degradacji kwasów tłuszczowych zawierających więcej niż 22 atomy węgla. To rzadko występujące schorzenie w ok. 70% jest powodowane przez mutację w genie *PAS1* (homolog *Pex1* drożdży) [48]. Produktem tego genu jest białko AAA, peroksyna, które bierze udział w imporcie matriksowych białek peroksysomów. Zmutowana forma białka wywołuje zaburzenia w biogenezie peroksysomów. Syndrom Zellwegera należy do grupy genetycznych zaburzeń zwanych chorobami peroksysomalnymi, które wpływ mają na rozwój mózgu i otoczki mielinowej. Objawy choroby, tj. powiększenie wątroby, wysoki poziom żelaza i cynku we krwi i zaburzenia wzroku często występują w pierwszym lub drugim roku życia dziecka. Symptomy takie, jak brak właściwego napięcia mięśni (hypotonia), brak ruchu mogą wystąpić już przy urodzeniu dziecka. Rokowania nie są dobre. Choroba często prowadzi do upośledzenia umysłowego i śmierci. W ciągu ostatnich kilkunastu lat mutacje w genach innych białek AAA zostały powiązane z różnymi klinicznymi syndromami, podkreślając ważność tej grupy enzymów w wielu aspektach normalnej fizjologii. Stwierdzono m.in., że mutacje w genie kodującym parapleginę, która jest homologiem *m-AAA*, są przyczyną dziedzicznej formy spastycznej paraplegii, HSP (porażenie obustronne występujące symetrycznie zwłaszcza w dolnej połowie ciała wskutek uszkodzenia rdzenia kręgowego) [49]. Choroba ta dziedziczy się autosomalnie, recesywnie. Mutacje w genie spasty, kolejnego białka AAA, także wywołują paraplegię, ale w tym przypadku choroba jest dziedziczona autosomalnie, dominująco [50]. Mechanizm wywoływania paraplegii przez zmutowane białka spasty i parapleginy nie jest znany. Ustalono także, że syndrom miocytomy (zapalenie tkanki mięśniowej), demencja czołowo-skroniowa oraz występująca u dorosłych osób dystrofia kości zwana chorobą Pageta są wywoływane przez mutacje w genie kodującym białko p97, pełniące różnorodne funkcje w komórce [51]. Dystonia torsyjna (uogólniona) charakteryzująca się mimowolnymi, skręcającymi ruchami tułowia jest kolejną chorobą związaną z ATPazami AAA [52]. Wywołują ją mutacje w genie torsyny A. Mutacje motorycznego białka dyneiny także są przyczyną kilku chorób człowieka. Jedną z nich jest pierwotna dyskineza rzęsek [53]. Objawia się ona częstymi infekcjami dróg oddechowych, zapaleniem zatok, rozstrzeżeniem oskrzeli i bezpłodnością (dziedziczona autosomalnie, recesywnie; 1:16 000). Pierwotna dyskineza rzęsek połączona z przełożeniem trzewi (*situs inversus*) nazywana jest syndromem Kartagenera. Podłożem tych zaburzeń jest nieprawidłowa budowa rzęsek, która prowadzi do upośledzenia ich ruchomości. Rzęski nieruchome lub poruszające się w niewłaściwy sposób nie mogą prawidłowo funkcjonować. Dysfunkcja dyneiny może także prowadzić do dezorganizacji korowych regionów mózgu. Przyczyną tej dezorganizacji są defekty w migracji neuronalnej [54].

Niektóre z białek AAA, tj. p97, torsyna A, podjednostki regulatorowe 19S uważa się, że mają związek z chorobami

neurodegeneracyjnymi, bowiem wykrywa się je w nierozpuszczalnych agregatach patogennych białek, które tworzą się w komórkach nerwowych mózgu i prowadzą do jego degeneracji [24]. Wiele chorób związanych z białkami AAA dziedziczy się autosomalnie, dominująco. Istnieje też pewna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji genów białek AAA a chorobą. Na przykład stwierdza się zależność pomiędzy obniżonym poziomem syntezy NSF a schizofrenią i epilepsją [55,56]. Białko NSF ze względu na udział w fuzjach błonowych ma wpływ na transport komórkowy, w tym transport neuroprzekazników, w związku z tym jest istotne w neurotransmisji. Stąd związek tego białka z niektórymi chorobami układu nerwowego.

PODSUMOWANIE

Moduły AAA są sercem molekularnej maszyny katalizującej proste, mechaniczne ruchy, które umożliwiają lub znoszą kontakty między makrocząsteczkami. Efektem tych ruchów jest lokalne lub globalne rozwinięcie łańcucha polipeptydowego lub polinukleotydowego DNA, składanie lub rozkładanie kompleksów białkowych, czy też transport makrocząsteczek. Aktywności te uwydatniają procesy istotne dla replikacji DNA i rekombinacji, sekrecji, komórkowej reorganizacji i biogenezy organelli, degradacji białek i transportu wewnątrzkomórkowego. Molekularne szczegóły tych wszystkich procesów nie zostały jeszcze w pełni poznane. Jednym z najważniejszych wyzwań naukowych jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób wiązanie nukleotydu i hydroliza przyczyniają się do zmiennych ruchów domen wymaganych w procesach rozwijania białek, rozkładania kompleksów, czy w translokacji substratów. Niewiele też wiadomo na temat rozpoznawania substratów przez białka AAA, zarówno ich bezpośrednich oddziaływań z substratami, jak i poprzez białka adaptorowe współpracujące z nimi. W jaki sposób wiązanie i uwalnianie substratów jest skoordynowane z wewnętrznymi ruchami domen, aby wywołać przemianę strukturalną substratu? To kolejne pytanie, które jak na razie pozostaje bez odpowiedzi. Ponadto dalsze badania *in vitro* i *in vivo* są niezbędne, aby przekonać się, czy ATPazy AAA ssaków (p97/VCP, torsyna A, kompleks regulatorowy 19S), wchodzące w skład różnych inkluzji tworzących się w chorobach neurodegeneracyjnych, posiadają aktywność dezagregazy taką jak białka ClpB/Hsp104.

PIŚMIENICTWO

- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 519-529
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6: 575-597
- Maurizi MR, Li CC (2001) AAA proteins: in search of a common molecular basis. *EMBO Rep* 2: 980-985
- Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B (2002) AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett* 529: 6-10
- Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of *N*-ethylmaleimide sensitive fusion protein. *Cell* 94: 525-536
- Zhang X, Shaw A, Bates PA, Newman RH, Gowen B, Orlova E, Gorman MA, Kondo H, Dokurno P, Lally J, Leonard G, Meyer H, van Heel M, Freemont PS (2000) Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* 6: 1473-1484

- Lee S, Sowa ME, Watanabe Y, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FT (2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* 115: 229-240
- Kedzierska S, Akoev V, Barnett ME, Zolkiewski M (2003) Structure and function of the middle domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42: 14242-14248
- Dougan DA, Reid BG, Horwich AL, Bukau B (2002) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell* 9: 673-683
- Guo F, Esser L, Singh SK, Maurizi MR, Xia D (2002) Crystal structure of the heterodimeric complex of the adaptor, ClpS, with the N-domain of the AAA+ chaperone, ClpA. *J Biol Chem* 277: 46753-46762
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G (2000) A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* 19: 2181-2192
- Hishida T, Han Y-W, Fujimoto S, Iwasaki H, Shingawa H (2004) Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9573-9577
- Privezentzev CV, Keeley A, Sigala B, Tsaneva IR (2005) The role of RuvA octamerization for RuvAB function *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 280: 3365-3375
- Ohnishi T, Hishida T, Haradas Y, Iwasaki H, Shinagawa H (2005) Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J Biol Chem* 280: 30504-30510
- Dworkin J, Jovanovic G, Model P (2000) The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of σ^{54} -dependent transcription. *J Bacteriol* 182: 311-319
- Elderkin S, Bordes P, Jones S, Rappas M, Buck M (2005) Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol* 187: 3238-3248
- Elderkin S, Jones S, Schumacher J, Studholme D, Buck M (2002) Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. *J Mol Biol* 320: 23-37
- Han YW, Iwasaki H, Miyata T, Mayanagi K, Yamada K, Morikawa K, Shinagawa H (2001) A unique β -hairpin protruding from AAA+ ATPase domain of RuvB motor protein is involved in the interaction with RuvA DNA recognition protein for branch migration of holliday junctions. *J Biol Chem* 276: 35024-35028
- Yamada K, Kunishima N, Mayanagi K, Ohnishi T, Nishino T, Iwasaki H, Shinagawa H, Morikawa K (2001) Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1442-1447
- Partridge JJ, Lopreiato JO, Jr Latterich M, Indig FE (2003) DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol Biol Cell* 14: 4221-4229
- Kano F, Kondo H, Yamamoto A, Kaneko Y, Uchiyama K, Hosokawa N, Nagat K, Murata M (2005) NSF/SNAPs and p97/p47/VCIIP135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network. *Genes Cells* 10: 989-999
- Brunger AT, DeLaBarre B (2003) NSF and p97/VCP: similar at first, different at last. *FEBS Lett* 555: 126-133
- Lee S, Tsai FTF (2005) Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* 38: 259-265
- Weibezahn J, Bukau B, Mogk A (2004) Unscrambling an egg: protein disaggregation by AAA+ proteins. *Microbial Cell Factories* 3: 1-12
- Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Huber R (1997) Crystal structure of heat shock locus V (HsIV) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6070-6074
- Kessel M, Wu W-T, Gottesman S, Kocsis E, Steven AC, Maurizi MR (1996) Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett* 398: 274-278
- Wang J, Hartling JA, Flanagan JM (1998) Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *J Struct Biol* 124: 151-163

28. Pak M, Wicker S (1997) Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4901-4906
29. Nakai H, Doseeva V, Jones JM (2001) Handoff from recombinase to replisome: insights from transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8247-8254
30. Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84: 813-815
31. Jentsch S, Schlenker S (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the Proteasome. *Cell* 82: 881-884
32. Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7: 766-772
33. Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 25: 247-251
34. Zeth K, Dougan DA, Cusack S, Bukau B, Ravelli RB (2002) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Escherichia coli* adaptor protein ClpS, free and in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1207-1210
35. Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, Baker TA (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX- recognition signals. *Mol Cell* 11: 671-683
36. Erbe A, Schmidt R, Bornemann T, Schneider-Mergener, Mogk A, Zahn R, Dougan DA, Bukau B (2006) ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* 439: 753-756
37. Neher SB, Flynn JM, Sauer RT, Baker TA (2003) Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev* 17: 1084-1089
38. Kędzierska S (2005) Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postepy Biochem* 51: 146-153
39. Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73-82
40. Schlee S, Beinker P, Akhrymuk A, Reinstein J (2004) A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. *J Mol Biol* 336: 275-285
41. Kędzierska S, Chesnokova L, Witt SN, Zolkiewski M (2005) Interactions within the ClpB/DnaK bi-chaperone system from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 444: 61-65
42. Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119: 653-665.
43. Ziętkiewicz S, Krzewska J, Liberek K (2004) Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* 279: 44376-44383
44. Ziętkiewicz S, Lewandowska A, Stocki P, Liberek K (2006) Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100 dependent disaggregation. *J Biol Chem* 281: 7022-7029
45. Whiteheart SW, Schraw T, Matveeva EA (2001) N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int Rev Cytol* 207: 71-112
46. Hohl TM, Parlati F, Wimmer C, Rothman JE, Sollner TH, Engelhardt H (1998) Arrangement of subunits in 20S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol Cell* 2: 539-548
47. Konieczny I, Liberek K (2002) Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *J Biol Chem* 277: 18483-18488
48. Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould SJ (1997) Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* 17: 445-448
49. Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Balabio A (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93: 973-983
50. Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Durr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J (1999) Spastin, a new AAAprotein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23: 296-303
51. Watts GD, Wymmer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 36: 377-381
52. Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE (1997) The early-onset torsin dystonia gene (*DYT1*) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 17: 40-48
53. Omran H, Haffner K, Volkel A, Uehr J, Ketelsen UP, Ross UH, Konietzko N, Wienker T, Brandis M, Hildebrandt F (2000) Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain *DNAH5* as a candidate gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 696-702
54. Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang Y, Vallee RB (2000) A role for the lissencephaly gene *LIS1* in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2: 784-791
55. Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53-67
56. Guan Z, Lu L, Zheng Z, Liu J, Yu F, Lu S, Xin Y, Liu X, Hong J, Zhang W (2001) A spontaneous recurrent seizure-related Rattus NSF gene identified by linker capture subfraction. *Brain Res Mol Brain Res* 87: 117-123

Structure, function and mechanisms of action of ATPases from the AAA superfamily of proteins

Sabina Kędzierska 

Department of Biochemistry, University of Gdańsk, 24 Kładki St., 80-822 Gdańsk, Poland

E-mail: kedzie@biotech.univ.gda.pl

Key words: AAA ATPases, adaptor proteins, molecular chaperones, disaggregation, proteolysis, proteases

ABSTRACT

AAA ATPases are found in all living organisms. Their common feature is the presence of a highly conserved the AAA domain referred to as AAA module that is responsible for ATP binding and hydrolysis. The AAA domain is required for proper function of AAA proteins. It contains 200-250 residues, among them there are two classical motifs, Walker A (GX_4GKT) and Walker B ($HyDE$). AAA proteins participate in variety of cellular processes, including cell-cycle regulation, protein proteolysis and disaggregation, organelle biogenesis and intracellular transport. Some of them function as molecular chaperones, subunits of proteolytic complexes or independent proteases (FtsH, Lon). They also act as DNA helicases and transcription factors. This review describes the structure, function and mechanisms of action of the most known AAA proteins.

CYTOMETR PRZEPEŁYWOWY

BD FACSCanto II



BADAJ WIĘCEJ

ODKRYWAJ

WIĘCEJ

PRZY POMOCY

BD FACSCANTO II

*Najnowszego
Cytometru BD*

Idealnego do badań
naukowych oraz
diagnostyki klinicznej

- BD FACSCanto II może mierzyć do **8 kolorów** z **dwu** lub **trzech** laserów
- Pełna automatyka pracy i obsługi
- Może być wyposażony w Automatyczny Podajnik Probówek albo w moduł HTS – Podajnik z płytek wielodołkowych

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954 Warszawa

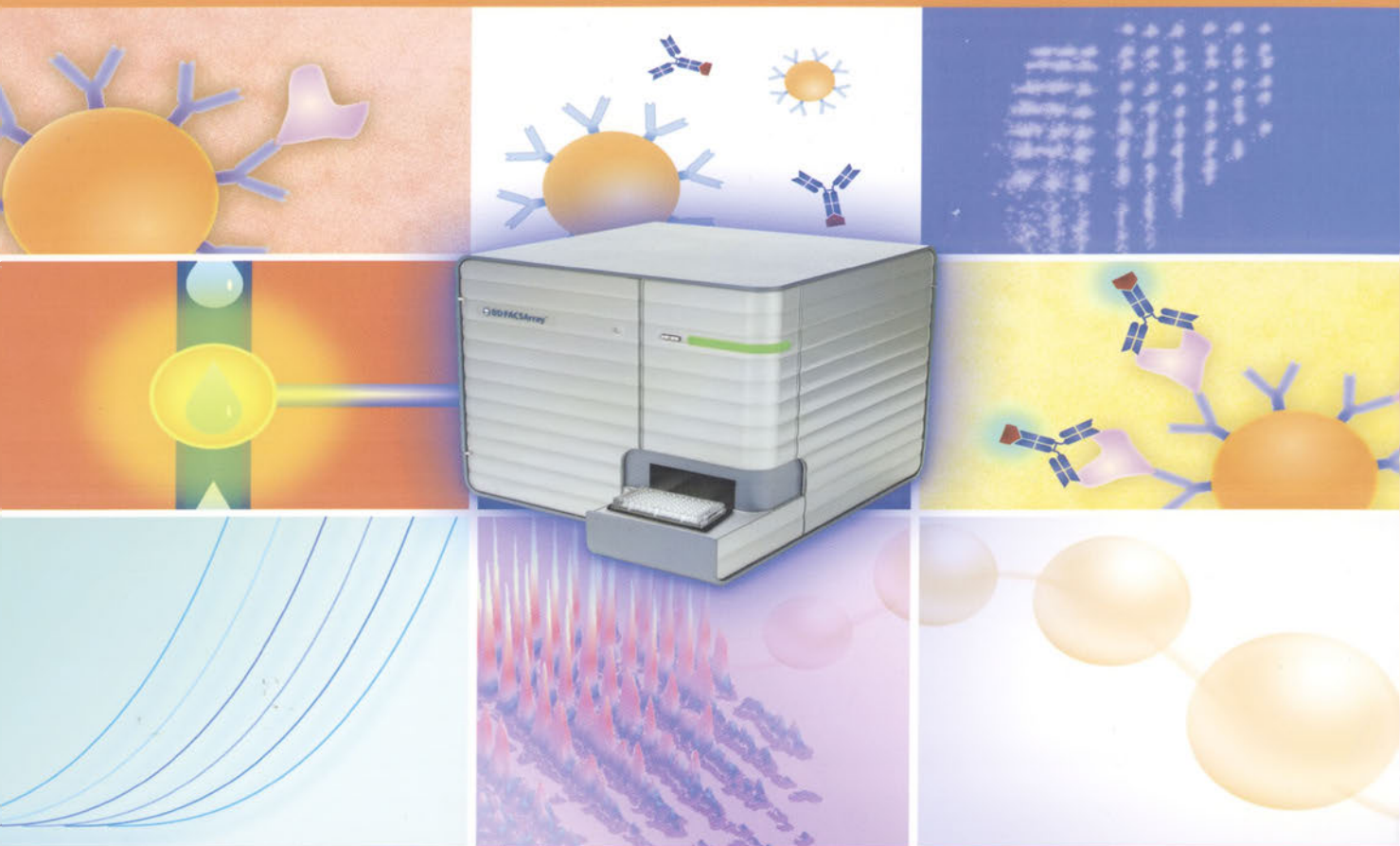
tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

<http://rcin.org.pl>
www.bdbeurope.com



BD

UŻYWASZ TESTÓW ELISA I MASZ CYTOMETR PRZEPEŁYWOWY



W naszej ofercie posiadamy zestawy ELISA na cytometr: **FlexSet**

- Zestawy do **ilościowego** oznaczania **cytokin i chemokin** w surowicy, płynach ustrojowych i nadsączach hodowlanych
- Zestawy do **ilościowego** oznaczania **białek sygnałowych** – całkowitych i/lub ufosforylowanych w lizatach komórkowych
- **FlexSet zawiera:** kulki opłaszczane przeciwciałami monoklonalnymi wiążącymi badane białka, przeciwciała wykrywające połączone z PE oraz zestaw buforów. Każdy FlexSet zawiera także rekombinowane standardy oznaczanych białek.
- W **50 µl** próbki można oznaczyć jednocześnie do **72 białek**

**Zapewniamy fachową pomoc przy wdrażaniu pomiarów
z naszymi odczynnikami na cytometrze.**

BD Biosciences, ul. Królowej Marysieńki 90, 02-954

Warszawa

tel.: +48 22 651 75 88, faks: +48 22 651 75 89

www.bdbeurope.com



BD