

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2008
TOM 54
NUMER 1

Własność intelektualna w naukach przyrodniczych
Mechanizmy wierności replikacji DNA
Mikromacierze DNA



PL ISSN 0032-5422
Indeksowane w Medline /PubMed
www.postepybiochemii.pl

5  LAT

Calbiochem®

InhibitorSelect™ Protein Kinase Library I

Convenient for:

- **Target identification in drug discovery**
Screen for small molecule inhibitors that block receptor mediated signal transduction
- **Biochemical pathway analysis**
Screen small molecule inhibitors that may affect either upstream or downstream targets
- **Screening of new protein kinases**
Profile against inhibitors with known biological activity and structure
- **Other pharmaceutical applications**
Useful for cell phenotypic screening
- **Cell-based assays**

Merck Sp. z o.o.
Al. Jerozolimskie 178
02-486 Warszawa

Tel.: 022 53 59 770
Fax: 022 53 59 945
E-mail: dzial.handlowy@merck.pl
www.merck.pl

Introducing

InhibitorSelect™ Protein Kinase Library I

NEW

Library I contains 80 well-characterized, potent protein kinase inhibitors in a convenient 96-well plate in 50 µl aliquots supplied at a concentration of 10 mM in DMSO.

Targets:

Akt	AMPK	Aurora	Bcr-Abl	DNA-PK
EGFR	FLT3	FMS	IGFR	IRAK
JAK	Lck	Met	PDGFR	PI 3-K
PKC	Rho	Src	Syk	TGF-βR
VEGFR				

Product	Cat. No.
InhibitorSelect™ Protein Kinase Library I	539744

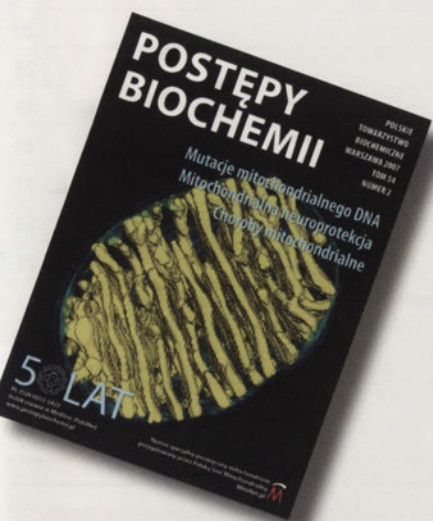


For information on our
Inhibitor Library please go to

www.merckbio.eu/inhibitorkinaselibrary



<http://rcin.org.pl>



W NASTĘPNYM NUMERZE:

Mutacje mitochondrialnego DNA

Mitochondrialna neuroprotekcja

Choroby mitochondrialne

Numer specjalny poświęcony mitochondriom, przygotowany przez Polską Sieć Mitochondrialną www.mitonet.pl



Rysunek na okładce:

Komórki osteosarkomy (linia 143B) z wybarwionymi F-aktyną (faloidyna-TRIC – kolor czerwony), winkuliną (przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciw winkulinie, przeciwciała drugorzędowe sprzężone z FITC – kolor zielony) i jądrem (DAPI – kolor niebieski). Fotografię z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego wykonała dr Joanna Szczepanowska z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie (wykorzystano za zgodą Autorki).

Polskie Towarzystwo Biochemiczne ma 50 lat

Lech Wojtczak

1

MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy

Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak

3

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesołowskiej

9

ARTYKUŁ SPONSOROWANY

Rozdział organelli komórkowych przy użyciu systemu elektroforezy w warunkach swobodnego przepływu

Jutta Denter, Mikkel Nissum

14

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Biotechnologia - od nauki do komercjalizacji

Tadeusz Pietrucha, Eliza Zawadzka

17

Własność intelektualna w naukach przyrodniczych

Tomasz Twardowski

20

Oporność wielolekowa grzybów

Izabela Łącka, Roland Wakieć

24

Peptydy natriuretyczne - ich receptory i rola w układzie krążenia

Hanna Jerczyńska, Zofia Pawłowska

35

Mechanizmy wierności replikacji DNA

Anna Bębenek

43

Wirusy związane z adenowirusami (AAV)

Maciej Małecki, Agnieszka Woźniak, Przemysław Janik

57

Chaperoniny CCT oraz białka współdziałające

Cezary Bregier, Barbara Kupikowska, Hanna Fabczak, Stanisław Fabczak

64

Mitochondrialny megakanal w fizjologii i patologii komórki - nowe spojrzenie

Mariusz R. Więckowski

71

Ekspresja genów kodujących białka morfogenetyczne kości, metaloproteinazy i inhibitory metaloproteinaz w nowotworach płuc i ich znaczenie rokownicze

Magdalena Bieniasz, Jacek Bartkowiak, Janusz Szemraj

82

Mechanizmy chroniące przed toksycznością homocysteiny

Jarosław Zimny

91

Szlaki przekazywania sygnałów indukowane przez etylen

Kamil Frankowski, Jacek Kęsy, Wojciech Kotarba, Jan Kopcewicz

99

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Mikromacierze DNA - perspektywy wykorzystania w badaniach skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leków

Iza Roman

107

Events/Opinions/Comments	1
REVIEWS	
BD Free Flow Electrophoresis System	14
Intellectual property in natural sciences	20
Multidrug resistance in fungi	24
Natriuretic peptides – their receptors and role in cardiovascular system	35
DNA replication fidelity	43
Adeno-associated viruses (AAV)	57
CCT chaperonins and their cochaperons	64
The role of mitochondrial permeability transition pore in physiology and pathology of the cell	71
Expression of bone morphogenetic proteins, matrix metalloproteinases and inhibitors of matrix metalloproteinases in lung cancers and their prognostic significance	82
Mechanisms that protect against homocysteine toxicity	91
Ethylene signal transduction pathway	99
DNA microarrays – perspective of application for drug effectivity and safety evaluation	107

III edycja konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii w 2007 roku

Polskie Towarzystwo Biochemiczne i firma Merck Sp. z o.o. ogłasza trzecią edycję konkursu na najlepszą pracę doktorską z biochemii wykonaną w polskiej instytucji naukowej. Warunkiem uczestnictwa jest przyznanie autorowi pracy tytułu doktora przez właściwą radę naukową lub radę wydziału w 2007 roku. Nagroda obejmuje premię pieniężną dla autora w wysokości 4 000 zł, ufundowaną przez firmę Merck, oraz opublikowanie też doktoratu w 4 numerze kwartalnika „Postępy Biochemii” w 2008 roku. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w porozumieniu z firmą Merck.

Zgłoszenia kandydatów do Nagrody mogą dokonywać pracownicy naukowcy ze stopniem doktora habilitowanego lub tytułem profesora.

Zgłoszenia w formie listu przewodniego wraz z pracą doktorską w formacie pdf należy przestać **w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 2008 roku** tylko drogą elektroniczną na adres:

s.pikula@nencki.gov.pl

Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi do 31 sierpnia 2008 roku, a uroczyste wręczenie Nagrody odbędzie się na dorocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Olsztynie we wrześniu 2008 roku.

Patronat medialny nad konkursem sprawuje redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”. Informacje dotyczące konkursu można uzyskać kierując pytania pod następujący adres poczty elektronicznej: s.pikula@nencki.gov.pl.

profesor Sławomir Pikula
Sekretarz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

PARTNERZY POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

MERCK

Polska Sieć Mitochondrialna
www.mitonet.pl

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

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

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

Sekretarz redakcji: Hanna Łaskowska; e-mail: h.laskowska@nencki.gov.pl, tel. (022) 5892441

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

Korekta językowa: Marta Magdalena Izdebska; e-mail: 3mip@neostrada.pl lub marta.izdebska@gmail.com

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

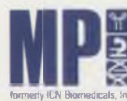
Oferujemy odczynniki i wyposażenie laboratoryjne

abo

DYSTRYBUTOR: abo Grażyna Boreysza
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

 **Fermentas**
LIFE SCIENCES

Enzymy restrykcyjne, PCR, odwrotna transkrypcja, markery DNA, RNA i białkowe, zestawy do biologii molekularnej;

 **MP**
formerly ICR Biomedicals, Inc.

Podstawowe odczynniki, elektroforeza, transfekcja, biologia komórki, pożywki bakteryjne, drożdżowe, roślinne, PCR, izolacja i oczyszczanie DNA i RNA, ekspresja genów, immunologia, apoptoza

 **SCIE-PLAS**

Aparaty do elektroforezy poziomej i pionowej, do blottingu, zasilacze, ochrona przed promieniowaniem gamma i beta, drobne wyposażenie laboratoryjne;

 **PRONA**
AGAROSE

Agarozy;

 **MoBiTec**

Biologia komórki, genomika, proteomika, przeciwciała, chromatografia;

 **alomone labs**

Przeciwciała, modulatory, neurotoksyny i odczynniki do neurobiologii;

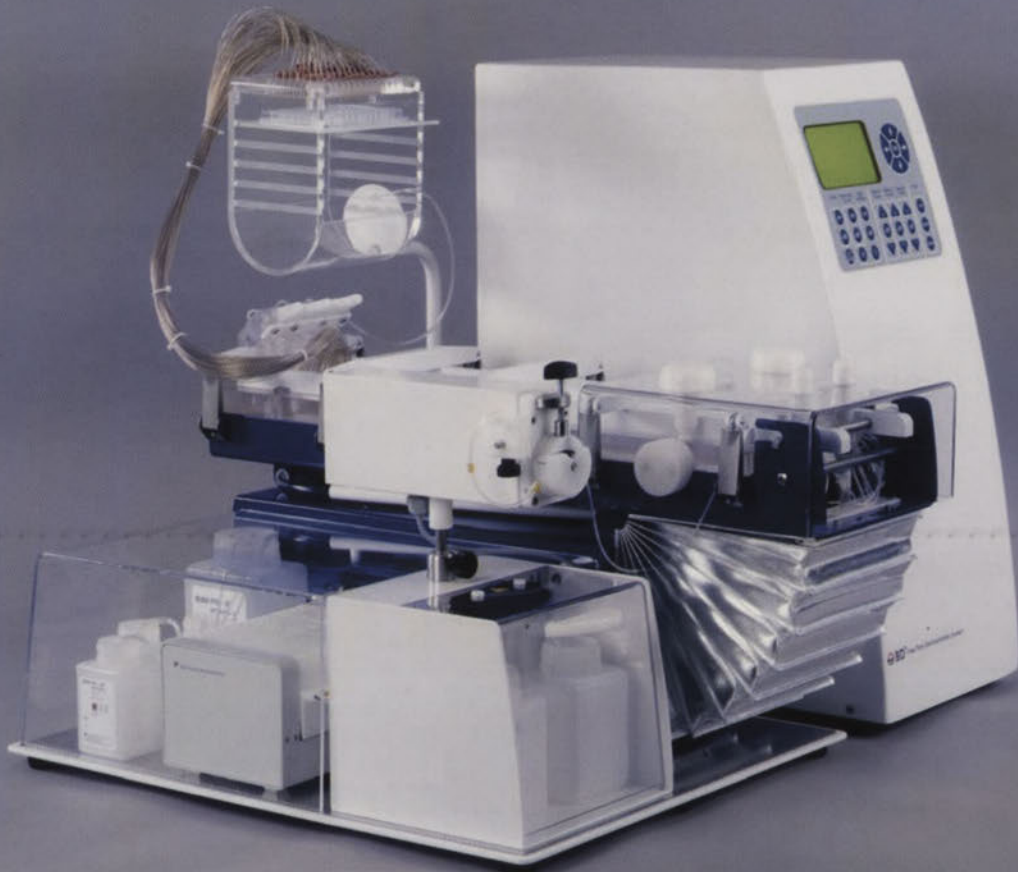
 **BLUESTAR**
FORENSIC
Latent bloodstain reagent

Odczynnik do wykrywania niewidocznych śladów krwi.

rcin.org.pl

BD™ FFE

System Elektroforyzy ze Swobodnym Przepływem



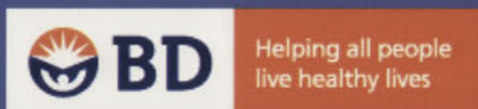
Separacja Białek z Wysoką Rozdzielczością

Ciągły przepływ / brak macierzy rozdziału :

- Wzbogaca rzadko występujące białka
- Polepsza odzysk
- Umożliwia najwyższą efektywność

Ultracienki gradient separacji :

- Pozwala na 96 dyskretnych odcięć pH w czasie poniżej 30 minut
- Separuje Albuminy



BD Preanalytical Systems
Becton Dickinson Polska Sp. z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel. 0 22 651 75 88, faks 0 22 651 75 89
www.bd.com/proteomics

Polskie Towarzystwo Biochemiczne ma 50 lat

Wkrótce po wojnie, gdy życie naukowe w odbudowywanych lub nowo powstających uczelniach i pozauczelnianych instytutach badawczych zaczęło się odradzać, naukowcy pracujący w zakresie biochemii skupiali się głównie w powstałym jeszcze w okresie międzywojennym Polskim Towarzystwie Fizjologicznym. W ramach ogólnopolskich i lokalnych zjazdów i konferencji tego Towarzystwa organizowano sesje o charakterze biochemicznym. Rozwój fizjologii i narastająca specjalizacja w jej obrębie sprawiły, że w świadomości coraz liczniejszego grona ówczesnych polskich biochemików dojrzewała idea utworzenia odrębnego towarzystwa, tym silniejsza, że działał już wówczas przy Polskiej Akademii Nauk Komitet Biochemii. Było to jednak ciało nieliczne, kilkunastoosobowe, pochodzące z nominacji. Nie mogło ono zatem zaspokoić potrzeby szerszego ruchu naukowego, obejmującego również młodych adeptów biochemii. W tej sytuacji grupa kilkunastu wybitnych polskich biochemików postanowiła utworzyć Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Zebranie założycielskie odbyło się przy okazji jednego z zebrań Komitetu Biochemii PAN w dniu 6 października 1957 roku. Powołano na nim Zarząd Tymczasowy pod przewodnictwem profesora Włodzimierza Niemierki, kierownika Zakładu Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warszawskiego i zarazem kierownika Zakładu Biochemii Instytutu im. Marceliego Nenckiego. Zadaniem tej grupy było dopełnienie odpowiednich formalności, w wyniku których Polskie Towarzystwo Biochemiczne zostało z dniem 22 marca 1958 roku, na mocy decyzji odpowiednich władz, wciągnięte do rejestru stowarzyszeń. Datę tę przyjmujemy za oficjalny termin powołania naszego Towarzystwa. Dwunastego grudnia tego samego roku odbyło się w Warszawie pierwsze Walne Zebranie Towarzystwa, na którym wybrano pierwszy Zarząd Główny. Pierwszym prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego został wybitny biochemik, profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, Bolesław Skarżyński.

Towarzystwo przystąpiło do działalności przede wszystkim przez organizację konferencji naukowych. Zaczęto od specjalistycznych sympozjów. Lecz już w 1963 roku odbył się w Łodzi ogólnopolski zjazd obejmujący wszystkie dziedziny biochemii i nazwany Pierwszym Krajowym Kongresem Biochemii. Zapoczątkował on tradycję corocznych (z małymi wyjątkami) szerokotematycznych, ogólnokrajowych spotkań polskich biochemików, kontynuowanych po dzień dzisiejszy pod nieco skromniejszą nazwą "Zjazdów". Tak więc Zjazd, który odędzie się w Olsztynie we wrześniu bieżącego roku, ma kolejny numer 43.

Wzrastała też liczebność Towarzystwa, od około 200 członków w roku założenia do obecnej liczby około 1200 członków. Powstawały nowe oddziały terenowe, których jest obecnie dwanaście i pokrywają wszystkie większe ośrodki akademickie. Wkrótce po swym powstaniu, Polskie Towarzystwo Biochemiczne przejęło wydawanie założonego kilka lat wcześniej czasopisma "Postępy Biochemii". Pierwszymi jego redaktorami byli prof. Józef Heller, a następnie prof. Irena Chmielewska. Wielkie zasługi dla tego pisma położyła wieloletnia (w latach 1973 – 2000) redaktor naczelna, prof. Zofia Zielińska. Drugim wydawnictwem Towarzystwa stały się wydawane nieregularnie "Monografie Biochemiczne". Celem nawiązania kontaktu ze wzrastającą rzeszą członków, zaczęto wydawać rodzaj biuletynu informacyjnego, który z inicjatywy dr Teresy Wesołowskiej ze Szczecina, przekształcił się w kwartalnie wydawane "Listy do Biochemików".

W latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia zaistniała potrzeba uporządkowania i ujednoczenia polskiego słownictwa biochemicznego. Powstała wówczas przy Towarzystwie pod kierunkiem prof. Tadeusza Korzybskiego Komisja Słownictwa Biochemicznego, która swe ustalenia i zalecenia

publikowała w "Postęпах Biochemii", a także wydała polską wersję międzynarodowego nazewnictwa enzymów.

Polscy biochemicy zawsze starali się utrzymywać ściśle kontakty z nauką światową. Toteż i Polskie Towarzystwo Biochemiczne od swego zarania, mimo ogromnych trudności wynikających z ówczesnej sytuacji politycznej, dążyło do nawiązywania kontaktów z podobnymi towarzystwami w innych krajach. W efekcie tych kontaktów nasze Towarzystwo, wraz z towarzystwami biochemicznymi 17 innych krajów europejskich, założyło w 1964 r. Federację Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS). Pierwszy statut FEBS, zajmujący łącznie z podpisami sygnatariuszy jedną kartkę papieru (!), podpisał w dniu 23 marca 1964 roku w imieniu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ówczesny jego prezes, prof. Kazimierz Zakrzewski. Polska bardzo aktywnie włączyła się do działalności FEBS i już dwa lata później, na wiosnę 1966 roku, odbył się w Warszawie trzeci Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Było to istotne wydarzenie naukowe. W zjeździe uczestniczyło kilku ówczesnych i przyszłych laureatów Nagrody Nobla, a niektóre przedstawione na nim doniesienia i wykłady są po dziś dzień cytowane. Dziś trudno docenić, jak ważnym wydarzeniem był ten Zjazd dla polskich biochemików, a w szczególności dla młodych naukowców, którzy w ówczesnych warunkach mieli ograniczone możliwości kontaktowania się z nauką światową. Jednakże wiele lat musiało upłynąć, zanim nasze Towarzystwo ponownie zdecydowało się na organizację Zjazdu FEBS. Odbył się on w naszym kraju dopiero w 2004 roku jako 29. Kongres FEBS i również był dużym sukcesem.

Od lat przedstawiciele naszego Towarzystwa regularnie biorą udział w obradach odbywających się corocznie posiedzeń Rady FEBS (FEBS Council), a także uczestniczą w pracach poszczególnych komisji jako ich członkowie. Natomiast aktualnie dwóch polskich biochemików sprawuje bardzo ważne funkcje we władzach Federacji. Są nimi prof. Maciej J. Nałęcz - przewodniczący Komisji Stypendialnej FEBS i prof. Adam Szewczyk - pełnomocnik FEBS do spraw Kongresów (Congress Councillor). Nie można również pominąć faktu, że dwukrotnie przedstawiciel naszego Towarzystwa pełnił bardzo prestiżową funkcję Przewodniczącego całej Federacji. W latach 1966 - 1967 był to prof. Kazimierz Zakrzewski, a w latach 2004 - 2006 prof. Jolanta Barańska. Jest bowiem w zwyczaju Federacji, iż prezes towarzystwa krajowego, które gości kolejny kongres, zostaje przez najbliższy rok vice-Przewodniczącym, a przez rok następny Przewodniczącym FEBS.

Z okazji okrągłej rocznicy urodzin Polskiego Towarzystwa Biochemicznego życzę mu, a w istocie nam wszystkim, dalszego rozwoju ku pożytkowi polskiej biochemii.



Lech Wojtczak

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika

„Nic nie tworzy przyszłości, tak jak
marzenia”
W. Hugo

Ryszard Oliński,
Marek Jurgowiak

Collegium Medicum UMK
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

NIECO HISTORII

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej CM UMK ma historię nieco krótszą niż macierzysta Uczelnia, w ramach której funkcjonuje. Początki sięgają 1988 roku, kiedy powstawał na ówczesnej Akademii Medycznej im. L. Rydygiera Wydział Farmaceutyczny. W dniu 24 listopada 2004 roku Akademia Medyczna w Bydgoszczy przekształciła się w Collegium Medicum im. L. Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W tym czasie Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej posiadała już ugruntowaną pozycję dydaktyczno-naukową, nie tylko w macierzystej Uczelni, ale i na mapie Polskiej Biochemii.

TRUDNE POCZĄTKI

Zakład, pod kierownictwem prof. dr hab. Ryszarda Olińskiego, początkowo ulokowany w jednym ze skrzydeł Szpitala Klinicznego, rozpoczął działalność w składzie trzyosobowym. Pierwszymi współpracownikami profesora Olińskiego byli Paweł Jurga i Tomasz Zastawny (obecnie już doktorzy habilitowani). Początki były trudne ze względu na brak aparatury badawczej, w którą stopniowo zasilane było zakładowe laboratorium. W tym pionierskim okresie, funkcjonując już jako Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, jednostka nawiązała stałą współpracę naukową, umocnioną w latach 90-tych i kontynuowaną do dzisiaj, z Laboratorium dr Mirala Dizdaroglu (NIST, USA), niekwestionowanego eksperta w dziedzinie analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Warto wspomnieć, że dr Miral Dizda-



Fotografia 1. Zespół Katedry i Zakładu Biochemii Klinicznej CM UMK.

roglu w roku 2000 otrzymał doktorat *honoris causa* Akademii Medycznej w Bydgoszczy.

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej od początku istnienia zaangażowała się w proces dydaktyczny Uczelni, kształcąc początkowo studentów Wydziału Farmaceutycznego (kierunek Analityka Medyczna), a obecnie prowadząc zajęcia dydaktyczne dla studentów większości kierunków na wszystkich Wydziałach działających w ramach Collegium Medicum UMK.

STAN OBECNY

Siedziba jednostki zmieniła ostatecznie swoją lokalizację w połowie lat 90-tych (wyprowadzka z gmachu Kliniki im. doktora A. Jurasza na ulicę Karłowicza), a obecnie Katedrę i Zakład Biochemii Klinicznej tworzy spory zespół współpracowników naukowych i dydaktycznych oraz personelu pomocniczego: kierownik prof. dr hab. n. biol. Ryszard Oliński, adiunkci: dr hab. n. med. Karol Białkowski, dr n. med. Tomasz Dzieman, dr n. med. Marek Foksiński, dr n. med. Daniel Gackowski, dr n. med. Rafał Różalski, dr n. med. Agnieszka Siomek, starszy wykładowca: dr n. med. Marek Jurgowiak, asystenci: mgr Ewelina Zarakowska i mgr Bartłomiej Kalinowski, a także st. specja-

lista mgr Teresa Olińska, st. technik mgr Anna Szpila, technik mgr Jolanta Guz, sekretariat: mgr Iwona Daszyńska i pracownik obsługi: Małgorzata Bejgrowicz (Fot. 1).

I... JEDNAK SIĘ UDAŁO

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej CM UMK jest jednym z kilku wiodących ośrodków, prowadzących badania nad uszkodzeniami oksydacyjnymi DNA oraz ich udziałem w procesach nowotworzenia. Wyrazem tego stanu rzeczy był aktywny udział Zespołu Katedry w realizacji projektów badawczych i liczne publikacje, tj. dwa granty w ramach Drugiego Polsko-Amerykańskiego Funduszu im. M. Skłodowskiej-Curie (lata 1993-1998); dwa granty finansowane przez Unię Europejską w V Ramowym programie UE: EUROFEDA i ESCODD (trzyletni okres działalności komitetu ESCODD, grupującego 30 europejskich zespołów badawczych wykazał, że laboratorium bydgoskie lokuje się w ścisłej czołówce europejskiej pod względem kompetencji oraz wiarygodności prowadzonych badań z zakresu oksydacyjnych uszkodzeń DNA); realizowany od maja 2005 roku grant w ramach VI Programu Ramowego Unii Europejskiej (w ramach Sieci Doskonałości Environmental Cancer risk, Nutri-

tion and Individual Susceptibility, ECNIS); dziewięć grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w tym udział w realizacji trzech grantów zamawianych w latach 2003-2006; duża liczba publikacji w renomowanych czasopiśmie naukowych. Jakościową ocenę opublikowanych prac opisują poniższe parametry. Łączny współczynnik przebiccia (Impact Factor) artykułów opublikowanych przez pracowników Katedry wynosi ponad 300. Liczba cytowanych prac z afiliacją Katedry w latach 1996-2007 wynosi około 2150, w tym w latach 2005-2007 ponad 850, a modny ostatnio współczynnik h, liczony od roku 1996, ma wartość 24 (zgodnie z bazą SCOPUS).

Pracownicy Katedry byli wielokrotnie nagradzani za osiągnięcia naukowe, otrzymując siedmiokrotnie nagrody Ministra Zdrowia, dwukrotnie Nagrodę Zespołu Nauk Medycznych PAN, a Ryszard Oliński jest laureatem subsydium profesorskiego FNP (obecnie program Mistrz). Ponadto, doktorzy Daniel Gackowski, Rafał Różalski i Agnieszka Siomek są stypendystami Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (Program Start).

PRZEDMIOT I GŁÓWNE KIERUNKI BADAŃ

Szeroko pojęta biochemia reaktywnych form tlenu (RFT), w tym wolnych rodników tlenowych (WRT), to jedno z najciekawszych zagadnień współczesnej biologii molekularnej i medycyny. Udział reaktywnych form tlenu w procesie kancerogenezy jest obecnie bogato udokumentowany, a wkład naszego Zespołu w tym zakresie jest dość pokaźny.

Ze względu na duży potencjał mutageny szczególnie znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórki mogą mieć oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe. Na niebagatelną rolę, jaką mogą odgrywać takie modyfikacje w procesie kancerogenezy u człowieka, wskazują wyniki naszych badań, opublikowanych na początku lat 90-tych ubiegłego wieku, w których wykazano znacznie podwyższoną zawartość oksydacyjnych uszkodzeń DNA w tkankach nowotworowych pobranych od chorych na różne typy nowotworów, w porównaniu z tkanką obrzeża, wolną od zmian patologicznych [1]. Były to pierwsze

takie badania w literaturze światowej, a ich wyniki potwierdzono później przez liczne ośrodki na świecie (pod hasłem „oxidative DNA damage and cancer”, można znaleźć blisko 2000 artykułów w bazie PubMed). Jednym z rodzajów nowotworów indukowanych przez wolne rodniki jest rak płuc. Wiadomo obecnie, że 90% przypadków raka płuc powiązanych jest z paleniem tytoniu. Zaobserwowany fakt pozwolił na stosunkowo precyzyjne ustalenie przedziału czasowego, jaki upływa od chwili ekspozycji na czynnik rakotwórczy do momentu pojawienia się w pełni uformowanego guza. Dla dużej liczby przypadków jest to okres nawet około trzydziestu lat. Wiadomo też, że niezbędna jest stała ekspozycja na czynnik kancerogeny ponieważ, jak wykazano, rezygnacja z nałogu palenia tytoniu znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby. Przepuszczalnie pod wpływem dymu tytoniowego (zawartych w nim składników) zachodzi cała seria zmian niezbędnych do progresji przemian nowotworowych w komórce. Jednym z rodzajów takich zmian mogą być oksydacyjne uszkodzenia komórkowego DNA, indukowane przez wolne rodniki tlenowe. Wiadomo jednak, że rak płuc występuje „tylko” u około 15% palaczy. Przepuszcza się więc, że predyspozycje genetyczne decydują o selekcji. Jednym z najbardziej prawdopodobnych parametrów, który może decydować o wystąpieniu choroby nowotworowej jest wydajność naprawy uszkodzeń DNA.

Wspólnie z Zespołem Pani profesor Barbary Tudek oraz profesora Janusza Kuśmierka z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, przeprowadziliśmy badania oksydacyjnych uszkodzeń DNA u osób chorych na nowotwory płuc i u osób w grupie kontrolnej. Wyniki tych badań opublikowane w czasopiśmie Cancer Research i Journal of National Cancer Institute [2,3] pokazują, że takie kompleksowe analizy mogą wskazać osoby z większym, uwarunkowanym genetycznie, ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej płuc. Takie osoby powinny bezwzględnie zrezygnować z palenia tytoniu.

Szeroko rozpowszechnione jest obecnie przekonanie, że dieta bezpośrednio moduluje ryzyko występowania nowotworów. Takie działanie

mają zawarte w diecie antyoksydanty. Jednym z możliwych mechanizmów ochronnego działania warzyw i owoców może być właśnie duży potencjał antyoksydacyjny takich składników, jak witaminy A, C i E. Antyoksydanty te są bowiem efektywnymi zmiataczami wolnych rodników i potencjalnie powinny chronić DNA komórek przed uszkodzeniami tlenowymi. W naszych badaniach skoncentrowaliśmy się na analizie szerokiego spektrum znaczników oksydacyjnych uszkodzeń DNA leukocytów (poziom 8-oksoguanozyny), zawartości produktów naprawy DNA, takich jak 8-oksoguanozyna, 8-oksoguanina i 5-hydroksymetylouracyl w moczu i zależnego od diety i biodostępności poziomu niskocząsteczkowych antyoksydantów we krwi (witamina A, C i E, kwas moczowy). Wyniki przeprowadzonych w naszej placówce analiz wykazały znamiennej statystycznie zależność pomiędzy wzrostem poziomu uszkodzeń DNA a spadkiem poziomu antyoksydantów [4]. Uzyskane przez nas dane wskazują, że podstawowa zawartość witamin A, C i E może wpływać na poziom potencjalnie mutagennych uszkodzeń DNA; poziom tych witamin zależy nie tylko od diety, ale prawdopodobnie od ich biodostępności (wchłaniania), która może być genetycznie uwarunkowana.

W sezonie zima – wczesna wiosna owoce i warzywa, będące źródłem witamin są znacznie droższe i, co nie mniej ważne, uboższe w nietrwałą witaminę C (prawdopodobnie również w inne antyoksydanty). Przeprowadziliśmy zatem analizy witamin antyoksydacyjnych oraz parametrów opisujących oksydacyjne uszkodzenia DNA w różnych porach roku. Wyniki uzyskane przez nas wskazują na sezonowe fluktuacje obu rodzajów parametrów, najsilniej zaznaczone dla α -tokoferolu i 8-oksoguanozyny. Zwraca tu uwagę bardzo symetryczne odwzorowanie spadku antyoksydantów i wzrostu oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Ryc. 1).

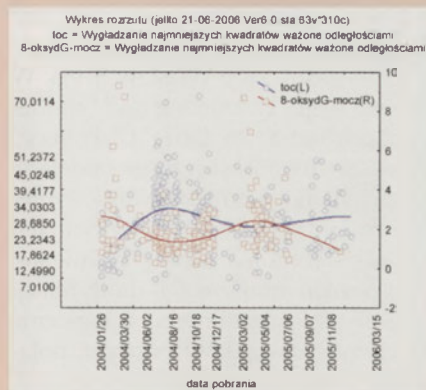
Patogeneza miażdżycy to także jeden z wiodących tematów współczesnej medycyny i pole naszych zainteresowań badawczych. Ostatnio pojawiły się dane doświadczalne dotyczące udziału reaktywnych form tlenu w patogenezie miażdżycy i wskazujące

na szok tlenowy, jako jeden z czynników sprawczych tej choroby. Również opublikowane przez nas dane doświadczalne wskazują, że jednym z czynników mutagennych prowadzących do rozwoju miażdżycy mogą być oksydacyjne uszkodzenia DNA. U chorych na miażdżycę symptomy szoku tlenowego podkreśla bardzo wysoka zawartość 8-oksoguanozyny w DNA limfocytów i spadek poziomu witamin antyoksydacyjnych [5,6].

GŁOS W DYSKUSJI

Należy obecnie przyjąć, że stres oksydacyjny może towarzyszyć większości patologii człowieka, ponieważ nieodłącznie towarzyszy stanom zapalnym. Jest on jednak zazwyczaj skutkiem, a nie pierwotną przyczyną choroby. Relacje między zaburzeniami metabolizmu, zmianami poziomu wytwarzania reaktywnych form tlenu i procesami chorobowymi mają najczęściej bardzo różnorodny charakter. Bezpośredni udział wolnych rodników w patogenezie zdecydowanej większości patologii jest ciągle kontrowersyjny (dokładniejsze omówienie sygnalizowanych tutaj problemów można znaleźć w naszych pracach przeglądowych [5,7]). Jedno z fundamentalnych pytań, na które w dalszym ciągu brak jest jednoznacznej odpowiedzi, brzmi czy oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą inicjować proces chorobowy, czy też są jego skutkiem?

Niezmiernie trudno jest zaplanować doświadczenie, które w bezsporny sposób wskazałoby na reaktywne formy tlenu jako czynnik sprawczy jakiegokolwiek patologii. Używając języka prawniczego należałoby stwierdzić, że badania takie przypominają



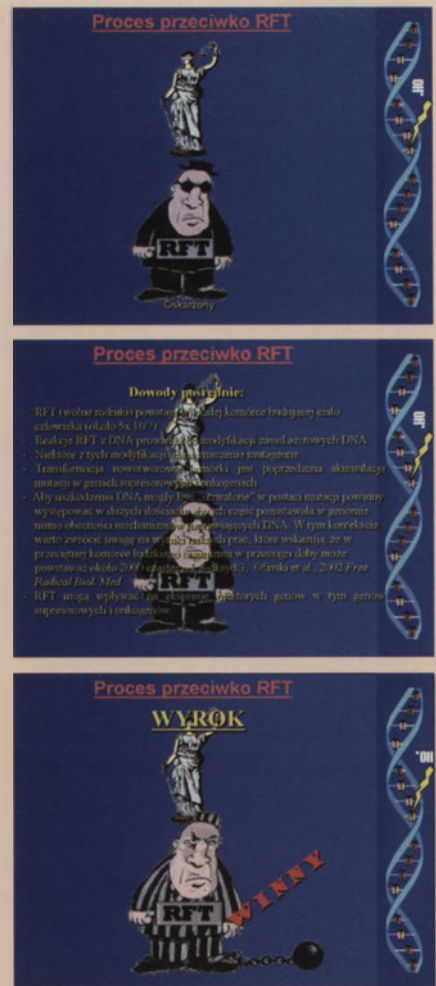
Rycina 1. Sezonowe zmiany zawartości α-tokoferolu i 8-oksoguanozyny.

raczej niezwykle zagmatwany proces poszlakowy. W takiej sytuacji liczba poszlak zdecydowanie przyczynia się do prawidłowego wskazania sprawcy. Stąd też uważamy, że nowotwory są jedyną grupą chorób, w których liczba poszlak i dowodów pośrednich wskazuje jednoznacznie na udział reaktywnych form tlenu w jej patogenezie. W związku z tym obiektywna ława przysięgłych nie miałaby problemów z wydaniem wyroku skazującego. Może to dość obrazowo opisać poniżej prezentowana próbka komiksowa, która w uproszczony, ale działający na wyobraźnię sposób problem ten podsumowuje (Ryc. 2).

NA ZAKOŃCZENIE

O tym, że tlen jest niezbędny do życia nikogo nie trzeba przekonywać. W naszych rozważaniach staraliśmy się przekonać, że tlen ma również drugą, bardziej mroczną twarz, reprezentowaną przez powstające w wyniku jego przemian reaktywne formy tlenu. Ta podwójna natura O_2 jest naszym zdaniem dobrze określona w słowach zaczerpniętych z dzieła klasyka literatury, jakim bez wątpienia jest „Czarodziejska góra” Tomasza Manna: „W świecie materii rzeczy mają się tak, że każde ciało kryje w sobie zarazem życie i śmierć; wszystko jest jednocześnie lekarstwem i trucizną, toksykologia i farmakologia są jednym i tym samym, bo trucizna ma właściwości lecznicze, a to co uchodzi za życiodajne, zabija w pewnych warunkach”.

Niedługa historia Katedry i Zakładu Biochemii Klinicznej CM UMK obfitowała podjęciem licznych badań kontynuowanych do dzisiaj, a dotyczących patogennej roli reaktywnych form tlenu i udziału oksydacyjnych uszkodzeń DNA w przebiegu niektórych chorób człowieka. Nasze badania dotyczyły także roli reaktywnych form tlenu w procesach starzenia [8] i ich metabolizmu w okresie wczesnego rozwoju organizmów [9]. Nie bez znaczenia jest także popularyzacja tej wiedzy, a liczne artykuły autorstwa naszych pracowników pozwalają na zapoznanie się z problematyką biologii reaktywnych form tlenu również szerokiemu gronu czytelników nie-specjalistów i specjalizujących się w innych dziedzinach biologii i medycyny.



Rycina 2. Proces przeciwko RFT wytoczono w związku z podejrzeniem o ich udział w patogenezie chorób nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- Oliński R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. FEBS Lett 309: 193-198
- Gackowski D, Speina E, Zielińska M, Kowalewski J, Różalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Oliński R (2003) Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. Cancer Res 63: 4899-4902
- Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, Zielińska M, Siomek A, Kowalewski J, Oliński R, Tudek B, Kuśmierz JT (2005) Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. J Natl Cancer Inst 97: 384-395
- Foksiński M, Gackowski D, Różalski R, Siomek A, Guz J, Szpila A, Dziaman T, Oliński R (2007) Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. Eur J Nutr 46: 174-180
- Oliński R, Gackowski D, Foksiński M, Różalski R, Roszkowski K, Jaruga P (2002) Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and

acquired immunodeficiency syndrome. *Free Rad Biol Med* 33: 192-200

- Gackowski D, Kruszewski M, Jawień A, Ciecierski M, Oliński R (2001) Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. *Free Rad Biol Med* 31: 542-547
- Oliński R, Jurgowiak M. Uszkodzenia DNA

przez wolne rodniki tlenowe- konsekwencje biologiczne i implikacje kliniczne W: Na pograniczu chemii i biologii (Koroniak H, Barciszewski J red) Tom VII, Poznań 2003, 11-44

- Siomek A, Gackowski D, Różalski R, Dziaman T, Szpila A, Guz J, Oliński R (2007) Higher leucocyte 8-oxo7,8-dihydro-2-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate

in aging humans? *Antioxid Redox Signal* 9: 143-150

- Dziaman T, Gackowski D, Różalski R, Siomek A, Szulczyński J, Zabielski R, Oliński R (2007) Urinary excretion rates of 8-oxoGua and 8-oxoG and antioxidant vitamins level as a measure oxidative status in healthy, full-term newborns. *Free Radic Res* 41: 997-1004

GLIWICE SCIENTIFIC MEETINGS 16-17.11.2007 R.

W dniach 16-17 listopada 2007 odbyła się kolejna edycja corocznych Gliwickich Spotkań Naukowych. Tegoroczna konferencja była już jedenastą w cyklu rozpoczętym w 1997 roku (Fot. 1). W tegorocznej konferencji uczestniczyły 173 osoby, w tym 27 z Wielkiej Brytanii, Francji, Danii, Norwegii, Niemiec, Ukrainy, Białorusi, USA i Kanady. Program konferencji, noszącej ogólną nazwę „Molecular Biology and Bioinformatics in Cancer Diagnostics and Therapy”, obejmował 39 referatów zgrupowanych w kilku sesjach. Na prośbę organizatorów, przewodniczący poszczególnych sesji przekazali nam swoje refleksje.



Fotografia 1. Otwarcie konferencji „Gliwickie Spotkania Naukowe 2007” – profesor Joanna Rzeszowska i docent Piotr Widlak.

Sesja I. Modeling and Synthetic Approaches in Drug Discovery. Część A. Przewodniczący Jarosław Polański. Nowe leki można uzyskać w drodze zaprojektowania na poziomie cząsteczkowym, w wyniku przypadkowego odkrycia lub w rezultacie badań przesiewowych na wielką skalę. Oczywisty priorytet posiadają metody racjonalnego projektowania leków. Taki tok rozumowania umożliwił w dzisiejszej dobie zupełnie nowe podejście do projektowania leków, czego dobrym przykładem są bio- oraz chemioinformatyka, jak również pro-

teomika. Z drugiej strony należy mieć na uwadze, że synteza organiczna jest w praktyce częstokroć kłopotliwa i nierzadko stanowi wąskie gardło procesu uzyskania leku.

Johann Gasteiger (Computer-Chemie-Centrum, Uniwersytet Erlangen-Nuremberg, Niemcy), który otrzymał nagrodę Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego za swój wkład w zastosowanie metod informatycznych w chemicznej i farmakologicznej problematyce badawczej, jest jednym z pionierów wdrażania w tych dziedzinach względnie prostych metod obliczeniowych. W swojej prezentacji pt. „Explorations into Biochemical Pathways” autor naszkicował złożoność systemu przemian biochemicznych w żywych organizmach. Żeby tylko zilustrować wydajność tej prawdziwej fabryki wystarczy przypomnieć, że w organizmie człowieka powstaje dziennie około 75 kg ATP. Czy chemioinformatyka może być pomocna w badaniach nad systemem tych przemian? Jak go modelować? Jak przechowywać i odszukiwać zebrane dane? Jak klasyfikować enzymy? Autor wraz ze swym zespołem przedstawił w postaci bazy danych reakcji (uzupełnionej o informacje dodatkowe) plakat o nazwie „Biochemical Pathways”, rozpowszechniany początkowo przez firmę Boehringer Mannheim (obecnie Roche). Utworzona baza danych umożliwi znacznie głębszy wgląd w mechanizmy reakcji składających się na szlaki biochemiczne. Może służyć również do wyciągania wniosków dotyczących metabolizmu związków. Z kolei Beata Walczak (Uniwersytet Śląski w Katowicach), która jest ekspertem w dziedzinie przetwarzania danych wielowymiarowych, przygotowała doskonały wykład pokazujący integralne podejście „start-to-end” do analizy danych proteomicznych.

Złożoność natury takich danych wymaga bowiem stosowania bardzo skrupulatnych metod analizy. Jarosław Polański (Uniwersytet Śląski w Katowicach) przedstawił drogę „od danych do leku”. Stosowane metody terapii zakażenia wirusem HIV oparte są na wykorzystaniu własności odwrotnej transkryptazy i proteazy. W chwili obecnej nie posiadamy zarejestrowanego leku skierowanego przeciwko integracji. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia, w wyniku badań przesiewowych ponad 250 tysięcy związków, które przeprowadziła firma Merck, odkryto tzw. inhibitory diketokwasów (Raltegravir jest związkiem będącym obecnie w fazie III badań klinicznych). Inhibitory integrazy zostały również zaprojektowane i zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego. Autor przedyskutował zastosowanie Analizy Porównawczej Powierzchni Cząsteczkowej do oceny zebranych danych molekularnych. Pomimo, że droga od zebrania takich danych do wytworzenia leków wydaje się wyboista, to jasnym jest, że chemioinformatyka okazała się pomocna w uzyskaniu szeregu nowych, aktywnych terapeutycznie inhibitorów.

Sesja I. Modeling and Synthetic Approaches in Drug Discovery. Część B. Przewodniczący Wiesław Szeja: W ramach sesji I „Modeling and Synthetic Approaches in Drug Discovery” przedstawiono współczesne podejście do racjonalnego projektowania, syntezy i badań aktywności potencjalnych leków. Szczególną uwagę kierowano na szerokie możliwości modyfikacji właściwości naturalnych biologicznie aktywnych związków poprzez połączenie z grupami cukrowymi.

Bogdan Lesyng (Uniwersytet Warszawski) przedstawił zasady

modelowania oddziaływań biopolimer (enzym, receptor komórkowy, kwas nukleinowy) – glikokoniugaty pochodne związków naturalnych. Wyniki badań aktywności biologicznej zaprojektowanych związków potwierdzają zasadność takiego podejścia do projektowania leków. Dla przykładu inhibitory kinaz modelowane w grupie Bogdana Lesynga i syntetyzowane w zespole Wiesława Szeja efektywnie hamują proliferację komórek nowotworowych. Waldemar Priebe i Timothy Madden (MD Anderson Cancer Center, Houston, USA) omówili wyniki badań klinicznych z użyciem leków antracyklinowych modyfikowanych w części cukrowej. Na licznych przykładach pokazali dramatyczne zmiany aktywności związków w wyniku funkcjonalizacji grup wodorotlenowych. Jeden ze związków jest kandydatem na pierwszy lek do zastosowania w chemoterapii nowotworów mózgu. Grzegorz Gryniewicz (Instytut Farmaceutyczny w Warszawie) omówił na licznych przykładach jak zmienia się aktywność biologiczna związków naturalnych po przeprowadzeniu w glikokozydy. Wiesław Szeja przedstawił nowe rozwiązania syntetyczne pozwalające na stereoselektywne utworzenie wiązania glikozydowego i ich aplikacje w odniesieniu do naturalnych biologicznie aktywnych izoflawonów, nukleozydów. Wyniki badań wskazują na potencjalne możliwości zastosowania syntetyzowanych związków jako leków przeciwwirusowych i antynowotworowych. Prezentowane prace dobrze udokumentowały nowe możliwości projektowania i badania leków poprzez optymalizację struktury cukru w glikokoniugacie.

Sesja II. Ion Channels in Biology and Medicine. Przewodniczący Stanisław Przystański (Fot. 2), relację przygoto-



Fotografia 2. Profesor Stanisław Przystański.

wał Zbigniew Grzywna: Sesja II została zorganizowana przez Zbigniewa J. Grzywnę z Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Wykłady wygłosiło 6-ciu zaproszonych badaczy, dwoje z Imperial College w Londynie, jeden z University of California (Irvine, USA) oraz trzech Polaków. Wszystkie wystąpienia dotyczyły kanałów jonowych; niektóre związku kanałów z przerzutowością komórek rakowych (piersi, prostaty). Pierwszy wykład Mustafy B. A. Djamgoza (Fot. 3) z



Fotografia 3. Profesor Mustafa B. A. Djamgoz.

Imperial College dotyczył przede wszystkim kanałów sodowych, możliwości ich badania, a jednocześnie przedstawił ostatnie wyniki i osiągnięcia autora dotyczące badań nad komórkami nowotworowymi piersi oraz prostaty. Mustafa B. A. Djamgoz zaprezentował nową metodę wczesnego diagnozowania raka opartą o badanie poziomu syntezy kanałów sodowych w tkance. Zainteresowani słuchacze zadawali wiele pytań, ale z powodu ograniczonego czasu część dyskusji przeniosła się do kularów. Kolejne wykłady prezentowały już wybrane aspekty problemu. I tak zaprezentowano zarówno podejście eksperymentatora (Maria Mycielska), jak również teoretyka – biofizyka (Zbigniew Grzywna). Ponadto Jerzy Mozrzyk przedstawił zagadnienia opisu synaps nerwowych, a Steven White kanały jonowe w ujęciu dynamiki molekularnej. Ostatni wykład w sesji wygłosił Krzysztof Dołowy (SGGW, Warszawa); wykład dotyczył kanału chlorkowego i jego udziału w postawianiu różnych schorzeń i dysfunkcji.

Sesja III Biotechnologies. Część A. Genomics and Proteomics in Medicine. Przewodniczący Piotr Widłak.

Część B. Biomaterials for Regenerative Medicine. Przewodniczący Aleksander L. Sieroń (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach). Medycyna regeneracyjna jest dziedziną, która odnosi szczególne osiągnięcia w ostatnich kilku latach. Dotyczy to zarówno wprowadzania na rynek coraz to nowych produktów wykorzystywanych w rekonstrukcji ubytków tkanek, a także postępu w poznaniu i lepszym rozumieniu biologii komórek oraz zasad ich komunikacji między sobą i z/lub poprzez otaczające środowisko pozakomórkowe. W części skupiono się na biomateriałach dla medycyny regeneracyjnej. Przewodniczący sesji, po wprowadzeniu w tematykę biologii macierzy pozakomórkowej, przedstawił możliwości inżynierii genetycznej w zakresie otrzymywania zmodyfikowanych kolagenów do określania właściwości biofizycznych i biologicznych kolagenów włóknkowych. Wykorzystanie tej wiedzy już znalazło zastosowanie w przygotowaniu technologii leczenia schorzeń genetycznych, takich jak wrodzona łamliwość kości, a także wytworzenia trójwymiarowych szkieletów do hodowli komórek macierzystych zarówno adherentnych, jak i zróżnicowanych fibroblastów, co zostało szerzej przedstawione w referacie Anny Szydło (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach). Perspektywy w zakresie budowy tkanek dla medycyny regeneracyjnej z wykorzystaniem pluripotencyjnych komórek typu zarodkowego przedstawiono na przykładzie charakterystyki i poszukiwania markerów swoistego różnicowania w ścieżce sygnałowej Notch (Ksymena Urbanek, Śląski Uniwersytet Medyczny, Fot. 4). Syntezę i charakterystykę fizykochemiczną nowych polimerów biokompatybilnych



Fotografia 4. Doktor Ksymena Urbanek.

i biodegradowalnych oraz ich wykorzystanie jako nośników leków i do budowy szkieletów przestrzennych omówił Marek Kowalczyk (Centrum Polimerów i Materiałów Węglowych, PAN, Zabrze). Wystąpienie zaproszonego z CNRS/Uniwersytet Lyon, Francja, Davida Hulmes'a poświęcone było produkcji ekwiwalentu rogowki. Zespołowi prelegenta powiodła się próba wyprodukowania zębca macierzy stromalnej odwzorowującej niemal idealnie macierz rogowki oka człowieka oraz umieszczenia w niej po obydwu stronach, w sposób taki jak w warunkach naturalnych, komórek nabłonkowych i śródbłonkowych. Uzyskany w ten sposób ekwiwalent rogowki przechodzi obecnie próby na zwierzętach. W drugiej części swego wystąpienia David Hulmes przedstawił wyniki prac swego zespołu, które wyznaczają nowy cel terapeutyczny w leczeniu schorzeń zwłóknieniowych, takich jak twardzina, zwłóknienia wątroby itp. Wszystkie przedstawione referaty były żywo dyskutowane przez słuchaczy i jedynie ograniczony czas przeznaczony na tę część sesji nie pozwolił na obszerniejszą dyskusję przedstawionych w wystąpieniach problemów.

Sesja IV: New Trends in Cancer Diagnostics and Therapy. Część A. Przewodnicząca Barbara Tudek: Sesja ta była dość zróżnicowana pod względem tematycznym. Thoralf Christoffersen oraz Dagny Sandness (Uniwersytet Oslo, Norwegia) przedstawili nowe badania nad sygnalizacją poprzez receptory związane z białkami G oraz receptory prostaglandynowe. Oba te szlaki są ze sobą powiązane, a stymulacja szlaku zależnego od receptora naskórkowego czynnika wzrostu powoduje indukcję syntezy cyklooksygenazy 2. Zaobserwowano, że komórka adaptuje się do odebranego sygnału i następny, taki sam bodziec od receptora EGF, znacznie wzmacnia odpowiedź prostaglandynowego szlaku sygnalizacyjnego. Raisa Smolyakova (N.N. Aleksandrov Institute of Oncology and Medical Radiology, Mińsk, Białoruś) przedstawiła szeroko zakrojone poszukiwania markerów prognostycznych w nowotworach sutka. Barbara Tudek (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, Fot. 5) pokazała, że deficyt naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA może być



Fotografia 5. Profesor Barbara Tudek.

jednym z czynników ryzyka rozwoju raka płuca i jelita grubego. Rozwój różnych histologicznych typów raka płuca związany jest z obniżeniem naprawy uszkodzeń DNA powstających różnymi drogami, bądź wskutek bezpośredniego utlenienia zasad (rak płaskonabłonkowy), bądź wskutek addycji produktów peroksydacji lipidów do zasad DNA (rak gruczolowy). Na szybkość naprawy ogromny wpływ mają polimorfizmy występujące jednocześnie w dwóch genach naprawczych (OGG1 i XRCC1). Największym zainteresowaniem cieszyły się prezentacje Carmel Mothersill oraz Colina Seymoura (McMaster University, Hamilton, Canada). Ich badania dotyczyły efektu sąsiada (tzw. bystander effect). Naświetlenie komórek, a nawet całych organizmów (ryby) promieniowaniem jonizującym powoduje uwolnienie do środowiska wodnego substancji, które są w stanie wywołać efekt toksyczny w komórkach i organizmach nie naświetlonych przeniesionych do medium, w którym uprzednio przebywały organizmy naświetlone. W komórkach tych obserwuje się uszkodzenia DNA, apoptozę, stymulację syntezy niektórych białek i inne efekty. Natura sygnału przekazywanego przez komórki poddane promieniowaniu jonizującemu nie jest poznana. Wydaje się, że przynajmniej częściowo sygnał przekazywany jest przez kanały wapniowe. Efekt sąsiada może zwiększać toksyczność radioterapii dla całego organizmu. Badania Dr Mothersill i Dr Seymoura skupiają się również na poszukiwaniu związków zmniejszających ten efekt.

Sesja IV: New Trends in Cancer Diagnostics and Therapy. Część B. Przewodniczący Marek Los: Gliwickie Spotkania Naukowe przekształciły się z nieformalnej imprezy skupiającej

wąskie grono głównie polskich naukowców w dojrzałą imprezę naukową, która jest w stanie przyciągnąć czołowych naukowców ze światowej sławy ośrodków, jak na przykład San Diego (Burnham Institute, La Jolla), London (Imperial College), Heidelberg (Univ. Med. Clinic), Dallas (MD Anderson Cancer Res. Center), Hamilton, (McMaster Univ.) i wiele innych. Mimo światowego poziomu, impreza nie straciła swojego dawnego nieformalnego charakteru, co jest w dużej mierze zasługą jej organizatorów, przede wszystkim Pani profesor Rzeszowskiej-Wolny, która z typową polską gościnnością przyjmuje delegatów i stara się nie tylko o wysoki poziom naukowy imprezy, ale również o odpowiednią reklamę polskiego dziedzictwa kulturowego, poprzez organizowanie wycieczek do pobliskich centrów kulturowych. Na bardzo swobodny klimat imprezy zwracali uwagę przede wszystkim niektórzy goście z ośrodków zachodnich i zapowiadali, że przy najbliższej okazji bardzo chętnie przyjechaliby na konferencję ze swoimi studentami, gdyż jak twierdzili, „Gliwickie Spotkania Naukowe zapewniają optymalne warunki do swobodnej wymiany poglądów oraz rozwijania współpracy, a wszystko to bez przepychu drogich hoteli i z wpisowym w rozsądnej cenie”. Jak na każdej konferencji, zwłaszcza multidyscyplinarnej, poziom wykładów był zróżnicowany, gdzie obok światowej sławy doskonale przygotowanych prelegentów mieli możliwość zaprezentowania się (i podpatrzenia) również młodzi naukowcy, a także koledzy z Europy Wschodniej. Z zaskoczeniem odnotowano duży postęp zwłaszcza w dziedzinie bioinformatyki. Podczas gdy w przeszłości prezentowano głównie nieśmiało próby modelowania stosunkowo prostych procesów biologicznych, tym razem modele matematyczne, dość zresztą wiernie, opisywały skomplikowane zależności występujące np. w ścieżkach sygnałowych odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego oraz programowanej śmierci komórki (apoptozy), gdy zmienny był np. stopień uszkodzenia DNA lub szybkość naprawy uszkodzeń kodu genetycznego. Duże wrażenie wywarł szczególnie wykład Mustafy B. A. Djamgoza (Imperial College, Lon-

don) na temat roli kanałów sodowych w fenotypie złośliwości komórek nowotworowych, jak również wykład Adama Godzika (La Jolla, California) na temat metagenomiki, czyli analizy "garniturów genetycznych" całych biotopów, a nie jak do tej pory pojedynczych organizmów. Oba wykłady, jak również tandem wykładów na temat "bystander effect" wygłoszonych przez Carmel Mothersill i Colina Seymoura (McMaster University), zdominowały dyskusje w kularach. Podkreślano tutaj przede wszystkim innowacyjność tych projektów, ale również w przypadku "bystander effect" pewien niedosyt charakterystyki zachodzących w układzie eksperymentalnym procesów. Podobała się również sesja prowadzona przez Aleksandra L. Sieronia z Katowic, który zamiast "chwalić" się własnymi wynikami dał wykład wprowadzający do tematów sesji, podczas gdy wybrane projekty z jego ośrodka były przedstawione przez młodszych pracowników naukowych.

W tej części sesji "New Trends in Cancer Diagnostic and Therapy" Walter Mier (Universitätsklinikum, Heidelberg, Fot. 6) przedstawił m.in. nowe trendy w zakresie diagnostyki



Fotografia 6. Profesor Walter Mier.

nowotworów, jak różne markery do PET. Marek Los przedstawił po raz pierwszy nowo odkryte przez jego zespół białko z rodziny defensyn, które ma selektywne własności przeciwnowotworowe. Pozostałe wykłady koncentrowały się na bioinformatyce (Maciej Giefing z Instytutu Genetyki Człowieka w Poznaniu - macierze-GCH, nowy program do wyszukiwania aktywnych elementów w promotorach genowych; Krzysztof Puszyński z Politechniki Śląskiej w Gliwicach, modelowanie ścieżek sygnałowych MDM2/p53, a także wpływ na te ścieżki PI3-K/Akt). Zaskoczeniem

była duża frekwencja na wszystkich sesjach, łącznie z ostatnią, co nie zawsze ma miejsce na innych, nawet bardziej renomowanych spotkaniach naukowych. Konferencja ta na pewno przyczyniła się nie tylko do edukacji młodszego pokolenia i pogłębiania współpracy między polskimi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi, ale przede wszystkim zburzenia stereotypów o polskiej nauce jako czymś nie całkiem jeszcze na poziomie europejskim.



Fotografia 7. Ceremonia wręczenia I-szej nagrody za najlepszy plakat prezentowany na Konferencji. Od lewej: trzymający nagrody - Jakub Hanus, pracownik Zakładu Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej; Juliusz Unrug - przedstawiciel firmy Roche Diagnostics, Polska; Mykola Chekan, laureat I-szej nagrody za plakat „Cell adhesion proteins expression in papillary thyroid cancer”; Joanna Rzeszowska, przewodnicząca komitetu organizacyjnego Gliwickich Spotkań Naukowych.

WYDARZENIA - OPINIE - KOMENTARZE

Premier Donald Tusk oświadczył w expose, że polityka odważnego inwestowania w badania, zwiększenie ich konkurencyjności oraz stworzenie możliwości ich bezpośredniego wykorzystania w gospodarce będzie priorytetem rządu. Zapowiedział, iż dla osiągnięcia tych celów zmienione zostaną mechanizmy finansowania nauki, a samo finansowanie będzie zharmonizowane z polityką badań i innowacji Unii Europejskiej. Zapowiedział też zwiększenie wydatków na badania naukowe oraz zwiększenie autonomii i konkurencyjności uczelni państwowych i niepaństwowych. Według Premiera RP sposób finansowania szkolnictwa wyższego będzie promować kierunki studiów najwyższej jakości.

W latach 2007-2013 MNiSW będzie dysponentem środków z funduszy strukturalnych, które przyczynią się do wzrostu konkurencyjności polskiej nauki, m.in. poprzez wspieranie karier młodych naukowców, poprawę jako-

ści infrastruktury badawczej, zwiększenie dostępu ośrodków naukowych do zaawansowanych technologii informatycznych. Kształcenie w szkołach wyższych zostanie dostosowane do potrzeb nowoczesnej gospodarki opartej na wiedzy i zmieniających się wymogów rynku pracy. Do wykorzystania w ramach trzech Programów Operacyjnych (PO Innowacyjna Gospodarka, PO Infrastruktura i Środowisko, PO Kapitał Ludzki) są ponad 4 miliardy euro. Beneficjentami środków finansowych w ramach PO Kapitał Ludzki będą m.in. szkoły wyższe i studenci. Jedno z działań priorytetu IV (4.1) zakłada wzmocnienie i rozwój potencjału dydaktycznego uczelni oraz zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki. Niemal 900 milionów euro zostanie przeznaczony na sfinansowanie projektów, dzięki którym powstaną nowe kierunki studiów, w tym także podyplomowe i doktoranc-

kie. Pełna informacja na stronie www.nauka.gov.pl

W 2007 r. został zaprezentowany i trafił do konsultacji środowiskowej projekt nowelizacji obowiązującej obecnie ustawy **Prawo o szkolnictwie wyższym**. Jest dostępny na stronach internetowych MNiSW. Projekt zakłada m.in. zwiększenie autonomii dużych uczelni (posiadających ponad 100 prof. tytularnych i 10 uprawnień do habilitacji) i zwiększenie dotacji dla nich, proponuje porozumienia akredytacyjne, delegowanie kadry, zamawiane kształcenie studentów, zakłada wzmocnienie nadzoru, eliminację zjawisk patologicznych, dowartościowanie habilitacji i doktoratu. W niektórych kwestiach, np. nazw uczelni, przyjmuje rozwiązania wariantowe. Większość zaproponowanych rozwiązań zyskało akceptację prezydium KRASP, natomiast szereg uwag zgłosiły KRZaSP i Parlament Studentów. Ministerstwo chciałoby,

aby do końca bieżącego roku projekt trafił do parlamentu, a od kolejnego roku akademickiego zmiany weszły w życie.

Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) ma Radę. 18 września 2007 r. minister nauki powołał Radę NCBR. W skład Rady Centrum wchodzi: sześciu przedstawicieli powołanych spośród kandydatów wskazanych przez środowiska naukowe, reprezentujących uczelnie, PAN i jednostki badawczo - rozwojowe (są to obecnie **prof. Marek Chmielewski** z Instytutu Chemii Organicznej PAN, zastępca przewodniczącego Wydziału III Nauk Matematycznych, Fizycznych i Chemicznych PAN - kandydatura wysunięta przez PAN; **prof. Jan Gawęcki** z Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, członek Rady FNP - kandydatura wysunięta przez KRASP; **prof. Marek Jeżabek** z Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie; **prof. Janusz Rachoń** z Politechniki Gdańskiej - kandydatura wysunięta przez KRASP; **prof. Leszek Rafalski** z Instytutu Badawczego Dróg i Mostów, przewodniczący Rady Głównej JBR; **prof. Maciej Zalewski** z Międzynarodowego Centrum Ekologii PAN - kandydatura wysunięta przez PAN); sześciu przedstawicieli powołanych spośród kandydatów wskazanych przez środowiska gospodarcze i finansowe (wybrano **Marka Dareckiego**, prezesa Wytwórni Sprzętu Komunikacyjnego - PZL Rzeszów S.A., prezesa Zarządu Stowarzyszenia Grupy Przedsiębiorców Przemysłu Lotniczego „Dolina Lotnicza”, koordynatora Polskiej Platformy Technologicznej Lotnictwa; **prof. Piotra D. Moncarza** ze Stanford University, współzałożyciela firmy doradczej Exponent Inc., prezesa Rady Nadzorczej Elektrociepłowni w Żarnowcu; **Krystiana Patera**, członka Zarządu PKN Orlen, przedstawiciela PKN Orlen w zarządach Unipetrol Rafinerie a.s. oraz Chemopetrol a.s., członka Zarządu AB Mazeikiu Nafta; **Krzysztofa Pietraszkiewicza**, prezesa Związku Banków Polskich, przewodniczącego Rady Nadzorczej Biura Informacji Kredytowej S.A.; **dr Ludwika Sobolewskiego**, prezesa Zarządu Giełdy Papierów Wartościowych w Warszawie, przewodniczącego Rady Nadzorczej Krajowego Depozytu Pa-

pierów Wartościowych - kandydatura zgłoszona przez środowisko naukowe, **dr Krzysztofa Safina** z Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu, współzałożyciela i dyrektora Izby Przemysłowo-Handlowej w Legnicy; organizatora i byłego prorektora PWSZ w Legnicy, współzałożyciela i pierwszego prezydenta Lions Club Legnica - kandydatura wysunięta przez Konfederację Pracodawców Polskich); jeden przedstawiciel Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej; po jednym przedstawicielu administracji rządowej wyznaczonym przez ministrów właściwych do spraw nauki - **prof. Aleksander Wolszczan**, finansów publicznych, gospodarki - **prof. dr hab. Jan Szyszko**, środowiska - **dr Krzysztof Gulda**, rolnictwa - **prof. dr hab. Seweryn Kukuła**, rozwoju regionalnego - **dr Jacek Szczot**, zdrowia - **prof. dr hab. med. Kazimierz Roszkowski** - Śliż, budownictwa, gospodarki przestrzennej i mieszkaniowej, transportu i łączności - **prof. dr hab. Mirosław Chaberek** oraz przez Ministra Obrony Narodowej - **plk dr hab. inż. Zygmunt Mierczyk**. Dyrektor NCBR jest powoływany przez ministra właściwego ds. nauki spośród dwóch kandydatów wyłonionych w drodze konkursu przez Radę Centrum. Kadencja Dyrektora trwa 5 lat, ta sama osoba może pełnić funkcję Dyrektora nie dłużej niż przez dwie kadencje. Dyrektor kieruje działalnością Centrum i reprezentuje je na zewnątrz. **Pierwszym Dyrektorem Centrum** został **prof. Bogusław Smólski** (Fot. 1)



Fotografia 1. Profesor Bogusław Smólski.

powołany zgodnie z art. 29 ustawy o NCBR przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Dyrektor kieruje działalnością Centrum i reprezentuje je na zewnątrz, a w szczególności decyduje w sprawach związanych z organizowaniem działań naukowych

i prac rozwojowych oraz realizacją innych zadań Centrum. Jednym z **ustawowych zadań NCBR** jest wspieranie działań w obszarze mobilności kadr naukowych. Wzrost mobilności pracowników naukowych pracujących w różnych jednostkach naukowo-badawczych, jak i w przemyśle, w znacznej mierze ułatwia transfer wiedzy w Europie. W nauce polskiej otwiera się nowy rozdział - z kontekstem europejskim i przy powszechnym zrozumieniu, że konieczne jest finansowanie budżetowe dużych wieloletnich projektów, a równocześnie niezbędne wsparcie organizacji pozarządowych, takich jak FNP, które mogą szybko dawać pieniądze na realizację dobrze uzasadnionych pomysłów ludziom uznanym za dobrych.

Profesor Jacek Wysocki, kierownik Katedry Profilaktyki Zdrowotnej, prorektor Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, przewodniczący Polskiego Towarzystwa Wakcynologii, jest doskonałym menedżerem, zwolennikiem spłaszczenia hierarchicznej piramidy pracowników naukowych. W wywiadzie dla *Menedżera Zdrowia* (styczeń 2008) przedstawił jaką jest rola lidera zespołu naukowego w zdobywaniu funduszy, przypominając, że finanse uczelni pozwalają jedynie na *podtrzymanie przy życiu* jednostek badawczych. Twierdzi też, że jeszcze wielu naukowców na polskich uczelniach medycznych nie ma świadomości, że ich praca ma podłoże ekonomiczne i jest wkładem w rozwój gospodarczy kraju.

Bioprodukt - pierwszy w Polsce klaster działający na rynku żywności ekologicznej. Klasy to grupy przedsiębiorstw, instytucji i organizacji, powiązanych siecią zależności, często o charakterze nieformalnym. Inicjatorem utworzenia klastra jest grupa 20 producentów, przetwórców żywności ekologicznej oraz różnych instytucji zajmujących się np. promocją czy technologią żywności skupionych w spółce O!Eko. Powstanie klastra ma umożliwić stworzenie polskiej marki żywności ekologicznej, która będzie zauważalna na europejskim rynku. Pieniądże na organizację klastra - tj. zorganizowanie biura, zakupienia serwera, opracowanie strategii działania - wyłożyła Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości, która jest koordynatorem tych działań. Strategia dzia-

łania Bioproduktu opracowana jest do 2020 roku. Ideą jest wypromowanie Polski jako producenta żywności ekologicznej. Klaster będzie zachęcał właścicieli gospodarstw o powierzchni 5-15 hektarów (takich gospodarstw jest w naszym kraju 580 tys.) do przedstawienia się na produkcję ekologiczną. Zajmie się także organizowaniem centrów skupu i dystrybucji żywności oraz sprzedażą towarów na rynku europejskim. Planowane jest stworzenie nowych produktów ekologicznych przy współpracy ze SGGW. Eksperti Konfederacji Pracodawców Polskich zwracają uwagę, iż popularyzowanie ciekawych projektów klastrowych i wspieranie ich funduszami strukturalnymi może przyczynić się do wzrostu innowacyjności polskiej gospodarki.

Polski wynalazek - monitor hałasu, czyli układ do monitorowania hałasu w środowisku zewnętrznym - zdobył złoty medal na Międzynarodowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Technik „Brussels Eureka 2007”, które odbywały się w dniach 22-25 listopada 2007 r. w Brukseli. Monitor, wyposażony w pamięć cyfrową, przeznaczony jest do wykonywania długotrwałych pomiarów akustycznych w rozległym terenie dla oceny rozprzestrzeniania się hałasu w środowisku zewnętrznym i związanych z nim zagrożeń. Jest to bardzo przydatne np. w przedsiębiorstwach związanych z opracowaniem map akustycznych dużych obszarów. Ustawa „Prawo Ochrony Środowiska” z roku 2001 oraz - związana z tym obszarem zagadnień - dyrektywa Unii Europejskiej nr 202/49/WE - obligują do opracowania map akustycznych w pierwszej kolejności dla miast powyżej 250 tys. mieszkańców i w dalszej dla miast powyżej 100 tys. mieszkańców.

Po raz siódmy redakcja „Polityki” przyznała młodym naukowcom stypendia „Zostańcie z nami”. Na pracę badawczą każdy z 17 laureatów otrzymał portfel z 25 tysiącami złotych. W dziedzinie nauk przyrodniczych i matematyczno-fizycznych stypendia otrzymali: **dr inż. Anna Arutunow** (Fot. 2), absolwentka Politechniki Gdańskiej i AGH w Krakowie. Pracuje w Katedrze Elektrochemii, Korozji i Inżynierii Materiałowej PG. Zainteresowania naukowe laureatki skupiają się na problematyce ochrony mate-



Fotografia 2. Doktor Anna Arutunow.

riałów przed korozją oraz na fizykochemii powierzchni; **dr inż. Andrzej Chydziański**, adiunkt w Instytucie Informatyki Politechniki Śląskiej (praca naukowa laureata poświęcona jest modelowaniu i ocenie efektywności sieci komputerowych); **dr Wojciech Macyk**, adiunkt w Zakładzie Chemii Nieorganicznej na Wydziale Chemii UJ (po studiach doktoranckich na Uniwersytecie w Erlangen, pod kierunkiem prof. Horsta Kischka; rozprawa doktorska wyróżniona nagrodą firmy Staedtler oraz przyznaną co dwa lata nagrodą im. prof. Alberta Wellera za dysertację w dziedzinie fotochemii; dr Macyk interesuje się fotokatalizatorami heterogenicznymi, które mogą być użyteczne nie tylko w procesach detoksykacji wody i powietrza, ale można je wykorzystać również do niszczenia komórek nowotworowych i mikroorganizmów); **dr Szymon Pustelny**, asystent na Wydziale Fizyki UJ (zajmuje się analizą efektów magnetoptycznych; takie pomiary mogą być przydatne w badaniach prowadzonych przez astronomów, fizyków, chemików i archeologów, ale również mogą znaleźć szereg zastosowań aplikacyjnych, np. w elektronice, medycynie czy wojskowości; dzięki pracom prowadzonym przez Szymona Pustelnego i Zespół z UJ została opracowana nowatorska metoda superczułych pomiarów pól magnetycznych o wyższym natężeniu); **dr Szymon Ziętkiewicz** (Fot. 3),



Fotografia 3. Doktor Szymon Ziętkiewicz.

adiunkt na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i AM w Gdańsku (bada mechanizm działania białek opiekuńczych organizmów niższych, takich jak grzyby i bakterie; białka opiekuńcze z bakterii *E. coli* były obiektem jego badań w pracy doktorskiej - kandydatura rekomendowana przez prof. Ewę Bartnik); **dr Bartosz Karaszewski** (Fot. 4), neurolog z AM w Gdańsku (także stypendysta innych fundacji, m.in. FNP z 2007 r.).



Fotografia 4. Doktor Bartosz Karaszewski.

Badania nad udarami mózgu dr Bartosz Karaszewski rozpocznie, w ramach stypendium FNP, w kwietniu 2008 r. w Edynburgu; będzie tam analizował interesującą metodę leczenia pacjentów z ostrym udarem niedokrwinnym mózgu. Jego praca skoncentruje się na znaczeniu niektórych białek i genów w leczeniu udarów mózgu. Ekspresję genów kodujących te białka można by modyfikować, co mogłoby decydować o tym, czy pacjent przeżyje i na ile sprawny wyjdzie ze szpitala. Powyższe badania są częścią większego projektu finansowanego przez Stroke Association. Przy użyciu najnowszych technik rezonansu magnetycznego dr Karaszewski planuje prowadzić obserwację zmian, jakie zachodzą w ostrej fazie tej choroby. Stypendysta planuje też prowadzić badania z zakresu neuroimmunologii udarów mózgu. Dodatkowo, będzie pracował z brytyjskimi pacjentami w oddziałach neurologicznych. Ośrodek, w którym będzie pracował dysponuje lepszym sprzętem w zakresie obrazowania strukturalnego czy funkcjonalnego mózgowia niż ośrodki polskie. Dr Karaszewski podkreśla, że w Edynburgu nad określonym zagadnieniem medycznym pracują nie tylko lekarze, jak to za-

zwyczaj bywa w Polsce, ale także informatycy, statystycy, fizycy, każdy wyspecjalizowany w określonej metodzie rezonansu magnetycznego, np. w tzw. spektroskopii, w obrazowaniu DWI/PWI i traktografii. Według naukowca taki sposób prowadzenia badań jest jednym z najważniejszych elementów w drodze do sukcesu naukowego i wdrażania nowych technologii. Ponadto, w ośrodkach zagranicznych pracownik uniwersytetu uzyskujący finansowanie projektu badawczego zostaje oddelegowany do wyłącznej pracy nad projektem. W Polsce naukowiec zajmuje się nie tylko realizacją grantu, ale kontynuuje pracę dydaktyczną i jako czynny klinicysta (praca etatowa i w systemie dyżurów lekarskich). Według dr Karaszewskiego z tych powodów w Polsce nie ma tak wielu innowacyjnych wdrożeń, jak w krajach skandynawskich, Wielkiej Brytanii, Kanadzie czy USA. Ale są także minusy w krajach poza Polską, np. brytyjska biurokracja naukowa. Dr Karaszewski był już członkiem zespołów prowadzących zarówno badania o charakterze eksperymentalnym, jak i klinicznym. Eksperymentalny charakter miał projekt transplantacji i transfuzji komórek macierzystych w udarach mózgu analizowany w Paryżu, badania nad wpływem tkankowego aktywatora plazminogenu na produkcję wolnych rodników, prowadzone w Gdańsku, badania nad metodami analityki chemicznej peptydów w mózgu, w Oslo. Z kolei badania kliniczne objęły dużą część jego doktoratu - były to badania nad metabolizmem mózgu w ostrej fazie udaru niedokrwienno-ego i nowoczesne techniki obrazowania mózgowia stosowane w Edynburgu. Dr Bartosz Karaszewski jest także stypendystą International Brain Research Organization i stypendystą Stroke Association na Uniwersytecie w Edynburgu. Właśnie w Edynburgu zrealizował większą (kliniczną) część swojego doktoratu w ramach programu doktoranckiego Unii Europejskiej „Marie Curie”. Badania dotyczyły głównie zaburzeń metabolicznych mózgu w ostrym okresie udaru niedokrwienno-ego i opisywały ich wpływ na różne cechy kliniczne badanych pacjentów. Inne prace w tamtejszym ośrodku związane były z nową metodą oceny temperatury mózgu-tkanki

u pacjentów z udarami niedokrwienno-ymi.

Laureatkami (Fot. 5) konkursu o stypendium L'Oréal Polska dla Kobiet zostały w 2007 roku w dzie-



Fotografia 5. Laureatki konkursu o stypendium firmy L'Oréal Polska.

dzinie biochemia i biotechnologia: **mgr Agnieszka Jaźwa**, absolwentka studiów na kierunku Analityka Medyczna Wydziału Farmaceutycznego CM UJ, doktorantka na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (stypendium przeznaczone jest na realizację pracy doktorskiej pt. Zastosowanie bicystronowych wektorów plazmidowych i AAV do transferu genów VEGF i FGF-4 stymulujących procesy neowaskularyzacji, pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Dulaka, w Zakładzie Biotechnologii Medycznej; A. Jaźwa jest stypendystką Funduszu UJ im. Stanisława Estreichera w roku akademickim 2006/2007 i zdobywczynią nagrody MNiSW w 2006 roku za prace badawcze m.in. nad mechanizmami regulacji procesów powstawania naczyń krwionośnych); w dziedzinie diagnostyki i genetyki molekularna: **mgr Aleksandra Szczepankiewicz**, absolwentka biotechnologii (będzie realizować pracę pt. Ocena związków między polimorfizmami genów receptorów dla leków przeciwastmatycznych a przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na leczenie u dzieci chorych na astmę oskrzelową, w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej, III Katedry Pediatrii, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu; jako jedna z niewielu w Polsce prowadzi badania nad wpływem genów na skuteczność terapii u dzieci chorych na astmę; wyniki jej pracy umożliwią indywidualny dobór leków dla chorego dziecka, co poprawi skuteczność leczenia i pozwoli zredukować jego koszty, którymi głównie obarczeni są rodzice); w dziedzinie immunologia:

mgr Magdalena Winiarska z Zakładu Immunologii Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie (stypendium przeznaczyła na badania do swej pracy doktorskiej pt. Badanie wpływów inhibitorów syntezy cholesterolu na wykrywanie cząsteczki CD20 oraz na przeciwnowotworowe działanie rytuksymabu); w dziedzinie neurologii: **dr Katarzyna Kotulska**, neurolog dziecięcy, pracująca także w Klinice Neurologii i Epileptologii Centrum Zdrowia Dziecka (CZD) w Warszawie (zajmuje się badaniami nad stwardnieniem guzowatym; jest to choroba genetyczna, która prowadzi do powstawania guzów w mózgu, sercu, nerkach, wątrobie, płucach i innych narządach. CZD to największy w Polsce ośrodek zajmujący się pacjentami ze stwardnieniem guzowatym. Dr Kotulska prowadzi prace badawcze w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Śląskiej Akademii Medycznej; tematem jej pracy habilitacyjnej jest „Regeneracja nerwów obwodowych w modelach eksperymentalnych”; poszukuje czynników, które decydują o skutecznym odroście uszkodzonych włókien nerwowych oraz sposobów skuteczniejszego leczenia urazów nerwów obwodowych; niektóre wyniki prowadzonych przez nią badań znalazły już zastosowanie w praktyce klinicznej); w dziedzinie biologii molekularnej i biologii komórki: **dr Marta Miączyńska**, absolwentka Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, gdzie studiowała biologię molekularną (w trakcie studiów była stypendystką w Wielkiej Brytanii, a studia doktoranckie podjęła na uniwersytecie w Wiedniu, a zaraz potem odbyła dwa staże podoktorskie w Heidelbergu oraz w Dreźnie; w 2005 roku powróciła do kraju i stworzyła Laboratorium Biologii Komórki w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie; tutaj pracuje; z 8-osobowym zespołem bada procesy, za pomocą których komórki pobierają z zewnątrz różne substancje, składniki odżywcze, a także leki czy kosmetyki. Możliwe to jest poprzez komunikację pomiędzy komórkami, przekazującymi sobie sygnały. Zaburzenia w procesach sygnalizacji prowadzą m. in. do chorób nowotworowych, które wynikają z niekontrolowanych podziałów komórek lub do chorób neurodegenera-

cyjnych, gdy komórki przedwcześnie obumierają. W trakcie wcześniejszych badań dr Miączyńskiej w Niemczech odkryto nowy szlak, wykorzystujący białka o nazwie APPL, które reguluje namnażanie się komórek, a więc może stanowić potencjalny cel terapii antynowotworowych. Badania te są kontynuowane w Warszawie we współpracy z ośrodkami zagranicznymi w ramach projektu finansowanego przez UE oraz grantów przyznanych jej przez instytucje z Wielkiej Brytanii i USA. Stypendium stanowi pomoc w realizacji badań do rozprawy habilitacyjnej pt. „Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych”.

Symposium „ Nutrition and Molecular Mechanisms Related to Adipogenesis in Adipogenesis” zorganizowane przez Zespół Biochemii Klinicznej CMUJ (kierownik prof. Aldona Dembińska – Kieć) w ramach projektu F6 UE FOOD 506360 NuGO “European Nutrigenomics Organisation – Linking Genomics, Nutrition and Health Research”, odbyło się w Krakowie w dniach 18-19 października 2007 roku. Podstawy naukowe spotkania: jednym z celów NuGO jest wykazanie regulacji ekspresji genów przez wpływy środowiska, a w tym składników diety. Angiogeneza/waskulogeneza towarzyszy nie tylko rozwojowi organizmu, przebudowie tkanek, chorobie nowotworowej, ale jak wykazują ostatnie badania jest podstawowym elementem powstania i wzrostu tkanki tłuszczowej wiodącej do powstania otyłości, zespołu metabolicznego, insulinooporności i cukrzycy typu 2. Brak tkanki tłuszczowej (lipodystrofia) także jest przyczyną (oprócz dyslipidemii) rozwoju cukrzycy. Sesje, główne wykłady, wykładowcy. W sesji **Angiogenesis, Development and Disease** wystąpili prof. Lorenz Poellinger (Karolinska Institutet, Sztokholm), prof. Roger Lijnen (Katholieke Universitet Leuven), prof. Gary Hausman (USA Dept. Agriculture, Athens GA) oraz zespół Biochemii Klinicznej CMUJ. W sesji omawiana była rola niedotlenienia tkanek i składników diety w funkcji czynników transkrypcyjnych HIF-1 α /VHL, w indukcji czynników pro- i antyangiogennych i ich receptorów. Omawiana była także rola inhi-

bitorów angiogenezy (PTK787/Vatalanib), rola białek podścieliska/enzymów proteolitycznych uwalnianych z makrofagów w angiogenezie/adipogenezie. Zespół Biochemii Klinicznej, a zwłaszcza młodzi pracownicy (dr Beata Kieć-Wilk, mgr Adrianna Bawierz), przedstawili rolę β -karotenu i kwasów tłuszczowych w mechanizmach różnicowania się preadipocytów (metylacja DNA, rola mTOR, AMPK, koneksyny 43). W sesji **Adipogenesis, Angiogenesis and Metabolic Syndrome** wystąpili prof. Zofia Żukowska (Department of Physiology Georgetown University Medical Centre), prof. Marek Deja (Śląski Uniwersytet Medyczny), prof. Florian Seeger (Johan Wolfgang Goethe University Frankfurt/Main), prof. Aldona Dembińska-Kieć oraz młodzi pracownicy Zespołu Biochemii Klinicznej CMUJ. Bardzo ważnym wykładem była prezentacja prof. Zofii Żukowskiej, która ostatnio (Nature Medicine 2007) w modelach doświadczalnych i u ludzi wykazała istotną rolę powstającego w układzie sympatycznym podczas stresu NPY i jego receptorów w angiogenezie, towarzyszącej rozwojowi otyłości i powstaniu objawów zespołu metabolicznego. Dużo uwagi poświęcono w tej sesji mediatorom odczynu zapalnego, adipokinom i udziałowi kinaz p38 i AMPK w generacji powikłań zespołu metabolicznego w klinice. Zespół Biochemii Klinicznej CMUJ (mgr Urszula Czech, mgr Łukasz Wątor) przedstawił regulację angiogenezy (znaczenie hiperglikemii, hiperleptinemii i insulinemii) w modelach zespołu metabolicznego u transgenicznych myszy (RXR) i myszy NZO. W sesji **Adipose Tissue Plasticity** wzięli udział dr Dorothy Hausman (University of Georgia, Athens GA), prof. Marina Ziche (Medical University, Siena), prof. Janice E. Drew (Univ. Aberdeen, Scotland) i młodzi pracownicy Zakładu Biochemii Klinicznej CMUJ (dr Anna Polus). Nie zabrakło informacji dotyczących różnicowania się komórek progenitorowych zrębu naczyniowego tkanki tłuszczowej w angioblasty/preadipocyty/osteoblasty (plastyczność tych komórek) ważnych w rozwoju nie tylko zespołu metabolicznego (otyłość), ewentualnym zastosowaniu terapeutycznym (terapia rekonstrukcyjna tkanek), ale i w powstawaniu nowotworów i ich

przerzutach. Szczególną uwagę poświęcono w tych prezentacjach roli kwasów tłuszczowych i ich metabolitów (zwłaszcza prostanoidów) w mechanizmach różnicowania się komórek. W spotkaniu sponsorowanym w całości przez EU F6 NuGO wzięło udział około 80 uczestników z Wydziału Medycznego, Wydziału Farmacji CMUJ oraz Wydziału Biotechnologii UJ (Autorem relacji jest prof. A. Dembińska-Kieć).

Międzynarodowa konferencja **The Advancement of Science and the Dilemma of Dual Use: Why We Can't Afford to Fail** na temat niebezpieczeństwa wykorzystywania wyników badań naukowych w celach sprzecznych z ich założeniami (tzw. podwójne zastosowanie, *dual use*). Konferencja odbyła się w Pałacu Prezydenckim w dniach 9-10 listopada 2007 roku. Konferencję otworzył prof. Michał Kleiber, Prezes PAN i Doradca Prezydenta RP ds. Nauki. W imieniu Prezydenta RP uczestników konferencji przywitał gen. Roman Polko, p.o. Szefa Biura Bezpieczeństwa Narodowego. W Konferencji wzięło udział szerokie grono ekspertów reprezentujących instytucje międzynarodowe i naukowe, m.in. Komisję Europejską, National Academy of Sciences (USA), Światową Organizację Zdrowia (WHO), Światowe Stowarzyszenie Lekarzy (WMA), The Royal Society (Wielka Brytania), Federację Amerykańskich Towarzystw Biologii Doświadczalnej (FASEB).

II Krajowa Konferencja Nanotechnologii jest zaplanowana w Krakowie (Auditorium Maximum UJ), w dniach 25-28 czerwca 2008 r. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.confer.uj.edu.pl/nano2008/.

Sprostowanie do numeru 3 (tom 53 z 2007 roku)

W artykule „Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona”, autorstwa Marka Jankowskiego (str. 297-303), z przyczyn niezależnych od redakcji został mylnie podany adres autora. Właściwy adres brzmi: Katedra i Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski Collegium Medicum UMK, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; <http://www.cm.umk.pl>

Rozdział organelli komórkowych przy użyciu systemu elektroforezy w warunkach swobodnego przepływu (BD Free Flow Electrophoresis System)

Jutta Denter

Mikkel Nissum

BD Diagnostics

Artykuł sponzorowany przez firmę BD. W celu uzyskania dalszych informacji na temat opisanego w artykule produktu lub uzyskania kopii artykułu "Differential analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis"; autorzy: Zischka *et al.* z sierpnia 2006 r., prosimy odwiedzać stronę internetową bd.com/proteomics lub skontaktować się z przedstawicielem firmy, pisząc na adres: e-mail: Beata_Skowera@europe.bd.com lub BDFFE@europe.bd.com.
Tłumaczenie: Renata Stasińska

Stosując system rozdziału BD™ Free Flow Electrophoresis (FFE), można rozdzielać organella komórkowe i oczyszczać je w ich funkcjonalnej formie, umożliwiając badania określonych subproteomów. System BD FFE pomaga utrzymać integralność organelli komórkowych oraz ich podtypów. Organella komórkowe odgrywają fundamentalną rolę w biologii komórki. Podstawowe funkcje komórki, takie jak synteza białka, metabolizm energetyczny i katabolizm substancji toksycznych, zachodzą w odrębnych przedziałach złożonych z białek i lipidów. Otrzymywanie wzbogaconej frakcji organelli i analiza ich składu mają fundamentalne znaczenie z punktu widzenia przedstawiania profilu szlaku białek w badaniach proteomicznych i metabolicznych. Analiza organelli i frakcji subkomórkowych posiada wiele zalet: w dużym stopniu zredukowana zostaje złożoność, a jednocześnie ulegają wzbogaceniu białka i kompleksy sygnalizujące występujące w komórce w niewielkich ilościach. Dodatkowo zidentyfikowane białka mogą być powiązane z funkcją, ponieważ są oczyszczane wraz z określonymi organellami lub frakcjami subkomórkowymi. Otrzymanie frakcji wzbogaconych w określone organella i analizowanie ich zawartości ma fundamentalne znaczenie z punktu widzenia profilowania szlaków sygnałowych w badaniach proteomicznych i metabolicznych.

W celu opracowania metody umożliwiającej otrzymanie wzbogaconych w określone organella frakcji subkomórkowych z różnych źródeł, pozbawionych w dostatecznym stopniu zanieczyszczeń, potrzebne są skuteczne narzędzia proteomiczne. Integralność organelli komórki z zachowaną strukturą i funkcją jest kluczowa z punktu widzenia badania organizmów modelowych. Dodatkowo, wyniki najnowszych badań wskazują na znaczenie różnorodności organelli komórkowych, np. rozdziału różniących się fizjologią subpopulacji organelli komórki, które mogą być kluczem w badaniach nad różnorodnymi chorobami (Tabela 1) [1,2].

Tabela 1. Choroby powiązane z zaburzeniami funkcji organelli komórkowych [2].

Mitochondria	Lizosomy	Peroksysomy	ER/Aparat Golgiego
Dziedziczny zanik nerwu wzrokowego Lebera	Mukopolisacharydoza typu I - VII	Zespół Zellwegera	Zespół Wolframa
Ataksja Friedreicha	Choroba Taya-Sachsa	Zespół przypominający zespół Zellwegera	Wrodzony przerost nadnerczy
Zanik nerwu wzrokowego	Choroba Gauchera	Adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X	Choroba spichrzeniowa glikogenu typu I
Choroba Parkinsona	Cystynoza	Adrenoleukodystrofia noworodkowa	Dystrofia mięśniowa Emery-Dreifussa
Stwardnienie zanikowe boczne	Niedobór hialuronidazy	Dziecięca postać choroby Refsuma	Wrodzone zaburzenia glikozytacji (> 20)
Choroba Alzheimerza	Choroba Schindlera	Dorośla postać choroby Refsuma	Choroba Wilsona
Choroba Huntingtona	Choroba Wolmana	Niedobór DHAP-AT	Choroba Haileya-Haileya

ZASADA DZIAŁANIA SYSTEMU ELEKTROFOREZY W WARUNKACH SWOBODNEGO PRZEPŁYWU (BD FREE FLOW ELECTROPHORESIS - FFE)

FFE jest to technika elektroforezy, w której nie jest stosowany stały nośnik. Analizowane obiekty są rozdzielane według ich ładunku i ruchliwości elektroforetycznej w ciągłym przepływie laminarnym buforowanych roztworów. Linie pola elektrycznego są prostopadłe do kierunku przepływu. Przepływ laminarny jest zbierany w 96 kapilarach na końcu komory izolującej, umożliwiając w ten sposób ciągłe frakcjonowanie w płytce zbierającej (Ryc. 1). W zależności od składu chemicznego, można zastosować trzy różne zasady rozdziału: ogniskowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric focusing* - IEF), elektroforezę strefową (ang. *zone electrophoresis* - ZE) i izotachoforezę (ang. *isotachopheresis* - ITP).

System bez nośnika stałego umożliwia rozdział komórek i organelli komórkowych, dużych polimerów (białek) i bardzo małych cząsteczek (peptydów). Oprócz metody rozdziału w warunkach denaturujących, można również stosować metody frakcjonowania pozwalające na zachowanie struktury i funkcji w warunkach niedenaturujących. Warunki niedenaturujące wymagane są wtedy, gdy ważna jest integralność próbek, tak jak w przypadku rozdziału organelli komórkowych lub kompleksów białkowych. Technika FFE pozwala na stosowanie do rozdziału detergentów

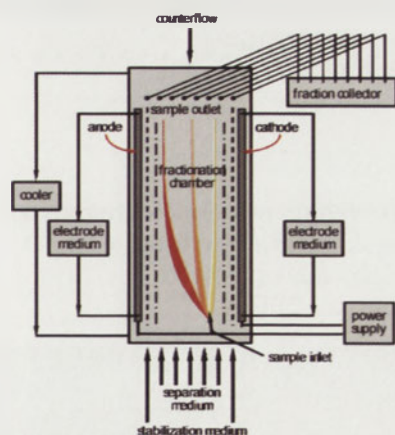
niejonowych, umożliwiających oczyszczanie powierzchniowych białek błonowych, a także integralnych białek błon, które mogą być trudne do oczyszczenia z wykorzystaniem innych technik. Szczególne cechy techniki FFE, w tym jednolite warunki podczas rozdziału i frakcjonowania, zapewniają wysoką powtarzalność rozdziału i wysoki wskaźnik odzysku. Główne cechy metody FFE wymieniono w Tabeli 2.

Tabela 2. Cechy technologii BD FFE.

Składniki, które mogą być rozdzielone	Komórki i organella komórki, mikroorganizmy, kompleksy białkowe, białka błonowe, izoformy białek, enzymy, peptydy, itp.
Elektroforetyczne metody rozdziału	Ogniskowanie izoelektryczne (IEF) Elektroforeza strefowa (ZE) Izotachoforeza (ITP)
Warunki rozdziału	Denaturujące i niedenaturujące
Tolerowane dodatki (przykłady)	CHAPS, CHAPSO, digitonina, dodecylo- β -D- maltozyd, oktylo- β -D- glukozyd, Triton-X-100, Tween, SDS, DTT
Objętości próbek	50 μ l (analityczna) do >100 ml (preparacyjna)
Przepustowość	Maks. 30-40 mg/godz.

BD FFE UMOŻLIWIA OCZYSZCZANIE ORGANELLI KOMÓRKI I ICH PODTYPÓW Z WYSOKĄ ROZDZIELCZOŚCIĄ I PRZY JEDNOCZESNYM ZACHOWANIU INTEGRALNOŚCI

Metody tradycyjne, stosowane do rozdziału organelli komórki, obejmują wirowanie różnicowe i/lub wirowanie w gradencie gęstości. Jednakże te technologie są często obciążone wadą, jaką jest ciśnienie hydrostatyczne w trakcie wirowania, które może powodować utratę i/lub deformację próbek. Pozbawiony stałego nośnika system BD FFE może pomóc przezwyciężyć ten problem, przy jednoczesnym znaczącym poprawieniu stopnia czystości. Rycina 2 przedstawia frakcję mitochondriów *Saccharomyces cerevisiae* wzbogaconą poprzez etap zintegrowanego oczyszczania drogą elektroforezy strefowej BD FFE (ZE-FFE). Jedną z głównych zalet tej łagodnej dla rozdzielanego materiału biologicznego technologii jest zachowanie integralności organelli komórkowych i ich subfrakcji, przy jednoczesnym skutecznym usunięciu zanieczyszczających białek i/lub enzymów macierzy pozakomórkowej. Zischka i wsp. [1] zastosowali wirowanie różnicowe w celu rozdziału preparatów mitochondrialnych, które zawierały znaczący poziom białek niemitochondrialnych (16%) [3]. To zanieczyszczenie może być skutecznie zredukowane (do 2%) poprzez włączenie etapu oczyszczania z zastosowaniem ZE-FFE przed dwukierunkową elektroforezą żelową. Ten wyższy stopień czystości doprowadził do identyfikacji znacznie większej liczby białek z ekstraktów białek mitochondrialnych oczyszczonych przy wykorzystaniu ZE-FFE (n=129), w porównaniu do ekstraktów białek mitochondrialnych wyizolowanych przez wirowanie różnicowe (n=80). Ponadto odnotowano wyraźny spadek białek zdegradowanych. Poza tym w ekstraktach białek mitochondrialnych, oczyszczonych metodą ZE-FFE można było zidentyfikować czterokrotnie wyższą liczbę (17 versus 4) białek, których poziom syntezy w komórce jest niski.



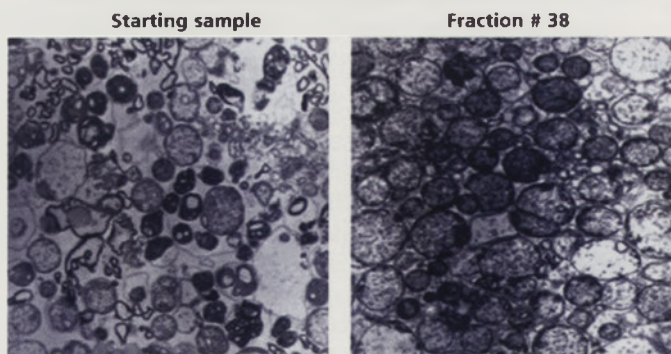
Rycina 1. System elektroforezy w warunkach swobodnego przepływu BD Free Flow Electrophoresis. W przeciwieństwie do innych metod rozdziału, dodawanie próbki ma charakter ciągły. Próbka jest nieprzerwanie wstrzykiwana do bieżącego przepływu laminarnego, pozwalając na obróbkę próbek od objętości 50 μ l w ciągu kilku minut do 100 ml w 24-godzinnym cyklu. Próbki mogą być poddawane rozdzielaniu z prędkością do 30 mg/godz. Czas rozdziału, a więc i czas przebywania próbki w polu elektrycznym, zależą od prędkości przepływu.

Innym ważnym ograniczeniem tradycyjnych metod wirowania różnicowego i w gradiencie gęstości może być ograniczona możliwość rozdzielenia organelli komórkowych i ich subpopulacji o podobnej gęstości. Mohr i Völkl [4] wykazali jak trudno jest oczyścić określoną subpopulację peroksysomów z wykorzystaniem konwencjonalnego wirowania w gradiencie stężeń, z powodu bardzo podobnych właściwości sedymentacyjnych subpopulacji tych organelli w porównaniu do innych organelli komórkowych, szczególnie mikrosomów. Badacze ci wprowadzili zatem immunoelektroforezę w warunkach swobodnego przepływu (IFFE), łącząc zalety rozdzielenia elektroforetycznego z wysoką selektywnością reakcji immunologicznych, umożliwiającą oczyszczanie subpopulacji peroksysomów [4].

Zmiany strukturalne i molekularne w organellach komórkowych wydają się być decydującymi czynnikami w patologii wielu chorób. W celu przeanalizowania tych zmian na poziomie molekularnym i wyjaśnienia przyczyn, dla czego niektóre organelle wydają się być bardziej dotknięte i wrażliwsze niż inne, niezbędne są narzędzia analityczne i przygotowawcze, które są w stanie rozwiązać problem tej heterogenności. Metody elektroforetyczne, jak system BD FFE, stanowią bardzo obiecujące podejście do badania heterogenności organelli komórkowych i mogą być stosowane do odróżnienia różnych populacji (np. mitochondriów) [1].

PIŚMIENNICTWO

1. Zischka H, Braun RJ, Marantidis EP, Bühringer D, Bornhövd C, Hauck SM, Demmer O, Gloeckner CJ, Reichert AS, Madeo F, Ueffing M (2006)



Rycina 2. Wzbogacanie i oczyszczanie mitochondriów (*Saccharomyces cerevisiae*) z zastosowaniem techniki BD FFE. Mikrografie z mikroskopu elektronowego [3]. Powiększenie 30 000 x. Próbkę startową: mitochondria zostały wyizolowane z zastosowaniem wirowania różnicowego. Można zauważyć obecność uszkodzonych organelli i innych struktur pęcherzykowych. Frakcja FFE nr 38: typowy obraz mitochondriów, które zostały oczyszczone z zastosowaniem techniki ZE-FFE, reprezentuje jednorodną populację organelli. Przedruk za zgodą © 2003 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. BD i BD Logo są znakami handlowymi Becton, Dickinson and Company ©2007 BD.

Differential analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 5: 2185-2200

2. Islinger M (2006) Doniesienie, the Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and Lab Medicine, Mannheim, Germany 1-4.10
3. Zischka H, Weber G, Weber PJ, Posch A, Braun RJ, Bühringer D, Schneider U, Nissum M, Meitinger T, Ueffing M, Eckerskorn C (2003) Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis. *Proteomics* 3: 906-916
4. Mohr H, Völkl A (2002) Isolation of peroxisomal subpopulations from mouse liver by immune free-flow electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 2130-213

REKLAMA



Firma BD rozpoczęła działalność ponad 100 lat temu w USA jako producent wyrobów medycznych. Od tego momentu BD stała się jedną z największych na świecie firm tego rodzaju. Silne podstawy w postaci własnych, prawnie zastrzeżonych technologii dały BD pozycję wiodącego dostawcy produktów medycznych. Więcej informacji o ofercie firmy można znaleźć na www.bd.com

linki: bd.com/vacutainer (blood collection system)
vmdp.com (molecular diagnostics)

Nowości BD Preanalytical Systems : (for research use only)

BD™ P100 Kit - próbki próżniowe do uzyskiwania osocza zawierające czynniki stabilizujące białka



BD™ P700 - próbki próżniowe do uzyskiwania próbki osocza dla próbek wymagających Inhibitora DPP-IV



Biotechnologia jest tym obszarem działalności badawczo-rozwojowej, w którym komercjalizacja wyników badań jest istotnym i naturalnym elementem aktywności badacza. Według najprostszej definicji, biotechnologia to interdyscyplinarna dziedzina nauki i techniki zajmująca się zmianą materii żywej i nieożywionej poprzez wykorzystanie organizmów żywych, ich części, bądź pochodzących od nich produktów, a także modeli procesów biologicznych w celu tworzenia wiedzy, dóbr i usług.¹ Tworzenie dóbr i usług jest jak najbardziej działalnością gospodarczą, czyli komercyjnym rezultatem działalności badawczej. W biotechnologii powiększanie kapitału wiedzy powinno więc skutkować, bardziej niż w innych dziedzinach nauki, efektami ekonomicznymi.

PROJEKT BADAWCZY A PROJEKT APLIKACYJNY

Specjalnością biotechnologów są projekty badawczo-rozwojowe, które powinny charakteryzować się tym, że mają precyzyjnie określony cel aplikacyjny. Ta cecha wyraźnie odróżnia je od klasycznych projektów badawczych. W zależności od typu realizowanego projektu oczekuje się też różnych efektów (Tabela 1). Końcowym „produktem” działalności badacza jest najczęściej nowa wiedza, udokumentowana i opisana w artykule naukowym. Końcowym „produktem” działalności badacza-biotechnologa jest efekt ekonomiczny, mający konkretny wymiar finansowy (nawet jeśli to nie będzie produkt materialny wprowadzony na rynek). Punktem wyjścia w tworzeniu obu rodzajów projektów jest aktualna wiedza naukowa. Badacz stawia sobie za cel jak tę wiedzę poszerzyć w obrębie interesującego go zagadnienia. Naukowiec-biotechnolog będzie starał się poprzez swoje działanie wytworzyć, na bazie posiadanej wiedzy, produkt mający wymierną wartość ekonomiczną, często posługując się tymi samymi narzędziami (metodami badawczymi), co jego wspomniany wyżej kolega.

Tabela 1. Porównanie działalności badawczej prowadzonej w placówkach naukowych i badawczo-rozwojowej w firmach biotechnologicznych.

	Laboratoria naukowe (uczelnie, PAN)	Firmy biotechnologiczne
Cel	poznawczy	komercjalizacja
Finansowanie	środki publiczne	środki publiczne + środki niepubliczne
Wiedza	szeroko upowszechniana	stanowiąca kapitał intelektualny firmy (nie upowszechniana na zewnątrz)
Końcowy produkt	publikacje	przychód

Opracowując biotechnologiczny projekt badawczo-rozwojowy trzeba więc koniecznie odpowiedzieć na następujące pytania. Gdzie znajdzie zastosowanie produkt, który ma być ostatecznym rezultatem inicjowanego projektu (czyli mówiąc językiem ludzi biznesu – jaki jest rynek dla tego produktu)? Jaki może być szacunkowy przychód z produktu uzyskanego w wyniku realizacji projektu, w jaki sposób i po jakim czasie może nastąpić zwrot poniesionych nakładów na realizację projektu; kiedy i pod jakimi warunkami realizacja projektu zapewni zysk? Jaką przewagę konkurencyjną będzie miał produkt, który zamierzamy uzyskać w wyniku realizacji projektu, nad innymi produktami istniejącymi na rynku czy też spełniającymi podobną funkcję? Czy nasze działanie nie będzie naruszać cudzych praw do własności intelektualnej (np. patentów)?

Naukowcy-biotechnolodzy muszą mieć świadomość tych zagadnień już na etapie opracowywania projektu (wniosku grantowego). Tych zagadnień nie muszą oczywiście uwzględniać w swojej działalności badacze realizujący projekty poznawcze z obszaru tzw. nauk podstawowych. Niezbędna jest więc minimalna

¹ Stan i kierunki rozwoju Biogospodarki. Raport opracowany przez Interdyscyplinarny zespół do spraw Rozwoju Biogospodarki pod kierunkiem profesora Adama Dubina, <http://www.biotechnologia.pl/biotechnologia/12/928>

Tadeusz Pietrucha^{1,2}

Eliza Zawadzka^{1,3}

¹Bio-Tech Consulting Sp. z o. o., ul. Kamińskiego 23, 90-229 Łódź

²Zakład Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, Łódź

³Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Sterlinga 5, Łódź

Artykuł sponsorowany przez firmę Bio-Tech Consulting Sp z o.o., ul. Kamińskiego 23, 90-229 Łódź, tel.: (042)6780112, faks: (042)6780128

świadomość ekonomiczna wśród kandydatów na biotechnologicznych milionerów.

KLUCZOWE DECYZJE NA WCZESNYM ETAPIE ROZWOJU PROJEKTU BIOTECHNOLOGICZNEGO

Niewątpliwym sukcesem jest pozyskanie środków (najczęściej publicznych) na realizację biotechnologicznego projektu badawczo-rozwojowego. W biotechnologii niezwykle rzadko 2-3 letni grant kończy się wprowadzeniem produktu na rynek. Jest to zaledwie początek fascynującej drogi. Uzyskanie eksperymentalnego potwierdzenia założeń przyjmowanych na etapie przygotowywania biotechnologicznego projektu badawczo-rozwojowego stawia przed naukowcem-biotechnologiem konieczność podjęcia decyzji (Ryc. 1), czy ten projekt należy rozwijać dalej i walczyć o pozyskanie kolejnych środków finansowych (tym razem najczęściej prywatnych), czy też zakończyć go (np. sprawozdaniem wzbogaconym o publikacje) i rozejrzeć się za kolejnym grantem na następne 2-3 lata. Racjonalne podjęcie takiej decyzji najczęściej wymaga ponownej oceny potencjału projektu do przeprowadzenia jego komercjalizacji. Tym razem jednak ta ocena jest daleko bardziej zaawansowana niż ta, którą dokonywał autor (autorzy) projektu podczas wstępnego etapu jego opracowywania. Badaniem potencjału do komercjalizacji na tym etapie rozwoju projektu zajmuje się najczęściej wyspecjalizowana firma (w Polsce zajmuje się tym m.in. firma Bio-Tech Consulting). Analiza ta obejmuje znacznie więcej parametrów i znacznie bardziej szczegółowo analizowanych niż te, które były uwzględniane w fazie powstawania projektu.

Pozytywny wynik przeprowadzonej analizy pociąga za sobą najczęściej decyzję biznesową co do sposobu komercjalizacji projektu. Na tym etapie w zasadzie wyczerpują się możliwości dalszej samodzielnej realizacji projektu przez zespół naukowy. Konieczny jest partner biznesowy, który dostarczy środków finansowych na jego dalszą realizację, a przede wszystkim wiedzy w zakresie profesjonalnego zarządzania projektem (który staje się już typowym projektem

biznesowym) i zadba o uzyskanie optymalnego efektu ekonomicznego.

Z ekonomicznego punktu widzenia, najbardziej ryzykownym, ale też najbardziej skutecznym i efektywnym sposobem komercjalizacji projektu jest założenie firmy biotechnologicznej (biotechnologicznego „start-up”). Ta decyzja wymaga determinacji, odwagi i przekonania co do rzeczywistej wartości projektu. Ten sposób komercjalizacji jest najczęściej wybierany w krajach, które są liderami w rozwoju biotechnologii. Jednak wejście na ścieżkę komercjalizacji wymaga od naukowca-biotechnologa nabycia nowych umiejętności, o czym będzie mowa poniżej.

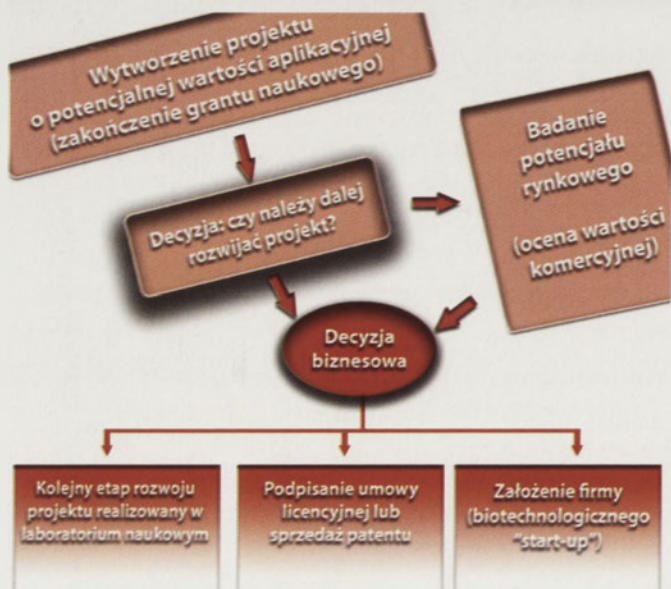
Licencjonowanie lub sprzedaż patentu w praktyce zdarza się znacznie rzadziej. Jest też zazwyczaj mniej korzystne pod względem finansowego sukcesu komercjalizacji projektu. Jednak także w tym przypadku biotechnolog-naukowiec musi znacząco wzbogacić swoją wiedzę, m.in. o techniki negocjacji, rozumienia podstawowych parametrów i wskaźników ekonomicznych (np. takich jak koszt kapitału, BEP, wewnętrzna stopa zwrotu, bilans itp.).

W przekonaniu autorów niniejszego artykułu, kontynuacja rozwoju projektu w laboratorium naukowym jest raczej tylko teoretyczną możliwością. Laboratorium naukowe na uczelni, czy w innej placówce naukowej, nie jest właściwym miejscem do kontynuacji prac mających na celu jak najszybsze wprowadzenie produktu na rynek i/lub uzyskanie przez niego wartości rynkowej. W tych warunkach zespół nadal funkcjonuje jak zespół naukowy, a nie innowacyjna firma biotechnologiczna.

CZYNNIKI WARUNKUJĄCE EKONOMICZNY SUKCES NAUKOWCÓW W BIOTECHNOLOGII

Utworzenie firmy biotechnologicznej i rozpoczęcie funkcjonowania w nowej rzeczywistości i nowym otoczeniu (biznesowym) na bazie komercjalizowanego projektu badawczo-rozwojowego jest przełomową decyzją co do dalszych losów projektu badawczo-rozwojowego. To właśnie firmy biotechnologiczne nadają dynamikę rozwojowi biotechnologii, są najefektywniejszym i najskuteczniejszym narzędziem tworzenia nowej ekonomii opartej na wiedzy.

Zmniejszenie ryzyka niepowodzenia w komercjalizacji projektu biotechnologicznego można uzyskać m.in. poprzez rozważne wprowadzenie do projektu partnera biznesowego. Jak już wspomniano, jego rola nie ogranicza się tylko do dostarczenia środków finansowych na dalszą realizację/komercjalizację projektu, co jest ważne, ale odgrywa raczej rolę drugoplanową. Największą korzyścią wnoszoną przez partnera biznesowego do firmy biotechnologicznej tworzonej przez naukowców jest jego wiedza i doświadczenie biznesowe. Współpraca z partnerem, by była skuteczna i efektywna, wymaga sporego wysiłku z obu stron. Partner biznesowy powinien (a wręcz musi) poznać na czym polega merytoryczna wartość projektu (w praktyce oznacza to dla niego przyspieszony kurs np. biologii molekularnej czy innego wybranego działu nauki, na którym bazuje projekt). Z kolei biotechnolog-naukowiec musi (specjalnie użyto słowa „musi”, a nie „powinien”) opanować podstawowe zagad-



Rycina 1. Wstępne etapy komercjalizacji projektu.

nienia dotyczące: zarządzania firmą, zarządzania projektami, zarządzania własnością intelektualną, kreatywności, innowacji (tak jak te terminy rozumiane są w biznesie), umiejętności interpersonalnych, komunikacji społecznej, marketingu, rachunkowości zarządczej, zarządzania zmianą i zarządzania ryzykiem. Wiedza ta jest niezbędna chociażby do tego, by obie strony mogły siebie nawzajem rozumieć i stworzyć harmonijny zespół. Wówczas szansa na odniesienie sukcesu rynkowego wzrasta niepomiaralnie.

POLSCY BIOTECHNOLODZY WOBEC WYZWAŃ NOWOCZESNEJ BIO-GOSPODARKI

Patrząc z perspektywy targów Biotechnologii i Biobiznesu – Bio-Forum (www.bioforum.pl), w polskim środowisku naukowym zachodzą pozytywne zmiany, które wkrótce pozwolą być może na to, by biotechnologia w naszym kraju zaczęła rozwijać się równie dynamicznie jak w krajach Europy Zachodniej. Przede wszystkim, wśród naukowców zwiększa się zainteresowanie realizacją projektów aplikacyjnych. Widoczna jest wyraźna zmiana w mentalności naukowców, którzy w realizacji projektów aplikacyjnych zaczynają upatrywać więcej korzyści niż zagrożeń. Ten przełom dokonuje się zarówno wśród liderów zespołów badawczych, profesorów, jak i wśród młodszych stażem pracowników nauki. Zainteresowanie „aplikacyjnością” projektów widoczne jest także wśród studentów biotechnologii, co daje nadzieję, że ta pozytywna tendencja utrzyma się w najbliższych latach. Niechęć wobec „przetwarzania wiedzy na efekty ekonomiczne” ustępuje miejsca zainteresowaniu, entuzjazmowi i chęci realizacji nowych wyzwań. Niestety, jak dotąd ten entuzjazm nie jest poparty rzetelną wiedzą na temat sposobów komercjalizacji projektów badawczych. Wśród naukowców brakuje zrozumienia dla realiów panujących na rynku, umiejętności oceny potencjału rynkowego projektu, wiedzy jak zarządzać samym projektem. Brakuje też pozytywnych przykładów wdrażania projektów biotechno-

logicznych, które z pewnością zostaną z czasem pozyskane. Obecnie naukowcy, którzy decydują się na zakładanie własnych firm, to ciągle jeszcze pionierzy w tym sposobie działania. Decyzja o założeniu biotechnologicznego „startup” wymaga determinacji i odwagi do podjęcia ryzyka. Na szczęście w Polsce znaleźli się już naukowcy, którzy podjęli to ryzyko. Wystarczy wspomnieć takie firmy jak Proteon Pharmaceuticals z Łodzi, DNA II Gdańsk, Lipopharm.pl z Gdańska czy Biotrans z Wrocławia. Są też podejmowane inne biotechnologiczne inicjatywy, które z pewnością nie długo ujawnią się na polskim rynku. Charakterystyczne jest jednak to, że naukowcy zakładający firmy niechętnie rezygnują całkowicie z działalności naukowej na uczelniach (czy to ze względów prestiżowych, czy bezpieczeństwa w razie niepowodzenia własnego interesu, czy dostępu do pewnych źródeł, osób, sprzętu itp.).

Swoją szansę w biotechnologii zaczynają dostrzegać również niektóre polskie firmy o uznanej pozycji rynkowej. Spektakularnym przedsięwzięciem było założenie przez cztery znane polskie firmy farmaceutyczne (Polfarmex, Celon Pharmę, Biomed Kraków, Genexo) firmy biotechnologicznej Mabion, przy udziale firm prowadzonych przez pracowników naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego (BioCentrum) i Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Bio-Tech Consulting).

Na pozytywne zmiany z pewnością ma i będzie mieć coraz większy wpływ polityka naukowa rządu oraz inne działania podejmowane w celu stymulowania naukowców do realizacji biotechnologicznych projektów badawczo-rozwojowych i tworzenia na bazie tych projektów firm biotechnologicznych. Zwiastunem tej nowej polityki jest Inicjatywa Technologiczna, czy pojawiające się inne możliwości finansowania tego rodzaju projektów w ramach funduszy strukturalnych, grantów celowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz programów europejskich.



Bio-Forum VII
Biotechnology & Biobusiness
Trade Fair

NAJWIĘKSZE WYDARZENIE BIOTECHNOLOGICZNE DLA KRAJÓW EUROPY ŚRODKOWEJ

TARGI BIOTECHNOLOGII I BIOBIZNESU

Bio-Forum VII
Łódź, 15-16 maja 2008

www.bioforum.pl





Bio - Forum daje możliwość:

- *Nawiązania ciekawych kontaktów z przedstawicielami sektora biogospodarki;*
- *Zweryfikowania wartości rynkowej realizowanego projektu badawczo-wdrożeniowego;*
- *Rozpoczęcia kariery biznesowej na bazie wiedzy naukowej.*











Własność intelektualna w naukach przyrodniczych

Wykład inaugurujący obrady XLII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, 18. 09. 2007 r.

Tomasz Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań i Politechnika Łódzka; tel.: (061) 852 85 03, faks: (061) 852 05 32, e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: własność intelektualna, patenty,

W cyklu od odkrycia naukowego, poprzez wynalazek, do produkcji zasadnicze miejsce zajmują sprawy własności intelektualnej. W przypadku wdrożeń warunkiem koniecznym jest jednoznaczne zdefiniowanie statusu prawnego własności w odniesieniu do danego wynalazku. Jedynie patent jednoznacznie określa stan prawny i kwestie własności. Pozytywne jak i negatywne aspekty patentowania znajdują swe odzwierciedlenie w biotechnologii łączącej wiele dziedzin przyrodniczych. W Polsce zagadnienia własności intelektualnej regulowane są mocą ustawy: „Prawo własności przemysłowej” z 30 czerwca 2000 r.; Dz. U. z 2003 r. nr 119, poz. 1117, z późniejszymi zmianami. Ta regulacja prawna jest w pełni skorelowana z dyrektywami Unii Europejskiej oraz Konwencją Monachijską. W Polsce zdolność patentową mają procesy i produkty. Jednakże procedury patentowania są długie i kosztowne. Należy podkreślić, że opatentowane wynalazki mogą być stosowane bez opłat do celów dydaktycznych i czysto naukowych. Efektywne wykorzystanie patentu wymaga współpracy eksperymentatora – wynalazcy z rzecznikiem patentowym. Współdziałanie to wymaga przełamania wielu barier pojęciowych, nomenklaturowych, jak i wzajemnego zrozumienia.

WPROWADZENIE

Komercjalizacja nauki, a przede wszystkim dążenie do samofinansowania prac badawczych, związana jest z zasadniczym wzrostem znaczenia zagadnień legislacyjnych. W kontekście komercjalizacji prac badawczych podstawową rolę odgrywają kwestie praw własności intelektualnej, określane często skrótem IPR (ang. *intellectual property rights*). Jednocześnie czynnikiem warunkującym wdrożenie innowacyjnego rozwiązania naukowego do praktyki gospodarczej jest zabezpieczenie właściwych uregulowań i norm prawnych – przede wszystkim jest to jednoznaczne zdefiniowanie praw własności konkretnego wynalazku. W konsekwencji współczesne środowisko naukowe w naszym kraju musi zaakceptować fakt, że oprócz badań podstawowych, dydaktyki i upowszechniania wiedzy w zakresie obowiązków konieczne jest również przeprowadzanie wdrożeń oraz osiąganie zysków.

Istotnym etapem w drodze od odkrycia naukowego poprzez wynalazek do jego wdrożenia i produkcji jest patent. Inwestycja związana z wdrożeniem nowego wynalazku wymaga jednoznacznego określenia praw własności intelektualnej. Niezależnie od naszych osobistych ocen patentowanie w naukach przyrodniczych jest powszechną praktyką stosowaną na świecie i nie można tego ignorować. Intensywny rozwój nauki jest wynikiem efektywnej współpracy przedstawicieli wielu różnych dziedzin: biochemii, biologii, chemii, genetyki, nauk technicznych, rolnictwa, medycyny z farmacją i wielu innych. Niezbędna jest również współpraca naukowców przyrodników z prawnikami, etykami i rzecznikami patentowymi. Współdziałanie to wymaga poznania i zrozumienia specyficznej terminologii prawniczej oraz wyjaśnienia podstaw molekularnych i technicznych, nowoczesnych rozwiązań z zakresu nauk przyrodniczych.

Polskie uregulowania w zakresie praw własności intelektualnej zawarte są w ustawie „Prawo własności przemysłowej” (w skrócie Pwp) (z 30 czerwca 2000 r.; Dz. U. z 2003 r. nr 119, poz. 1117, z późniejszymi zmianami). Ta norma prawna jest zgodna z uregulowaniami Unii Europejskiej oraz Konwencją Monachijską i umożliwia uzyskanie ochrony patentowej zarówno na proces, jak i na produkt. Podstawowym celem ochrony własności intelektualnej jest ochrona praw wyłącznych twórcy i zabezpieczenie możliwości osiągania korzyści materialnych z dokonanych nowatorskich rozwiązań w znaczeniu ekonomicznym. Prawa własności intelektualnej potocznie identyfikowane są tylko z patentami, ale nazwa ta oznacza także znaki i wzory firmowe, tajemnicę firmy, rejestrację roślin, jak również prawa autorskie. Należy podkreślić, że korzystanie dla celów badawczych i dydaktycznych z wynalazków opatentowanych w sposób wyłączający komercjalizację nie narusza patentu.

DLACZEGO PATENTY?

Prawo patentowe umożliwia uzyskanie przez uprawnionego wyłączności na korzystanie z wynalazku w okresie obowiązywania ochrony patentowej. W czasie trwania ochrony patentowej uprawniony poza wytwarzaniem i wprowadzaniem na rynek może również czerpać zyski z udzielenia licencji, sprzedaży patentu oraz wykorzystywać patent w inny sposób, np. wnieść go do spółki w formie aportu lub wykorzystać do ustanowienia zastawu. Natomiast w przypadku naruszenia patentu przez osoby nieuprawnione właściciel i wynalazca mogą domagać się zaprzestania naruszania jego prawa. Inną zaletą opatentowania i publikacji wynalazku jest jego szerokie rozpowszechnienie na całym świecie. Umożliwia to rozpropagowanie nie tylko samego wynalazku, ale także informacji o jego właścicielu, co może ułatwiać nawiązanie współpracy z osobami zainteresowanymi tym rozwiązaniem. Ponieważ opatentowany wynalazek staje się częścią stanu techniki, powinien stanowić przedmiot badań i punkt wyjścia do dokonywania kolejnych innowacyjnych rozwiązań.

Cele i zadania świata akademickiego są zdefiniowane poprzez wielowiekową tradycję jako edukacja, nauka i upowszechnianie. Jednakże współcześnie został sformułowany bardzo stanowczo następny cel – to jest zysk, którego osiągnięcie możliwe jest poprzez wdrożenia.

Dla naukowców zasadnicze znaczenie mają patenty. Prawa autorskie są nader istotne i od dawna w pełni honorowane w środowisku naukowym, zarówno przy publikacji prac naukowych jak również z tytułu przygotowania wykładów. Znaki towarowe w mniejszym stopniu związane są z naszą pracą. Natomiast tajemnica firmy (określana potocznie jako *know-how*) jest w swej istocie sprzeczna z charakterem pracy uczonego, który zmierza do szerokiej popularyzacji efektów i wyników swej pracy. Patenty są udzielane na wynalazki, charakteryzujące się (w Polsce zgodnie z art. 10, art. 24 Pwp, co pokrywa się z § 2, art. 52.1 EPC): nowością, poziomem wynalazczym oraz przydatnością do przemysłowego stosowania. W odniesieniu do wynalazku biotechnologicznego, przedmiotem zgłoszenia patentowego może być wytwór składający się z materiału biologicznego, wytwór zawierający materiał biologiczny lub sposób wytwarzania, przetwarzania i wykorzystywania.

Zabezpieczenie praw własności intelektualnej umożliwia uczciwą konkurencję, zysk i zwrot nakładów zgłaszającym i twórcom. Patent w istniejącym systemie prawnym zapewnia swemu właścicielowi i) prawo wyłącznego korzystania z wynalazku w celach komercyjnych, w sposób zarobkowy lub zawodowy (na terytorium państwa gdzie dokonano opłat licencyjnych); ii) okres ochronny, którego czas trwania wynosi 20 lat (w większości krajów); iii) zakres ochrony – precyzyjnie określony w zastrzeżeniach patentowych.

ZDOLNOŚĆ PATENTOWA WYNALAZKÓW

Typowe przykłady wynalazków w naukach biologicznych charakteryzujących się zdolnością patentową to produkty, np. polipeptydy (enzymy, przeciwciała), kwasy nukleinowe (startery, sekwencje kodujące, wektory), mikro-

organizmy, linie komórkowe, zestawy (np. diagnostyczne), kompozycje (np. leki, szczepionki); sposoby, np. metody otrzymywania produktów (biofermentacje, metody izolacji i oczyszczania), metody testowe i diagnostyczne *in vitro*, metody laboratoryjne; zastosowania, np. nowe zastosowanie znanego produktu, tzw. II zastosowanie medyczne.

Sposoby wytwarzania roślin i zwierząt mają zdolność patentową, jednakże z wyłączeniem nowych odmian i ras. Podobnie w przypadku mikroorganizmów – one także posiadają zdolność patentową. Możliwe jest zatem dokonanie zgłoszenia patentowego dotyczącego grzybów, wirusów, bakterii, kultur komórkowych i tkankowych. Równocześnie, jeżeli materiał biologiczny nie jest powszechnie dostępny oraz nie może być przedstawiony w opisie w taki sposób, aby umożliwić zastosowanie wynalazku – to należy złożyć depozyt mikroorganizmu we właściwej instytucji depozytowej, najpóźniej w dniu zgłoszenia wynalazku w Urzędzie Patentowym.

Dodatkową formę ochrony będącą przedłużeniem ochrony patentowej stanowi dodatkowe prawo ochronne (SPC, ang. *supplementary protection certificate*). Dotyczy ono jednak tylko farmaceutyków oraz środków ochrony roślin, których komercjalizacja związana jest z wyjątkowo długim i kosztownym okresem badań wstępnych, warunkujących dopuszczenie do obrotu rynkowego. To rozwiązanie prawne umożliwia przedłużenie monopolistycznej pozycji wynalazcy o maksymalnie 5 lat dodanych do ochrony patentowej. Dodatkowe prawo ochronne daje większe szanse na zwrot poniesionych nakładów na badania, proces wdrożenia, ocenę biobezpieczeństwa i godziwy zysk. Inwestycje w nowe leki stanowią szczególną wartość dla społeczeństwa, a jednocześnie, jak już wspomniano, są szczególnie kosztowne, ale także należy pamiętać, że zyski producentów innowacyjnych preparatów farmaceutycznych są wyjątkowo duże. Prowadzi to do rywalizacji producentów leków oryginalnych z przemysłem generycznym.

Leki markowe i leki generyczne wbrew potocznej opinii nie są tożsame, są podobne, ale nie są identyczne. Wprowadzony został termin „biosimilar”, a zatem „biologicznie podobny”. Wyjaśnienie tej kwestii zawarte jest w definicji leku generycznego, który charakteryzowany jest poprzez zasadnicze podobieństwo (ang. *essential similarity*) z lekiem oryginalnym. Polega ono na tym, że mamy ten sam związek chemiczny, stosujemy taką samą formę podania (doustna, iniekcyjna itd.) i tę samą dawkę. Podstawową jednak kwestią są odpowiedzi na pytania: Czy lek charakteryzuje również taka sama biodostępność? Czy wpływ na ludzki organizm jest identyczny? Jakie są uwarunkowania?

Podkreślić z całym naciskiem należy, że nie mają zdolności patentowej idee, pomysły, prawa przyrody oraz wynalazki, których wykorzystanie mogłoby być sprzeczne z porządkiem publicznym lub dobrymi obyczajami, jak sposoby klonowania ludzi, procesy modyfikacji tożsamości genetycznej linii zarodkowej człowieka, stosowanie embriónów ludzkich dla celów przemysłowych lub handlowych, sposoby modyfikacji genetycznej zwierząt powodujące ich cierpienia, bez istotnej korzyści medycznej dla człowie-

ka lub zwierzęcia. Zdolności patentowej nie mają również otrzymane w ten sposób zwierzęta.

NIEKOMERCYJNE KORZYSTANIE Z PATENTÓW

Jednym z najczęściej formułowanych błędnych zarzutów jest stwierdzenie, że patenty to tajemnica, blokowanie postępu i ograniczenie podstawowych prac naukowych. Specyficzną „ceną” za uzyskanie wyłączności praw przez zgłaszającego jest ujawnienie jego rozwiązania. Każdy opatentowany wynalazek jest opisany w literaturze w sposób umożliwiający jego odtworzenie. Te informacje są ogólnie dostępne. W związku z tym literatura dotycząca patentu jest powszechnie znana zainteresowanym. Mamy zatem do czynienia ze stymulacją wymiany informacji naukowej i technicznej, a nie z ograniczeniem dostępu do niej. Kwestią kolejną jest to, że nie tylko literatura, ale także opisane wynalazki są dostępne dla wszystkich, bez wnoszenia opłat, w czystych celach naukowych i dydaktycznych. Oczywiście, jeżeli prowadzone badania podstawowe, w których wykorzystywane są preparaty, procedury, metody czy też techniki zawarte w opatentowanych wynalazkach zaowocują komercjalizacją (czy też kolejnym zgłoszeniem patentowym) – to konieczne jest uzyskanie licencji od właściciela wykorzystywanego patentu i poniesienie stosownych opłat. W prawie własności przemysłowej zakłada się także możliwość niekomercyjnego zastosowania patentów. Zgodnie z art. 69.1. Pwp nie narusza się patentu przykładowo przez: 1) korzystanie z wynalazku dotyczącego środków komunikacji i ich części lub urządzeń, które znajdują się na obszarze RP czasowo, a także przedmiotów, które znajdują się na tym obszarze w komunikacji tranzytowej; 2) korzystanie z wynalazku dla celów państwowych, w niezbędnym wymiarze, bez prawa wyłączności, jeżeli jest to konieczne do zapobieżenia lub usunięcia stanu zagrożenia ważnych interesów Państwa, w szczególności w zakresie bezpieczeństwa i porządku publicznego; 3) **stosowanie wynalazków do celów badawczych i doświadczalnych, dla dokonania jego oceny, analizy albo nauczania**; 4) korzystanie z wynalazku, w niezbędnym zakresie, dla wykonania czynności, jakie na podstawie przepisów prawa są wymagane dla uzyskania rejestracji bądź zezwolenia, stanowiących warunków dopuszczenia do obrotu niektórych wytworów ze względu na ich przeznaczenie, w szczególności środków farmaceutycznych; 5) wykonanie leku w aptece na podstawie indywidualnej recepty lekarskiej; 6) osobie, której wynalazek jest wykorzystywany do celów państwowych przysługujące prawo do wynagrodzenia ze środków budżetu Państwa, w wysokości odpowiadającej wartości rynkowej licencji; 7) uzyskanie rejestracji bądź zezwolenia, o których mowa w ust. 1 pkt 4, nie wpływa na odpowiedzialność cywilną za wprowadzenie wyrobów do obrotu bez zgody uprawnionego, jeżeli taka zgoda jest potrzebna.

URZĄD PATENTOWY I RZECZNIKY PATENTOWI

Zgłoszenie patentowe w przypadku osoby prawnej wymaga pośrednictwa i pomocy rzecznika patentowego. Natomiast osoba fizyczna może dokonać zgłoszenia samodzielnie. Podstawowe zadanie rzecznika patentowego to dokonanie analizy patentowych baz danych i zbadanie istniejącego stanu techniki aby sprawdzić i ocenić czy dane

rozwiązanie jest nowe i cechuje się odpowiednim poziomem wynalazczym, tak aby spełniało założone kryteria i miało szansę na uzyskanie ochrony patentowej. Dalszym etapem jest opracowanie zgłoszenia patentowego zgodnie ze specyficznym „schematem” i „językiem” wymaganym przez urząd patentowy. Praca rzecznika patentowego ma szczególnie istotne znaczenie właśnie ze względu na postępowanie przed urzędami patentowymi poszczególnych państw oraz przed Europejskim Urzędem Patentowym. Pozwala uniknąć wielu niejasności i nieporozumień związanych ze specyfiką procedur.

Ze względów zupełnie oczywistych podstawowe znaczenie mają dwa pozornie proste pytania: po pierwsze ile to kosztuje, a po drugie ile „na patencie” można zarobić. Drugie pytanie prowadzi do prostej odpowiedzi: dopóki ktoś nie kupi naszego patentu – to wynalazca ma tylko wydatki. Natomiast cena sprzedaży (patentu w całości czy też licencji częściowej) jest kwestią całkowicie umowną. Przy wszelkich działaniach dotyczących zakupu – sprzedaży praw do patentu czy też np. licencji, z pewnością zasadna jest pomoc rzecznika patentowego oraz radcy prawnego. Kolejnym poważnym zagadnieniem jest kwestia podziału zysków bowiem jest to sprawa umowna. W przypadku placówek takich jak uniwersytety często sugeruje się model „1/3” lub „50:25:25”, co oznacza przykładowo 50% zysków dla wynalazcy – autora, a po 25% dla laboratorium (na rozwój pracowni) oraz placówki macierzystej, która finansuje całość prac i zapewnia zaplecze logistyczne. Bardzo częsty jest również odwrotny stosunek zysków dla poszczególnych stron.

Natomiast koszty zgłoszenia patentowego są bardzo zróżnicowane. Procedura i koszty zgłoszenia krajowego obejmujące badanie stanu techniki, honorarium rzecznika, zgłoszenie i opłaty urzędowe, mieści się w przedziale 5000-10 000 zł. Natomiast opłaty za utrzymywanie ochrony (po uzyskaniu patentu) – to kwota ok. 10 000 zł/20 lat. Opłaty przy wejściu w fazę międzynarodową w trybie PCT (ang. *Patent Cooperation Treaty*, Układ o Współpracy Patentowej) obejmujące badanie stanu techniki, honorarium rzecznika, zgłoszenie i opłaty urzędowe, uzależnione są oczywiście od liczby krajów, niezbędnych tłumaczeń (liczby języków tłumaczenia oraz objętości maszynopisu) oraz okresu ponoszonych opłat. W przypadku 8 państw Unii Europejskiej jest to kwota rzędu 50 000 euro na 10 lat. Zrozumiałe, podane koszty mają jedynie charakter bardzo orientacyjny.

W 2005 r. w UP RP dokonano 2028 polskich zgłoszeń patentowych. W tym samym roku dokonano w Polsce 4565 zgłoszeń międzynarodowych, z zagranicy do Polski. Natomiast w 2003 r. polscy wynalazcy uzyskali 160 patentów w Europejskim Urzędzie Patentowym (przy liczbie 62 000 patentów przyznanych wynalazcom z innych krajów UE).

WNIOSKI

Niewątpliwie system własności przemysłowej jest wysoce niedoskonały i budzi wiele uzasadnionych obiekcji. Jednakże nie mamy innej alternatywy aniżeli zaakceptowanie istniejącego stanu i korzystania z niego. Podsumowując, można sformułować kilka zasadniczych kwestii. W przy-

padku komercjalizacji nauki: konieczne jest wykorzystanie praw własności przemysłowej dla stymulacji rozwoju nauki i przemysłu. Należy uświadamiać, że patenty są źródłem informacji naukowej, a nie (jak często się mówi potocznie) formą ukrywania wiedzy. Niezależnie od faktu publikacji zgłoszenia patentowego po dokonaniu zgłoszenia zasadna i słuszna jest publikacja pracy naukowej. Pomimo że koszty patentowania międzynarodowego są bardzo wysokie to istnieją obecnie programy wspierające polskie rozwiązania naukowe i możliwość dofinansowania z resortu nauki. Należy też pamiętać o tym, że zgłoszenie patentowe w trybie europejskim międzynarodowym daje realną możliwość znalezienia już w trakcie zgłoszenia nabywcy patentu bądź licencjobiorcy i pozyskania strategicznego partnera w dalszych etapach komercjalizacji. Współpraca pomiędzy uczonymi a rzecznikami patentowymi i ludźmi biznesu jest koniecznością, aczkolwiek wymaga pokonania wielu barier. Jednakże szanowanie i korzystanie z praw własności intelektualnej jest koniecznością.


PIŚMIENNICTWO

- Program Ministra NiSzW „Wsparcie patentowania wynalazków powstających w jednostkach naukowych” ustanowiony na podstawie art. 14 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 8 października 2004 r. o zasadach finansowania nauki (Dz. U. Nr 238, poz. 2390)
- Twardowski T, Twardowska A (2004) Protecting Biotech Invention Rights. *Europ Biotechnol News* 3: 27-29
- Konwencja o udzielaniu patentów europejskich (Konwencja o patencie europejskim), sporządzona w Monachium dnia 5 października 1973 r., zmieniona aktem zmieniającym artykuł 63 Konwencji z 17 grudnia 1991 r. oraz decyzjami Rady Administracyjnej Europejskiej Organizacji Patentowej z 21 grudnia 1978 r., 13 grudnia 1994 r., 20 października 1995 r., 5 grudnia 1996 r. oraz 10 grudnia 1998 r., wraz z Protokołami stanowiącymi jej integralną część (Dz. U. z 2004 r., nr 79, poz. 737)
- Poradnik wynalazcy „Metodyka badania zdolności patentowej wynalazków i wzorów użytkowych”, UP RP, Warszawa 2006

Intellectual property in natural sciences

Tomasz Twardowski 

Institute of Bioorganic Chemistry PAS, 12 Noskowskiego St., 61-704 Poznań and Technical University of Łódź, Poland

 e-mail: twardows@ibch.poznan.pl

Key words: patents, intellectual property rights, Poland

ABSTRACT:

The way from scientific finding through invention to production line and finally to the consumer is long and expensive and patent should be taken into account. This is evident because the investment connected with the new application needs clear definition of intellectual property rights. Independently what we personally think about patenting in nature sciences – this is a common practice around the world. The positive and negative parameters of patenting are focus on biotechnology. The development of biotechnology is a cumulative effect of co-operation of several disciplines: biology, biochemistry, chemistry, engineering, genetics, medicines and pharmacy and many more. Between not cited here is law and consequently the needs of cooperation between researchers and lawyers. There are several barriers in this co-operation, for example: nomenclature as well as the way of thinking. These borders could be pass only with intercommunication and cross-understanding. The dialog and transfer of knowledge is a must for understanding the nomenclature, terminology of nature by lawyers and by researchers in case of law.

Polish legislation concerning intellectual rights is regulated by the law „Prawo własności przemysłowej” (30 June, 2000; Dz. U. 2003, Nr 119, pos. 1117, with later amendments). This legislation is related to European Union directives and Munich Convention. Accordingly patenting of product and process is possible in Poland. However, the procedure is time and money consuming, particularly in the case of patent submission in several countries. Amendment of the Polish law to biotechnology made possible patenting of living organism and their parts. It is worth to stress that patented inventions can be used free of charge for research and teaching.

Izabela Łacka

Roland Wakieć

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; tel.: (058) 347 16 93, e-mail: lackaiza@wp.pl

Artykuł otrzymano 30 listopada 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 10 grudnia 2007 r.

Słowa kluczowe: oporność wielolekowa, komórki grzybowe, transportery ABC, białka MFS, pompy wyrzutowe

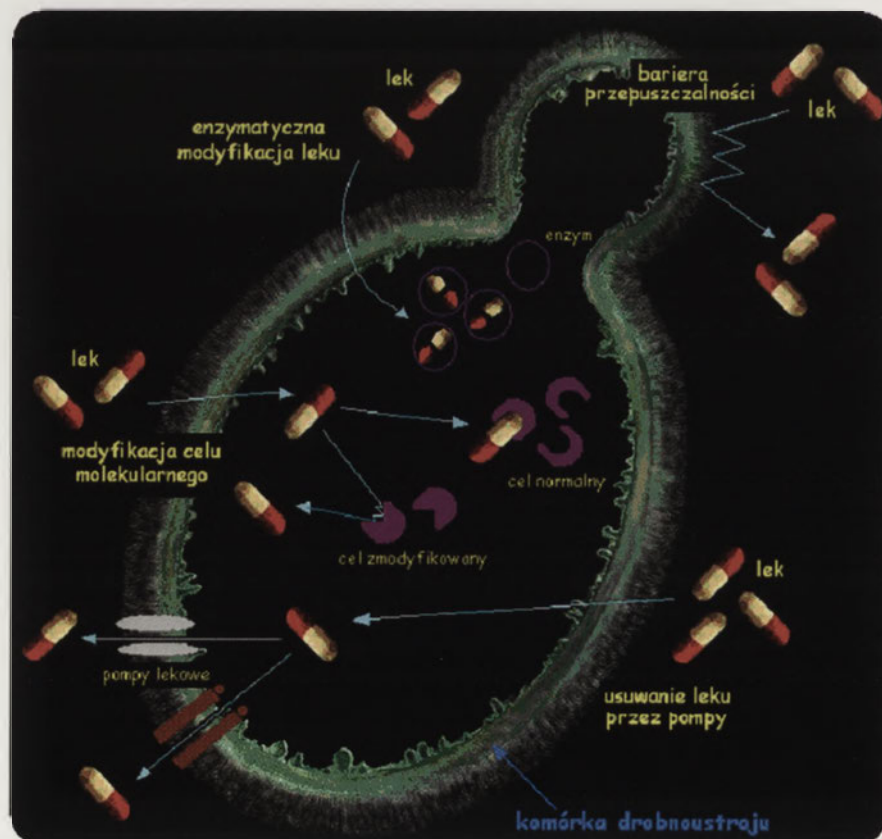
Wykaz skrótów: ABC – domena wiążąca ATP (ang. *ATP binding cassette*), NBD – domena wiążąca nukleotydy (ang. *nucleotide binding domain*), MDR – oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*), MFS – rodzina głównych białek wspomagających (ang. *major facilitator superfamily*), P-gp – glikoproteina P, TMD – domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*), TMS – segment transbłonowy (ang. *transmembrane segment*)

Podziękowania: Składamy serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu za cenne uwagi i pomoc przy pisaniu pracy oraz Panu Łukaszowi Wojasowi za wykonanie ilustracji

Oporność grzybów patogennych na naturalne oraz syntetyczne chemoterapeutyki staje się coraz większym wyzwaniem współczesnej terapii. W klinikach pojawiają się z narastającą częstotliwością patogenne drożdżaki i grzyby filamentujące, odporne na większość stosowanych leków. Spośród wielu typów oporności grzybów najgroźniejszym wydaje się oporność wielolekowa. Wśród mechanizmów, które leżą u podstaw tej oporności, za najważniejszy należy uznać nadprodukcję błonowych białek transportujących ksenobiotyki (w tym leki), których działanie powoduje eliminację cząsteczek leku z komórek będących celem chemoterapii. W komórkach grzybów wykazano obecność transporterów ksenobiotyków typu ABC i MFS. Spośród wielu strategii pokonywania oporności wielolekowej patogenów grzybowych jedną z ważniejszych jest stosowanie związków chemicznych, których podawanie w kombinacji z chemoterapeutykami przywraca wrażliwość komórek opornych na działanie leku. Związki te działają na zasadzie kompetycji substratowej, wpływu na fizykochemiczne właściwości fazy lipidowej błony komórkowej lub też jako modulatory aktywności transporterów wielolekowych. W niniejszym artykule omówiono obecny stan wiedzy na temat białek warunkujących oporność wielolekową komórek grzybowych oraz sposobów jej pokonywania za pomocą interwencji farmakologicznej.

WPROWADZENIE

W ostatnich dwóch dekadach znacznie zwiększyła się częstość pojawiania się zakażeń grzybiczych. Przeważnie są to grzybice powierzchniowe, np. jamy ustnej, ale coraz częściej obserwuje się postaci inwazyjne powiązane z zakażeniem narządów wewnętrznych: przewodu pokarmowego, płuc, wątroby, śledziony, gałki ocznej oraz mózgu [1,2]. Sytuacja ta, paradoksalnie, jest w znacznym stopniu spowodowana rozwojem współczesnej medycyny, coraz większą liczbą pacjentów poddawanych intensywnemu leczeniu cytostatykami, radioterapii, leczeniu immunosupresyjnemu oraz skutecznemu leczeniu zakażeń bakteryjnych przez stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania [3,4]. Podgrupą



Rycina 1. Przykładowe mechanizmy oporności drożdżowców na chemoterapeutyki.

chorych o szczególnie dużym zagrożeniu powikłaniami w postaci inwazyjnych zakażeń grzybiczych są pacjenci po transplantacji szpiku kostnego [3]. Ponadto zagrożeni są chorzy poddawani przeszczepom narządów i przewlekłej immunosupresji, chorzy na AIDS oraz przedwcześnie urodzone niemowlęta [1]. Przyczyną infekcji są najczęściej grzyby z rodzaju *Candida* (około 50 % przypadków) i *Aspergillus* (około 29 % przypadków) [1,5]. Coraz częściej z organizmów pacjentów izoluje się szczepy odporne na leczenie większością dostępnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Szczepy te charakteryzują się nie tylko opornością nabytą podczas leczenia, lecz co niepokojące, także opornością na leki, którymi pacjenci traktowani są po raz pierwszy.

Drobnoustroje, w tym także grzyby patogenne dla człowieka, wykształciły wiele mechanizmów oporności gwarantujących im przeżycie w obecności toksycznej dla nich substancji. Niektóre z nich przedstawiono na Ryc. 1. Oporność może być wynikiem wytworzenia bądź bariery przepuszczalności uniemożliwiającej lekowi dostanie się do wnętrza komórki i osiągnięcie celu, bądź inaktywacji związku w wyniku działania specyficznych enzymów lub przez jego związanie ze strukturami komórkowymi, bądź wzmożonej syntezy celu molekularnego lub jego modyfikacji w rezultacie mutacji, czy też wytworzenia zastępczych dróg metabolicznych. Oprócz wymienionych mechanizmów, które warunkują tzw. oporność specyficzną, w populacji patogennych drobnoustrojów pojawiają się coraz częściej mechanizmy oporności plejotropowej lub inaczej wielolekowej, warunkowane nadprodukcją białek błonowych znanych pod zbiorczą nazwą transporterów lub pomp wielolekowych. Białka te bardzo skutecznie transportują poza komórkę szeroką gamę strukturalnie i funkcjonalnie niepowiązanych ze sobą związków chemicznych o charakterze ksenobiotyków, w tym także chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Szerokie spektrum substratowe transporterów wielolekowych jest wytłumaczeniem obserwowanego zjawiska oporności wielolekowej (MDR, ang. *multi-drug resistance*). Obecność transporterów wielolekowych jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w chemoterapii chorób nowotworowych, jednakże zjawisko to dotyczy w coraz większym stopniu także chorób zakaźnych wywoływanych przez patogenne drobnoustroje, w tym grzybic układowych.

TRANSPORTERY WIELOLEKOWE GRZYBÓW

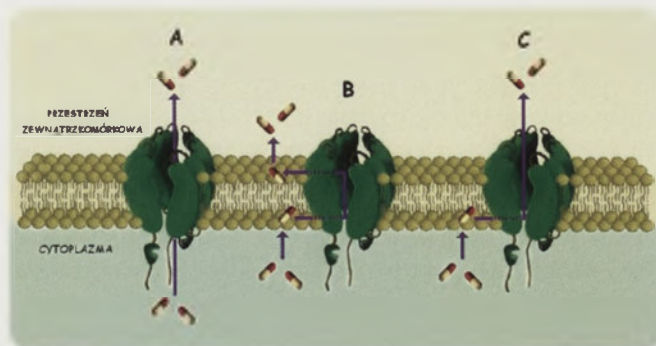
Białka transportowe, odpowiedzialne za zależny od zużycia energii transport ksenobiotyków z cytoplazmy na zewnątrz komórki są obecne we wszystkich organizmach żywych, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Mimo iż występują u tak różnych organizmów, posiadają wiele cech wspólnych pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Transportery tego rodzaju zlokalizowane są w błonie plazmatycznej, w mitochondriach, peroksisomach i na terenie cytoplazmy. Biorąc pod uwagę rodzaj energii wykorzystywanej do przenoszenia substancji, a także pewne cechy strukturalne wyróżnia się dwa główne rodzaje tych białek. Pierwszy z nich stanowią transportery I-rzędowe, wykorzystujące energię z hydrolizy ATP, należące do rodziny białek ABC (ang. *ATP binding cassette*). Drugi rodzaj stanowią transportery II-rzędowe, czerpiące energię

z gradientu stężeń protonów występującego w poprzek błony biologicznej. Zalicza się do niej białka MFS (ang. *major facilitator superfamily*), RND (ang. *resistance-nodulation-cell division*), SMR (ang. *small MDR superfamily*) i nieco mniej powszechne białka MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*). O ile w przypadku komórek bakteryjnych dominują transportery wielolekowe typu MFS, a w komórkach nowotworowych zdecydowanie przeważają pompy wielolekowe typu ABC, to w komórkach patogennych grzybów stwierdza się obecność transporterów należących do obu klas [6-8]. Transportery te mogą w komórce pełnić różne funkcje, np. kanałów jonowych, przenośnikowych pomp służących do pobierania oraz usuwania z komórek substancji odżywczych lub hydrofobowych leków, a także uczestniczą w translokacji fosfolipidów w poprzek błony plazmatycznej lub w regulacji wewnątrzkomórkowego pH. Ponieważ są one zdolne do usuwania z komórki zarówno endogennych metabolitów, jak i szkodliwych ksenobiotyków przypuszcza się, że ich główną funkcją jest udział w procesach detoksykacji [9,10].

MECHANIZMY DZIAŁANIA TRANSPORTERÓW WIELOLEKOWYCH

Proponowane są trzy modele działania transporterów wielolekowych (Ryc. 2). Zgodnie z pierwszym z nich ksenobiotyki są wyrzucane z cytoplazmy na zewnątrz komórki poprzez por fazy wodnej (model poru wodnego, ang. *aqueous pore model*). W myśl drugiej hipotezy pompy wielolekowe działają jak flipazy, transportując chemoterapeutyki z wewnętrznego do zewnętrznego listka błony komórkowej, zanim cząsteczki leku zdążą przeniknąć do cytoplazmy (ang. *flippase model*). Trzecia hipoteza zakłada, że transportery są „molekularnymi odkurzaczami” – wysysają hydrofobowe cząsteczki chemoterapeutyku z cytoplazmatycznej warstwy błony i aktywnie transportują je na zewnątrz komórki (ang. *hydrophobic vacuum cleaner model*) [9].

Istnieją dane doświadczalne potwierdzające prawdziwość każdej z tych hipotez. Wykazano m.in., że wiązanie i transport hydrofilowych substratów pomp, takich jak aminoglikozydy zachodzi bezpośrednio z cytoplazmy [11]. Przypuszcza się, że dla większości chemoterapeutyków przeciwgrzybowych, których cząsteczki mają charakter stosunkowo hydrofobowy, najbardziej prawdopodobny jest wychwyty cząsteczek przez pompy z błony komórkowej, zanim nastąpi ich uwolnienie do wnętrza komórki. Cząsteczki



Rycina 2. Prawdopodobne mechanizmy działania transporterów wielolekowych. A – por wodny, B – flipaza, C – odkurzacz molekularny. Szczegółowy opis w tekście.

leku, które przedostaną się do cytoplazmy, ale nie zwiążą się ze strukturami wewnątrzkomórkowymi, wiążą się z wewnętrzną warstwą błony cytoplazmatycznej i zostają poddane aktywnemu transportowi pomp wielolekowych [11]. Taki sposób działania jest zatem kombinacją modelu flipazy i molekularnego odkurzacza.

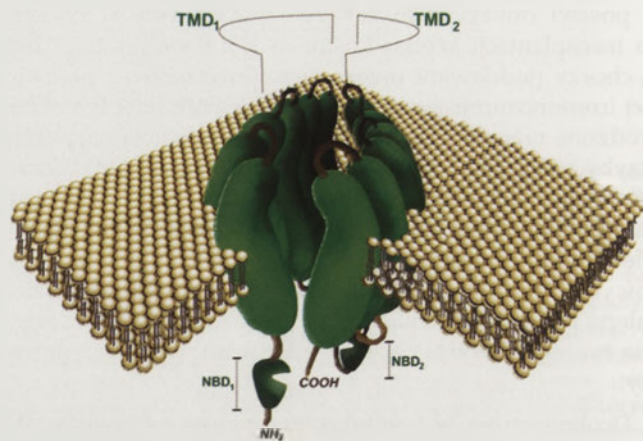
TRANSPORTERY WIELOLEKOWE TYPU ABC

Białka ABC zbudowane są przeważnie z czterech domen strukturalnych, których organizacja przestrzenna różni się w obrębie rodziny. Dwie domeny zawierające kilka segmentów zakotwiczone są w błonie – TMD₁ i TMD₂ (ang. *transmembrane spanning domain*), a dwie domeny wiążące nukleotydy NBD₁ i NBD₂ (ang. *nucleotide binding domain*) pozostają w cytoplazmie (Ryc. 3). Domeny NBD zawierają fragmenty Walker A (G-X₄G-K-S/T) i Walker B (reszta hydrofobowa₄-D) oraz tak zwany „motyw C” zgodnej sekwencji lub „motyw ABC” (L/V-SGG-X₃R-reszta hydrofobowa-X-reszta hydrofobowa-A), poprzedzający fragment Walker B [12]. Sekwencje Walker A i B odpowiedzialne są za hydrolizę ATP, dostarczającą energię niezbędną do transportu [13].

Na podstawie podobieństw sekwencji, białka ABC pochodzące z *Saccharomyces cerevisiae* podzielono na sześć podrodziny, PDR (ang. *pleiotropic drug resistance*), MDR (ang. *multidrug resistance*), MRP/CFTR (ang. *multidrug resistance associated protein/ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), RL1 (ang. *RNase L Inhibitor 1*), YEF3 (ang. *yeast elongation factor 3*) oraz ALDP (ang. *adrenoleukodystrophy protein*) [7].

Białka należące do podrodziny PDR odgrywają rolę w powstawaniu oporności na leki przeciwgrzybowe i stanowią grupę jednych z najlepiej poznanych transporterów ABC z *Saccharomyces cerevisiae*. Przedstawiciele podrodziny MRP/CFTR przyczyniają się do powstawania oporności na chemoterapeutyki oraz nieorganiczne jony. Białka podrodziny RL1 i YEF3 nie posiadają domen TMD (topologia (NBD)₂) i są prawdopodobnie niezdolne do transportu substancji. Wszystko wskazuje, że przedstawiciele podrodziny ALDP, o topologii TMS₆-NBD, uczestniczą w procesach utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [13,14].

Spośród transporterów wielolekowych typu ABC występujących w komórkach grzybów, stosunkowo najlepiej poznany jest białko występujące w komórkach drożdży. Wśród zidentyfikowanych do tej pory pomp ABC z *S. cerevisiae*, tylko kilka białek należących do podrodziny PDR transportuje leki poza komórkę. Pdr5p, pierwsze białko transportowe zidentyfikowane u *S. cerevisiae*, jest szczególnie interesujące ze względu na podobieństwo sekwencji z ludzkim białkiem Mdr1p [13]. Co ciekawe, topologia białka Pdr5p, (NBD-TMS₆)₂, stanowi lustrzane odbicie struktury białka Mdr1p. Znaczenie inwersji domen pomiędzy tymi bliskimi homologami transporterów lekowych nie jest znane. Spektrum substratowe białka Pdr5p obejmuje między innymi leki przeciwgrzybowe, herbicydy, fungicydy, leki przeciwnowotworowe oraz ludzkie hormony steroidowe, takie jak β-estradiol i kortykosterol [15].



Rycina 3. Białko transportowe typu ABC. Szczegółowy opis w tekście.

Mutageniza kilku reszt aminokwasowych Pdr5p w rejonach NBD o sekwencji zachowanej w ewolucji czyli transbłonowym segmencie TM10 oraz pętli 6 leżącej pomiędzy segmentami TM11 i TM12, doprowadziła do drastycznych zmian w specyficzności substratowej tego białka [16]. Na tej podstawie można przypuszczać, że rejonny te uczestniczą w wiązaniu substratów do transportera Pdr5p.

Kolejny przedstawiciel podrodziny PDR i bliski homolog Pdr5p, białko Snq2p, jest główną przyczyną powstawania oporności na mutagen *N*-tlenek 4-nitrochinoliny (NQO). Białko Pdr12p, pomimo 37 % identyczności z Pdr5p i Snq2p, nie przyczynia się do oporności ani na NQO, substrat specyficzny dla Snq2p, ani na cykloheximid, substrat charakterystyczny dla Pdr5p. Substratami Pdr12p są natomiast słabe kwasy organiczne, takie jak: sorbiniany, benzoesany, octany i propioniany, często stosowane jako konserwanty żywności [13,17].

Transportery Yor1p i Ycf1p, należące do podrodziny MRP/CFTR, przyczyniają się do powstawania oporności odpowiednio na oligomycynę oraz kadm [13]. Białko Ycf1p zlokalizowane jest w błonie wakuolarniej i uczestniczy w procesach detoksykacji, działając jako transporter koniugatów glutationu. Białko Yrs1p transportuje natomiast organiczne aniony zawierające w swej strukturze grupy karboksylowe [13].

W przeciwieństwie do *S. cerevisiae*, pompy innych szczepów *Saccharomyces* są słabo poznane. Częściowo scharakteryzowane zostały dwa transportery leków pochodzące z *Schizosaccharomyces pombe*, *bfr1*⁺ i *pmd1*⁺. Podczas gdy *bfr1*⁺ odpowiada za oporność na takie związki jak brefeldyna A, cerulenina i cytochalazyna B, *pmd1*⁺ jest odpowiedzialny za powstawanie oporności między innymi na leptomycynę B. Inne białko, *hmt1*⁺, jest jednym z czynników przyczyniających się do tolerancji grzybów na obecność metali ciężkich, wynikającej z usuwania metali do wnętrza wakuoli w postaci kompleksów z fitochelatynami [18].

Pierwszą pompą typu ABC scharakteryzowaną w patogenicznych szczepach grzybów było białko Cdr1p z *Candida*

albicans o spektrum substratowym obejmującym m.in. cykloheximid oraz syntetyczne chemoterapeutyki przeciwgrzybowe, takie jak flukonazol, ketokonazol i itraconazol [19]. Gen *CDR1* koduje białko zbudowane z 1501 reszt aminokwasowych, o topologii podobnej do Pdr5p oraz Snq2p z *S. cerevisiae* [19]. Pomimo wielu strukturalnych i funkcjonalnych podobieństw pomiędzy Cdr1p i Pdr5p, istnieją między nimi także widoczne różnice. Przykładowo obecność genu *CDR1* zmniejsza wrażliwość komórek na oligomycynę, natomiast ani amplifikacja, ani rozbitcie genu *PDR5* nie zmienia wrażliwości komórek grzybów na ten związek [19].

W celu uzyskania informacji na temat wiązania i transportu substratów wykonano badanie polegające na delecji 79 reszt aminokwasowych z C-końca białka Cdr1p (obejmujących segment TM12). Ingerencja ta nie powodowała całkowitej utraty zdolności do wyrzutu związków cytotoksycznych [20]. Natomiast synteza skróconego białka w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* skutkowałą zmianą wrażliwości na leki takie jak cykloheximid, anisomycyna i nystatyna. Niezmieniona pozostawała oporność komórek na o-fenantrolinę, NQO, cerulenin, azole, oligomycynę, erytromycynę, chloramfenikol i benomyl. Można więc domniemywać, że miejsca wiązania pewnych leków w Cdr1p mogą znajdować się właśnie w obrębie segmentu TM12. W przypadku skróconego transportera Cdr1p zaobserwowano również, że niezmiennione pozostały funkcje hydrolizy nukleotydów oraz lokalizacja pomp w błonie komórkowej [20].

Zdolność Cdr1p do transportu steroidów, takich jak β -estradiol i kortykosterol sugeruje, że ludzkie hormony steroidowe mogą również być substratami transporterów wielolekowych [21,22]. Wykazano jednak, że progesteron indukujący nadekspresję genu *CDR1*, nie jest transportowany przez Cdr1p [22]. Niektóre leki usuwane z komórek przez Cdr1p, na przykład cykloheximid, chloramfenikol, flukonazol i o-fenantrolina, redukują wyrzut β -estradiolu i kortykosterolu prawdopodobnie w wyniku kompetycji, co sugeruje nakładanie się miejsc wiązania steroidów i leków [22].

Skoro pompy występujące w organizmach grzybów posiadają zdolność do transportu hormonów steroidowych człowieka, jest wielce prawdopodobne, że ich substratem może być także ergosterol, występujący w organizmach grzybów analog cholesterolu człowieka. A to z kolei sugeruje prawdopodobną rolę pomp transportujących leki w utrzymaniu homeostazy sterolowej w komórkach grzybów [23].

Warto wspomnieć także o różnicach pomiędzy homologami Cdr1p pochodzącymi z *Candida albicans*. Białko Cdr2p, identyczne z Cdr1p w 84 %, charakteryzuje się odmiennym spektrum substratowym [24]. Nadekspresja lub delecja *CDR3* i *CDR4*, genów kodujących homologi Cdr1p i Cdr2p, nie wpływa na wrażliwość komórek grzybów na leki [25]. Produkty genów *CDR1* i *CDR3* posiadają taką samą topologię (NBD-TMS₆), jedyną widoczną różnicą zdaje się być struktura regionu C-końcowego - białko Cdr3p posiada wydłużoną pętlę, łączącą transbłonowe segmenty TM11 i TM12. Dodatkowo analiza C-końcowego fragmentu pompy Cdr3p ukazuje sekwencję 21 reszt aminokwasowych, której brak w przypadku białka Cdr1p. Biorąc pod uwagę fakt, że

fragment C-końcowy transporterów odpowiada za wiązanie leków, wymienione różnice mogą tłumaczyć odmienną specyficzność substratową pomp [20,26].

Nadekspresja genów kodujących transportery Cdr1p i/ lub Cdr2p może paradoksalnie spowodować zwiększenie wrażliwości komórek grzybów na niektóre związki przeciwgrzybowe. Zjawisko takie stwierdzono w przypadku działania związku FK520 na komórki *C. albicans* z nadekspresją *CDR1* [24], lipopeptydowego chemoterapeutyku przeciwgrzybowego, mikafunginy, na komórki tego samego drożdżaka z nadekspresją genu *CDR2* [27] oraz syntetycznych oligopeptydów zawierających w swojej strukturze aminokwasowe inhibitory syntazy glukozyamin-6-fosforanu na komórki *C. albicans*, nadprodukujące Cdr1p lub Cdr2p [28].

Z punktu widzenia leczenia zakażeń wywołanych przez patogeniczne grzyby odporne na konkretny lek, istotna jest ich wrażliwość na pozostałe chemoterapeutyki przeciwgrzybowe. Do nowej klasy związków z grupy echinokandyn należy kaspofungina, która wybiórczo hamuje syntezę β -(1-3)-D-glukanu, uszkadzając w ten sposób integralność ściany komórkowej grzybów. W wyniku niestabilności osmotycznej dochodzi do rozpadu komórki [29]. Początkowe badania wpływu kaspofunginy na szczepy *Candida albicans* odporne na flukonazol w wyniku nadekspresji pomp *CDR* i *MDR1* nie dały jednoznacznych rezultatów [30]. Z doświadczeń przeprowadzonych na szczepach *Saccharomyces cerevisiae* z nadekspresją *CDR1* i *CDR2* wynika, że białka Cdr2p oraz, w mniejszym stopniu, Cdr1p przyczyniają się do wykształcania oporności komórek grzybowych na ten związek [31]. Inni badacze stwierdzili [27], że nadprodukcja białka Cdr2p powoduje jedynie słaby spadek wrażliwości komórek *Candida albicans* na kaspofunginę, natomiast zaobserwowano wysoki wzrost wrażliwości na mikafunginę, inny związek z grupy echinokandyn.

Działanie antybiotyku polienowego powszechnie stosowanego w terapii grzybic, amfoterycyny B (AmB) oraz jej dwóch półsyntetycznych pochodnych AMA (amid 3-dimetyloaminopropylowy AmB) i MFAME (ester metylowy *N*-metylo-*N*-D-fruktopyranozylo AmB) przetestowano pod kątem aktywności wobec komórek *Saccharomyces cerevisiae* ADCDR2 i ADCaMDR1 nadprodukujących białka Cdr2p i CaMdr1p [32]. Wykazano, że obecność pomp (typu ABC lub MFS) nie ma wpływu na działanie amfoterycyny B i jej pochodnych. Wrażliwość transformantów jest porównywalna z poziomem charakterystycznym dla szczepu wrażliwego AD1234568 nie zawierającego pomp wielolekowych. AmB i jej pochodne prawdopodobnie z powodu dużych rozmiarów nie są substratami białek transportowych, co czyni z nich bardzo skuteczne narzędzia w pokonywaniu zjawiska oporności wielolekowej grzybów [32].

Przeprowadzono również badania przeciwgrzybowej aktywności związków z grupy azoli, amfoterycyny B i mikafunginy na flukonazolo-oporne szczepy *Candida albicans* C26 (nadekspresja *CDR1*) i C40 (nadekspresja *MDR1*). W przypadku obu szczepów zaobserwowano dużą wrażliwość na działanie mikafunginy oraz amfoterycyny B, natomiast w przypadku azoli pojawiła się oporność krzyżowa na ketokonazol. Oporność na itraconazol pojawiła się jedynie w

przypadku szczepu C26 nadprodukującego pompy Cdr1p, co pozwala przypuszczać, że związek ten nie jest substratem białek CaMdr1p [33].

Niedawno opublikowano wyniki badań aktywności vorikonazolu, nowej pochodnej triazolowej wobec, flukonazolo-opornych klinicznych izolatów *Candida albicans* oraz rekombinantowych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* z wklonowanymi genami *CaCDR1*, *CaCDR2* i *CaMDR1*. Skuteczność działania vorikonazolu została porównana z aktywnością innych leków z grupy azoli, flukonazolu, ketokonazolu oraz klotrimazolu. Zaobserwowano obniżoną wrażliwość komórek na badane związki, choć działanie przeciwgrzybowe vorikonazolu okazało się skuteczniejsze niż flukonazolu [27,34]. Badania kompetycji wyrzutu z komórek barwnika fluorescencyjnego (rodaminy 6G) wykazały, że vorikonazol jest najprawdopodobniej substratem pomp Cdr1p i Cdr2p [34].

Geny kodujące transportery ABC zidentyfikowano również w innych szczepach *Candida*. W przypadku *Candida glabrata* są to *CgCDR1*, *CgCDR2* i *PDH1* [35]. *ABC1* i *ABC2* to geny kodujące pompy potencjalnie wpływające na zjawisko lekooporności szczepów *Candida krusei* [36]. Natomiast obecność *CdCDR1* i *CdCDR2* w komórkach *Candida dubliniensis* powoduje zmniejszoną akumulację flukonazolu w opornych izolatach, a nadprodukcja *CdMdr1p* przyczynia się do oporności także na *N*-tlenek 4-nitrochinoliny, cerulenin oraz brefeldin A [37].

Interesująca jest również rola transporterów ABC w przemieszczaniu fosfolipidów. Białka Pdr5p, Yor1p z *Saccharomyces cerevisiae* oraz Cdr1p i Cdr2p z *Candida albicans* pośredniczą w translokacji fosfolipidów w obrębie błony komórkowej. Funkcja nie wydaje się charakterystyczna dla wszystkich pomp lekowych, chociażby ze względu na fakt, że Snq2p, bliski homolog Pdr1p, nie wykazuje tej zdolności [38]. Badania obejmujące głodzenie komórek dowodzą, że translokacja fosfolipidów może być fizjologiczną reakcją komórek na stres środowiskowy [39]. Co ciekawe, Cdr1p i Cdr2p, których nadprodukcja prowadzi do lekooporności, powodują ruch fosfolipidów w kierunku zewnętrznej błony (flopazy), natomiast Cdr3p, białko niezwiązane z opornością na leki, kieruje fosfolipidy do wnętrza (flipaza) [40]. Leki takie jak flukonazol, cykloheximid i mikonazol zaburzają ruch fosfolipidów wynikający z aktywności Cdr1p i

Cdr2p, nie wpływają zaś na translokację, w której pośredniczy Cdr3p. Różnice w kierunku transferu fosfolipidów pomiędzy pompami Cdrp mogą więc wynikać z ich zdolności do wyrzutu leków. Cdr4p, białko o niepoznanym do tej pory znaczeniu w zjawisku MDR, również posiada zdolność translokacji fosfolipidów [40].

Homologi *CDR1* z innych szczepów *Candida* nie zostały do tej pory zbadane pod kątem translokacji fosfolipidów, lecz biorąc pod uwagę strukturalną i funkcjonalną homologię, jest bardzo prawdopodobne, że niektóre z nich również odgrywają tę rolę.

Oportunistyczne szczepy filamentujących grzybów *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus flavus* mogą być przyczyną trudnych w leczeniu aspergilloz, często prowadzących do śmierci w przypadku pacjentów z uszkodzonymi mechanizmami oporności [41].

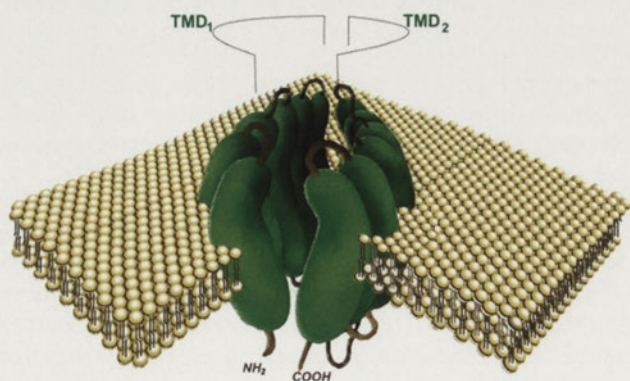
Badania przeprowadzone na szczepach *A. fumigatus* charakteryzujących się opornością na itrakonazol sugerują, że bardzo prawdopodobnym mechanizmem oporności jest obecność pomp usuwających ten azol z komórek. Do białek transportowych typu ABC związanych z lekoopornością w *A. fumigatus* należą między innymi: AfuMdr1p, AfuMdr2p, AfuMdr4p i AtrFp. AfuMdr1p charakteryzuje się dużym stopniem podobieństwa do pompy pmd1⁺ z *Schizosaccharomyces pombe* i do białka MDR1 człowieka, a ekspresja jego genu w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* skutkowałą opornością na cilofunginę, przeciwgrzybowy analog echinokandyny B. Badania sekwencji genu *AfIMDR1* z *Aspergillus flavus* wykazały duży stopień homologii z genem *AfuMDR1* [42].

Transportery typu ABC zidentyfikowano także w komórkach *Aspergillus nidulans*. AtrAp i AtrBp posiadają taką samą topologię jak Pdr4p i Snq2p z *Saccharomyces cerevisiae* oraz Cdr1p z *Candida albicans* - (NBD-TMD)₂. W wyniku nadmiernej syntezy AtrBp zaobserwowano pojawienie się oporności na wiele fungicydów i naturalnych toksyn oraz co ciekawe, zwiększenie wrażliwości na fungicydy ditiokarbaminianowe, chlorothalonil i antybiotyk felomycynę [43].

Białko transportowe o budowie typowej dla rodziny ABC odkryto również w komórkach oportunistycznie patogenicznego szczepu *Cryptococcus neoformans* (szczep M1-106) powodującego kryptokokozy narządów wewnętrznych i skóry oraz w filamentujących grzybach *Trichophyton rubrum*, będących przyczyną około 80 % przewlekłych dermatoz skóry i paznokci [44,45]. Struktura zarówno CneMdr1p, jak i TruMdr2p zawiera dwie domeny transbłonowe składające się z sześciu segmentów oraz dwie domeny wiążące ATP o topologii (TMS₆-NBD)₂. Rola transportera z *Cryptococcus neoformans* nie jest do tej pory poznana, o TruMDR2 wiadomo natomiast, że poziom jego ekspresji wpływa na wrażliwość *Trichophyton rubrum* na terbinafinę, *N*-tlenek 4-nitrochinoliny oraz bromek etydyny [44,45].

TRANSPORTERY WIELOLEKOWE TYPU MFS

Transportery wielolekowe typu MFS nie posiadają domeny NBD (Ryc. 4), nie są więc zdolne do hydrolizy ATP.



Rycina 4. Białko transportowe MFS. Szczegółowy opis w tekście.

Energię do aktywnego transportu substancji czerpią z gradientu protonów po obu stronach błony. Pompy typu MFS pełnią w komórkach grzybowych rozmaite funkcje, transportują między innymi chemoterapeutyki, związki cukrowe, intermedyaty cyklu Kresa, estry fosforanowe i fosforany, dostarczają również do komórek oligosacharydy [46].

Transportery MFS, ze względu na liczbę segmentów budujących domeny TMD można podzielić na dwie grupy, zawierające 12 lub 14 transbłonowych segmentów – 12 TMS lub 14 TMS. Przeprowadzone badania wykazały, że N-końcowe rejony różnych białek MFS charakteryzują się znacznie większym podobieństwem niż rejony C-końcowe. Sugeruje to udział domen C-końcowych w rozpoznawaniu substratów, a N-końcowych w translokacji protonów [46].

W przypadku *Saccharomyces cerevisiae*, spośród dotychczas zidentyfikowanych białek z rodziny MFS tylko niektóre, takie jak Flr1p, Atr1p oraz Sge1p, odgrywają rolę w zjawisku wielolekooporności [47]. Odkryto, że Hxt9p oraz Hxt11p, należące do rodziny transporterów MFS przenoszących heksozy, mogą przyczynić się do zmian profilu oporności komórek. Nadekspresja *HXT9* i *HXT11* prowadzi do wrażliwości komórek na leki, natomiast ich delecja powoduje oporność na leki takie jak: cykloheximid, sulfometuron metylowy oraz NQO [48]. Efekt ten jest przeciwny do najczęściej obserwowanego mechanizmu oporności wynikającej z nadekspresji genów kodujących wielolekowe pompy ABC lub MFS.

Geny MFS odgrywające główną rolę w oporności komórek *Candida albicans*, to *CaMDR1* (dawniej zwany *BEN^r*) oraz *FLU1*. *CaMDR1* został początkowo zidentyfikowany jako gen odpowiedzialny za oporność na benomyl i metotreksat. *FLU1* przyczynia się do powstawania oporności na flukonazol, dalsze badania wykazały jednak, że jego specyficznym substratem jest kwas mykofenolowy [49]. *CaMDR1* jest homologiem *FLR1* z *S. cerevisiae*, natomiast *FLU1* wykazuje duże podobieństwo do *ORFYLL028wp*, genu *S. cerevisiae*, który nie koduje żadnego transportera [49]. Obecność pomp *CaMdr1p* w *Saccharomyces cerevisiae* skutkuje opornością na szereg leków, a ich nadprodukcja jest przyczyną oporności na flukonazol w komórkach *Candida albicans* [50]. Ekspresja *CaMDR1* w komórkach *Candida albicans* jest wzmożona między innymi w obecności bemomyli i metotreksatu oraz w klinicznych izolatach opornych na azole. Wykazano, że nadekspresja genu *CaMDR1* jest czynnikiem wystarczającym do zapewnienia oporności na niektóre toksyczne związki będące substratami tej pompy (np. cerulenina i brefeldyna A), a stopień oporności zależy od poziomu ekspresji *CaMdr1p* [50].

Homologi *CaMDR1* zidentyfikowano między innymi w *Candida dubliniensis* (*CdMDR1*) i *Candida glabrata* (*CgMDR1*), gdzie ich nadekspresja jest odpowiedzialna za oporność na flukonazol [35,37]. Białko transportowe *AfuMdr3p* należące do rodziny MFS, zidentyfikowano również w komórkach *Aspergillus fumigatus* [42].

Badania obejmujące wprowadzenie kilku punktowych mutacji do sekwencji *CaMDR1* wykazały, że ważną rolę w oporności wielolekowej odgrywają domeny bogate w se-

kwencje aminokwasowe Ser-Asn-Asp [50]. Jednak zważając na fakt, że domeny te nie są obecne w homologach *CaMdr1p*, takich jak *CdMdr1p* i *Flr1p*, niezbędne są dalsze badania dotyczące roli tych sekwencji [35,50].

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ W KOMÓRKACH GRZYBÓW

W celu dokładnego poznania mechanizmów wpływających na zjawisko oporności wielolekowej, ważne jest zrozumienie molekularnych mechanizmów regulujących ekspresję genów kodujących pompy transportujące leki. Do tej pory scharakteryzowano kilka czynników transkrypcyjnych z *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* należących do sieci regulatorowych PDR (ang. *pleiotropic drug resistance*) i YAP (ang. *yeast activator protein*). Jednak dokładne mechanizmy rządzące regulacją genów związanych z wielolekoopornością nie są jeszcze poznane.

Sieć PDR w *Saccharomyces cerevisiae* zawiera rodzinę regulatorów transkrypcji $Cys_6-Zn(II)_4$, do której należą: *PDR1*, *PDR3*, *PDR7* i *PDR9* [51,52]. Z regulacją ekspresji genów *PDR5*, *SNQ2* i *YOR1* związane są czynniki transkrypcyjne *PDR1* i *PDR3*, a ich działanie polega na wiązaniu się z regionami sekwencji promotorowych genów zwanymi PDRE (ang. *pleiotropic drug resistance elements*). Na ekspresję *SNQ2* i *YOR1* wpływa dodatkowo regulator *YRR1* [53]. Wykazano, że czynniki transkrypcyjne *PDR1* i *PDR3* (regulujące syntezę pomp ABC) wpływają również na białka MFS transportujące heksozy, *HXT9* i *HXT11*, co sugeruje istnienie genetycznych powiązań pomiędzy genami kodującymi dwie rodziny transporterów lekowych – ABC oraz MFS [48].

Regulatory YAP, należące do rodziny białek bZIP, są związane z regulacją oporności na związki, takie jak: cykloheximid, NQO, sulfometuron metylowy i kadm. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* z regulacją genów kodujących pompy wielolekowe związanych jest 8 alleli z rodziny YAP – *YAP1-8* [54]. *YAP1* (zwany także *PARI*, *SNQ3* lub *PDR4*) w celu aktywacji transkrypcji wiąże się z sekwencją DNA YRE (ang. *YAP1 response element*), znajdującą się w obrębie promotora regulowanego genu. Białko *Yap1p* kontroluje ekspresję genów *YCF1* i *FLR1* [55]. *Ycf1p* jest przedstawicielem transporterów ABC, *Flr1p* natomiast należy do białek MFS, *Yap1p* jest więc kolejnym (obok *Pdr1/3p*) czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję pomp wielolekowych należących do obu rodzin transporterów. Innymi przykładami genów regulowanych przez *Yap1p* są: *ATR1*, *TPS2*, *GSH1*, *TRX2*, *TRR1* oraz *GLR1* [54].

W przeciwieństwie do *Saccharomyces cerevisiae*, regulacja MDR w komórkach *Candida albicans* i innych patogenów grzybowych jest słabo poznana.

Jednym z trzech regulatorów FCR (ang. *fluconazole resistance*) w *Candida albicans* jest *FCR1*. Jego delecja prowadzi do oporności na szereg leków, co sugeruje, że *Fcr1p* działa prawdopodobnie jako negatywny regulator ekspresji genów [56]. Innym genem regulatorowym z *Candida albicans* jest *CAP1*, homologiczny do rodziny czynników transkrypcyjnych YAP z *Saccharomyces cerevisiae* [55]. Wśród genów znajdujących się pod kontrolą *CAP1* znajdują się prawdopo-

dobnie *CaMDR1*, *CaYCF1*, *CaGLR1* oraz *CaTRR1* [57]. Delecja *CAP1* prowadzi do rozwoju oporności między innymi na flukonazol, co oznacza, że Cap1p, analogicznie do Fcr1p, działa jako negatywny regulator ekspresji genów [57].

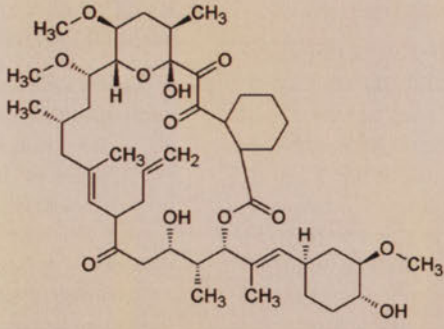
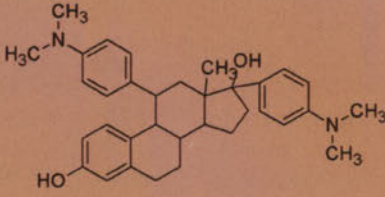
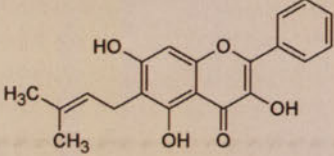
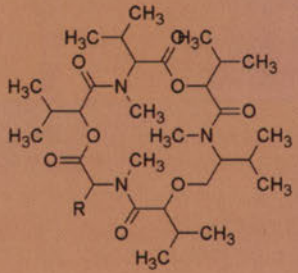
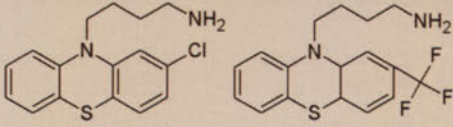
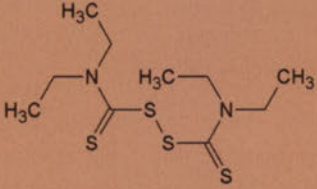
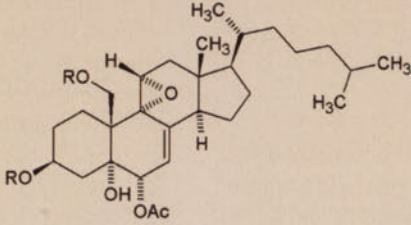
STRATEGIE NIWELOWANIA OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ GRZYBÓW

Najpowszechniej badaną przez naukowców strategią pokonywania zjawiska oporności wielolekowej jest stosowanie związków wpływających na aktywność pomp wielolekowych. Mogą one działać jako inhibitory białkowych transporterów, wiążąc się z nimi i hamując ich działanie lub jako bardzo efektywne substraty, podobne strukturalnie do leku i konkurujące z nim o miejsce wiązania w pompach. Działanie na transportery wielolekowe może być również pośrednie, poprzez wpływ na fizykochemiczne właściwości fazy lipidowej błony komórkowej.

Mimo iż poszukiwania skutecznych związków modulujących działanie białkowych transporterów trwają od ponad dwóch dekad, nie uzyskano do tej pory spektakularnych wyników. Najbardziej zaawansowane są badania nad modulatorami oporności wielolekowej zależnej od P-glikoproteiny (P-gp) w komórkach nowotworowych, zapoczątkowane na początku lat 80-tych XX wieku. Problemem oporności grzybów zainteresowano się znacznie później i dlatego wiedza na temat przywracania ich wrażliwości na leki jest znacznie uboższa. Wiadomo jednak, że budowa i mechanizm działania pomp, znajdujących się w komórkach nowotworowych i grzybowych, są zbliżone [13]. Z tego względu modulatory, działające na komórki nowotworowe, mogą przynieść oczekiwane rezultaty również w komórkach grzybowych.

Ze względu na podobieństwo budowy i struktury nowotworowych białek P-gp oraz grzybowych Cdr1p i Cdr2p, poszukiwania modulatorów pomp w wielolekoopornych komórkach grzybowych początkowo obejmowały badania nad związkami o udowodnionym działaniu na pompy komórek nowotworowych. Wybór badanych grup związków jest jednak często przypadkowy, badania rzadko osiągają etap celowego projektowania, z uwzględnieniem zależności struktury i aktywności. Naukowcy przeważnie szu-

Tabela 1. Modulatory grzybowych pomp wielolekowych.

Struktura związku	Nazwa	Piśmiennictwo
	FK506	58,60
	RU 49953	61
	6-(3,3-dimetyloallilio) galangin	62
	eniatyny	63
	maleniany aminofenotiazyny M961 i M963	64
	disulfiram	72, 73
	9,11 α -epoksycholest-7-en-3 β ,5,6 α ,19-tetrol 6-octan (ECTA)	74

kają potencjalnych modulatorów poprzez badania przesiewowe, wśród różnych rodzin związków chemicznych.

Wiele inhibitorów pomp wykazujących działanie w komórkach ssaków okazało się również skutecznym w przypadku transporterów znajdujących się w komórkach grzybów. Oporność szczepów *Candida* wynikająca z działania pomp Cdr1p i Cdr2p jest odwracana przez związki, takie jak terbinafina, propafenony (np. GP382, substrat pomp typu ABC) oraz makrolid FK506 [58,59]. Związek FK506 (Tabela 1) jest również blokerem pomp CDR z *Saccharomyces cerevisiae*. Jego działanie przywraca komórkom wrażliwość na przeciwgrzybowe azole [60].

Także verapamil, β -estradiol i progesteron, znane inhibitory transporterów wielolekowych typu ABC w komórkach człowieka oraz ibuprofen testowano jako potencjalne modulatory oporności w szczepach *Candida*. Wszystkie badane związki, a szczególnie ibuprofen, okazały się skuteczne, odwracały oporność na flukonazol, itraconazol i vorikonazol. Lipofilowy ibuprofen w wysokich stężeniach charakteryzował się działaniem grzybobójczym, powodował uszkodzenia błon komórkowych. Stężenie niezbędne do zablokowania pomp wielolekowych i odwrócenia oporności na azole było dużo niższe. Steroidy, takie jak progesteron, estradiol, dezoksykortykosteron oraz syntetyczne pochodne, RU 38486 (pochodna progesteronu) i RU 49953 (pochodna estradiolu, Tabela 1), działały hamująco na białko Pdr5p pochodzące z *Saccharomyces cerevisiae* [61]. Dokładne mechanizmy działania wymienionych wyżej związków nie są do tej pory poznane.

Pozytywne wyniki dały także badania nad flawonoidami. Wykazano, że stanowią one potencjalne inhibitory pompy wielolekowej Pdr5p pochodzącej z *Saccharomyces cerevisiae*. Najlepszymi właściwościami charakteryzowała się hydrofobowa pochodna, 6-(3,3-dimetyloallilo) galangina (Tabela 1).

Prenylowane flawonoidy charakteryzują się wysokim powinowactwem do jednego z miejsc wiązania substratów w białku Pdr5p, co skutkuje silnym hamowaniem kompetywnym. Związki te hamują również aktywność UTPazową i ATPazową białka Pdr5p, jednak właściwość tę zaobserwowano dla stosunkowo dużych stężeń flawonoidów [62].

Pompa Pdr5p *S. cerevisiae* jest blokowana przez jonoforowe antybiotyki – eniatyny B, B1 oraz D (Tabela 1). Ich działanie jest kompetytywne wobec związku FK506; aktywność modulatorowa w porównaniu do FK506 jest wyższa, przy znacznie niższej toksyczności. W wiązaniu zarówno eniatyn, jak i związku FK506 zdaje się uczestniczyć domena transbłonowa TMS10 transportera Pdr5p [63].

Potencjalne modulatory transporterów Pdr5p odkryto też wśród pochodnych fenotiazyny, a najbardziej aktywne związki zawierają wolne grupy aminowe na końcu łańcucha butylowego. Maleniany aminofenotiazyny M961 i M963 (Tabela 1) okazały się skutecznymi modulatorami pomp drożdżowych, wykazującymi działanie synergistyczne z ketokonazolem już w zakresie mikromolowych stężeń

związku. Efekt ten był silniejszy niż w przypadku trifluooperazyny, tiorodazyny i chlorpromazyny [64].

Poszukiwania inhibitorów białek Pdr5p objęły również badania przesiewowe pochodnych D-oktapeptydów. Do oznaczania aktywności związków użyto szczepu *Saccharomyces cerevisiae* AD/PDR5⁺ wykazującego nadprodukcję transporterów Pdr5p. Najlepsze wyniki otrzymano dla 4-metoksy-2,3,6-tirmetrylobenzenosulfonylo-podstawionej pochodnej (KN20), która przywracała szczepowi AD/PDR5⁺ wrażliwość na flukonazol, itraconazol i ketokonazol. KN20 hamował również aktywność ATP-azową innych białek ABC, na przykład Cdr1p i Cdr2p w *Candida albicans*. Zaobserwowano także przywrócenie wrażliwości na leki klinicznych izolatów szczepów *Candida* oraz *S. cerevisiae* charakteryzujących się nadprodukcją zarówno pomp ABC, jak i MFS. Związek KN20 hamuje również działanie umiejscowionych w błonie *Saccharomyces cerevisiae* protonowych pomp Pma1p, przy jednoczesnym zwiększeniu przepuszczalności błony dla rodaminu 6G. Na podstawie tych obserwacji wysnuto przypuszczenie, że mechanizm działania związku KN20 może opierać się na uszkodzeniu błony komórkowej [65].

Innym przykładem związku o właściwościach znoszących oporność komórek grzybowych jest izonitryl, który stosowany w nietoksycznych stężeniach oddziaływał z pompami Pdr5p *Saccharomyces cerevisiae*, hamował usuwanie cykloheksymidu i ceruleniny z komórek charakteryzujących się nadprodukcją tych pomp. Izonitryl skutecznie hamuje również funkcje białek Cdr1p i Cdr2p w patogennych szczepach *Candida albicans* [66].

Potencjalnym inhibitorem pomp transportujących leki w komórkach grzybów może być także pochodna triazyny CTBT (7-chlorotetrazolo-[5,1-c]-benzo-[1,2,4]-triazyna). CTBT wykazywał słabą aktywność przeciwgrzybową, a w kombinacji z niskimi stężeniami środków przeciwgrzybowych silnie hamował wzrost drożdży. Właściwość tę zaobserwowano dla szczepów *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* i *Candida*, zarówno na stałych, jak i w płynnych podłożach. CTBT powodował również wzrost wrażliwości na flukonazol wielolekoopornych komórek wykazujących nadprodukcję pomp wielolekowych. Choć mechanizm działania CTBT nie został do tej pory dokładnie poznany, podejrzewa się, że zaburza on homeostazę sterolową w błonie komórkowej [67]. Inną grupą związków badaną pod kątem blokowania transporterów lekowych *Candida albicans* są chinazoliny. Spośród przebadanych (*N*-metylo-piperazynylo)-pochodnych najsukuczniejszy okazał się związek MC-5805 [68].

Peptydy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym stanowią kolejną grupę związków o potencjalnych właściwościach niwelujących działanie pomp wielolekowych. Wykazano, że niektóre oligopeptydy, m.in. FKRRWQWRM (Pep2), poprawiały grzybobójczą aktywność itraconazolu w stosunku do szczepów *Candida*. Ich działanie polegało na wzmożeniu wypływu ATP z komórki przez kanały anionowe. Zwiększone usuwanie ATP wydawało się z kolei blokować pompy Cdr1p i Cdr2p, gdyż ich funkcje transportowe są uzależnione od hydrolizy ATP. Hamowanie działania pomp ABC powodowało zwiększenie wewnątrzkomórkowo-

wej akumulacji leków, co uzasadnia stosowanie tych peptydów w kombinacji z lekami przeciwwgrzybowymi [69].

Hydroksyanizol butylowy (BHA), przeciwutleniacz i powszechnie stosowany konserwant znacząco poprawiał skuteczność działania tiokonazolu w opornych szczepach *Candida albicans*. Natomiast działanie tetracykliny na oporne szczepy *Candida albicans*, *Candida krusei* i *Candida glabrata* znacznie poprawiono przy jednoczesnym stosowaniu dioktylosulfobursztynianu sodowego, emulgatora stosowanego przy produkcji wyrobów piekarniczych oraz w preparatach farmaceutycznych [70,71].

Interesujące było odkrycie działania disulfiramu (Tabela 1), związku stosowanego w leczeniu uzależnień od alkoholu, jako modulatora pompy wielolekowej Cdr1p. Wykazano, że przywraca on wrażliwość komórek *Candida albicans* na działanie flukonazolu i mikonazolu w wyniku oddziaływania z miejscem wiązania substratów i miejscem wiązania ATP [72]. Wykazano, że disulfiram hamuje aktywność ATPazową transporterów P-gp, MRP1 i MRP4 w wyniku oddziaływania z cysteinami znajdującymi się w pobliżu miejsc aktywnych tych białek [73]. Najprawdopodobniej także w przypadku pompy Cdr1p działanie disulfiramu polega na tworzeniu wewnątrzkomórkowych wiązań disulfidowych z cysteinami, tym bardziej, że w obu domenach NBD₁ i NBD₂ białka Cdr1p znajduje się pięć tych aminokwasów. W rezultacie dochodzi do blokowania wiązania i hydrolizy ATP. Dodatkowym efektem działania disulfiramu na białko Cdr1p jest blokowanie wiązania substratów, np. mikonazolu i nystatyny [72].

Potencjalny modulator grzybowych pomp wielolekowych znaleziono również wśród steroli. 9,11 α -epoksycholest-7-en-3 β ,5,6 α ,19-tetrol 6-octan (ECTA), sterol wyizolowany z gąbek *Dysidea arenaria* obniża oporność na flukonazol uwarunkowaną obecnością pomp wielolekowych w *Candida albicans*, jednak mechanizm tego działania nie został do tej pory poznany [74].

PODSUMOWANIE

Zjawisko oporności wielolekowej MDR zostało zaobserwowane w komórkach nowotworowych oraz u większości potencjalnych patogenów, między innymi: bakterii, grzybów i pierwotniaków. W przypadku chemoterapii przeciwgrzybowej zjawisko wielolekooporności stanowi palący problem, zwłaszcza, że wachlarz leków stosowanych do leczenia różnego rodzaju grzybic jest niezwykle wąski. Za to niebezpieczne zjawisko odpowiedzialna jest głównie nadprodukcja białek błonowych zwanych pompami wielolekowymi. W komórkach grzybowych zidentyfikowano pompy należące do rodziny transporterów typu ABC oraz MFS. Do najważniejszych należą występujące w *Candida albicans* białka Cdr1p i Cdr2p oraz Pdr5p i Snq2p, wyizolowane z *Saccharomyces cerevisiae*. Białka te zdolne są do eksportu poza komórkę niezwykle różniących się od siebie pod względem budowy i sposobu działania związków chemicznych, wśród których znajduje się większość chemoterapeutyków przeciwgrzybowych.

Od ponad dwudziestu lat naukowcy zajmują się poszukiwaniem efektywnych modulatorów aktywności pomp wielolekowych. Najbardziej zaawansowane są badania dotyczące blokowania transporterów w komórkach nowotworowych. Niestety problemem oporności w komórkach grzybowych zainteresowano się znacznie później i dlatego wiedza na temat przywracania u nich wrażliwości związkami o działaniu modulatorowym jest uboższa. Wiadomo jednak, że budowa i mechanizm działania pomp, znajdujących się w komórkach nowotworowych i grzybowych, są bardzo zbliżone. Stąd przypuszczenie, że modulatory działające na pompy nowotworowe, przyniosą oczekiwany rezultat również w komórkach grzybowych. Dlatego przed naukowcami stoi duże wyzwanie, aby zgłębiać wiedzę na ten temat i w rezultacie odnaleźć związki o dużej aktywności i selektywności działania.

PIŚMIENNICTWO

1. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR (2006) Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 43: S3-S14
2. Elis M (2002) Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. *Mol Immunol* 38: 947-957
3. Ascioglu S, Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ (2002) Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 34: 7-14
4. Shao P-L, Huang L-M, Hsueh P-R (2006) Invasive fungal infections – laboratory diagnosis and antifungal treatment. *J Microbiol Immunol Infect* 39: 178-188
5. Krcmery V, Barnes AJ (2002) Non-albicans *Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50: 243-260
6. Krishna R, Mayer LD (2000) Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 11: 265-283
7. Decottignies A, Goffeau A (1997) Complete inventory of yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15: 137-145
8. Webber MA, Piddock LJV (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 51: 9-11
9. Prasad R, Panwar SL, Smiriti (2002) Drug resistance in yeasts – an emerging scenario. *Adv Microb Physiol* 46: 155-201
10. Mamnun YM, Schüller D, Kuchler K (2004) Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett* 559: 111-117
11. Lomovskaya O, Watkins WJ (2001) Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr Medic Chem* 8: 1699-1711
12. Gottesman MM, Ambudkar SV (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembranes* 33: 453-458
13. Van Veen HW, Konings WN (1998) The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochim Biophys Acta* 1365: 31-36
14. Cole SPC, Deeley RG (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *BioEssays* 20: 931-940
15. Kolaczowski M, Kolaczowski A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A (1998) *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist* 4: 143-158
16. Egner R, Bauer BE, Kuchler K (2000) The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol* 35: 1255-1263

17. Piper P, Mahe Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Muhlbauer M, Coote P, Kuchler K (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J* 17: 4257-4265
18. Nagao K, Taguchi Y, Arioka M, Kadokura H, Takatsuki A, Yoda K, Yamasaki M (1995) *bfr1**, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol* 177: 1536-1543
19. Prasad R, Worgifosse PD, Goffeau A, Balzi E (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *C. albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27: 320-329
20. Krishnamurthy S, Chatterjee U, Gupta V, Prasad R, Das P, Snehlata P, Hasnain SE, Prasad R (1998) Deletion of transmembrane domain 12 of *CDR1*, a multidrug transporter from *Candida albicans*, leads to altered drug specificity: expression of a yeast multidrug transporter in Baculovirus expression system. *Yeast* 14: 535-550
21. Kolaczowski M, van der Rest ME, Cybularz-Kolaczowska A, Soumillion J-P, 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
22. Krishnamurthy S, Gupta V, Snehlata P, Prasad R (1998) Characterization of human steroid hormone transport mediated by Cdr1p, multidrug transporter of *Candida albicans*, belonging to the ATP binding cassette super family. *FEMS Microbiol Lett* 158: 69-74
23. Kontoyiannis DP (2000) Efflux mediated resistance to fluconazole could be modulated by sterol homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* 46: 199-203
24. Gauthier C, Weber S, Alarco AM, Alqawi O, Daoud R, Georges E, Raymond M (2003) Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1543-1554
25. Franz R, Michel S, Morschäuser J (1998) A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters. *Gene* 220: 91-98
26. Zhang X, Collins KI, Greenberger LM (1995) Functional evidence that transmembrane 12 and the loop between transmembrane 11 and 12 from part of the drug-binding domain in P-glycoprotein encoded by *MDR1*. *J Biol Chem* 270: 5441-5448
27. Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, Monk BC, Cannon RD (2006) Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2* or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1148-1155
28. Milewski S, Mignini F, Prasa R, Borowski E (2001) Unusual susceptibility of a multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 223-228
29. Onishi J, Meinz M, Thompson J, Curotto J, Dreikorn S, Rosenbach M, Douglas C, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Cabello A, Vicente F, Pelaez F, Diez MT, Martin I, Bills G, Giacobbe R, Dombrowski A, Schwartz R, Morris S, Harris G, Tsiouras A, Wilson K, Kurtz MB (2000) Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 368-377
30. Bachmann SP, Patterson TF, Lopez-Ribot JL (2002) In vitro activity of caspofungin (MK-0091) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* 40: 2228-2230
31. Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Krapf G, Enzinger S, Presterl E, Kuchler K (2003) The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* 48: 225-325
32. Ślisz M, Cybulska B, Grzybowska J, Czub J, Prasad R, Borowski E (2007) The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives. *J Antibiot* 60: 436-446
33. Maesaki S, Hossain MA, Miyazaki Y, Tomowo K, Tashiro T, Kohno S (2000) Efficacy of FK463, a (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1728-1730
34. Wakieć R, Prasad R, Morschäuser J, Barchiesi F, Borowski E (2006) Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 50: 109-115
35. Sanglard D, Ischer F, Bille J (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1174-1183
36. Katiyar SK, Edlind TD (2001) Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter gene in *Candida krusei*. *Med Mycol* 39: 109-116
37. Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhäuser J (2001) MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3416-3421
38. Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, De Wet H, McIntosh DB, Goffeau A (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem* 273: 12612-12622
39. Hanson PK, Nicholas JW (2001) Energy-dependent flip of fluorescently labeled phospholipids is regulated by nutrient starvation and transcription factors, PDR1 and PDR3. *J Biol Chem* 276: 9861-9867
40. Smriti M, Krishnamurthy S, Dixit BL, Gupta CM, Milewski S, Prasad R (2002) ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* 19: 303-318
41. Georgiev VST (1998) Infectious diseases in immunocompromised hosts. CRC Press, Boca Raton, New York
42. da Silva Ferreira ME, Capellaro JL, dos Reis Marques E, Malavazi I, Perlin D, Park S, Andersen JB, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA, Goldman MHS, Goldman GH (2004) In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4405-4413
43. Andrare AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JGM, De Warda MA (2000) The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology* 146: 1987-1997
44. Thornewell SJ, Peery RB, Skatrud PL (1997) Cloning and characterization of *Cne MDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene* 201: 21-29
45. Fachin AL, Rerreira-Nozawa MS, Maccheroni W Jr., Martinem-Rossi NM (2006) Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 55: 1093-1099
46. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60: 575-608
47. Ehrenhofer-Murray AE, Keller MU, Seitz K, Sengstag C (1998) The Sge1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a membrane associated multidrug transporter. *Yeast* 14: 49-65
48. Nourani A, Wesolowski-Louvel M, Delaveau T, Jacq C, Delahodde A (1997) Multiple drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol* 17: 5453-5460
49. Calabrese D, Bille J, Sanglard D (2000) A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 146: 2743-2754
50. Hiller D, Sanglard D, Morschhäuser J (2006) Overexpression of *MDR1* gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1365-1371
51. Balzi E, Goffeau A (1995) Yeast multidrug resistance: The PDR network. *J Bioenerget Biomemb* 27: 71-76
52. Dexter D, Rowley SM, Wu A, Golin J (1994) Mutations in the yeast *PDR3*, *PDR4*, *PDR7* pleiotropic (multiple) drug resistance loci affect the transcript level of an ATP binding cassette transporter encoding gene, *PDR5*. *Genetics* 136: 505-515
53. Hertle K, Hasse E, Brendel M (1991) The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr Genet* 19: 429-433
54. Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17: 6982-6993

55. Nguyen D-T, Alarco AM, Raymond M (2000) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* 276: 1138-1145
56. Talibi D, Raymond M (1999) Isolation of putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181: 231-240
57. Alarco AM, Raymond M (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 700-708
58. Chiba P, Burghofer S, Richter E, Tell B, Moser A, Ecker G (1995) Synthesis, pharmacologic activity, and structure-activity relationships of a series of propafenone-related modulators of multidrug resistance. *J Med Chem* 38: 2789-2793
59. Ryder NS, Leitner I (2001) Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Med Mycol* 39: 91-95
60. Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Egner R, Ecker G, Kuchler K (2003) Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int J Antimicrob Agents* 22: 291-300
61. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mardh PA (2005) Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother* 56: 678-685
62. Conseil G, Decottignies A, Jault J-M, Comte G, Barron D, Goffeau A, Di Pietro A (2000) Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39: 6910-6917
63. Hiraga K, Yamamoto S, Hamanaka N, Oda K (2005) Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 1119-1125
64. Kolaczowski M, Michalak K, Motohashi N (2003) Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22: 279-283
65. Niimi K, Harding DRK, Parshot R, King A, Lun DJ, Decottignies A, Niimi M, Lin S, Cannon RD, Goffeau A, Monk BC (2004) Chemosen- sitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1256-1271
66. Yamamoto S, Hiraga K, Abiko A, Hamanaka N, Oda K (2005) A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 622-628
67. Cernicka J, Kozovska Z, Hnatova M, Valachovic M, Hapala I, Riedl Z, Hajós G, Subik J (2007) Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 29: 170-178
68. Watkins WJ, Lemoine RC, Chong L, Cho A, Renau TE, Kuo B, Wong V, Ludwikow M, Garizi N, Iqbal N, Barnard J, Jankowska R, Singh R, Madsen D, Lolans K, Lomovskaya O, Oza U, Dudley MN (2004) Quinazolinone fungal efflux pump inhibitors. Part 2: In vitro structure-activity relationships of (N-methyl-piperazinyl)-containing derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 5133-5137
69. Tanida T, Okamoto T, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T (2006) Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. *J Antimicrob Chemother* 57: 94-103
70. Simonetti G, Simonetti N, Willa A (2003) Increase of activity of tioconazole against resistant microorganisms by the addition of butylated hydroxyanisole. *Int J Antimicrob Agents* 22: 439-443
71. Simonetti G, Simonetti N, Willa A (2004) Tetracycline in combination with sodium dioctylsulfosuccinate show increased antimicrobial activity in resistant microorganisms. *J Chemother* 16: 38-44
72. Shukla S, Sauna ZE, Prasad R, Ambudkar SV (2004) Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 520-525
73. Sauna ZE, Peng XH, Nandigama K, Tekle S, Ambudkar SV (2004) The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* 65: 675-684
74. Jacob MR, Hossain CF, Mohammed KA, Smillie TJ, Clark AM, Walker LA, Nagle DG (2003) Reversal of fluconazole resistance in multidrug efflux-resistant fungi by the *Dysidea arenaria* sponge sterol 9 α ,11 α -epoxycholest-7-ene-3 β ,5 α ,6 α ,19-tetrol 6-acetate. *J Nat Prod* 66: 1618-1622

Multidrug resistance in fungi

Izabela Łacka[✉], Roland Wakieć

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza St., 80-952 Gdańsk, Poland

[✉]e-mail: lackaiza@wp.pl

Key words: multidrug resistance, fungi, ABC transporters, MFS, efflux pumps

ABSTRACT

Antibiotic and synthetic chemotherapeutic resistance in pathogenic yeast becomes one of the biggest challenges for the modern chemotherapy. An increasing number of pathogenic yeast and filamentous fungi resistant to the action of the majority of currently used drugs is isolated in clinics nowadays. Among variety of the resistance mechanisms, the most dangerous grows to be the multidrug resistance. The most important mechanism of the multidrug resistance is the overexpression of membrane proteins participating in the active efflux of drugs out of the cells subjected to chemotherapy. Representatives of two classes of multidrug efflux transporters, ABC and MFS, have been identified in fungi. One of the most important strategies for overcome the phenomenon of multidrug resistance in pathogenic fungi, is the use of chemical compounds co-administrated with chemotherapeutics which are able to restore drug susceptibility in multidrug resistant cells. Mode of action of these chemical compounds may be very diverse, from the substrate competition, through the influence on the membrane fluidity, to the multidrug transporters activity modulation. This paper presents a review of the current knowledge on proteins contributing to fungal multidrug resistance and strategies for overcoming multidrug resistance by pharmacological intervention.

Peptydy natriuretyczne odgrywają ważną rolę w regulacji procesu diurezy i natriurezy oraz rozszerzania naczyń krwionośnych. Obniżają one aktywność systemu renina-angiotensyna-aldosteron, a ponadto są zaangażowane w regulację homeostazy układu naczyń krwionośnych, metabolizmu tłuszczów oraz we wzrost kości długich. Głównymi przedstawicielami rodziny peptydów natriuretycznych u ssaków są: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), uwalniany z przedsionków serca, mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP), uwalniany głównie z komór serca oraz peptyd natriuretyczny typu C (CNP), produkowany w komórkach śródbłonna. Uwalnianie tych peptydów stymulowane jest głównie przez zwiększenie ciśnienia krwi w sercu i naczyniach krwionośnych, niedotlenienie lub dysfunkcję nerek. Peptydy natriuretyczne wywierają efekty biologiczne poprzez oddziaływanie z transbłonowymi receptorami o aktywności cyklicznej guanylanowej, NPR-A i NPR-B. Stężenia tych peptydów są kontrolowane przez procesy internalizacji i degradacji, w których uczestniczą receptor NPR-C lub obojętna endopeptydaza. Niniejszy artykuł przeglądowny przedstawia aktualny stan wiedzy na temat budowy i funkcji biologicznych rodziny peptydów natriuretycznych.

RODZINA PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Już kilkadziesiąt lat temu naukowcy zakładali istnienie humoralnego łącznika między sercem a nerkami. Pierwszy bezpośredni dowód na występowanie takiego czynnika dostarczony został przez de Bolda i jego współpracowników w roku 1981 [1]. Zaobserwowali oni, że dożylnie podanie szczurom homogenatów z tkanki przedsionków serca powodowało gwałtowne obniżenie ciśnienia krwi oraz zwiększenie wydalania sodu i wody z nerek. Wkrótce po tym odkryciu, wielu zespołom udało się wyizolować z tkanki przedsionków peptydy o różnych wielkościach, które posiadały właściwości natriuretyczne, diuretyczne oraz rozluźniające mięśnie gładkie. Otrzymywanym peptydom nadawano różne nazwy, np. przedsionkowy czynnik natriuretyczny ANF (ang. *atrial natriuretic factor*), atriopeptyna, czy też przedsionkowy peptyd natriuretyczny ANP (ang. *atrial natriuretic peptide*) – termin, który używany jest obecnie najczęściej.

W roku 1988 wyizolowano z mózgu świni kolejny peptyd posiadający podobne właściwości; nazwano go mózgowym peptydem natriuretycznym BNP (ang. *brain natriuretic peptide*). Kolejne badania wykazały jednak, iż jest on syntetyzowany głównie w komorach serca, dlatego też obecnie nazywa się go raczej peptydem natriuretycznym typu B. Również peptyd natriuretyczny typu C – CNP (ang. *C-type natriuretic peptide*), nazwany tak, by zachować przyjętą nomenklaturę, pierwotnie otrzymano z ekstraktów mózgu świni. Z czasem okazało się, że ten trzeci członek rodziny, odkryty w roku 1990, syntetyzowany jest głównie przez komórki śródbłonna. Ponieważ ANP jest czynnikiem wywołującym silną natriurezę, pozostałe peptydy ze względu na podobną budowę, również zostały nazwane natriuretycznymi, chociaż np. wpływ CNP, na stężeniu fizjologicznym, na regulowanie gospodarki sodowej może być nieznaczny. Peptydy natriuretyczne są neurohormonami uczestniczącymi w regulacji gospodarki wodno-sodowej i utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Ponadto hamują one aktywność współczulnego układu nerwowego i bezpośrednio rozszerzają naczynia krwionośne. Bodźcem do uwalniania zarówno ANP, jak i BNP może być wzrost ciśnienia i rozciąganie komórek przedsionków i komór serca, gdzie peptydy te magazynowane są w ziarnistościach.

Wszystkie wymienione peptydy posiadają niemal identyczną sekwencję z 11 aminokwasami homologicznymi dla każdego peptydu. Reszty cysteiny z początku i końca tej sekwencji połączone są mostkiem disiarczkowym, co powoduje powstanie 17-aminokwasowej struktury pierścieniowej, która odpowiada za rozpoznanie receptora i biologiczną aktywność peptydów. Peptydy natriuretyczne syntetyzowane są jako pre-propeptydy, a biologicznie aktywne formy tj. ANP-28, BNP-32, CNP-53, czy też CNP-22, powstają po proteolitycznym trawieniu prekursorów (Ryc. 1). Peptydy te stanowią bardzo ważne ogniwo w regulacji układu krążenia, a kolejne

Hanna Jerczyńska

Zofia Pawłowska ✉

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

✉Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (042) 678 33 93 w. 306, e-mail: pawlow@zdn.am.lodz.pl

Artykuł otrzymano 27 sierpnia 2007 r.

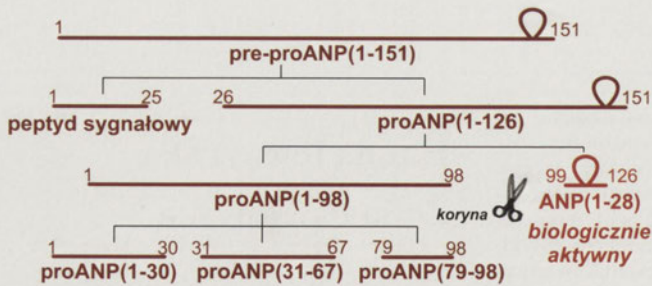
Artykuł zaakceptowano 10 października 2007 r.

Słowa kluczowe: peptydy natriuretyczne, receptory peptydów natriuretycznych

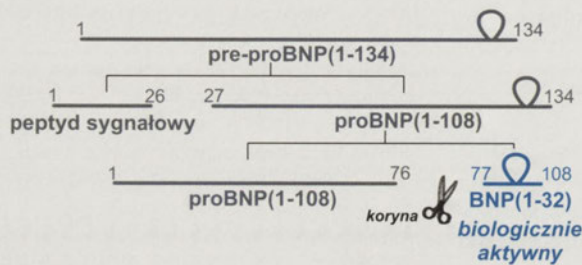
Wykaz skrótów: ANP (ang. *atrial natriuretic peptide*) – przedsionkowy peptyd natriuretyczny; bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; BNP (ang. *brain natriuretic peptide*) – mózgowy peptyd natriuretyczny; CNP (ang. *C-type natriuretic peptide*) – peptyd natriuretyczny typu C; Il-1 – interleukina 1; NPR (ang. *natriuretic peptides receptor*) – receptor peptydów natriuretycznych; PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) – czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego; TNF α (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu α

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu PBZ. KBN-124/P05/2004

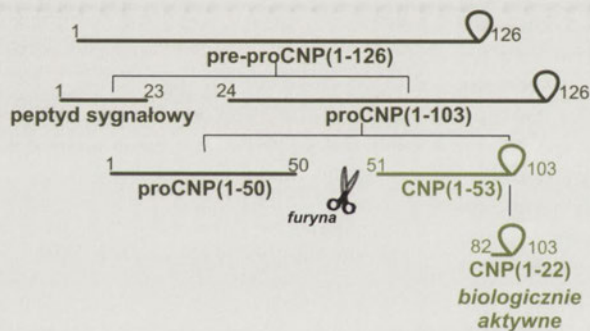
ANP



BNP



CNP



Rycina 1. Schemat powstawania biologicznie aktywnych form peptydów natriuretycznych.

badania dostarczają dowodów na ich szczególnie ważną rolę w patogenezie niewydolności serca. Z tego powodu, peptydy natriuretyczne stają się coraz ważniejszymi czynnikami w diagnostyce i terapii schorzeń układu krążenia. Badania ostatnich lat wskazują, że peptydy natriuretyczne mogą regulować ekspresję białek układu krzepnięcia i fibrynolizy [2-4], a także mają wpływ na proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych [5,6].

Wymienione dotąd peptydy natriuretyczne mogą być usuwane z krwiobiegu w dwojaki sposób: poprzez degradację enzymatyczną z udziałem obojętnej endopeptydazy NEP (ang. *neutral endopeptidase*), która inaktywuje dojrzałą formę peptydu [7], przez internalizację i lizosomalną degradację po związaniu ze specyficznym receptorem, NPR-C. Na działanie systemu peptydów natriuretycznych ma wpływ nie tylko regulacja syntezy, przechowywania i uwalniania tych hormonów, ale również zmiana ekspresji ich receptorów na powierzchni komórek. Peptydy natriuretyczne i ich receptory obecne są w

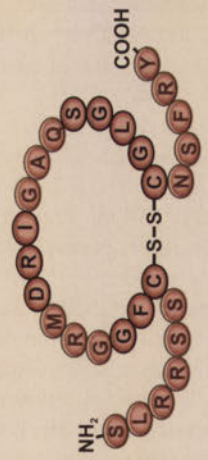
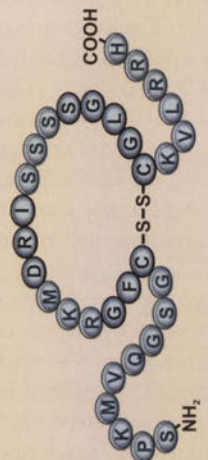
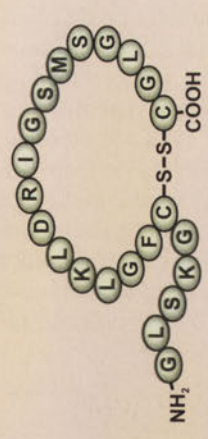
wielu komórkach układu immunologicznego, jednakże ich znaczenie dla układu odpornościowego jest dopiero badane. Peptydy te są często opisywane jako biorące udział jedynie w regulacji ciśnienia i objętości krwi, jednak ich poziom ulega zmianie w odpowiedzi na wiele czynników patologicznych, a działanie jest znacznie szersze. Peptydy natriuretyczne są funkcyjnymi antagonistami systemu renina-angiotensyna-aldosteron. Wywierają one efekty biologiczne poprzez syntezę cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), który jest typowym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem wtórnym. Wzrost stężenia cGMP obserwuje się we wszystkich komórkach posiadających na swej powierzchni receptory typu A i B, eksponowanych na działanie peptydów natriuretycznych [8]. Charakterystyka tych peptydów przedstawiona jest w Tabeli 1.

PRZEDSIONKOWY PEPTYD NATRIURETYCZNY (ANP)

Pre-propeptyd ANP człowieka zbudowany jest ze 151 reszt aminokwasowych. Hydroliza N-końcowej części sygnałowej powoduje powstanie proANP zbudowanego ze 126 reszt aminokwasowych. Forma ta przechowywana jest głównie w ziarnistościach przedsionków [9]. W skutek stymulacji, ziarnistości te przesuują się w kierunku powierzchni miocytów uwalniając proANP(1-126). Natychmiast po wydzieleniu do krwiobiegu, proANP trawiony jest (między resztami Arg98 a Ser99) [9] przez transbłonową proteazę serynową – korynę, do biologicznie aktywnego, C-końcowego fragmentu ANP(99-126), czyli ANP-28 (Ryc. 1) [10]. Alternatywne trawienie proANP przez nieznaną proteazę następuje w nerkach, gdzie powstaje zbudowana z 32 aminokwasów urodylatyna (nerkowy peptyd natriuretyczny). Odgrywa ona ważną rolę w regulowaniu wydalania wody i sodu w nerkach [11]. N-końcowy fragment, proANP(1-98), poddawany jest dalszemu trawieniu proteolitycznemu do trzech form: – proANP(1-30) lub LANP (ang. *long acting natriuretic peptide*); – proANP(31-67) lub czynnik rozluźniający naczynia oraz – proANP(79-98) lub peptyd kaliuretyczny. Początkowo sądzono, że fragmenty te nie pośredniczą w żadnych efektach biologicznych, jednakże istnieją dowody wskazujące na to, iż mogą one posiadać nieznaczne działanie natriuretyczne, kaliuretyczne oraz rozszerzające naczynia krwionośne (stąd ich nazwy) [12].

Biologicznie aktywna forma ANP zbudowana jest z 28 reszt aminokwasowych, z 17-aminokwasowym pierścieniem zamkniętym mostkiem disiarczkowym pomiędzy resztami cystein w pozycji 7 i 23. Gen kodujący ANP człowieka, *NPPA*, ulokowany na chromosomie 1p36.21, zbudowany jest z 3 eksonów i 2 intronów. Jego ekspresja zmienia się podczas rozwoju organizmu. U dorosłego człowieka ANP obecny jest w przedsionkach i komorach serca, przednim płacie przysadki mózgowej, płucach i nerkach. Stężenie ANP w osoczu osób zdrowych wynosi około 10 pM, wzrasta 10-30 krotnie u osób z zastoinową niewydolnością krążenia [13], a czas półtrwania tego hormonu w osoczu wynosi około 2 minut [14]. Głównym stymulatorem uwalniania ANP jest zwiększona objętość płynów w krwiobiegu powodująca wzrost naprężenia ścian naczyń. Uwalnianie ANP następuje ponadto na skutek przewlekłego niedotlenienia [15], wzrostu osmolarności (np. zwiększonego poziomu jonów sodu) [16], a także działania hormonów i neuroprzekaźników takich jak katecholaminy, endotelina-1 [17], angiotensyna II, arginina-wazopresyna, hor-

Tabela 1. Charakterystyka peptydów natriuretycznych.

Biologicznie aktywna forma	ANP-28	BNP-32	CNP-53, CNIP-22
Budowa			
Masa cząsteczkowa [Da]	3080,5	3464,09	5801,77 2197,63
Wzór sumaryczny	$C_{127}H_{205}N_{45}O_{39}S_3$	$C_{143}H_{244}N_{50}O_{42}S_4$	$C_{251}H_{417}N_{81}O_{71}S_5$ $C_{93}H_{157}N_{27}O_{26}S_3$
Receptory	NPR-A, NPR-C	NPR-A, NPR-C	NPR-B, NPR-C
Gen	NPPA 3 eksony, 2 introny	NPPB 3 eksony, 2 introny	NPPC 2 eksony
Locus	1p36.21	1p36.2	2q24-qter
Wydzielany głównie przez	kardiomiocyty przedsionków serca	kardiomiocyty komór serca	śródbłonek naczyń krwionośnych
Miejsce występowania	przedsionki serca, komory serca, nerki	komory serca, przedsionki serca	kości, mózg, śródbłonek, serce
Enzym trawiący pro-peptyd	koryna [na zewnątrz komórki]	koryna [na zewnątrz komórki]	furyna [wewnątrz komórki]*
Miejsce trawienia	Arg98-Ser99	Arg76-Ser77	Arg50-Asp51
Stężenie w osoczu [pM]:			
- fizjologiczne	10 ± 0,9	1 ± 0,7	1,4 ± 0,6
- zastoinowa niewydolność krążenia	87 ± 12	310 ± 11	1,4 ± 0,2
- przewlekła niewydolność nerek	43 ± 11	130 ± 37,4	3,0 ± 0,4
Czas półtrwania w organizmie	~ 2 minuty	~ 20 minut	~ 3 minuty
Główne efekty	rozszerzenie naczyń krwionośnych, natriureza, diureza, hamowanie uwalniania reniny i aldosteronu	rozszerzenie naczyń krwionośnych, natriureza, diureza, hamowanie uwalniania reniny i aldosteronu	rozszerzenie naczyń krwionośnych, hamowanie uwalniania reniny i aldosteronu, modulowanie wzrostu kości

* CNP-53 trawiony jest na zewnątrz komórki do formy CNP-22 między Lys80-Gly81 przez nie poznany do tej pory enzym

mony tarczycy, glikokortykosterydy, a także TNF α i inne cytokiny. Wydzielenie ANP hamowane jest przez tlenek azotu [18]. Uwolniony do krwi ANP indukuje natriurezę, diurezę, rozluźnianie mięśni gładkich, hamuje uwalnianie reniny, angiotensyny i aldosteronu [14,19-21].

Wzrost stężenia ANP we krwi obserwowany jest w różnych stanach patologicznych. Towarzyszy on głównie nadciśnieniu tętniczemu, chorobie niedokrwiennej serca, zawałowi i niewydolności krążenia, zaburzeniom rytmu serca oraz chorobie węzła zatokowego [22,23]. U chorych z zawałem serca lub dysfunkcją lewej komory, ANP może być uwalniany w dużych ilościach zarówno z tkanki przedsionka, jak i komory. Stężenie ANP we krwi jest podwyższone u pacjentów z zaawansowanymi zaburzeniami przewodzenia przedsionko-komorowego. Po wszczęciu stymulatora serca na stałe, poziom ANP we krwi obwodowej obniża się [24]. Oznaczanie stężenia ANP we krwi po implantacji układu stymulującego jest użytecznym, nieinwazyjnym wskaźnikiem funkcjonowania stymulatora serca i jednocześnie reakcji układu krążenia na stałą stymulację [25].

MÓZGOWY PEPTYD NATRIURETYCZNY (BNP)

BNP człowieka syntezowany jest w miocytach serca jako pre-prohormon zbudowany ze 134 reszt aminokwasowych. ProBNP(1-108) powstaje na skutek odcięcia sekwencji sygnałowej, a dalsze trawienie przez korynę (między Arg76-Ser77) powoduje powstanie nieaktywnego N-końcowego fragmentu proBNP(1-76) (NT-proBNP) oraz C-końcowego, biologicznie aktywnego BNP (Ryc. 1). Oba powstałe fragmenty krążą w osoczu [26-28]. Dojrzała forma BNP, zbudowana z 32 reszt aminokwasowych, uwalniana jest do krwiobiegu natychmiast po syntezie, choć pewne ilości mogą być przechowywane w ziarnistościach przedsionków serca oraz w tkance komór [29-30]. Poziom BNP stanowi zaledwie 2-5% poziomu ANP w przedsionkach i 20-25% poziomu ANP w komorach serca zdrowego człowieka [14]. Ilość BNP w przedsionkach jest w przybliżeniu 100-krotnie wyższa niż w komorach, jednak stężenia te nie wpływają na znaczenie danej tkanki, jeśli chodzi o wydzielenie peptydu, bowiem właśnie komory serca są głównym źródłem krążącego w osoczu BNP [31].

Gen kodujący BNP człowieka, *NPPB*, znajduje się na chromosomie 1p36.2. Podobnie jak ANP zawiera on 3 eksony i 2 introny. Wzrost ciśnienia w naczyniach krwionośnych serca powoduje wzrost ekspresji genu dla BNP. Poziom BNP w osoczu osób zdrowych wynosi około 1 pM, a czas jego półtrwania to 20 minut [32]. Endotelina-1 stymuluje wydzielenie BNP z miocytów przedsionków serca szczura [30,33]. Wpływa ona także na regulację ekspresji genu i na poziom mRNA, który wzrasta już po 2 godzinach od jej zadziałania [17]. BNP uwolniony do krwi, na skutek zwiększonego napięcia przedsionków i komór, indukuje poprzez receptor NPR-A natriurezę, diurezę, rozluźnianie mięśni gładkich, obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, hamowanie uwalniania reniny, angiotensyny i aldosteronu, a także wykazuje działanie antyfibrotyczne [14,19-21]. Synteza i uwalnianie BNP z komór serca są zwiększone w przypadku przerostu mięśnia sercowego [14], natomiast u osób z zastoinową niewydolnością krążenia poziom ten może wzrastać nawet 300 – krotnie. Te olbrzymie różnice pomiędzy poziomami u osób zdrowych i chorych sprawiają, iż jest on

idealnym markerem choroby wieńcowej [13]. W ostrych zespołach wieńcowych BNP stanowi, obok troponiny, czynnik ryzyka odzwierciedlający procesy pęknięcia płytki miażdżycowej, niedokrwienia, martwicy i przeciążenia lewej komory. Chorzy z wysokimi stężeniami BNP, utrzymującymi się uporczywie mimo agresywnego leczenia, mają wyjątkowo duże ryzyko wystąpienia zdarzeń sercowych. Wysokie stężenie BNP pozwala na identyfikację grupy z dużym ryzykiem przebudowy mięśnia sercowego, dysfunkcji i niewydolności serca, zgonu u chorych po zawałach, a nawet z niestabilną chorobą wieńcową. Badania kliniczne potwierdziły skuteczność rekombinantowego BNP człowieka w leczeniu niewyrównanej niewydolności serca [25]. Podwyższony poziom BNP w osoczu zawsze wiąże się z niepomyślną prognozą.

PEPTYD NATRIURETYCZNY TYPU C (CNP)

Prekursorem CNP jest pre-proCNP zbudowany ze 126 reszt aminokwasowych, który po odcięciu sekwencji sygnałowej, proCNP(1-103), trawiony jest wewnątrz komórki do dojrzałej, biologicznie aktywnej formy CNP-53 przez endoproteazę furynę [34]. W niektórych tkankach CNP-53 trawiony jest następnie do formy CNP-22 przez nieznaną zewnątrzkomórkowy enzym (Ryc. 1). Spekuluje się, że CNP-53 może pełnić funkcję przechowującą formę CNP-22, który krąży w osoczu. Chociaż CNP-53 i CNP-22 pełnią podobne, jeśli nie identyczne funkcje, to ich występowanie w tkankach się różni. CNP-53 jest formą występującą głównie w mózgu, komórkach śródbłonka i sercu, natomiast CNP-22 obecne jest głównie w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym człowieka [35]. Stężenie obu form peptydu natriuretycznego typu C w osoczu osób zdrowych wynosi około 1,5 pM, a jego czas półtrwania 2-6 minut [36]. Gen kodujący CNP człowieka, *NPPC*, zawiera dwa eksony i zlokalizowany jest na chromosomie 2q24-qter. Struktura peptydu natriuretycznego typu C jest najsilniej zachowana w ewolucji ze wszystkich peptydów i jest niemal identyczna u różnych gatunków.

Głównymi stymulatorami wydzielania CNP w hodowli komórek śródbłonka są bradykinina, TNF α , Il-1a, Il-1b oraz lipopolisacharydy, a także ANP i BNP [37,38]. Wzrost poziomu CNP powodują również: niedotlenienie, przewlekła choroba nerek, a także uszkodzenie naczynia [36,38]. CNP jest peptydem najsilniej podnoszącym poziom cGMP w komórkach śródbłonka człowieka. Najbardziej widocznym fizjologicznym działaniem CNP jest stymulacja wzrostu kości długich. CNP wpływa na wiele typów komórek kości, ale głównie działa na chondrocyty [39]. Występowanie nieaktywnych mutacji w genach kodujących CNP powoduje karłowatość, podczas gdy podwyższone stężenie tego peptydu, będące skutkiem transgenicznej nadekspresji lub obniżonego usuwania go z krwiobiegu, powoduje przerost kości [38,40,41].

Tabela 2. Porównanie powinowactwa wiązania peptydów natriuretycznych z receptorami.

NPR-A	ANP \geq BNP \gg CNP
NPR-B	CNP \gg ANP \geq BNP
NPR-C	ANP \geq CNP $>$ BNP

Tabela 3. Charakterystyka receptorów peptydów natriuretycznych.

Receptor	NPR-A	NPR-B	NPR-C
Lokalizacja genu	<i>NPR1</i> 1q21-q22	<i>NPR2</i> 9p21-p12	<i>NPR3</i> 5p14-p13
pI	6,19	6,41	?
Długość	1061 aa	1047aa	541aa
Masa [Da]	118919,24	117022	59808
Fosforylacja [receptor człowieka]	S529, T532, S534, S538, S542, T545	S513, T516, S 518, S523, S526, Y725	S533
Występowanie: w tkance	nerki, nadnercza, mózg, serce, naczynia krwionośne, mięśnie gładkie, płuca, jelita, tkanka tłuszczowa	nerki, nadnercza, mózg, serce, duże naczynia krwionośne, mięśnie gładkie, płuca, chondrocyty, skóra, macica	większość tkanek
w linii komórkowej	pierwszorzędowe komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, pierwszorzędowe komórki nerek, PC-12, HEK 293	pierwszorzędowe komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (A10, A7R5), fibroblasty (NIH3T3, Balb3T3), chondrocyty	komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (A10), fibroblasty (3T3)
Funkcja	rozszerzanie naczyń, natriureza, obniżanie syntezy aldosteronu	regulacja neurohormonów	systemowe usuwanie krążących peptydów natriuretycznych i kontrola miejscowych efektów układu NP

RECEPTORY PEPTYDÓW NATRIURETYCZNYCH

Peptydy natriuretyczne mogą wiązać się z odpowiednimi receptorami NPR (ang. *natriuretic peptide receptor*) występującymi na powierzchni komórek docelowych. Znane są trzy typy białek wiążących peptydy natriuretyczne: NPR-A, NPR-B i NPR-C, które nazywane są również odpowiednio: NPR1, NPR2 i NPR3 lub GC-A, GC-B i receptor metabolizujący. Wszystkie te receptory stanowią transbłonowe białka z domeną zewnątrzkomórkową, wykazującą różny stopień powinowactwa w stosunku do peptydów natriuretycznych (Tabela 2) [42,43].

Receptory –A i –B są białkami o aktywności cyklazy guanylanowej, które po związaniu liganda katalizują przekształcanie GTP do cGMP [44,45]. Receptory te zbudowane są podobnie do receptorów dla czynników wzrostu (Ryc. 2). Posiadają one zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligandy (ok. 450 reszt aminokwasowych (aa), pojedynczą, krótką, hydrofobową domenę transbłonową rozdzielającą receptor na dwie części (ok. 20-25 aa), część wewnątrzkomórkową o długości około 570 reszt aminokwasowych, zawierającą domenę KHD (ang. *kinase homology domain*), homologiczną do kinazy tyrozynowej, ale pozbawioną aktywności katalitycznej (ok. 250 aa), dwuskrętną domenę dimeryzującą, tzw. "coiled coil" (ok. 40 aa) oraz katalityczną domenę o aktywności cyklazy guanylanowej (GC) znajdującą się na C-końcu receptora (ok. 250 aa) [45,46].

RECEPTOR NPR-A

Gen kodujący NPR-A człowieka (*NPR1*, 15,4 kbp) ulokowany jest na chromosomie 1q21-q22 i składa się z 22 eksonów i 21 intronów [47]. NPR-A wykazuje najwyższe powinowactwo wiązania dla ANP, niższe dla BNP i CNP (Tabela 2) [43,48]. Największą ekspresję mRNA NPR-A człowieka obserwuje się w nerkach, nadnerczach, jelicie krętym, a także w mózgu, sercu, naczyniach krwionośnych, płucach oraz w tkance tłuszczowej [49] (Tabela 3). Potwierdzono występowanie NPR-A w

hodowli pierwszorzędowej komórek mięśni gładkich, a także w małych ilościach w liniach komórkowych PC-12 i HEK 293 [43,44]. W stanie nieaktywnym NPR-A ufosforylowany jest na czterech resztach seryny (Ser529, Ser534, Ser538, Ser542) i dwóch resztach treoniny (Thr532, Thr545) znajdujących się w N-końcowej części domeny KHD. Zamiana czterech, lub więcej miejsc fosforylacji powoduje zanik aktywności receptora w odpowiedzi na hormon, co wskazuje na to, że fosforylacja jest absolutnie niezbędna do jego aktywacji [44].

RECEPTOR NPR-B

NPR-B jest głównym receptorem peptydów natriuretycznych w mózgu, występującym w wielu jego obszarach. Jego powinowactwo wiązania jest najwyższe dla peptydu typu C, niższe dla ANP i BNP (Tabela 2). Podobnie jak receptory A, receptory typu B są białkami o aktywności cyklazy guanylanowej [50]. *NPR2*, gen kodujący NPR-B człowieka (~16,5 kbp) ulokowany jest na chromosomie 9p21-12 i składa się z 22 eksonów i 21 intronów. mRNA dla receptora B występuje m.in. w tkankach mózgu, płuc, nadnerczy, nerek, macicy, jajników, przysadce mózgowej, mózdzku, skórze, w hipokampie i ciele migdałowatym (Tabela 3) [46]. NPR-B charakteryzuje niemal identyczna topologia jak receptor NPR-A. Receptor B ufosforylowany jest na reszcie treoniny (Thr516), czterech resztach seryny (Ser513, Ser518, Ser523 i Ser526) i jednej reszcie tyrozyny (Tyr725), znajdujących się w N-końcowej części domeny KHD.

Dotychczasowe badania nad funkcją tego receptora są nieliczne. Wykazano, że peptyd natriuretyczny typu C, działając poprzez receptor NPR-B, ma wpływ na częstość skurczu oraz wzrost komórek naczyń krwionośnych [51]. U pacjentów z rzadką formą karłowatości „*short-limbed dwarfism*” stwierdzono występowanie mutacji genu receptora NPR-B. Wszystkie hormony lub czynniki wzrostu, które stymulują skurcz naczyń lub promują wzrost i podział komórek, antagonizują działanie peptydów natriuretycznych. Przykładami czynników, któ-

re hamują działanie receptorów NPR-A i/lub NPR-B są: angiotensyna II, arginina-wazopresyna, kwas lizofosfatydowy, PDGF, bFGF i endotelina [52-54]. Dotychczas nie jest znany żaden specyficzny antagonist, który blokowałby całkowicie aktywność cykazy guanylanowej receptorów NPR-A i -B.

RECEPTOR NPR-C

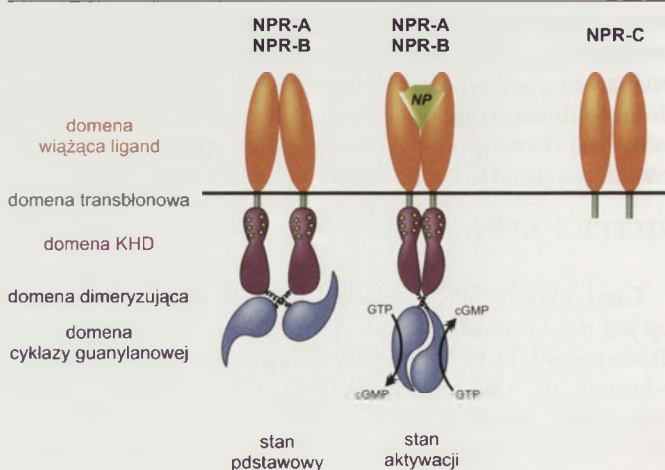
Główne działanie tego receptora (nazywanego również receptorem metabolizującym) polega na usuwaniu peptydów natriuretycznych z krwiobiegu lub środowiska zewnątrzkomórkowego. Kompleks ligand - NPR-C podlega lizosomalnej hydrolizie, po której receptor wraca na powierzchnię komórki [55]. O ile jednoznacznie stwierdzono, że receptor C ulega internalizacji, po czym powraca na powierzchnię komórki, o tyle potwierdzenie, czy takie zjawisko zachodzi w przypadku pozostałych dwóch receptorów (-A i -B) jest sprawą kontrowersyjną. NPR-C zbudowany jest z domeny zewnątrzkomórkowej, która jest w 30% identyczna z NPR-A i -B, z pojedynczej krótkiej części transbłonowej oraz krótkiej wewnątrzkomórkowej domeny podobnej do tej dla receptorów NPR-A i NPR-B, ale pozbawionej domeny KHD. Receptor ten nie posiada domeny o aktywności cykazy guanylanowej. Ufosforylowany jest on na jednej reszcie seryny (Ser533), zawiera dwa międzycząsteczkowe wiązania disiarczkowe pomiędzy resztami Cys-428 oraz pomiędzy Cys-431 [56], odpowiadające za łączenie się receptorów w homodimery lub homooligomery. Gen kodujący NPR-C człowieka (65 kpz) ulokowany jest na chromosomie 5p14-13 i zawiera 8 eksonów i 7 intronów [57]. Jego powinowactwo wiązania jest najwyższe dla ANP, niższe dla CNP, a najniższe dla BNP (Tabela 2). NPR-C występuje w dużych ilościach w wielu tkankach (Tabela 3), stanowiąc większą część populacji receptorów dla peptydów natriuretycznych. W komórkach śródbłonna receptory C stanowią 94% receptorów wiążących peptydy natriuretyczne. Również mRNA dla tego receptora występuje w wielu tkankach, między innymi w przedsionkach serca, płucach, nerkach, nadnerczach, żyłach, łożysku, w mięśniach gładkich aorty i komórkach śródbłonna aorty oraz w niektórych obszarach mózgu [58]. Istnieją doniesienia, które wskazują na to, że NPR-C wpływa na funkcje biologiczne komórek poprzez hamowanie aktywności cykazy adenylanowej lub stymulację fosfolipazy C [59].

Znanych jest wiele czynników mających wpływ na liczbę receptorów obecnych na błonie komórkowej. Wykazano, że poziom mRNA dla NPR-C wzrasta w komórkach śródbłonna pod wpływem glikokortykoidów [60]. U szczurów, niedobór wody i wysoki poziom soli znacząco zwiększa obecność receptorów typu C w nerkach [61]. Z kolei obniżenie syntezy NPR-C w komórkach śródbłonna powodowane jest poprzez aktywację NPR-A i NPR-B i związaną z tym produkcję cGMP [62]. Wiele badań wskazuje na to, iż same peptydy natriuretyczne również mogą redukować ilość receptorów [7]. Sugeruje się, że receptor C czuły jest również na stres osmotyczny i jonowy, ponieważ transkrypcja genu dla tego receptora jest znacząco zahamowana w komórkach śródbłonna aorty wołu (BAEC) w skutek podniesienia stężenia chlorku sodu w medium hodowlanym [63].

REGULACJA SYNTEZY I AKTYWNOŚCI RECEPTORÓW NPR

Oprócz podobnej struktury, receptory peptydów natriuretycznych charakteryzuje znaczne podobieństwo mechanizmów ich regulacji. W stanie podstawowym, w przypadku nieobecności liganda, receptory NPR-A i NPR-B są silnie ufosforylowane, a aktywność cykazy guanylanowej (GC) jest niska [64]. Białka te tworzą w błonach komórkowych formy homodimeryczne lub homotetrameryczne połączone zarówno na zewnątrz, jak i wewnątrz komórki (Ryc. 2). Wewnątrz komórki receptory połączone są w rejonie dimeryzującym, tzw. „coiled coil”, oddzielającym domenę KHD od domeny katalitycznej [65]. Uszkodzenie tego regionu skutkuje brakiem tworzenia oligomerów, jak również brakiem aktywacji wewnątrzkomórkowych konstruktorów, co wskazuje na to, iż dimeryzacja jest niezbędna do aktywacji cykazy guanylanowej. W stanie podstawowym receptory NP istnieją jako homooligomeryczne kompleksy. Każdy monomer jest silnie ufosforylowany w domenie homologicznej do kinazy tyrozynowej, której konformacja blokuje przyłączanie ATP. Receptory pozbawione tej domeny są konstytutywnie aktywne [61], co prowadzi do wniosku, że odpowiada ona za hamowanie aktywności katalitycznej domeny cykazy guanylanowej [64]. Przyłączenie peptydu natriuretycznego, ze stechiometrią jedna cząsteczka peptydu na dwie cząsteczki receptora [65] nie powoduje, jak to ma miejsce w przypadku receptorów dla czynników wzrostu, dalszej oligomeryzacji [44]. Związanie liganda wpływa jednak na translokację domen zewnątrzkomórkowych i zmniejszenie dystansu między nimi w rejonie przybłonowym [65]. Indukuje również zmiany w konformacji KHD, które prowadzą do przyłączenia ATP, co stabilizuje receptor i odblokowuje domenę katalityczną.

Ciągła ekspozycja receptorów NPR-A i NPR-B na peptydy natriuretyczne powoduje czasowo-zależną defosforylację receptora, co prowadzi do tak zwanego homologicznego obniżenia progu czułości, czyli zmniejszenia zdolności wiązania liganda. Homologiczne zobojętnianie receptorów NPR-A i -B jest jedynym w swoim rodzaju paradygmatem w porównaniu z większością receptorów, które są zobojętniane poprzez bezpośrednią fosforylację [44]. Aktywacja receptora po związaniu liganda powoduje defosforylację domeny KHD, wzrost poziomu dysocjacji cząsteczek ATP i liganda, co prowadzi do zaha-



Rycina 2. Schemat budowy i mechanizm aktywacji receptorów peptydów natriuretycznych (zmodyfikowano na podstawie [50]).

mowania przekazywania sygnału i jednoczesnego zmniejszenia czułości receptora na dalszą stymulację.

UWAGI KOŃCOWE


Choć od odkrycia pierwszego z członków rodziny peptydów natriuretycznych minęło już ponad 20 lat, to do niedawna przypisywano im głównie funkcję regulacyjną ciśnienia i objętości krwi. W ciągu ostatnich lat wykazano występowanie tych peptydów w wielu tkankach organizmu, nie tylko układu krwionośnego i moczowego. Rozszerza się szybko wiedza o ich funkcjach biologicznych oraz zmianach ich poziomu w odpowiedzi na występowanie wielu czynników patologicznych. Istotnym wydaje się poznanie roli jaką pełnią, te stosunkowo mało poznane neurohormony, w homeostazie organizmu. Wykazując działanie natriuretyczne, diuretyczne oraz naczyniorozszerzające, peptydy te stanowią istotny element mechanizmów kompensujących zaburzenia homeostazy układu krążenia.

PIŚMIENNICTWO

1. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28: 89-94
2. Bouchie JL, Hansen H, Feener EP (1998) Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP in the regulation of the plasminogen system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1771-1779
3. Yoshizumi M, Tsuji H, Nishimura H, Masuda H, Kunieda Y, Kawano H, Kimura S, Sugano T, Kitamura H, Nakagawa K, Nakagawa M (1999) Natriuretic peptides regulate the expression of tissue factor and PAI-1 in endothelial cells. *Thromb Haemost* 82: 1497-1503
4. Pawlowska Z, Jerczynska H, Szemraj J, Baranska P, Swiatkowska M, Cierniewski CS (2002) Natriuretic peptides reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett* 7: 1153-1157
5. Pedram A, Razandi M, Levin ER (2001) Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology* 142: 1578-1586
6. Brown C, Pan X, Hassid A (1999) Nitric Oxide and C-type Atrial Natriuretic Peptide Stimulate Primary Aortic Smooth Muscle Cell migration via a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 84: 655-667
7. Maack T (1992) Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 54:11-27
8. Baxter GF (2004) The natriuretic peptides: An introduction. *Basic Res Cardiol* 99: 71-75
9. Schmitt M, Cockcroft JR, Frenneaux MP (2003) Modulation of the natriuretic peptide system in heart failure: from bench to bedside? *Clinical Science* 105: 141-160
10. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8525-8529
11. Levin ER, Gardner DG, Willis SK (1998) Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339: 321-328
12. Vesely D (2000) Long-acting natriuretic peptide, vessel dilator, and kaliuretic peptide enhance the urinary excretion rate of b2-Microglobulin. *Metabolism* 49: 1592-1597
13. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inoue K, Imura H (1991) Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87: 1402-1412
14. Yandle TG (1994) Biochemistry of natriuretic peptides. *J Int Med* 235: 561-576
15. Ruskoaho H (1992) Atrial natriuretic peptide: Synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44: 479-601
16. Arjamaa O, Vuolteenaho O (1985) Sodium ion stimulates the release of atrial natriuretic polypeptides (ANP) from rat atria. *Biochem Biophys Res Commun* 132: 375-381
17. Bruneau BG, Piazza LA, de Bold AJ (1997) BNP gene expression is specifically modulated by stretch and ET-1 in a new model of isolated rat atria. *Am J Physiol* 273: H2678-H2686
18. Sanchez-Ferrer CF, Burnett JC Jr, Lorenz RR, Vanhoutte PM (1990) Possible modulation of release of atrial natriuretic factor by endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 259: H982-H986
19. McDowell G, Shaw C, Buchanan KD, Nicholls DP (1995) The natriuretic peptide family. *Eur J Clin Invest* 25: 291-298
20. Nakao K, Ogawa Y, Suga S-I, Imura H (1992) Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens* 10: 907-912
21. Nakao K, Ogawa Y, Suga S-I, Imura H (1992) Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 10: 1111-1114
22. Malinowski M, Biernat J, Roleder T, Dalecka AM, Reszka B, Deja MA, Woś S, Gołba KS (2006) Peptydy natriuretyczne: coś nowego w kardiologii? *Kardiol Pol* 64: 10 (supl. 6): 578-585
23. Pawlicki L, Różalski S, Kowalski J (1998) Niestabilna angina pectoris leczona PTCA. Czynniki wpływające na uwalnianie przedsionkowego peptydu natriuretycznego. *Kardiol Pol* 49: 304-313
24. La Villa G, Padeletti L, Lazzeri C, Salvi S, Michellucci A, Fronzarelli C, Porciani C, Mezzani A, Franchi F (1994) Plasma levels of natriuretic peptides during ventricular pacing in patients with a dual chamber pacemaker. *Pacing Clin Electrophysiol* 17: 953-958
25. Sielski J, Gawor Z, Janion M, Wozakowska-Kaplon B (2004) Ocena hormonalnej i hemodynamicznej czynności lewego przedsionka u pacjentów z blokiem przedsionkowo-komorowym II i III stopnia po wszczępieniu stymulatora serca na stałe. *Folia Cardiol* 11: 649-660
26. Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM, Espiner EA (1995) The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1175-1183
27. Pemberton CJ, Yandle TG, Rademaker MT, Charles CJ, Aitken GD, Espiner EA (1998) Amino-terminal proBNP in ovine plasma: evidence for enhanced secretion in response to cardiac overload. *Am J Physiol* 275: H1200-H1208
28. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA (2000) Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 36: 355-359
29. de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML (1996) Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 31: 7-18
30. Suzuki E, Hirata Y, Kohmoto O, Sugimoto T, Hayakawa H, Matsuoka H, Sugimoto T, Kojima M, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1992) Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells. *Circ Res* 71: 1039-1048
31. Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Itoh H, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M, Imura H (1991) Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is the major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ Res* 69: 491-500
32. Holmes SJ, Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Frampton C (1993) Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *Clin Endocrinol Metab* 76: 91-96
33. Horio T, Kohno M, Takeda T (1992) Effects of arginine vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 on the release of brain natriuretic peptide in vivo and in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 575-582
34. Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q (2003) Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem* 278: 25847-25852
35. Togashi K, Kameya T, Kurosawa T, Hasegawa N, Kawakami M (1992) Concentrations and molecular forms of C-type natriuretic peptide in brain and cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 38: 2136-2139
36. Igaki T, Itoh H, Suga S, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Mukoyama M, Sugawara A, Yoshimasa T, Tanaka I, Nakao K (1996) C-type natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans. *Kidney Int Suppl* 55: S144-S147

37. Nazario B, Hu RM, Pedram A, Prins B, Levin ER (1995) Atrial and brain natriuretic peptides stimulate the production and secretion of C-type natriuretic peptide from bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 1151-1157
38. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ishida H, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Yoshimasa T, Tanaka I, Nakao K (1998) Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages. *Endocrinology* 139: 1920-1926
39. Hagiwara H, Inoue A, Yamaguchi A, Yokose S, Furuya M, Tanaka S, Hirose S (1996) cGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Am J Physiol* 270: C1311-C1318
40. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4016-4021
41. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10: 80-86
42. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252: 120-123
43. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H (1992) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130: 229-239
44. Potter LR, Hunter T (2001) Guanylyl Cyclase-linked Natriuretic Peptide Receptors: Structure and Regulation. *J Biol Chem* 276(9): 6057-6060
45. Potter LR (2005) Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci* 10: 1205-1220
46. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58: 1155-1162
47. Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K (1998) Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 736-7399
48. Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG, Goeddel DV (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biol* 12: 2581-2590
49. Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ (1990) Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 16: 301-307
50. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27: 47-72
51. Barr CS, Rhodes P, Struthers D (1996) C-type natriuretic peptide. *Peptides* 17: 1243-1251
52. Abbey SE, Potter LR (2003) Lysophosphatidic acid inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase-B. *Endocrinology* 144: 240-246
53. Chrisman TD, Perkins DT, Garbers DL (2003) Identification of a potent serum factor that causes desensitization of the receptor for C-Type natriuretic peptide. *Cell Commun Signal* 1: 4
54. Jaiswal RK (1992) Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 395-402
55. Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR (2005) Downregulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol Pharmacol* 67: 174-183
56. Stults JT, O'Connell KL, Garcia C, Wong S, Engel AM, Garbers DL, Lowe DG (1994) The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer. *Biochemistry* 33: 11372-11381
57. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Aoi N, Izumi Y, Kanmatsuse K, Ozawa Y (2002) Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. *Endocrine* 17: 85-90
58. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA (1990) Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 796-803
59. Anand-Srivastava MB, Trachte GJ (1993) Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 45: 455-497
60. Lanier-Smith KL, Currie MG (1990) Effect of glucocorticoids on the binding of atrial natriuretic peptide to endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 178: 105-109
61. Kollenda MC, Vollmar AM, McEnroe GA, Gerbes AL (1990) Dehydration increases the density of C receptors for ANF on rat glomerular membranes. *Am J Physiol* 258: R1084-1088
62. Levin ER (1993) Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol* 264: E483-E489
63. Katafuchi T, Mizuno T, Hagiwara H, Itakura M, Ito T, Hirose S (1992) Modulation by NaCl of atrial natriuretic peptide receptor levels and cyclic GMP responsiveness to atrial natriuretic peptide of cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 7624-7629
64. Chinkers M, Wilson EM (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. *J Biol Chem* 267: 18589-18597
65. Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, Misono KS (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* 279: 28625-28631

Natriuretic peptides – their receptors and role in cardiovascular system

Hanna Jerczyńska, Zofia Pawłowska 

Chair and Department of Molecular and Medical Biophysics, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka Street, 92-215 Lodz, Poland,

[✉]e-mail: pawlow@zdn.am.lodz.pl

Key words: natriuretic peptide, natriuretic peptide receptors

ABSTRACT

Natriuretic peptides belong to a family of small proteins that play a major role in modulation of natriuresis, diuresis and vasodilatation. They counteract the activity of renin-angiotensin-aldosterone system. They are also involved in the regulation of homeostasis, fat metabolism and long bone growth. Natriuretic peptides family in mammals consists of three main members: atrial natriuretic peptide (ANP) – secreted by the atrial myocardium; brain natriuretic peptide (BNP) – secreted mainly by the ventricular myocardium, and C-type natriuretic peptide (CNP) – produced and released by endothelial cells. Secretion of these peptides is stimulated by atrial and ventricular distension, increased blood pressure, hypoxia or renal dysfunction. Natriuretic peptides play their roles via interactions with NPR-A and NPR-B receptors which are transmembrane guanylyl cyclases. Their local concentrations, regulated by internalization and degradation, are mediated by the NPR-C receptor and by neutral endopeptidase. The paper presents the current knowledge of structure and biological function of natriuretic peptides.

Zachowanie wysokiej wierności replikacji DNA ma fundamentalne znaczenie dla zapewnienia wiernego przekazywania informacji genetycznej w czasie podziałów komórkowych, jak również podczas przekazywania materiału genetycznego od rodziców do potomstwa. Głównymi strażnikami wierniej replikacji są replikacyjne polimerazy DNA, które są odpowiedzialne za replikację genomowego DNA. Polimerazy DNA, obok replikacji genomowego DNA, biorą także udział w wielu szlakach naprawy uszkodzeń DNA, wypełniając luki w DNA powstałe w wyniku działania enzymów naprawczych. Wysoka wierność replikacji determinowana jest przez właściwą selekcję nukleotydów w centrum aktywnym enzymu oraz zdolność do usuwania niekomplementarnych nukleotydów z końca matrycystartera przez aktywność korektorską. W artykule podsumowano obecny stan wiedzy na temat mechanizmów, które determinują wysoką wierność replikacji, ze szczególnym uwzględnieniem badań strukturalnych pokazujących istotne zmiany konformacyjne po związaniu się polimerazy z substratem. Podkreślono rolę wiązań wodorowych, geometrię par zasad oraz oddziaływania polimerazy z DNA i z białkami towarzyszącymi.

WPROWADZENIE

Ostatnie lata doprowadziły do odkrycia i opisanego wielu nowych polimeraz DNA zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych. W komórkach ludzkich odkryto już szesnaście polimeraz DNA, w komórkach drożdży *Sacharomyces cerevisiae* znanych jest dziewięć polimeraz, a w komórkach prokariotycznych pięć polimeraz DNA. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowej polimerazy DNA zostały podzielone na kilka rodzin, A, B, X, Y oraz C i D [1,2,3]. Do rodziny A zaliczane są między innymi; polimeraza I z *Escherichia coli*, polimeraza DNA faga T7, mitochondrialna polimeraza γ . Rodzina polimeraz B obejmuje eukariotyczne polimerazy replikacyjne, polimerazy α , δ oraz ϵ , polimerazę ξ , a także polimerazy DNA bakteriofagów T4, RB69 oraz ϕ 29. Do rodziny polimeraz X zaliczane są eukariotyczne polimerazy takie jak polimeraza β , polimeraza λ , polimeraza μ oraz terminalna transferaza TdT. Rodzina polimeraz Y obejmuje polimerazy replikujące uszkodzone DNA (TLS), do których zaliczane są między innymi prokariotyczne polimerazy IV i V oraz eukariotyczne polimerazy DNA takie jak polimeraza η , κ czy ι . Rodzina polimeraz D występuje w komórkach bakterii termofilnych [4] natomiast do rodziny polimeraz C zalicza się polimerazę III z *Escherichia coli*, która wykazuje stosunkowo niewielką homologię na poziomie sekwencji aminokwasowej do pozostałych polimeraz DNA [5]. Dodatkową grupę stanowią odwrotne transkryptazy, reprezentowane przez polimerazę z wirusa HIV-RT oraz telomerazę [6,7].

Polimerazy DNA w komórce pełnią wiele funkcji. Oprócz replikacji genomowego DNA zaangażowane są w szereg procesów związanych z naprawą DNA. Biorą udział w naprawie przez wycinanie zasad (BER), naprawie przez wycinanie nukleotydów (NER), naprawie uszkodzeń rekombinacyjnych czy naprawie uszkodzeń krzyżowych (ang. *cross-link*) [8]. Istnieje duża grupa polimeraz należąca do rodziny Y, które replikują w sposób bezbłędny uszkodzone DNA (ang. *translesion synthesis*) [2]. Tabela 1 przedstawia znane rodziny oraz ich najważniejszych przedstawicieli. Polimerazy DNA obok domeny polimerazy mającej i często towarzyszącej domeny egzonukleolitycznej posiadają inne domeny, jak np. domenę odpowiedzialną za usuwanie reszty cukrowej - o aktywności liazy 5'-dezoksyrybozo-fosforanu (ang. *dRP lyase domain*) (Pol I z *E. coli*, Pol β , Pol λ , Pol μ , oraz TdT), domenę 5'-3' egzonukleazy (Pol I z *E. coli*), domenę helikazy (Pol θ), domenę sygnałową BRCT (Pol λ , Pol μ , TdT oraz Pol Rev1) czy aktywność prymazy, jak polimeraza α (syntetyzowanie krótkich starterów RNA). Wiele polimeraz posiada jeszcze inne dodatkowe sekwencje, których funkcja jak na razie nie została poznana [3]. Tabela 2 przedstawia listę polimeraz człowieka, drożdży oraz polimeraz z *E. coli*, oraz przypisane im funkcje.

Anna Bębenek

Pracownia Mechanizmów replikacji DNA, Zakład Biologii Molekularnej, Instytutu Biochemii i Biofizyki, PAN, Warszawa

Pracownia Mechanizmów replikacji DNA, Zakład Biologii Molekularnej, Instytutu Biochemii i Biofizyki, PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-114 Warszawa; tel.: (022) 592 33 31, e-mail: aniab@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 16 sierpnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 8 listopada 2007 r.

Słowa kluczowe: polimerazy DNA, mutacje typu podstawienia zasad, mutacje zmiany ramki odczytu, aktywność korektorska, selekcja zasad, białka towarzyszące

Wykaz skrótów: BER (ang. *base excision repair system*) – system naprawy przez wycinanie zasad; GP45 – czynnik procesywności bakteriofaga T4 i RB69; FRAXA (ang. *Fragile chromosome X syndrome*) – zespół kruchości chromosomu X; FRDA (ang. *Friedrich's ataxia*) – ataksja Friedreich'a; MMR (ang. *mismatch repair system*) – system naprawy błędnie sparowanych zasad; NER (ang. *nucleotide excision repair system*) – system naprawy przez wycinanie nukleotydów; PCNA (ang. *proliferating nuclear antygen*) – eukariotyczny czynnik procesywności; PEO (ang. *Progressive External Ophthalmoplegia*) – progresywny zanik mięśni gałki ocznej; RPA (ang. *replicating protein A*) – eukariotyczne białko wiążące się z jednoniciowym DNA; SSB (ang. *single stranded DNA binding proteins*) – prokariotyczne białka wiążące się z jednoniciowym DNA; TLS (ang. *translesion DNA synthesis*) – replikacja uszkodzonego DNA; SHM (ang. *somatic hypermutation*) – hipermutacje somatyczne powstające w czasie tworzenia przeciwciał, wpływające na zmienność przeciwciał; NHEJ (ang. *non homologous end joining*) – łączenie końców DNA nie posiadających homologii; DSB (ang. *double strand break*) – pęknięcia w obu niciach DNA

Podziękowanie: Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N301014433

Tabela 1. Rodziny polimeraz i ich najważniejsi przedstawiciele.

Rodzina A	Pol I z <i>E. coli</i> , T7, Taq, ludzkie poly i Pol v
Rodzina B	Pol δ, Pol α, Pol ε, Pol ζ, RB69, T4, pol9 ^o -7
Rodzina C	Pol III z <i>E. coli</i>
Rodzina D	Pol D z <i>Archebakterii</i>
Rodzina X	Pol β, Pol μ, Pol λ, TdT, Polσ
Rodzina Y	Pol IV, Pol V z <i>E. coli</i> , Pol Rev1, Pol κ, Pol η
Odwrotne transkryptazy	HIV-RT, telomeraza

WIERNOŚĆ REPLIKACJI DNA

Wierność replikacji genomowego DNA jest bardzo wysoka; jeden błąd popełniany jest na 10^8 - 10^{11} replikowanych par zasad [9]. Na tak wysoką wierność składa się wiele czynników. Pierwszym i najważniejszym jest wierność replikacji polimeraz DNA, których połączone aktywności polimerazy (włączanie właściwego nukleotydu) i egzozonukleazy (usuwanie z końca 3'-OH źle sparowanych zasad) są odpowiedzialne za właściwy wybór nukleotydu. Wierność replikacji w zależności od polimerazy kształtuje się na poziomie jednego błędu na 10^6 - 10^8 replikowanych par zasad. System naprawy źle sparowanych zasad (ang. *Mismatch Repair System MMR*) rozpoznający i usuwający źle sparowane zasady pozostawione przez polimerazę w nowosyntetyzowanej nici podnosi wierność replikacji od dwóch do kilku rzędów wielkości [10]. Na kształtowanie wierności replikacji wpływa także naprawa rekombinacyjna oraz replikacja uszkodzonego DNA (ang. *translesion sythesis*) prowadzona przez wyspecjalizowane polimerazy DNA.

Polimerazy replikacyjne z wysoką precyzją włączają właściwy nukleotyd podczas syntezy DNA. Pierwotna hipoteza zakładała, że właściwa selekcja zasad jest determinowana przez możliwość tworzenia wiązań wodorowych przez właściwe pary Watsona-Cricka. Jednak różnica energii swobodnej pomiędzy właściwie a niewłaściwie sparowanymi nukleotydami jest zbyt mała, żeby mogła determinować tak wysoką selektywność (jeden błąd na 10^5 inkorporowanych par zasad). W środowisku wodnym ta różnica wynosi 0,02-4 kcal/mol i pozwala na jedną niewłaściwą inkorporację na 10 prawidłowych par zasad [11]. Dla niektórych mniej wiernych polimeraz, polimeraz rodziny Y, udział wiązań wodorowych ma wpływ na tworzenie nowych prawidłowych par, natomiast dla polimeraz o wysokiej wierności replikacji wiązania wodorowe odgrywają mniejszą rolę w tworzeniu prawidłowych par zasad. Wiadomo natomiast, że wiązania wodorowe są potrzebne do stabilizacji nowo tworzonego łańcucha DNA [12].

Już w 1979 roku Bruskov i Poltev [13] zaproponowali, że polimerazy mogą rozpoznawać właściwe nukleotydy na podstawie ich sterycznych właściwości i umożliwiać utworzenie wiązania fosfodiestrowego. Potwierdziły to badania kinetyczne, które wykazały, że polimerazy wiążą właściwy nukleotyd z wydajnością od 10-1000 razy wyższą niż niewłaściwy nukleotyd. Wiązanie właściwego nukleotydu po-

przedza następny etap, związany ze zmianami konformacyjnymi enzymu, który prowadzi do utworzenia wiązania fosfodiestrowego. Dla niewłaściwego nukleotydu ten etap może być nawet do 1000 razy wolniejszy niż dla właściwego nukleotydu [14].

BUDOWA CENTRUM AKTYWNEGO POLIMERAZ DNA

Porównanie sekwencji aminokwasowych C-końcowych domen polimeraz DNA z rodziny A dokonane przez Delarue i wsp. [15] pozwoliło zidentyfikować ważne zachowane ewolucyjnie i funkcjonalnie rejony, które są odpowiedzialne za właściwości katalityczne polimeraz. W obrębie domeny polimerazy DNA wyróżnionych zostało sześć zachowanych rejonów oznaczonych 1-6. Trzy z tych motywów (3, 4 i 5) nazywane także domenami A, B i C są także silnie zachowane w polimerazach z rodziny B. Domeny A i C są zachowane w rodzinie polimeraz X (polimeraza β) oraz RT mimo, że polimeraza β wyewoluowała niezależnie od innych klas polimeraz DNA o znanej strukturze. Domeny te, jak to pokazały struktury krystalograficzne otrzymane dla polimeraz DNA, znajdują się w pobliżu miejsca wchodzenia trifosfonukleotydu i stanowią część centrum aktywnego polimerazy, odpowiedzialnego za włączanie nukleotydu [16].

Niezależnie od różnic w sekwencji aminokwasowej wielkość polimeraz, dla których otrzymano strukturę krystalograficzną, wykazuje bardzo podobną budowę. Kształt jest porównywany do kształtu jaki przyjmuje półotwarta prawa dłoń z domenami opisywanymi jako „palec”, „spód dłoni” oraz „kciuk” [17-22]. Domena polimerazy związa się w taki sposób, że tworzy się duży rowek, który stanowi miejsce dla wiązania DNA. Polimeraza β oraz ostatnio poznane i opisane inne polimerazy z rodziny X mają inną topologię domeny spodu dłoni w porównaniu do pozostałych rodzin polimeraz A, B, Y oraz RT oraz inne ułożenie domen kciuka i palców w stosunku do domeny spodu dłoni. W polimerazach tych kciuk stanowi funkcjonalny ekwiwalent palców, a palec pełni funkcję domeny kciuka [23,24]. Polimerazy z rodziny X używają tego samego mechanizmu wiązania nukleotydu i posiadają wszystkie strukturalne i mechanistyczne właściwości, które charakteryzują polimerazy z innych rodzin. Wszystkie badane do tej pory polimerazy posiadają centrum aktywne zlokalizowane w domenie spodu dłoni, które jest odpowiedzialne za wiązanie końca startera i α fosforanu wchodzącego nukleotydu. Dwa zachowane ewolucyjnie motywy A i C zidentyfikowane przez Delarue i wsp. [15] zawierają aż trzy silnie zachowane reszty karboksylowe. Dwie z tych reszt są niezmiennie i bezpośrednio zaangażowane w reakcję wiązania metalu i reakcję przekazywania nukleotydu. Mechanizm wiązania nukleotydu z udziałem dwóch jonów metalu (Mg^{2+}) został po raz pierwszy zaproponowany w 1993 przez Steitza dla polimerazy RNA [25]. Mechanizm ten okazał się także prawdziwy dla polimeraz DNA [25-28]. Porównanie struktur krystalograficznych polimeraz z różnych rodzin, polimerazy β (rodzina X), RB69 (rodzina B), T7 DNA polimerazy (rodzina A), odwrotnej transkryptazy HIV RT, a także polimerazy Dpo4 (rodzina Y) [29] pokazało, że wszystkie te polimerazy mają silnie zachowaną strukturę domeny katalitycznej znajdującej się w domenie „spodu dłoni” (motyw A i C) oraz wiążą dwa jony magnezu, które są koordynowane przez dwa kwasy aspara-

Tabela 2. Proponowane funkcje dla poznanych polimeraz DNA.

Polimerazy Eukariotyczne	Gen człowieka	Gen Drożdży	Dodatkowe aktywności	Proponowane funkcje
Rodzina B				
α (alfa)	<i>POLA</i>	<i>POL1</i>	prymaza	replikacja DNA chromosomalnego, udział w kontrolowaniu fazy S, naprawa DSB
δ (delta)	<i>POLD1</i>	<i>POL3</i>	3' egzonukleaza	replikacja DNA chromosomalnego, NER, BER, MMR, naprawa DSB
ϵ (epsilon)	<i>POLE</i>	<i>POL2</i>	3' egzonukleaza	replikacja DNA chromosomalnego, NER, BER, MMR, naprawa DSB, kontrolowanie fazy S
ζ (zeta)	<i>POLZ</i>	<i>Rev3</i>	-	TLS, naprawa DSB, hipermutacje somatyczne (SHM)
Rodzina A				
γ (gamma)	<i>POLG</i>	<i>M1P1</i>	3' egzonukleaza, dRP liaza	replikacja mitochondrialnego DNA, mitochondrialny BER
θ (theta)	<i>POLQ</i>	-	-	ICL (naprawa pęknięć krzyżowych) ?
Rodzina X				
β (beta)	<i>POLB</i>	-	dRP liaza	BER, naprawa pęknięć w ssDNA
λ (lambda)	<i>POLL</i>	<i>POL4</i>	dRP liaza	BER ?, NHEJ
μ (mu)	<i>POLM</i>	-	TdT	NHEJ
TdT	<i>DNTT</i>	-	TdT	NHEJ
σ (sigma)	<i>POLS</i>	<i>TRF4</i>		replikacja DNA kompleksów kohezyjnych siostrzanych chromatyd
Rodzina Y				
η (eta)	<i>POLH</i>	<i>RAD30</i>	-	TLS, mutacje somatyczne (SHM)
ι (iota)	<i>POLI</i>	-	dRP liaza	BER?, TLS?
κ (kappa)	<i>POLK</i>	-		TLS
Rev1	<i>REV1</i>	<i>REV1</i>	TdT (dla dC)	TLS
Polimerazy prokariotyczne (<i>E. coli</i>)	Nazwa genu	Dodatkowe aktywności		Proponowane funkcje
Pol I (rodzina A)	<i>polA</i>	3' egzonukleaza, 5' egzonukleaza, dRP liaza		replikacja chromosomalnego DNA, NER, BER
Pol II (rodzina B)	<i>polB</i>	3' egzonukleaza		replikacja nieuszkodzonego DNA, TLS
Pol III (rodzina C)	<i>polC</i>	3' egzonukleaza		replikacja chromosomalnego DNA, BER, MMR
Pol IV (rodzina Y)	<i>dinB</i>	-		TLS
Pol V (rodzina Y)	<i>umuC</i>	-		TLS

ginowe. W strukturze polimerazy β trzeci kwas asparaginyowy D256 oddziałuje z metalem A, który może zmieniać pKa (stała dysocjacji kwasowej) zarówno końca 3'-OH primera, jak i samego kwasu asparaginyowego [30]. Zamiana D256 do A hamuje aktywność polimerazy β , co wskazuje na istotną rolę tego aminokwasu w procesie katalizy. W rodzinie polimeraz A i Y odpowiednikiem kwasu asparaginyowego w tej pozycji jest kwas glutaminowy, w rodzinie polimeraz B jest to kwas asparaginyowy. Rola trzeciej reszty karboksylowej w rodzinie polimeraz A, Y oraz B nie jest do końca wyjaśniona i jej udział w oddziaływaniach z jonem Mg^{2+} nie jest potwierdzony. Niezależnie od różnic na poziomie sekwencji aminokwasowej, struktury domen spodu dłoni różnych polimeraz dają się nałożyć na siebie, a istotne reszty karbok-

sylove znajdują się w podobnej pozycji [28] co wskazuje, że wszystkie polimerazy wykorzystują ten sam mechanizm przekazywania nukleotydu.

Struktury domen palców i kciuka różnią się we wszystkich czterech rodzinach polimeraz, dla których znane są struktury krystalograficzne. Jednakże zarówno palce, jak i kciuk pełnią podobne funkcje we wszystkich tych polimerazach. Domena palców zawiera reszty aminokwasowe, które są zachowane wewnątrz rodzin polimeraz (motyw B) i zapewniają ważne oddziaływania z wchodzącym trifosfonukleotydem i z jednoniciowym DNA matrycy. Domena palców razem z domeną kciuka stanowią centrum katalityczne polimerazy. Domena kciuka oddziałuje z dwuniciowym

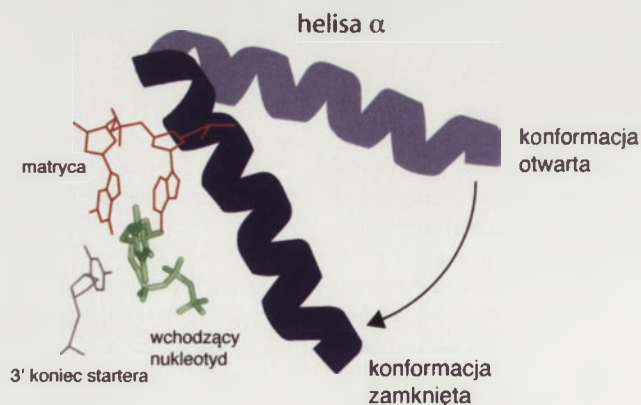
DNA od strony małego rowka i przypuszcza się, że odgrywa istotną rolę we właściwym ustawieniu DNA matrycy-startera w centrum aktywnym polimerazy, a także wpływa na procesywność polimerazy i bierze udział w translokacji polimerazy [27-29].

Porównanie struktur krystalograficznych potrójnych kompleksów (enzym + DNA + dNTP) z odpowiadającymi im podwójnymi kompleksami (enzym + DNA) lub apoenzymów (samych enzymów) otrzymanych dla polimeraz z rodziny X, A i B (polimerazy β , polimerazy T7, polimerazy I Taq oraz polimerazy DNA RB69) pokazało, że wiązanie dNTP prowadzi do istotnych zmian w orientacji DNA i domeny palców, a to prowadzi do utworzenia miejsca wiązania dla wchodzącego nukleotydu i komplementarnego nukleotydu matrycy [16,31]. W czasie włączania nukleotydu domena palców rotuje w kierunku domeny spodu dłoni tworząc tzw. „zamkniętą” konformację (Ryc. 1). Przybliża to istotne reszty aminokwasowe domeny palców, które mogą teraz kontaktować się z wchodzącym dNTP. Domena palców zamyka się wokół wchodzącego nukleotydu i komplementarnej zasady matrycy tworząc „kieszonkę wiążącą nukleotydy” (ang. *dNTP binding pocket*) dla nowo tworzącej się pary. Powierzchnia tej kieszeni określona jest częściowo poprzez oddziaływania polimerazy z małym rowkiem od strony zasady matrycy, a także z zasadą, cukrem i fosforanem wchodzącego nukleotydu. Powierzchnia ta określana jest również przez oba nukleotydy ostatniej pary matrycy – startera. Geometria tej kieszeni jest taka, że akceptowany będzie tylko właściwy komplementarny nukleotydy. W miejscu wiązania nukleotydu znajdują się liczne reszty aminokwasowe, które tworzą wiązania wodorowe od strony matrycy-startera. Akceptory wiązań wodorowych małego rowka DNA N3 puryn i O2 pirymidyn znajdują się w prawie identycznej pozycji we wszystkich czterech właściwych parach zasad, oraz są nieobecne lub inaczej położone w nieprawidłowych parach. Tak więc oddziaływania od strony małego rowka pozwalają na wykrycie niewłaściwych par. Związanie właściwego nukleotydu umożliwia utworzenie wiązania fosfoestrowego pomiędzy α fosforanem i 3' hydroksylową grupą startera, opisane dokładnie w [27]. Po przyłączeniu nukleotydu polimeraza przechodzi kolejną

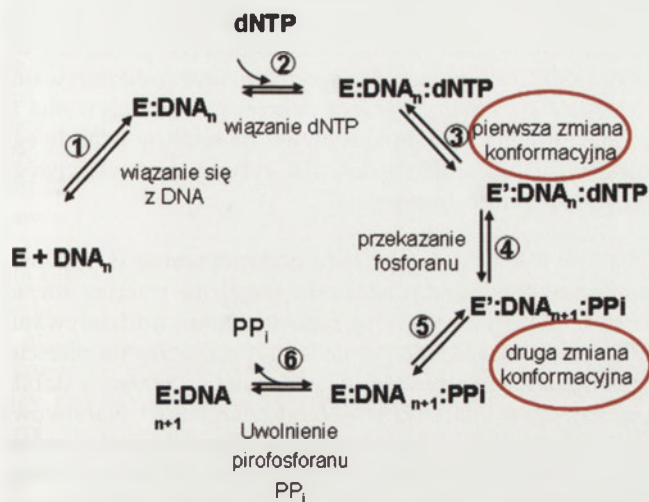
zmianę konformacyjną, która prowadzi do otwarcia palców, odsunięcia istotnych reszt aminokwasowych od centrum aktywnego i mówi się, że polimeraza przyjmuje konformację „otwartą”.

Potwierdzeniem tego, że geometria kieszeni odgrywa ważną rolę we właściwej selekcji zasad przez polimerazę są zmutowane formy polimeraz, gdzie zamieniono zachowane w ewolucji aminokwasy w pobliżu centrum aktywnego otrzymując polimerazy o obniżonej wierności replikacji. Mutanty o obniżonej wierności replikacji opisano dla polimerazy I, polimerazy β , polimerazy faga T4 i RB69 oraz eukariotycznych polimeraz α , δ oraz ϵ . Mutacje te zmieniały ważne dla wierności replikacji oddziaływania z końcem startera i wchodzącego nukleotydu (mutant R668A Pol I [32,33]), z małym rowkiem nukleotydu komplementarnego dla wchodzącego nukleotydu (mutant polimerazy β – R283 [34] oraz mutant polimerazy RB69 – Y567A [35]), oddziaływania z ostatnią parą matrycy-startera (mutant polimerazy I z *E. coli* – Y677A [36]) czy z zasadą, cukrem i fosforanem wchodzącego nukleotydu (mutant polimerazy I z *E. coli* – E710A [37]). Wierność replikacji determinowana jest także przez oddziaływania polimerazy z dupleksem DNA wiele zasad powyżej centrum aktywnego polimerazy. Polimerazy oddziałują z dupleksem matrycy-startera za pomocą wiązań wodorowych od strony małego rowka DNA. W strukturze krystalograficznej polimerazy T7, polimerazy Bst oraz Taq Pol zaobserwowano oddziaływania z udziałem wiązań wodorowych (ang. *H-bonding interactions*) obejmujące 4 zasady dupletu [21,38,39]. Analiza struktur krystalograficznych polimerazy HIV-RT i polimerazy β pokazała, że obie te polimerazy tworzą tylko jedno wiązanie wodorowe z zasadą od strony małego rowka. Te oddziaływania mają wpływ na siłę wiązania się polimerazy z DNA, jak również mają wpływ na rozpoznawanie prawidłowej geometrii nowo tworzonej pary zasad oraz na zdolność do wydłużania źle sparowanych zasad na końcu matrycy-startera [40,41].

Nie wszystkie polimerazy przechodzą tak istotne zmiany konformacyjne związane z włączaniem nukleotydu. Analizy struktur krystalograficznych polimerazy λ (rodzina X) związanej z DNA zawierającym jednonukleotydowną lukę i wypełniającą tę lukę pokazały, że polimeraza ta w czasie katalizy (włączania nukleotydu) nie podlega dużym zmianom konformacyjnym. Enzym nawet przy braku wchodzącego nukleotydu przyjmuje konformację zamkniętą. Zaobserwowano, że główne zmiany konformacyjne jakie zachodzą podczas włączania nukleotydu związane są z przemieszczeniem matrycy oraz rotowaniem istotnych dla zajęcia właściwej konformacji tworzącej się nowej pary [42]. Również dla wielu polimeraz o niskiej wierności replikacji, np. polimeraz z rodziny Y, badania strukturalne pokazały, że duże strukturalne zmiany związane z przemieszczaniem się domeny palców nie zachodzą w związku z włączaniem nukleotydu. Miejsce wiązania wchodzącego nukleotydu przypomina konformację zamkniętą, taką jaką się obserwuje dla innych polimeraz, natomiast miejsce wiązania matrycy znajduje się w konformacji otwartej. Powoduje to zwiększenie powierzchni „kieszeni wiążącej nukleotydy” [43]. W strukturze krystalograficznej polimerazy Dpo4, jednej z polimeraz rodziny Y, obserwuje się mniej oddziaływań polimerazy z



Rycina 1. Przemieszczanie się domeny palców w celu utworzenia kieszonki wiążącej nukleotydy. Przemieszczania się (rotowanie) α helisy domeny palców w kierunku DNA w celu utworzenia centrum katalitycznego polimerazy dla włączającego się dNTP. W czasie przejścia z konformacji „otwartej” do „zamkniętej” domena palców zmienia położenie o 30° w przypadku polimerazy Klenow, o 40° w przypadku polimerazy faga RB69 oraz 20° w przypadku polimerazy β .



Rycina 2. Etapy wiązania nukleotydu przez polimerazę. Uogólniony schemat kinetyki włączenia nukleotydu przez polimerazę. Dokładny opis reakcji znajduje się w tekście. E-DNA polimeraza, E' - konformacyjna zmiana w polimerazie DNA, DNA_n - substrat DNA, PPi - nieorganiczny fosforan, DNA_{n+1} - produkt DNA wydłużony o jeden nukleotyd.

DNA i wchodzącym nukleotydem, co ułatwia tej polimerazie zmieszanie w centrum aktywnym dużych zmodyfikowanych zasad lub dwóch zasad matrycy [22,29]. Polimerazy o mniejszej wierności włączają prawidłowy nukleotyd wolno, natomiast polimerazy o wysokiej wierności replikacji włączają właściwy nukleotyd bardzo szybko, co związane jest z budową centrum aktywnego polimeraz [44].

Dla polimeraz, które wykazują wysoką wierność replikacji włączenie niewłaściwego nukleotydu na końcu startera zwalnia wydłużanie startera i prowadzi do otwarcia palców i poszukiwania nowego prawidłowego nukleotydu lub, w przypadku polimeraz, które mają funkcję korektorską, wydłuża czas, w którym 3' koniec startera może zostać przekazany do centrum aktywnego 3' egzonukleazy [9,14].

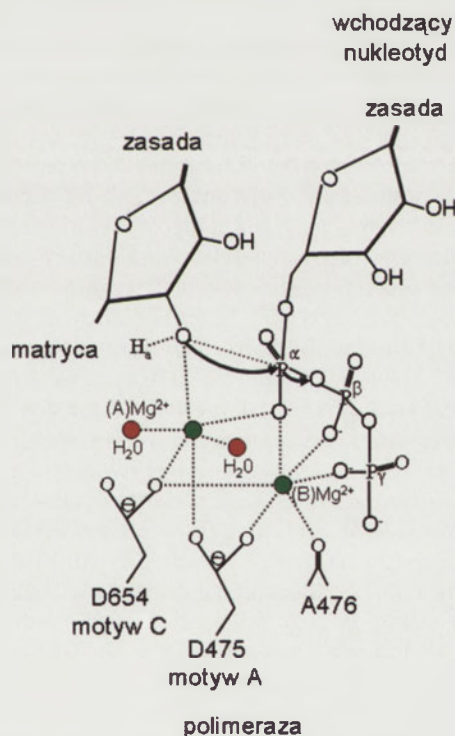
MECHANIZM WŁĄCZANIA WŁAŚCIWEGO NUKLEOTYDU - UDZIAŁ JONÓW METALI

Badania kinetyczne polimeraz o wysokiej wierności replikacji pozwoliły wyróżnić sześć etapów inkorporacji nukleotydu (Ryc. 2) [45]. Na etapie pierwszym dochodzi do wiązania się polimerazy z DNA - tworzy się kompleks podwójny. Na etapie drugim kompleks polimerazy z DNA (E:DNA_n) wiąże się z wchodzącym nukleotydem (dNTP) tworząc potrójny kompleks (E:DNA_n:dNTP). Etap trzeci związany jest ze zmianą konformacyjną kompleksu w taki sposób, że wchodzący trifosforan nukleotydu ustawiony jest w pozycji umożliwiającej zajęcie katalizy (*E:DNA_n:dNTP). Jest to pierwsza zmiana konformacyjna. Etap czwarty związany jest z reakcją katalizy i przekazaniem nukleotydu (*E:DNA_{n+1}:PPi). Etap piąty związany jest z kolejną zmianą konformacyjną polimerazy i DNA - powstaje kompleks (E:DNA_{n+1}:PPi). Etap szósty związany jest z translokacją polimerazy i DNA czemu towarzyszy uwolnienie pirofosforanu i powstaje o jeden nukleotyd dłuższy łańcuch DNA (E:DNA_{n+1}).

Sekwencja zdarzeń związana z włączaniem nukleotydu jest taka sama dla wszystkich polimeraz, ale dla różnych

polimeraz inne etapy reakcji mogą limitować inkorporację właściwego nukleotydu. Dla większości polimeraz (Polimerazy I fragmentu Klenowa, Polimerazy IV z *Solifolobus sulfataricus*, czy dla odwrotnej transkryptazy HIV) pierwsza zmiana konformacyjna związana z włączaniem nukleotydu jest czynnikiem limitującym reakcję (etap 3). Dla polimerazy β etapem limitującym jest etap czwarty związany z zajęciem katalizy i przekazaniem nukleotydu, natomiast dla polimerazy faga T4 i RB69 nie udało się ustalić etapu, który kontroluje reakcję inkorporacji nukleotydu [45].

Dwa jony metalu (Mg²⁺) A i B są bezpośrednio zaangażowane w wiązanie nukleotydu w czasie reakcji włączenia nukleotydu katalizowanego przez polimerazy [23,30]. Metal B (metal wiążący nukleotyd), który oddziałuje z atomami tlenu wchodzącego nukleotydu i dwiema resztami kwasu asparaginowego, ustawia trifosforan w centrum aktywnym enzymu i prawdopodobnie wpływa na obniżenie ładunku w czasie katalizy. Kiedy nukleotyd znajdzie się na swoim miejscu w centrum aktywnym, drugi jon Mg²⁺ (metal A) zostaje związany. Metal A oddziałuje z końcem 3'-OH (nukleotydu matrycy), indukując bardzo nieznaczne zmiany konformacyjne, które pozwalają ustawić koniec 3'-OH



Rycina 3. Mechanizm przekazywania nukleotydu w centrum aktywnym polimerazy. Rycina pokazuje dwa jony metalu Mg²⁺ A i B (zaznaczone na zielono) w centrum katalitycznym polimerazy. Ustawienie metalu B jest koordynowane poprzez oddziaływania z dwiema katalitycznymi resztami Asp 654 (strukturálny motyw A) i Asp 475 (strukturálny motyw C), tlenem Ala 476 oraz dwoma grupami fosforanowymi β i γ wchodzącego nukleotydu. Metal B ustawia trifosforan nukleotydu we właściwej pozycji w centrum katalitycznym polimerazy. Metal A jest związany w centrum aktywnym z dwoma katalitycznymi resztami Asp (475 i 654) oraz dwiema cząsteczkami wody znajdującymi się w pobliżu centrum katalitycznego (zaznaczone na czerwono). Metal A aktywuje koniec 3'OH startera do nukleofilowego ataku na α-fosforan wchodzącego dNTP. W czasie reakcji przekazywania nukleotydu proton z 3' OH nukleofilowego końca (Ha) zostaje usunięty i jest przekazywany do grupy pirofosforanowej opuszczającej centrum katalityczne enzymu. Rycinę przygotowano, opierając się na danych literaturowych zamieszczonych w pracy Joyce i Steitz (1995) [26] oraz Brautigam i Steitz 1998 [27]. Model przedstawiono, używając nazw reszt aminokwasowych polimerazy DNA faga T7.

w pozycji umożliwiającej nukleofilowy atak na α -fosforan wchodzącego nukleotydu. Jon metalu A może podwyższać nukleofilowość końca 3'-OH poprzez obniżenie jego wartości pKa. Powstaje pięciokoordynacyjny produkt pośredni, którego struktura jest stabilizowana przez dwa jony metalu (Ryc. 3). Reszty karboksylowe (Asp) polimerazy akceptują proton z końca 3'-OH, a następnie przekazują go do uwalnianego pirofosforanu (PPi). Metal B zaangażowany jest w dysocjację pirofosforanu [27,30,46,47]. Kiedy reakcja jest zakończona PPi i jony magnezu dysocjują, DNA ulega przemieszczeniu w taki sposób, że nowy koniec startera znajduje się w pozycji umożliwiającej zajście kolejnego cyklu katalitycznego.

INNE DETERMINANTY WPŁYWAJĄCE NA WIERNOŚĆ REPLIKACJI

Uważa się, że na wybór właściwego nukleotydu mają także wpływ inne czynniki. Jednym z nich jest uwodnienie (solwatacja) zasad. Uwodnieniu mogą podlegać grupy biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych. Uwodnienie zasad zwiększa znacznie ich objętość [12]. Utworzenie właściwych wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami prowadzi do wykluczenia cząsteczki wody i zmniejszenia objętości właściwej pary co pozwala na akceptację takiej pary w centrum aktywnym polimerazy. Niemożność utworzenia wiązań wodorowych przez niewłaściwe pary zasad może uniemożliwić wypchnięcie wody, co zwiększa objętość tworzonej pary i prowadzi do przestrzennego (sterycznego) wykluczenia takiej pary z centrum aktywnego polimerazy. Potwierdzeniem tej hipotezy było zastosowanie niepolarnych analogów zasad, które swoim kształtem przypominały właściwe nukleotydy, ale nie mogły tworzyć wiązań wodorowych. Dwa z nich difluorotoluenuodeksynukleozyd (dF), który naśladował tyminę oraz 9-metylo-1-H-imidazo[(4,5)-b] pirydynodeksynukleozyd (dQ), który naśladował adeninę były włączane do DNA z wydajnością podobną jak naturalne nukleotydy (zarówno *in vitro* i *in vivo*), co wskazywało na to, że naprawdę istotna w selekcji zasad jest geometria nowej tworzonej pary, a nie możliwość utworzenia wiązań wodorowych - omówione dokładnie w [12,48]. dF i dQ były włączane do DNA z wysoką wydajnością naprzeciwko adeniny (dF) oraz tyminy (dQ), jak również z dużą wydajnością były wstawiane na przeciwko siebie. *In vitro* pokazano, że dF wstawiany był naprzeciwko F z wydajnością od 100- do 1000-razy większą niż dT (deoksytymidyna) naprzeciwko T (tymina). Obie tyminy mogą ulec hydratacji, co bardzo zwiększa ich objętość. Niemożliwość utworzenia właściwych wiązań wodorowych może prowadzić do zatrzymania wody i para taka będzie zbyt duża, żeby mogła się zmieścić w kieszonce wiążącej nukleotydu. Para dF:F, która z powodu braku możliwości tworzenia wiązań wodorowych i ich hydratacji ma znacznie mniejszą objętość i zachowuje odpowiedni kształt i wielkość jest inkorporowana wydajniej przez polimerazę do DNA. Ten sam mechanizm dotyczy prawdopodobnie wszystkich niekomplementarnych par zasad, niewłaściwa para pomijając jej zmienioną symetrię i zmienione oddziaływania od strony małego rowka jest za duża, ponieważ ulega hydratacji i nie jest akceptowana przez polimerazę [12].

Innymi czynnikami modulującymi wierność procesu replikacji są oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy trifosforanami, magnezem a enzymem oraz oddziaływania pomiędzy enzymem a reszta cukrową. Oddziaływania te nie mają prawdopodobnie wpływu na selekcję właściwego nukleotydu, ale są niezbędne dla wytworzenia właściwego wiązania fosfodiesterowego [12].

Istotną rolę odgrywają także oddziaływania warstwowe (stakujące) pomiędzy zasadami (ang. *base-stacking interactions*). Oddziaływania te to niekowalentne oddziaływania wewnątrz-molekularne pomiędzy aromatycznymi pierścieniami zasad. Tego typu oddziaływania są ważne i stabilizują strukturę DNA. Również oddziaływania warstwowe między zasadami a aromatycznymi pierścieniami aminokwasów budujących centrum aktywne polimerazy mogą odgrywać istotną rolę w selekcji nukleotydów [49,50].

Ostatnio ukazała się praca, która pokazuje, że polimeraza α (jedna z eukariotycznych polimeraz replikacyjnych) używa innego mechanizmu do selekcji właściwego nukleotydu w centrum aktywnym. Pokazano, że chemiczne właściwości puryn - obecność atomów N-3 i N-1, które są donorami wiązań wodorowych sprawia, że naturalne puryny są rozpoznawane przez polimerazę α jako prawidłowe zasady (określone przez autorów jako zasady o wysokiej wierności) i wstawiane są naprzeciwko komplementarnych zasad w matrycy. Pozbawienie naturalnych puryn tych atomów azotu w pozycji 3 i 1 sprawia, że mogą one być częściej wstawiane naprzeciwko niekomplementarnych nukleotydów (selekcja negatywna). Puryny pozbawione tych wiązań chemicznych zostały określone jak „mniej wierne nukleotydy”. Natomiast obecność atomów N-1 i N-6 jest niezbędna, żeby polimeraza α mogła zidentyfikować właściwy nukleotyd i wstawić go naprzeciwko komplementarnego nukleotydu w matrycy (selekcja pozytywna). Dopiero w drugiej kolejności polimeraza α monitoruje kształt włączanych nukleotydów. Nie pokazano czy ten mechanizm dotyczy wstawiania właściwych pirymydyń oraz czy wszystkie polimerazy o wysokiej wierności mogą identyfikować właściwe zasady sprawdzając ich chemiczne właściwości [51].

TYPY MUTACJI

MUTACJE TYPU PODSTAWIENIA ZASADY

Polimerazy z pewną częstością wstawiają błędne nukleotydy co prowadzi do powstawania mutacji typu podstawienia zasad, które często określa się jako mutacje spontaniczne. Warunkiem powstania mutacji jest wstawienie, zaakceptowanie i wydłużenie błędnie wstawionego nukleotydu. Na podstawie analizy spektrum mutacji dla różnych polimeraz zaobserwowano, że mutacje w DNA nie są przypadkowe, zaobserwowano istnienie sekwencji, które częściej niż inne podlegały mutacjom tzw. „gorące miejsca” (ang. *hot spots*) oraz miejsca, które stosunkowo rzadko podlegały mutacjom, tzw. „zimne miejsca” (ang. *cold spots*). Niektóre z tych mechanizmów wydają się być wyjaśnione, jak np. częste występowanie tranzykcji C→T, która może następować na skutek dezaminacji 5-metylocytozyny do tyminy [52]. Wydaje się, że mutacje mogą częściej powstawać w rejonach bogatych w pary G:C, ponieważ obecność par G:C zapewnia

dodaniu jednej pary nukleotydów następują częściej w sekwencjach zawierających trakty powtarzających się takich samych par zasad, np. w traktach par A:T. Zaproponowano, że mutacje typu zmiany ramki odczytu mogą powstawać w wyniku wypętlenia zasady w jednoniciowym rejonie DNA (w nici startera lub matrycy). Taka struktura byłaby następnie stabilizowana poprzez utworzenie prawidłowej pary z sąsiednim nukleotydem i pozostawienie wypchniętej zasady poza łańcuchem DNA. W następnej rundzie replikacyjnej dochodziłoby do utrwalenia mutacji. Jeżeli wypchnięcie zasady nastąpiło w nici matrycy to po zjściu kolejnej rundy replikacji w nowej nici DNA będziemy obserwowali utratę (delecję) jednej zasady, jeżeli wypchnięcie zasady nastąpiło od strony startera w następnej rundzie replikacyjnej dojdzie do dodania jednej zasady (addycja) (Ryc. 4A). Model ten został nazwany ang. „*Slippage misalignment*” i oznacza ślizganie się polimerazy na traktach długich powtórzeń takich samych par zasad-opisane dokładnie w [58]. Im dłuższy trakt takich samych par zasad w DNA tym większe prawdopodobieństwo powstania mutacji typu zmiany ramki odczytu, ponieważ większa liczba prawidłowo utworzonych par może stabilizować pozahelikalne położenie jednej z zasad. Model ten racjonalnie tłumaczy obserwowany wzrost częstości mutacji zmiany ramki odczytu proporcjonalnie do wzrostu długości traktu takich samych par zasad, które zaobserwowano dla wielu polimeraz, takich jak polimeraza β [59], Pol γ [60] oraz dla pozbawionej aktywności korektorskiej polimerazy T7 [61].

Inny model, związany z przemieszczeniem się końca startera tłumaczy powstawanie mutacji typu podstawienia zasad na końcu sekwencji powtarzających się. Jeżeli prawidłowa zasada zostanie wstawiona na końcu sekwencji powtarzającej się po przemieszczeniu się startera (ang. *strand slippage*), a następnie starter ulegnie relokacji (przywrócone zostanie właściwe położenie startera) przed kolejną inkorporacją zasady do DNA, to otrzymamy na końcu matrycy startera błędnie sparowaną parę (ang. *terminal mismatch*). Jeżeli koniec startera nie powróci do prawidłowego położenia tylko utworzy stabilną prawidłową parę z pierwszym nukleotydem znajdującym się na końcu sekwencji, to w wyniku kolejnej rundy replikacji powstanie o jeden nukleotyd krótsze DNA – delecja (Ryc. 4B). Koniec sekwencji powtarzającej się będzie miejscem powstawania mutacji podstawienia zasady lub delecji. Model ten został zaproponowany w 1974 przez Fowlera [62], jako jeden z mechanizmów powstawania mutacji typu podstawienia zasad w *Escherichia coli*. Bezpośrednie dowody na możliwość istnienia takiego mechanizmu dostarczyły badania częstości powstawania i specyficzności mutacji typu podstawienia zasad ludzkiej polimerazy β [63] i polimerazy HIV-1 RT [64]. Polimerazy te generowały z wysoką częstością mutacje podstawienia zasady na końcu 5' sekwencji powtarzającej się, które jednocześnie stanowiły gorące miejsce (ang. *hot spot*) dla mutacji zmiany ramki odczytu.

Opisany powyżej mechanizm powstawania mutacji związany z przemieszczaniem (ślizganiem się) końca startera może także tłumaczyć nadmierne powielanie (ekspansję) czy też delecję trójnukleotydowych lub dłuższych powtarzających się sekwencji, jak również powstawanie dużych delecji czy addycji. W genomie ludzkim występują tandemowo powielone trójnukleotydowe powtarzające się

sekwencje (ang. *triplet repeats*) CAG/CTG, CGG/GCC czy GAA/TTC lub dłuższe powtórzenia, pięcio- i więcej nukleotydowe. Wykazano, że zwiększenie ilości kopii takich powtórzeń z normalnie występujących 5-30 powtórzeń do 40-100 powtórzeń prowadzi do powstania chorób genetycznych takich jak choroba Huntingtona, dystrofia mięśniowa, kruchość chromosomu X (FRAXA) czy ataksja Friedreicha (FRDA) [65].

Mechanizm związany z ekspansją powtórzeń w czasie replikacji DNA może być także związany ze ślizganiem się polimerazy na powtarzających się sekwencjach. Rejon DNA zawierające liczne powtórzenia tych samych sekwencji mogą tworzyć silne drugorzędowe struktury typu „szpilki do włosów”. W trakcie replikacji polimeraza może ominąć (przeskoczyć) taką strukturę, co będzie prowadzić do delecji fragmentu tworzącego szpilkę. Polimeraza, podobnie jak to ma miejsce przy powstawaniu mutacji zmiany ramki odczytu, może ślizgać się na takich powtórzonych sekwencjach i koniec startera może ulegać relokacji do następnego powtórzenia, co w kolejnej rundzie może prowadzić do zwielokrotnienia lub zmniejszenia liczby kopii nukleotydowych powtórzeń [58,66]. Należy jednak pamiętać, że ekspansja trójnukleotydowych powtórzeń może być spowodowana także błędami w rekombinacji czy błędami w naprawie DNA.

Podobny mechanizm można zaproponować dla powstawania dużych delecji lub addycji pomiędzy prostymi powtórzeniami sekwencji w DNA. Po zsyntetyzowaniu pierwszej z prostych sekwencji koniec startera może ulec dysocjacji od matrycy, a reasocjacja może nastąpić w rejonie następnej powtórzonej sekwencji. Synteza jest kontynuowana z nowego miejsca z pominięciem sekwencji znajdującej się pomiędzy powtórzeniami, co prowadzi do powstania pętli DNA na jednej z nici. Stabilność takiej pętli zależy od długości powtórzeń (im dłuższa sekwencja powtarzająca tym stabilniejsza jest utrzymanie struktury pętli) oraz od kompozycji nukleotydowej. Powtórzenia bogate w pary G:C tworzą bardziej trwałe kompleksy matrycy i startera co także wpływa na stabilność utworzonej pętli [58]. Jeśli wypętlenie nastąpi to w następnej rundzie replikacyjnej będziemy obserwowali delecję lub addycję dużych fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy powtórzonymi sekwencjami. Delecje (addycje) mogą obejmować od kilkunastu do kilkuset nukleotydów.

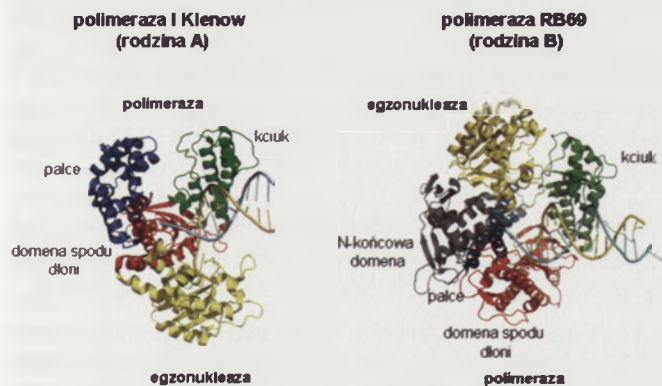
ROLA DOMENY EGZONUKLEAZY

Większości polimeraz replikacyjnych obok domeny polimerazy towarzyszy aktywność egzonukleazy, której rolą jest usuwanie błędów z końca 3', co zapewnia polimerazie wysoką wierność replikacji. Domena egzonukleazy może znajdować się na tym samym polipeptydzie co domena polimerazy, jak to ma miejsce w przypadku eukariotycznych polimeraz replikacyjnych – polimerazy δ i ϵ , mitochondrialnej polimerazy γ , polimerazy I i II z *E. coli*, czy też polimeraz bakteriofagowych T7, T4, RB69 czy ϕ 29. Może stanowić odrębną podjednostkę, jak podjednostka ϵ (produkt genu dnaQ), która wchodzi w skład holoenzymu polimerazy III z *E. coli*.

W czasie syntezy DNA koniec startera przemieszcza się między katalitycznymi domenami polimerazy i egzonukleazy i to przemieszczanie jest regulowane na drodze kompetycji o 3' koniec startera [67]. Preferowanym substratem dla aktywności egzonukleazy jest błędnie wstawiony nukleotyd na 3'OH końcu startera. Natomiast preferowanym substratem dla aktywności polimerazy jest prawidłowy nukleotyd na końcu 3'OH startera. Wstawienie błędnego nukleotydu w centrum aktywnym polimerazy powoduje zwolnienie reakcji tworzenia wiązania fosfodiesterowego z nowym wchodzącym nukleotydem, co pozwala na przemieszczenie końca startera do domeny katalitycznej egzonukleazy i usunięcie nukleotydu. Reakcja wycięcia nukleotydu zachodzi w centrum aktywnym egzonukleazy z udziałem dwóch jonów magnezu oraz dwóch zachowanych ewolucyjnie katalitycznych reszt karboksylowych. Reakcja ta jest bardzo podobna do tej, która zachodzi w centrum katalitycznym polimerazy. Jon Mg^{2+} A powoduje deprotonację cząsteczki wody. W efekcie tej reakcji powstaje anion hydroksylowy konieczny do ataku nukleofilowego na atom fosforu tworzący wiązanie fosfodiesterowe. Oba jony Mg^{2+} poprzez oddziaływania z atomami tlenu stabilizują geometrię i ładunek wytworzonego stanu przejściowego oraz ułatwiają produktowi hydrolyzy opuszczenie centrum aktywnego egzonukleazy. W wyniku tej reakcji uwalniany jest mononukleotyd [68]. Zachowanie równowagi pomiędzy wydłużaniem źle sparowanych zasad a szybkością ich wycinania określa katalityczną wydajność egzonukleazy [31]. Dla polimerazy I z *Escherichia coli* [69,70] oraz polimerazy bakteriofaga RB69 [71,72] znane są struktury krystalograficzne kompleksu edytorskiego (kompleksu polimerazy z DNA związanym w centrum egzonukleazy). We fragmencie Klenowa domeny polimerazy i egzonukleazy oddalone są od siebie o 30Å i stanowią dwie strukturalnie odrębne domeny (Joyce 1998). Domena egzonukleazy w polimerazie faga RB69 oddalona jest od centrum aktywnego polimerazy o 40Å i znajduje się pomiędzy domenami palców i kciuka, stanowiąc integralną część enzymu [71-73]. Położenie domen egzonukleazy względem domeny polimerazy jest zupełnie inne w obu enzymach (Ryc. 5). Różnice w topologii domen wskazują na inny me-

chanizm przekazywania końca startera z centrum aktywnego polimerazy do domeny egzonukleazy. We fragmencie Klenowa za względu na położenie domeny egzonukleazy w stosunku do domeny polimerazy wiązanie końca startera w centrum aktywnym egzonukleazy nie powoduje dużych zmian konformacyjnych enzymu. Natomiast w przypadku polimerazy RB69 przekazywanie końca startera do domeny katalitycznej egzonukleazy jest procesem, który wywala duże zmiany konformacyjne polimerazy RB69 potrzebne są do oddzielenia końca startera od matrycy i przekazanie jednoniciowego startera z centrum aktywnego polimerazy do centrum aktywnego egzonukleazy. Polimeraza przyjmuje tzw. otwartą konformację [71]. Przekazanie końca startera do domeny egzonukleazy wymaga rozdelenia nici DNA matrycy/startera na długości 3-4 nukleotydów [70,71]. Po usunięciu błędnego nukleotydu starter powraca do centrum aktywnego polimerazy i synteza DNA zostaje wznowiona. Polimeraza przyjmuje konformację zamkniętą. W polimerazach procesywnych, takich jak T7, T4, RB69, ϕ 29 oraz w mniejszym stopniu dla polimerazy I, przekazanie końca startera do domeny egzonukleazy odbywa się głównie w obrębie cząsteczki enzymu (ang. *intramolecular proofreading*), tzn. starter jest przekazywany do domeny egzonukleazy bez oddysocjowywania enzymu od DNA [73,74].

Ostatnie badania pokazują, że innym sposobem usuwania błędów jest oddysocjowanie polimerazy DNA od końca DNA gdzie został wstawiony błędny nukleotyd i ponowne przyłączenie się polimerazy do ssDNA startera poprzez domenę egzonukleolityczną i usunięcie błędu. Taki mechanizm usuwania błędów często wykorzystywany jest przez mało procesywną polimerazę I DNA z *E. coli* [70] oraz mitochondrialną polimerazę γ [75], w mniejszym stopniu jest on wykorzystywany przez polimerazy T7, T4 oraz RB69 [74]. Po oddysocjowaniu polimerazy od DNA w miejscu wstawienia błędnego nukleotydu źle sparowany nukleotyd może być usunięty także przez zewnętrzne egzonukleazy (ang. *intermolecular*). Zewnętrznymi egzonukleazami mogą być inne polimerazy posiadające aktywność korektorską lub autonomiczne egzonukleazy komórkowe. Po usunięciu błędu synteza DNA może być kontynuowana przez tą samą polimerazę, która wcześniej oddysocjowała od DNA, inną cząsteczkę takiej samej polimerazy lub nową polimerazę. Taki mechanizm usuwania błędnych zasad z końca startera zaobserwowano ostatnio dla polimeraz eukariotycznych. Pokazano, że błędy popełniane przez polimerazę α , która nie posiada własnej domeny korektorskiej mogą być usuwane przez aktywność egzonukleolityczną polimerazy δ , ale nie polimerazy ϵ [76]. Również polimeraza δ może usuwać błędy polimerazy ϵ [77]. Błędy polimerazy α w komórkach człowieka mogą być także usuwane przez (exo)N 3'-5' egzonukleazę człowieka [78]. Taki zewnątrz cząsteczkowy (ang. *intermolecular*) mechanizm usuwania błędów replikacyjnych wydaje się działać także dla polimeraz rodziny Y oraz X, które są mniej wierne i nie posiadają aktywności egzonukleazy. Błędy replikacji tych polimeraz mogą być usuwane przez domeny korektorskie głównych polimeraz replikacyjnych, albo przez inne egzonukleazy komórkowe.



Rycina 5. Położenie domen katalitycznych polimerazy i egzonukleazy względem siebie w rodzinie polimeraz A (Polimeraza I DNA fragment Klenow) i B (polimeraza DNA faga RB69). Rycina przedstawia struktury polimeraz z zaznaczonymi domenami - domeną egzonukleazy (kolor żółty) i wyróżnionymi domenami polimerazy- domeną spodu dłoni (kolor czerwony), domeną palców (kolor niebieski), domeną kciuka (kolor zielony) oraz N-końcową domeną polimerazy RB69 (kolor szary). Te ryciny zostały zrobione przy użyciu programu PyMol [100] i oparte są na strukturach krystalograficznych polimerazy Klenowa związanej z DNA (numer dostępu PDB 1KLN) oraz strukturze replikacyjnego kompleksu polimerazy RB69 (numer dostępu PDB 1IG9).

Egzonukleazy usuwają także mutacje typu zmiany ramki odczytu ± 1 oraz większe delecje czy addycje [31,61]. Nie tyl-

ko obecność błędnej pary na końcu startera powoduje kierowanie końca startera do domeny egzonukleazy, ale także obecność takiej błędnej pary lub DNA zawierającego zasadę poza helisą DNA, znajdujących się dwa, trzy lub cztery nukleotydy od centrum aktywnego może być sygnałem do przesłania końca startera do centrum aktywnego egzonukleazy [79]. Związane jest to z oddziaływaniem domeny kciuka polimerazy z dsDNA wzduż małego rowka DNA.

FUNKCJE BIAŁEK TOWARZYSZĄCYCH

W czasie replikacji DNA w komórce polimerazy oddziałują z wieloma innymi białkami, tzw. białkami towarzyszącymi (ang. *accessory proteins*), tworząc kompleksy replikacyjne, tzw. replisomy [80]. DNA w komórce replikowane jest przez polimerazy z wysoką procesywnością i tysiące nukleotydów mogą być włączane przez polimerazę bez dysocjacji polimerazy od DNA. Za wysoką procesywności polimeraz odpowiadają czynniki procesywności (ang. *sliding clamps*). Dla wielu czynników procesywności otrzymano struktury krystaliczne; dla eukariotycznego jądrowego czynnika proliferacji PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antygen*), podjednostki β prokariotycznej polimerazy III DNA oraz dla białka GP45 faga T4. Są to białka o zbliżonej strukturze, które mają budowę pierścienia i mogą przesuwac się wzduż dsDNA. Eukariotyczny czynnik procesywności PCNA oraz białko GP45 faga T4 są trimerami, β -pierścień z *E. coli* jest dimerem, ale struktura krystaliczna wszystkich tych białek jest bardzo podobna i wykazuje podobną oś symetrii [81]. Czynniki procesywności nie są w stanie samodzielnie związać się z DNA. Do wiązania z DNA służą białkowe kompleksy, tzw. białka ładujące (ang. *clamp loaders*). Rozpoznają one 3' koniec startera i poprzez hydrolizę ATP otwierają i zamykają strukturę pierścienia czynników procesywności i tym samym umożliwiają ich ładowanie się na DNA. Po związaniu się z DNA czynniki procesywności wiążą się z polimerazami i umożliwiają szybką i procesywną syntezę DNA pozwalając polimerazie na włączenie od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów za jednym przyłączeniem się polimerazy do DNA [82]. Tak przebiega replikacja nici wiodącej. Na nici opóźnionej po skończeniu syntezy każdego fragmentu Okazaki, czynnik procesywności jest zdejmowany z DNA również przez białka ładujące w obecności ATP. Powstaniu nowego fragmentu Okazaki towarzyszy załadowanie kolejnego pierścienia [82]. Białka ładujące pełnią więc podwójną rolę. Struktura krystalograficzna czynnika procesywności polimerazy RB69 GP45 związanego z C-końcowym peptydem polimerazy RB69 pokazała, że 11 reszt aminokwasowych C-końca peptydu jest odpowiedzialne za wiązanie się z białkiem GP45. Struktura ta pokazała, że tylko siedem aminokwasów z jedenastu silnie oddziałuje z hydrofobową kieszenią obecną w białku GP45, natomiast pozostałe aminokwasy tworzą elastyczne połączenie z polimerazą. Umożliwia to najprawdopodobniej polimerazie w momencie napotkania trudnego do przejścia miejsca, np. po wstawieniu błędnego nukleotydu, zatrzymanie się i przekazanie końca startera do domeny egzonukleazy bez konieczności oddysocjowywania enzymu od DNA [71]. Czynniki procesywności wiążą się nie tylko z polimerazami, ale stanowią platformę dla wiązania się innych białek, które uczestniczą w naprawie DNA oraz w kontroli cyklu komórkowego [83]. Czynniki procesywności poprzez wiązanie polimerazy z

DNA utrudniają jej dysocjację od DNA wpływając na procesywność i szybkość syntezy DNA. Uważa się, że zwiększenie procesywności powoduje zmniejszenie wierności replikacji. Związanie polimerazy z DNA obniża częstość jej dysocjacji i zwiększa prawdopodobieństwo wydłużania błędnej pary. *In vitro* dla polimerazy T7 po dodaniu thio-redoxyiny (czynnik procesywności polimerazy T7) zaobserwowano 46-krotny wzrost mutacji związanych z dodaniem jednej zasady (mutacji typu zmiany ramki odczytu) oraz zwiększoną częstość mutacji typu podstawienia zasad [84]. Takie działanie czynnika procesywności pokazano także *in vitro* dla polimerazy δ , gdzie w obecności eukariotycznego czynnika procesywności PCNA wierność replikacji polimerazy δ była obniżona od 2 do 7 razy [85]. Działanie czynnika procesywności nie tylko podwyższa procesywność i obniża wierność replikacji, ale może także modulować i wpływać na specyficzność mutacji, co pokazano dla polimerazy faga RB69 DNA [86]. Z drugiej strony wiązanie polimerazy z DNA obniża częstość powstawania dużych delecji od kilku do kilkuset nukleotydów. Mutacje czynnika procesywności mogą prowadzić do osłabienia wiązania się czynnika procesywności do kompleksu DNA-polimeraza. Polimeraza łatwiej dysocjuje od DNA i może przemieścić się do innej podobnej sekwencji jakimi są proste powtórzenia (ang. *direct repeats*) w DNA. W kolejnej rundzie replikacji będziemy obserwowali delecję fragmentu DNA znajdującego się pomiędzy tymi powtórzeniami. Taki mechanizm powstawania dużych delecji zaproponowano dla mutantu w POL30 (drożdżowy odpowiednik PCNA) [87], który wykazywał obniżone wiązanie do kompleksów polimeraza-DNA. Inne białka, które towarzyszą polimerazom DNA w czasie replikacji to białka SSB wiążące się z jednoniciowym DNA. Białka te chronią ssDNA matrycy przed działaniem nukleaz, znoszą drugorzędową strukturę DNA, ale także ułatwiają wiązanie się polimeraz z DNA. ssDNA ze związanymi białkami SSB jest znacznie lepiej rozpoznawany przez polimerazę. Białka SSB stymulują także procesywność polimeraz, co pokazano dla polimerazy faga T4 i RB69, a także podwyższają wierność replikacji [80,88,89]. Pokazano, że mutacja w białku RPA (SSB eukariotyczne) w komórkach drożdży powodowała wzrost dużych delecji w czasie replikacji DNA, wskazując na rolę białek RPA w przeciwdziałaniu powstawania tego typu uszkodzeń [90]. Podobną rolę dla białek RPA i PCNA pokazano dla drożdżowej polimerazy δ w badaniach *in vitro*, gdzie obecność każdego pojedynczego białka w mieszaninie reakcyjnej (RPA lub PCNA) obniżała częstość powstawania dużych delecji o 10%. Obecność obu tych białek w reakcji obniżała powstawanie dużych delecji o 90% w porównaniu z samą polimerazą [91], wskazując na udział czynnika procesywności i białek SSB w suprymowaniu powstawania dużych delecji w czasie replikacji DNA.

W skład replisomów obok białek SSB i czynników procesywności wchodzą także inne białka towarzyszące polimerazom replikacyjnym. Białka te wraz z polimerazą tworzą tzw. holoenzymy. Ostatnie badania wskazują, że wierność replikacji zależy także od oddziaływania polimerazy z białkami wchodzącymi w skład holoenzymu. Jednym z lepiej poznanych kompleksów replikacyjnych jest holoenzym polimerazy III z *E. coli*. W skład holoenzymu polimerazy III wchodzi podjednostka α (polimeraza), podjednostka ϵ (egzonukleaza) oraz podjednostka Θ (stymuluje aktywność podjed-

nostki ϵ), które stanowią tzw. rdzeń holoenzymu polimerazy III (ang. *core*). Dodatkowo w skład holoenzymu wchodzi szereg podjednostek między innymi kompleks złożony z podjednostki τ (tau) i γ (gamma) produkty genu *dnaX*, podjednostki δ i δ' (produkty genów *holA* i *holB*), podjednostka χ (produkt genu *holC*) oraz ψ (produkt genu *holD*). Wszystkie te podjednostki są konieczne dla stworzenia funkcjonalnego holoenzymu i odpowiedzialne są za wiązanie polimerazy z czynnikiem procesywności i oddziaływania holoenzymu z helikazą DnaB oraz białkami SSB. Podjednostki tau i gamma zaangażowane są w tworzenie aktywnego kompleksu replikacyjnego między innymi umożliwiają dimeryzację Pol III w widelkach replikacyjnych co pozwala na jednoczesną replikację nici wiodącej i opóźnionej. Mutacje w C-końcowym odcinku genu *dnaX*, który koduje podjednostkę tau wpływają na obniżenie wierności replikacji holoenzymu poprzez zwiększenie częstości powstawania mutacji typu zmiany ramki odczytu (-1) oraz mutacji typu podstawienia zasady, głównie transwersji [92].

Polimerazy eukariotyczne tworzą również kompleksy replikacyjne (holoenzymy) składające się z katalitycznych podjednostek oraz z podjednostek o nie do końca wyjaśnionych właściwościach. W skład holoenzymu polimerazy ϵ wchodzi katalityczna podjednostka Pol2, która posiada aktywność polimerazy i 3'-5' egzonukleazy, oraz trzy niekatalityczne podjednostki Dpb2, Dpb3 oraz Dbp4. Rola tych podjednostek nie jest dobrze poznana. Wiadomo, że podjednostka Dpb2 jest istotna dla funkcjonowania polimerazy ϵ oraz zaobserwowano, że mutacje w niekatalitycznej podjednostce drożdżowej polimerazy ϵ , podjednostce Dpb2 obniżają w sposób istotny wierność replikacji tej polimerazy [93].

W eukariotycznych widelkach replikacyjnych zidentyfikowano w ostatnich latach kompleks białek GINS, które oddziałują z helikazą MCM i czynnikiem replikacyjnym cdc45. Kompleks białek GINS składa się z czterech białek – Sld5, Psf1, Psf2 i Psf3. Struktura krystalograficzna otrzymana dla tego kompleksu wykazuje, że tworzy on rodzaj elipsy z centralnym prześwitem, który może pomieścić dwuniciowe DNA. Kompleks GINS oddziałuje z polimerazą α oraz ϵ i stymuluje ich aktywność. Na razie nie wiadomo, czy może on wpływać na wierność replikacji tych polimeraz [94].

KONSEKWENCJE WYNIKAJĄCE Z ZABURZEŃ REPLIKACJI DNA

Utrzymanie wysokiej wierności replikacji DNA jest ważne dla utrzymania integralności i stabilności informacji genetycznej. Integralność informacji genetycznej w komórce kontrolowana jest na wielu etapach, na etapie replikacji, naprawy uszkodzeń DNA czy na etapie kontroli cyklu komórkowego. Przekształcenie się zdrowej komórki w nowotworową związane jest z podwyższoną częstością mutacji na jednym z etapów życia komórki. Przyczyną podwyższenia się częstości mutacji jest najczęściej defekt (mutacja) w którymś z systemów naprawy DNA. Istnieje obecnie szereg przykładów pokazujących, że również mutacje w genach polimeraz, które inaktywują lub modyfikują ich enzymatyczne właściwości mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia. I tak na przykład myszy, których polimeraza δ (jed-

na z głównych polimeraz replikacyjnych) miała nieaktywną 3'-5' egzonukleazę na skutek mutacji punktowej w jednym z katalitycznych aminokwasów, wykazywały recesywny fenotyp mutatorowy i nowotworowy. Długość życia myszy uległa znacznemu skróceniu (średnia 10 miesięcy) oraz myszy te zapadały na nowotwory, głównie nowotwory skóry [95,96]. Badania te wskazywały w sposób jednoznaczny, że niedzień naprawione błędy replikacji prowadzące do nagromadzenia się mutacji mogą być przyczyną powstawania nowotworów.

Wprowadzenie punktowej mutacji w silnie zachowanym ewolucyjnie rejonie A mysiej polimerazy δ , w reszcie aminokwasowej Leu604 (L604G, L604K), prowadzi do otrzymania polimerazy o obniżonej wierności replikacji. Homozygotyczne myszy Pol^{L604K}/Pol^{L604K} oraz Pol^{L604G}/Pol^{L604G} umierają w stadium embrionalnym, natomiast heterozygoty Pol⁺/Pol^{L604K} Pol⁺/Pol^{L604G} rozwijają się normalnie. Zaobserwowano jednak, że w porównaniu z myszami dzikimi Pol⁺/Pol⁺ myszy te mają nieznacznie obniżoną długość życia i nieznacznie podwyższony poziom zachorowania na niektóre typy nowotworów. Tak niski poziom powstawania nowotworów heterozygotycznych myszy tłumaczony jest tym, że mutacje wprowadzone przez mutatorowe polimerazy δ L604G i L604K są kompensowane przez inne polimerazy, a głównie towarzyszące im domeny korektorskie. Jest to pierwsza praca wskazująca na możliwość istnienia mutatorowych polimeraz replikacyjnych niosących punktowe mutacje w domenie polimerazy [97].

Innym przykładem mutacji w genie polimerazy, która obniża wierność replikacji, są mutacje znalezione w mitochondrialnej polimerazie γ . Mutacje te powodują, że w mitochondrialnym DNA gromadzą się mutacje punktowe, jak również duże delecje mitochondrialnego DNA, które prowadzą do utraty funkcji mitochondriów. Mutacje w mitochondrialnej polimerazie zostały ostatnio powiązane z licznymi chorobami w tym PEO (ang. *progressive external ophthalmoplegia*), która jest rzadką chorobą wynikającą z zaburzeń pracy mitochondriów, charakteryzującą się dysfunkcją mięśni [98]. W chwili obecnej zmapowano wiele mutacji w genie podjednostki katalitycznej polimerazy DNA POLG, które zostały powiązane z chorobami mitochondrialnymi. Istnieje baza danych wszystkich mutacji w rejonie kodującym POLG wraz z przypisanymi im chorobami. Lista ta jest prowadzona przez „Mitochondrial Replication Group at NIEHS”.

Także mutacje w polimerazie η człowieka, które prowadzą do inaktywacji tej polimerazy stanowią podłoże choroby jednej z odmian Xeroderma pigmentosum (XPV variant). Xeroderma pigmentosum (XPV) charakteryzuje się podwyższoną zapadalnością na raka skóry wywołwanego promieniowaniem UV. Rolą tej polimerazy w komórce jest bezbłędne przechodzenie przez fotoprodukty powstałe w DNA na skutek promieniowania UV. Brak polimerazy η prowadzi do nagromadzenia się mutacji wywołanych promieniowaniem UV i choroby [99].

PODSUMOWANIE

Głównym strażnikiem replikacji genowego DNA są polimerazy replikacyjne. Wierność replikacji w najwyższym stopniu determinowana jest przez samą polimerazę na etapie selekcji właściwych nukleotydów w centrum aktywnym enzymu. W zależności od polimerazy na tym etapie jeden błąd jest generowany na 10^5 - 10^6 par replikowanych zasad. Błędy polimerazy korygowane są przez aktywność edytorską polimeraz, która podnosi wierność replikacji o 10-100 razy. Kolejnym etapem, który ma wpływ na kształtowanie wierności replikacji jest postreplikacyjny system naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair*), który rozpoznaje i usuwa mutacje typu podstawienia zasad oraz mutacje typu zmiany ramki odczytu w nowo syntetyzowanej nici DNA. System naprawy błędnie sparowanych zasad podnosi wierność replikacji o kolejne dwa-trzy rzędy wielkości. W efekcie wierność replikacji chromosomalnego DNA kształtuje się na poziomie jednego błędu na 10^9 - 10^{11} replikowanych par zasad.

Na wierność replikacji ma także wpływ replikacja uszkodzonego DNA z udziałem wyspecjalizowanych polimeraz DNA (polimeraz rodziny Y i X), naprawa rekombinacyjna czy wymiana siostrzanych chromatyd. Badania nad polimerazami DNA takimi jak polimeraza I z *Escherichia coli*, polimeraza T7, polimeraza β , polimerazami faga T4 i RB69 oraz nowo opisanymi polimerazami z rodziny Y i X, dla których otrzymano struktury krystalograficzne, przyczyniły się w bardzo istotny sposób do zrozumienia mechanizmów replikacji DNA.

Wiadomo obecnie, że wierność replikacji zależy od polimerazy (budowy jej centrum katalitycznego), sekwencji replikowanego DNA, a także oddziaływania polimeraz z białkami towarzyszącymi, jak czynniki procesywności, białkami wiążącymi ssDNA wchodzącymi w skład bardziej złożonej struktury jaką tworzą replisomy. Wiadomo również, że polimerazy różnią się zdolnością włączania liczby nukleotydów po związaniu się z DNA, co związane jest także z funkcją jakie te polimerazy pełnią w komórce. Wiele polimeraz, które nie były omawiane w tym artykule pełni wyspecjalizowane funkcje w komórce i przyczynia się do utrzymania wysokiej wierności replikacji. Funkcje jakie przypisuje się obecnie polimerazom zostały bardzo dokładnie omówione w dwóch pracach przeglądowych [2,3] oraz przedstawione w Tabeli 2.


PIŚMIENNICTWO

- Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 71: 133-163
- Shcherbakova PV, Bebenek K, Kunkel TA (2003) Functions of eukaryotic DNA polymerases. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003 RE3
- Bebenek K, Kunkel TA (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*. 69: 137-165
- Cann IK, Ishino Y (1999) Archeal DNA replication: identifying the pieces to solve the puzzle. *Genetics* 152: 1249-1267
- Kelman Z, O'Donnell M (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Ann Rev Biochem* 64: 171-200
- Sousa R (1996) Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends Biochem Sci* 21: 186-190
- O'Reilly M, Teichman SA, Rhodes D (1999) Telomerases. *Curr Opin Struct Biol*. 9: 56-65
- Pavlov YI, Shcherbakova PV, Rogozin IB (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int Rev Cyt* 255: 41-132
- Echols H, Goodman MF (1991) Fidelity mechanism in DNA replication. *Ann Rev Biochem* 60: 477-511
- Schaaper R (1993) Base selection, proofreading and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 23762-23765
- Petruska J, Goodman MF (2004) Enthalpy-entropy compensation in DNA melting thermodynamics. *J Biol Chem* 270: 746-750
- Kool ET (2002) Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Ann Rev Biochem* 71: 191-219
- Bruskov VI, Poltev VI (1979) On molecular mechanisms of nucleic acid synthesis. Fidelity aspects: 2. Contribution of protein-nucleotide recognition. *J Theor Biol* 78: 29-41
- Johnson KA (1993) Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Ann Rev Biochem* 62: 685-713
- Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* 3: 461-467
- Doublie S, Sawaya MR, Ellenberger T (1999) An open and closed for all polymerases. *Structure* 7: R31-53
- Ollis DL, Brick P, Hamlin R, Xuong NG, Steitz TA (1985) Structure of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313: 762-766
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-1790
- Sawaya MR, Pelletier H, Kumar A, Wilson SH, Kraut J (1994) Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science* 264:1930-1935
- Wang J, Abdus-Sattar KM, Wang C-C, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA (1997) Crystal structure of a pol α family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* 89: 1087-1099
- Doublie S, Tabor S, Long AM, Richardson CC, Ellenberger T (1998) Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2Å resolution. *Nature* 391:251-258
- Zhou B-L, Pata JD, Steitz TA (2001) Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell* 8: 427-437
- Beard WA, Wilson SH (2000) Structural design of eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Mutation Research* 460: 231-244
- Moon AF, Garcia-Diaz M, Batra VK, Beard WA, Bebenek K, Kunkel TA, Wilson SH, Pedersen LC (2007) The X family portrait: Structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst)* 6: 1709-1725
- Steitz TA, Steitz JA (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6498-6502
- Joyce CM, Steitz TA (1995) Polymerase structure and function: Variations on a theme? *J Bacteriol* 177: 6321-6329
- Brautigam CA, Steitz TA (1998) Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* 8: 54-63
- Steitz TA (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* 391: 231-232
- Ling H, Boudsocq F, Woodgate R, Yang W (2001) Crystal structure of a Y-family DNA polymerases in action: A mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell* 107: 91-102
- Batra VK, Beard WA, Shock DD, Krahn JM, Pedersen LC, Wilson SH (2006) Magnesium-induced assembly of a complete DNA polymerase catalytic complex. *Structure* 14: 757-766
- Bebenek K, Kunkel TA (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69: 497-529
- Minnick DT, Bebenek K, Osheroff WP, Turner RM Jr, Astatke M, Liu L, Kunkel TA, Joyce CM (1999) Side chains that influence fidelity at the

- polymerase active site of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem* 274: 3067-3075
33. Meyer AS, Blandino M, Spratt TE (2004) *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow Fragment) uses a hydrogen-bonding fork from Arg 668 to the primer terminus and incoming deoxynucleotide triphosphate to catalyze DNA replication. *J Biol Chem* 279: 3304-33046
 34. Osheroff WP, Beard WA, Wilson SH, Kunkel TA (1999) Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J Biol Chem* 274: 20749-20752
 35. Bebenek A, Dressman HK, Carver GT, Ng S, Petrov V, Yang G, Konigsberg WH, Karam JD, Drake JW (2001) Interacting fidelity defects in the replicative DNA polymerase of bacteriophage RB69. *J Biol Chem* 276: 10387-10397
 36. Bell JB, Eckert KA, Joyce CM, Kunkel TA (1997) Base miscoding and strand misalignment errors by mutator Klenow polymerases with amino acid substitutions at tyrosine 766 in the O helix of the fingers subdomain. *J Biol Chem* 272: 7345-7351
 37. Astatke M, Ng K, Grindley ND, Joyce CM (1998) A single side chain prevents *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) from incorporating ribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3402-3407
 38. Kiefer JR, Mao C, Braman JC, Beese LS (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* 391: 304-307
 39. Li Y, Korolev S, Waksman G (1998) Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J* 17: 7514-7525
 40. Yu H, Goodman MF (1992) Comparison of HIV-1 and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase fidelity on RNA and DNA templates. *J Biol Chem* 267: 10888-10896
 41. Beard WA, Osheroff WP, Prasad R, Sawaya MR, Jaju M, Wood TG, Kraut J, Kunkel TA, Wilson SH (1996) Enzyme-DNA interactions required for efficient nucleotide incorporation and discrimination in human DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 271: 12141-12144
 42. Garcia-Diaz M, Bebenek K, Krahn JM, Kunkel TA, Pedersen LC (2005) A closed conformation for the Pol λ catalytic cycle. *Nature Struct Mol Biol* 12: 97-98
 43. Trincão J, Johnson RE, Escalante CR, Prakash S, Prakash L, Aggarwal AK (2001) Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase η : implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 8: 417-426
 44. Beard WA, Wilson SH (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure* 11: 489-496
 45. Joyce CM, Benkovic SJ (2004) DNA polymerase fidelity: kinetic, structure, and checkpoints. *Biochemistry* 43: 14317-14324
 46. Pelletier H (1994) Polymerase structures and mechanism. *Science* 266: 2025-2026
 47. Lin P, Pedersen LC, Batra VK, Beard SH, Wilson SH, Pedersen LG (2006) Energy analysis of chemistry for correct insertion by DNA polymerase β . *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13294-13299
 48. Delaney JC, Henderson PT, Helquist SA, Morales JC, Essigmann JM, Kool ET (2003) High fidelity *in vivo* replication of DNA base shape mimics without Watson-Crick hydrogen bonds. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4469-4473
 49. Reineks EZ, Berdis AJ (2004) Evaluating the contribution of base stacking during translesion DNA replication. *Biochemistry* 43: 393-404
 50. Sponer J, Leszczynski J, Hobza P (2002) Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases. *Biopolymers* 61: 3-31
 51. Beckman J, Kincaid K, Hocek M, Spratt T, Engels J, Cosstick R, Kuchta R (2007) Human DNA polymerase α uses a combination of positive and negative selectivity to polymerize purine dNTPs with high fidelity. *Biochemistry* 46: 448-460
 52. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978) Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775-780
 53. Wang Z, Lazarov E, O'Donnel M, Goodman MF (2002) Resolving a fidelity paradox. Why *Escherichia coli* DNA polymerase II makes more base substitution errors in AT-compared with GC-rich DNA. *J Biol Chem* 277: 4446-4454
 54. Kouchakdjian M, Bodepudi V, Shibutani S, Eisenberg M, Johnson F, Grollman AP, Patel DJ (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry* 30: 1403-1412
 55. Hsu GW, Ober M, Carell T, Beese LS (2004) Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high fidelity DNA polymerase. *Nature* 431: 317-221
 56. Kunkel TA (2004) DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 279: 16895-16898
 57. Streisinger G, Owen J (1966) Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109: 633-659
 58. Bebenek K, Kunkel TA (2000) Streisinger revisited: DNA synthesis errors mediated by substrate misalignments. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 81-91
 59. Osheroff WP, Jung HK, Beard WA, Wilson SH, Kunkel TA (1999) The fidelity of DNA polymerase β during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem* 274: 3642-3650
 60. Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC (2001) The fidelity of human DNA polymerase γ with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J Biol Chem* 264: 11360-11366
 61. Kroutil LC, Register K, Bebenek K, Kunkel TA (1996) Exonucleolytic proofreading during replication of repetitive DNA. *Biochemistry* 35: 1046-1053
 62. Fowler RG, Degnen GE, Cox EC (1974) Mutational specificity of a conditional *Escherichia coli* mutator, mutD5. *Mol Gen Genet* 133: 179-185
 63. Kunkel TA (1985) The mutational specificity of DNA polymerase β during *in vitro* DNA synthesis: Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem* 260: 5787-5796
 64. Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA (1989) Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 264: 16948-16956
 65. Bowater RP, Wells RD (2001) The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 159-202
 66. Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS (2005) Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acid Research* 33: 3785-3798
 67. Shevelev IV, Hubsher U (2002) The 3'-5' exonucleases. *Natl Rev Mol Cell Biol* 3: 364-376
 68. Beese LS, Steitz TA (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal dependent ion mechanism. *EMBO J* 10: 25-33
 69. Ollis DL, Brick P, Hamlin R, Xuong NG, Steitz TA (1985) Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313: 762-766
 70. Joyce CM (1989) How DNA travels between the separate polymerase and 3'-5' exonuclease sites of DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem* 264: 10858-10866
 71. Shamooy Y, Steitz TA (1999) Building a replisome from inter-acting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* 99: 155-166
 72. Hogg M, Wallach SS, Double S (2004) Crystallographic snapshots of a replication DNA polymerase encountering an abasic site. *EMBO J* 23: 1483-1493
 73. Franklin MC, Wang J, Steitz TA (2001) Structure of the replicating complex of a pol α family DNA polymerase. *Cell* 105: 657-667
 74. Reddy MK, Weitzel SE, von Hippel PH (1991) Processive proofreading is intrinsic to T4 DNA polymerase. *J Biol Chem* 267: 14157-14166
 75. Johnson AA, Johnson KA (2001) Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 276: 38097-38107

76. Pavlov YI, Frahm C, Nick McElhinny SA, Niimi A, Suzuki M, Kunkel TA (2006) Evidence that errors made by DNA polymerase α are corrected by DNA polymerase δ . *Curr Biol* 16: 202-207
77. Morrison A, Sugino A (1994) The 3'-5' exonuclease of both DNA polymerases δ and ϵ participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242: 289-296
78. Brown KR, Weatherdon KL, Galligan CL, Skalski V (2002) A nuclear 3'-5' exonuclease proofreads for the exonuclease-deficient DNA polymerase α . *DNA Repair (Amst)* 1: 795-810
79. Lam W-C, Van der Schans JCE, Sowers LC, Millar DP (1999) Interaction of DNA polymerase I (Klenow fragment) with DNA substrates containing extrahelical bases: implications for proofreading of frameshift errors during DNA synthesis. *Biochemistry* 38: 2661-2668
80. Benkovic SJ, Valentine AM, Salinas F (2001) Replisome-mediated DNA replication. *Annu Rev Biochem* 70: 181-208
81. Jeruzalami D, O'Donnell M, Kuriyan J (2002) Clamp loaders and sliding clamps. *Curr Opin Struct Biol* 12: 217-24
82. Yao N, Kelman Z, Stukenberg PT, Dean F, Shechter D, Pan Z-Q, Hurwitz J, O'Donnell M (1996) Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, β and gp45 sliding clamps of human, *E. coli* and T4 replisomes. *Genes to Cell* 1: 101-113
83. Vivona JB, Kelman Z (2003) The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. *FEBS Lett* 546: 167-72
84. Kunkel TA, Patel SS, Johnson KA (1994) Error-prone replication of repeated DNA sequences by T7 DNA polymerase in the absence of its processivity subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 16830-16834
85. Hashimoto K, Shimizu K, Nakashima N, Sugino A. (2003) Fidelity of DNA polymerase δ holoenzyme from *Saccharomyces cerevisiae*: The sliding clamp proliferating cell nuclear antigen decreases its fidelity. *Biochemistry* 42: 14207-14213
86. Bebenek A, Carver GT, Dressman HK, Kadyrow F, Haseman JK, Petrov V, Konigsberg WH, Karam JD, Drake JW (2002) Dissecting the fidelity of bacteriophage RB69 DNA polymerase: site-specific modulation of fidelity by polymerase accessory proteins. *Genetics* 162: 1003-1018
87. Chen C, Merrill BJ, Lau PJ, Holm C, Kolodner RD (1999) *Saccharomyces cerevisiae* pol30 (proliferating cell nuclear antigen) mutations impair replication fidelity and mismatch repair. *Mol Cell Biol* 19: 7801-7815
88. Villemain JL, Ma Y, Giedroc DP, Morrical SW (2000) Mutations in the N-terminal cooperativity domain of gene 32 protein alter properties of the T4 DNA replication and recombination systems. *J Biol Chem* 275: 31496-31504
89. Sun S, Shamooy Y (2003) Biochemical characterization of interactions between DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein in bacteriophage RB69*. *J Biol Chem* 278: 3876-3881
90. Umezaki K, Sugawara N, Chen C, Haber JE, Kolodner RD (1998) Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. *Genetics* 148: 989-1005
91. Fortune JM, Stith CM, Kissling GE, Burgers PM, Kunkel TA (2006) RPA and PCNA suppress formation of large deletion errors by yeast DNA polymerase δ . *Nucleic Acid Research* 34: 4335-4341
92. Pham PT, Zhao W, Schaaper RM. (2006) Mutator mutants of *Escherichia coli* carrying a defect in the DNA polymerase III tau subunit. *Mol Microbiol* 59: 1149-1161
93. Jaszczur M, Flis K, Rudzka J, Kraszewska J, Budd ME, Polaczek P, Campbell JL, Jonczyk P, Fijalkowska IJ. Dpb2p, a Noncatalytic subunit of DNA polymerase ϵ , contributes to the fidelity of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Przyjęto do Genetics*
94. Chang YP, Wang G, Bermudez V, Hurwitz J, Chen XS (2007) Crystal structure of the GINS complex and functional insights into its role in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12685-12690
95. Goldsby RE, Lawrence NA, Hays LE, Olmsted EA, Chen X, Singh M, Presto BD (2001) Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. *Nat Med* 7: 638-639
96. Goldsby RE, Hays LE, Chen X, Olmsted EA, Slayton WB, Spangrude GJ, Preston BD (2002) High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15560-15565
97. Venkatesan RN, Treuting PM, Fuller ED, Goldsby RE, Norwood TH, Gooley TA, Ladiges WC, Preston BD, Loeb LA (2007) Mutation at the polymerase active site of mouse DNA polymerase increases genomic instability and accelerates tumorigenesis. *Mol Cell Biol*: 7669-7682
98. Ponomarew MV, Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC (2002) Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J Biol Chem* 277: 15225-15228
99. Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase ϵ . *Nature* 399: 700-704
100. DeLano WL (2002) The PyMOL molecular graphic system user's manual, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA

DNA replication fidelity

Anna Bebenek 

Institute of Biochemistry and Biophysics, Laboratory of DNA replication mechanism, 5a Pawińskiego St., 02-114 Warszawa, Poland

e-mail: aniab@ibb.waw.pl

Key words: DNA polymerases, base substitutions, frameshifts, proofreading, nucleotide selectivity, accessory proteins.

ABSTRACT

DNA replication fidelity plays fundamental role in faithful transmission of genetic material during cell division and during transfer of genetic material from parents to progeny. Replicative polymerases are the main guardian responsible for high replication fidelity of genomic DNA. DNA main replicative polymerases are also involved in many DNA repair processes. High fidelity of DNA replication is determined by correct nucleotide selectivity in polymerase active center, and exonucleolytic proofreading that removes mismatches from primer terminus. In this article we will focus on the mechanisms that are responsible for high fidelity of replications with the special emphasis on structural studies showing important conformational changes after substrate binding. We will also stress the importance of hydrogen bonding, base pair geometry, polymerase DNA interactions and the role of accessory proteins in replication fidelity.

Konstruowanie preparatów genowych dla celów terapii genowej wynika bezpośrednio z osiągnięć inżynierii genetycznej – możliwości klonowania molekularnego genów w wektorach plazmidowych i wirusowych. Ostatnio, w próbach klinicznych terapii genowej wykorzystuje się odkryte w latach 60. wirusy związane z adenowirusami (AAV). Badania kliniczne dowodzą, iż AAV są bezpieczne dla pacjentów i wydajnie zakażają komórki. Unikalną cechą AAV jest ich zdolność do miejscowo-specyficznego integracji DNA do 19 chromosomu człowieka. W niniejszej pracy podjęto próbę charakteryzowania wirusów AAV jako wektorów dla terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów odpowiedzialnych za transport transgenów i miejscowo-specyficzną integrację AAV do genomu gospodarza. Z przedstawionych badań wynika, iż w procesy integracji, ale również i replikacji AAV zaangażowane są bezpośrednio białka Rp78 i Rep68, sekwencje oskrzydłające ITR oraz wirusowy promotor p5. Wydaje się prawdopodobnym, iż badania biologii AAV pozwolą już wkrótce na konstruowanie unikalnych rekombinowanych wektorów AAV wprowadzających terapeutyczne geny w określone miejsca genomu człowieka.

WPROWADZENIE

Terapia genowa – znana w klinice od końca lat 80 [1] – jest nową metodą leczenia chorób, która wynika bezpośrednio z osiągnięć inżynierii genetycznej ostatnich kilkunastu lat oferującej biologom możliwości klonowania molekularnego genów w warunkach *in vitro*. Światowe źródła podają, iż terapia genowa w klinice to głównie próby wykorzystania genów terapeutycznych do leczenia chorób nowotworowych, naczyniowo-sercowych, monogenowych i zakaźnych [2]. Najwięcej, jak do tej pory prób klinicznych przeprowadzono na świecie z wykorzystaniem nośników wirusowych – adenowirusowych i retrowirusowych [2]¹. Dobór odpowiedniego nośnika genów – wektora – jest kluczowym warunkiem determinującym powodzenie terapii genowej. Wykorzystanie wektorów wirusowych charakteryzujących się wysoką wydajnością transfekcji komórek docelowych i najczęściej długą ekspresją transgenów, wiąże się z opisywanym nierzadko niebezpieczeństwem powikłań klinicznych u pacjentów poddanych genoterapii [3,4].

Badania podstawowe, które nierzadko przez badaczy francuskich określane są mianem „wektorologii” [5], charakteryzują mechanizmy oddziaływania rekombinowanych wektorów na komórkę oraz pozwalają konstruować, użyteczne dla terapii genowej, nowe nośniki wirusowe i przygotowywać farmakopelne preparaty genowe do badań klinicznych. Dużym zainteresowaniem wśród naukowców cieszą się obecnie wektory konstruowane w oparciu o genom wirusów związanych z adenowirusami (AAV ang. *adeno-associated virus*). Jak do tej pory opisanych jest już kilkadziesiąt prób klinicznych, w których wykorzystano rekombinowane AAV [2]. Mimo iż genom AAV jest mały (klonować można tylko niewielkie geny do około 2×10^3 par zasad), rAAV znajdują miejsce w klinice ponieważ wydajnie infekują zarówno komórki dzielące się, jak i nie dzielące się. Po transdukcji/infekcji rAAV najczęściej obserwuje się długotrwałą ekspresję transgenów. Zaletą rAAV jest również ich niska w porównaniu z innymi wektorami wirusowymi immunogenność w stosunku do komórek gospodarza. Biobezpieczeństwo rAAV zwiększa również, opisywana w chwili obecnej przede wszystkim dla dzikich typów AAV, miejscowo-specyficzna integracja DNA AAV z genomem gospodarza (chromosom 19, AAVS1; [6]), co minimalizuje możliwość przypadkowej integracji i mutagenyzy insercyjnej. rAAV cechuje dość szerokie powinowactwo do wielu różnych typów komórek; opisuje się, iż najczęściej, najwydajniej wektory rAAV zakażają komórki mięśni szkieletowych, serca, centralnego i obwodowego układu nerwowego oraz wątroby. rAAV wykorzystywane są w próbach klinicznych leczenia chorób monogenowych (niedobory odporności, bloki metaboliczne), jak i wielogenowych, również nowotworowych. Postępowaniu klinicznemu towarzyszy dość duży optymizm, którego wyrazem może być dynamicznie zwiększająca się liczba prób

¹ www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Maciej Małecki^{1,2,✉}

Agnieszka Woźniak²

Przemysław Janik¹

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

²Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

[✉]Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa i Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; tel.: (022) 546 26 21, e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Artykuł otrzymano 10 sierpnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 16 października 2007 r.

Słowa kluczowe: wirusy związane z adenowirusami (AAV), integracja z DNA, terapia genowa

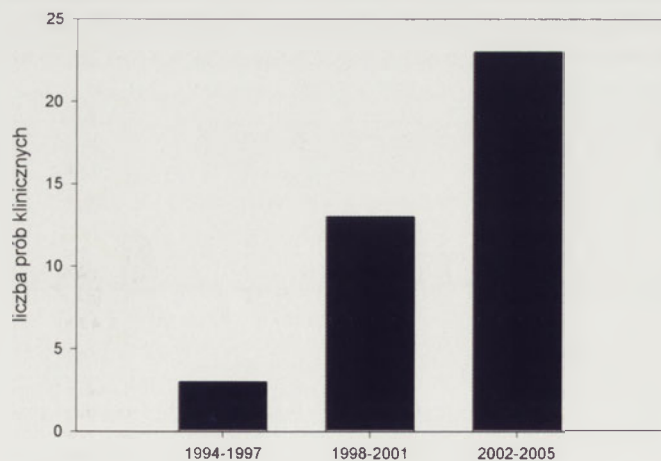
Podziękowanie: Praca częściowo finansowana z grantu KBN 2P05E 033 28

klinicznych na świecie z udziałem rAAV (Ryc.1). Niemniej, potrzeba prowadzenia badań podstawowych charakteryzujących własności biochemiczne, molekularne rAAV, jak również wyjaśniających mechanizmy oddziaływania rAAV z komórkami pozostaje nadal wysoce uzasadniona. Pełne kliniczne wykorzystanie rAAV jest bezpośrednio określane przez badania podstawowe, które pozwolą na zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych przede wszystkim za procesy konwersji jednoniciowego DNA rAAV do dwuniciowego, jak i integracji do genomu, które uważane są za podstawowe etapy ograniczające efektywność biologiczną rAAV. Dalszą część artykułu poświęcono charakterystyce molekularnej AAV ze szczególnym uwzględnieniem, obecnie opisywanych, mechanizmów integracji AAV do genomu komórek gospodarza.

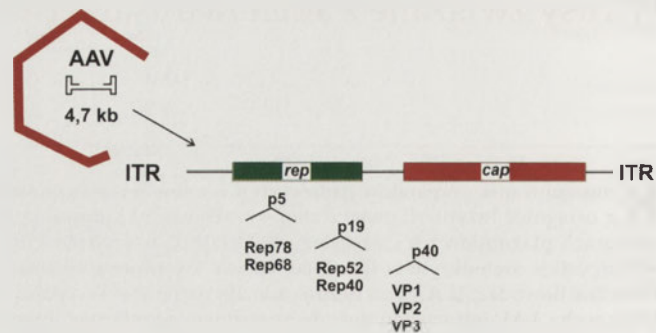
WIRUSY AAV - CECHY OGÓLNE

Wirusy AAV należą do rodziny *Parvoviridae*, rodzaju *Dependovirus*. Są jednymi z najmniejszych znanych wirusów, ich średnica wynosi zaledwie około 20 nm. Pozbawiony otoczki wirion AAV posiada symetrię ikosaedralną. Materiałem genetycznym (Ryc. 2) wirusów związanych z adenowirusami jest jednoniciowy DNA o długości około 5 000 nukleotydów [5,7]. AAV nie mają zdolności do samodzielnego namnażania się w komórce gospodarza. Do replikacji swojego materiału genetycznego wymagają obecności wirusa wspomagającego (*helper virus*). Jako wirusy ko-infekujące najczęściej występują adenowirusy (Ad) oraz herpeswirusy (HSV), znane są także ko-infekcje wirusem cytomegalii człowieka i papillomawirusem [5,7].

Pierwsze badania dotyczące AAV sięgają lat 60. Wówczas, głównie na podstawie badań z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej, opisywano AAV jako podjednostki adenowirusów, samodzielne wirusy kontaminujące preparaty adenowirusów lub, co potwierdzono później, wirusy, których cykl życiowy zależny jest od adenowirusów, czyli określane obecnie AAV [8,9]. Jednym z najlepiej opisanych obecnie AAV jest, odkryty jako pierwszy AAV typ 2, znaleziony jako zanieczyszczenie laboratoryjnej próbki adenowirusów. Do chwili obecnej wyizolowano 11 typów AAV (AAV1 –AAV11) [10], z czego, jak wykazały badania epidemiologiczne 3 serotypy są endemiczne dla człowieka



Rycina 1. Liczba prób klinicznych terapii genowej na świecie w latach 1994-2005, w których wykorzystano rekombinowane wektory wirusowe AAV [2].



Rycina 2. Schemat organizacji genomu AAV. Produkty białkowe genów *rep* i *cap* powstają dzięki aktywności transkrypcyjnej promotorów p5, p19 oraz p40.

(AAV2, AAV3, AAV5) [10]. Badania serologiczne wskazują również, że różne serotypy wirusów AAV mogą wykazywać różne preferencje do wirusów pomocniczych. Stwierdza się, iż np. przeciwciała przeciw AAV2 i AAV3 pojawiają się zwykle we wczesnym dzieciństwie, w przeciwieństwie do przeciwciał przeciw AAV5, których pojawienie się obserwuje się między 15 a 20 rokiem życia. Czas pojawiania się przeciwciał przeciw AAV2 i AAV3 koreluje z czasem pojawiania się przeciwciał w stosunku do adenowirusów, natomiast pojawienie się przeciwciał przeciw AAV5 zbiega się z wystąpieniem przeciwciał na HSV. Można stąd wysnuć wniosek, iż naturalnym wirusem pomocniczym dla AAV5, w przeciwieństwie do AAV1 i AAV2, jest nie adenowirus, a herpes simplex virus [11].

Naturalną drogą wnikania AAV do organizmu wydaje się być, tak jak w przypadku adenowirusów, droga oddechowa oraz droga pokarmowa. Do tej pory jednak nie jest ostatecznie ustalone, które tkanki lub narządy są preferowanymi miejscami infekcji dzikich typów AAV. Niemniej wiadomo, że rekombinowane wektory AAV u zwierząt wykazują długoterminową ekspresję genów w różnych rodzajach tkanek, w tym: mózgu, wątroby, mięśni, siatkówki [7]. Wskazuje się, że o specyficzności narządowej poszczególnych serotypów mogą decydować właściwości ich kapsydów [7,12]. Określa się, że nawet 70% populacji, niezależnie od szerokości geograficznej, jest seropozytywna pod względem AAV; nie mniej jednak, jak dotychczas, nie wiąże się AAV z określonymi zmianami klinicznymi [7,13].

GENOM AAV

Najlepiej poznanym wirusem AAV jest AAV2. Jego genom stanowi pojedyncza nić DNA złożona z 4680 nukleotydów (Ryc. 2). Końce ssDNA ograniczone są przez 145-nukleotydowe sekwencje ITR (ang. *inverted terminal repeats*). Przestrzenie ITR tworzą stabilną energetycznie strukturę spinki do włosów. ITRs odgrywają istotną rolę w replikacji, składaniu wirusowych cząstek oraz w integracji AAV do genomu komórki gospodarza. Między sekwencjami ITR w genomie AAV znajdują się tylko dwa geny: *rep* oraz *cap* oraz trzy promotory p5, p19 i p40 (Ryc. 2). W wyniku procesu alternatywnego składania i aktywności promotora p5 powstają białka Rep78, Rep68, promotora p19 białka Rep52, Rep40, zaś obecność promotora p40 pozwala na ekspresję genów białek kapsydowych VP1, VP2 i VP3. Białka Rep i

Cap stanowią około 70% masy wirionu AAV; pozostała część to DNA [5,7].

Białka Rep zaangażowane są we wszystkie etapy cyklu życiowego wirusa, włączając replikację wirusowego DNA, specyficzną integrację do chromosomu 19 gospodarza, uwolnienie w sprzyjających warunkach wirusowego genomu, a także regulację ekspresji zarówno wirusowych, jak i komórkowych genów [11,14]. Rep mają zdolność wiązania się ze specyficznymi sekwencjami DNA i biorą udział w nacinaniu ITRs w specyficznych miejscach określanych jako *trs* (ang. *terminal resolution site*). Rozcięcie DNA pozwala na replikację zakończeń liniowego genomu i wymaga wiązania białek Rep z tandemowymi powtórzeniami GAGC obecnymi w ITRs. Wiązanie z DNA, jak i jego częściowa denaturacja są prawdopodobnie istotne także w specyficznej integracji AAV do genomu na ramieniu q 19 chromosomu człowieka. Mimo różnic sekwencyjnych w obrębie ITR między serotypami u wszystkich wirusów AAV stwierdzono obecność miejsc wiążących białka Rep (ang. *Rep binding protein, RBS*) i miejsc *trs*. Białka Rep78/68 w nieobecności wirusa wspomagającego są syntetyzowane w niewielkiej ilości i są odpowiedzialne za hamowanie dalszej ekspresji genów (autoinhibicja) [15,16]. Według jednego z opisywanych mechanizmów, zakłada się, że hamowanie ekspresji genów przez białka wirusowe jest wynikiem wiązania białka Rep z promotorem p5 AAV, między sekwencją TATA-box a miejscem inicjacji transkrypcji. Możliwym jest, że białko Rep zakłóca tworzenie inicjującego kompleksu transkrypcyjnego [17]. Wskazuje się również, iż p5 może pełnić również, oprócz funkcji promotora, ważną rolę w procesie miejscowo specyficznej integracji AAV do genomu gospodarza [18,19]. Dwa pozostałe białka Rep: Rep52 i Rep40 powstają również w wyniku alternatywnego składowania mRNA i podobnie jak Rep78 i Rep68 różnią się sekwencją C-końca. Białka te nie mają zdolności wiązania DNA opisywanych dla dwóch poprzednich białek, wykazano natomiast, że mogą one pełnić rolę ATP-zależnej helikazy [11] i prawdopodobnie są zaangażowane w składanie nowych wirusów [20]. Prawa ramka odczytu CAP koduje białka strukturalne AAV, są to białka VP1, VP2 i VP3. Powstają one dzięki aktywności promotora p40 i występują w cząstce wirionu w proporcji 1:1:10. Białka VP2 i VP3 są niezbędne do uformowania kapsydu, natomiast białko VP1 prawdopodobnie odpowiada za zdolność infekowania komórek [21].

CYKL ŻYCIOWY AAV

Infekcja AAV jest procesem wieloetapowym, obejmującym adhezję wirusa do powierzchni komórki gospodarza, związanie z receptorem komórkowym, internalizację wirusa, migrację cytoplazmatyczną w kierunku jądra komórkowego, transport do jądra przez otoczkę jądrową, syntezę dsDNA AAV oraz jego integrację z genomem gospodarza (brak wirusa pomocniczego) lub replikację genomu AAV (obecność wirusów pomocniczych) [7,22]. Cykl życiowy rekombinowanych wektorów AAV (rAAV) – pozbawionych wirusowych genów *rep* i *cap* (Ryc. 3), sprowadza się oczywiście do wprowadzenia do jądra komórkowego kasety ekspresyjnej zawierającej klonowany transgen, a następnie syntezy rekombinowanego (terapeutycznego) białka.

Adhezja AAV do błony komórkowej gospodarza prawdopodobnie jest możliwa dzięki rozpoznawaniu przez wirus miejsc receptorowych zawierających proteoglikany bogate w siarczan heparanu (HSPG) [13,22], stosunkowo gęsto rozmieszczonych na powierzchni wielu rodzajów komórek, co mogłoby częściowo tłumaczyć powinowactwo wirusa do wielu typów komórek. W wiązanie wirusa do komórki zaangażowane są potencjalnie także białka receptorowe dla fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) [21]. Natomiast receptory integrynowe $\alpha_v\beta_5$ prawdopodobnie uczestniczą w internalizacji wirusa do komórki na zasadzie endocytozy. Umożliwiają one umieszczenie wirusa w uformowanych zagłębieniach klatrynowych, w formowanie których zaangażowana jest dynamina, rozpuszczalne białko wewnątrzkomórkowe o aktywności GTP-azy. Oligomeryzacja dynaminy w pierścieniowe struktury jest odpowiedzialna za utworzenie powleczonego klatryną pęcherzyka i jego oderwanie od błony komórkowej. Jak wskazują badania, jeden endosom niesie jedną cząstkę wirusa. W wyniku dojrzewania endosomu / stopniowego spadku pH wirus uwalniany jest do cytozolu [13,22]. Stąd migruje do jądra komórkowego, gdzie traci płaszcz białkowy. Podejrzewa się, że AAV ze względu na swoje małe rozmiary może wnikać do jądra przez jądrowy kompleks porów (NPC) [13]. Zdaniem jednak niektórych autorów, mimo tego, że rozmiary wirusa pozwalałyby na jego przedostanie się do jądra przez NPC, mechanizm jest inny, gdyż wejścia AAV do jądra nie hamują czynniki blokujące aktywność NPC-zależnego transportu, ani też temperatura 4°C, w której transport przez NPC ustaje [23].

W jądrze komórkowym gospodarza AAV przechodzić może cykl lizogeniczny lub lityczny w zależności od obecności lub braku wirusa pomocniczego. Pod nieobecność wirusa wspomagającego, uruchamiana jest auto-represja genów (prawdopodobnie zahamowanie replikacji DNA wirusów AAV następuje po nacięciu *trs* i uczestniczą w nim białka Rep78/68 [24]), ssDNA jest przepisywane do dsDNA i ulega integracji z chromosomem 19 gospodarza. Wbudowanie materiału genetycznego wirusa następuje w charakterystycznym miejscu na długim ramieniu chromosomu 19 (19q13.4), nazywanym AAVS1 [6]. Obecność wirusa w genomie gospodarza jest wykrywalna między 8 a 16 godziną po infekcji [25,26]. Nie wiadomo jak dokładnie przebiega przejście wirusa z jednej fazy w drugą, ale podejrzewa się, że w proces ten również są zaangażowane białka Rep



Rycina 3. Genom wirusów związanych z adenowirusami (AAV) oraz rekombinowanych wektorów AAV (rAAV). Kasetę ekspresyjną rAAV, oskrzydloną przez sekwencje ITR nie zawiera wirusowych genów *rep* i *cap*. W miejsce genów *rep* i *cap* wprowadzono transgen pod transkrypcyjną kontrolą promotora *cmv*. *polyA* – miejsce poliadenylacji transkryptu

78 i Rep68 [24]. Na skutek zakażenia komórki zawierającej AAV (faza lizogeniczna) wirusem pomocniczym, następuje przejście wirusa do cyklu litycznego – replikacja i pakowanie ssDNA AAV do białkowych otoczek. Konsekwencją jest uwolnienie nowych cząstek wirusów. Wskazuje się również, iż w niewielkim stopniu czynniki uszkodzające DNA (promieniowanie UV, cytostatyki) [27,28] mogą indukować przejście AAV z fazy lizogenicznej w lityczną.

MIEJSCOWO-SPECYFICZNA INTEGRACJA AAV DO GENOMU GOSPODARZA

Unikalną cechą AAV jest ich zdolność do wprowadzania własnego materiału genetycznego do chromosomu 19 (19q13.4, AAVS1) gospodarza [6], określana jako miejscowo-specyficzna integracja AAV. Zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie i integrację AAV w zakażonych komórkach pozwala rozważać możliwości konstruowania rekombinowanych wektorów AAV wprowadzających kasetę ekspresyjną zawierającą terapeutyczne transgeny w określone miejsce genomu gospodarza. Dużą wagę poświęca się badaniom – kodowanych przez wirusowy gen *rep* – białkom Rep. Im i wsp. [29] poddali badaniu wszystkie cztery białka Rep i stwierdzili, że kluczową rolę w procesie integracji odgrywają białka Rep78 i Rep68. Autorzy wskazują na biochemiczne właściwości białek Rep78/68: zdolność wiązania się z charakterystyczną dla AAV strukturą spinki do włosów, ATP-zależną aktywność endonukleazy związaną z wprowadzeniem nacięcia w miejsce *trs*, zdolność kowalencyjnego wiązania z 5' końcem powstałym w wyniku nacięcia *trs*, a także aktywność helikazy DNA. Zaobserwowaną różnicą między aktywnością obu białek jest zdolność wykorzystywania przez Rep68 różnych trifosforanów nukleotydów jako kofaktorów endonukleaz, podczas gdy Rep 78 wykorzystuje do reakcji jedynie ATP. Autorom nie udało się natomiast wykazać istotnej zdolności specyficznego wiązania białek Rep52 i Rep40 ze strukturą spinki do włosów wirusa. Nie stwierdzono również, iż białka Rep52 i Rep40 posiadają aktywności endonukleazy czy helikazy DNA, jak również zdolności kowalencyjnego wiązania z naciętymi końcami w *trs*. Weitzman i wsp. [30] również wskazują na zasadnicze znaczenie białek Rep68 i Rep78 w procesie miejscowo-specyficznej integracji. Ich zdaniem białka te są odpowiedzialne za tworzenie kompleksu między DNA wirusa a miejscem integracji w DNA gospodarza, przy czym zdaniem autorów drugorzędowa struktura spinki do włosów nie odgrywa podstawowej roli w rozpoznawaniu i wiązaniu odpowiednich elementów [30]. Dość często wskazuje się pewne podobieństwo początkowych etapów replikacji i integracji AAV. Według Yoon i wsp. [31] niezbędnymi do replikacji, a tym samym do integracji, elementami genomu AAV są miejsca w ITR – *Rep binding site* (RBS), *terminal resolution site* (*trs*) oraz region oddzielający RBS od *trs*. RBS odpowiada za prawidłowe wiązanie białka Rep z miejscem startu replikacji, co pozwala na zachodzące później wprowadzenie przez Rep nacięcia w obrębie sekwencji TRS. Rola regionu oddzielającego polega na uprzywilejowanym ułożeniu TRS tak, żeby mogło ono następnie zostać nacięte przez białko Rep. Co ciekawe, w miejscu wiążącym – AAVS1 (chromosom 19) odkryto obecność regionów homologicznych do opisanych struktur wirusowych: TRS i RBS [31]. Zakłada się, iż w procesie integra-

cji białko Rep łącząc się chromosomowym miejscem AAVS1 bierze udział w nacinaniu łańcucha DNA. W przypadku braku wirusa pomocniczego dalsza replikacja, zależna od białka Rep, nie zachodzi, co może prowadzić do powstawania połączeń DNA wirusa i gospodarza, opisywanych jako specyficzna miejscowo integracja [31].

Jak już wspomniano białko Rep78 jest nie tylko odpowiedzialne za przyłączanie do miejsca startu replikacji (*ori*) wirusa, ale także zawiera elementy niezbędne do zachowania katalitycznej aktywności endonukleazy [15,16,31]. Badania wskazują, iż w oddziaływaniu białka Rep z miejscem rbs wirusa główną rolę odgrywa łańcuch polipeptydowy białka Rep między 187-208 resztą aminokwasową, natomiast N-końiec białka Rep tworzy niezależną domenę o aktywności endonukleazy wymaganej do inicjacji zarówno replikacji DNA, jak i miejscowo specyficznej integracji. Stwierdza się również, iż aktywność opisywanej endonukleazy zależna jest od jonów Mn^{2+} .

Badania wskazują, iż w genomie człowieka jest przynajmniej kilkanaście miejsc, które zawierają wspomniane miejsce rbs zdolne do wiązania białek Rep wirusów AAV [32,33], przy czym wiele z nich położonych jest w genach regulujących proces proliferacji komórek [32]. Badacze utrzymują, że takich miejsc może być nawet 200 000, jednak w warunkach *in vivo* większość z nich jest prawdopodobnie niedostępna dla białek Rep, w przeciwieństwie do miejsca na chromosomie 19, które wykazuje swoistą hiperwrażliwość na ich działanie. Miejsce to jest prawdopodobnie zawsze dostępne do związania białka Rep. Wskazuje się również, że ilość białek Rep w infekcji latentnej może być czynnikiem ograniczającym specyficzną miejscowo integrację. Specyficzna miejscowo integracja zachodzi jedynie, gdy RBE towarzyszy obecna na chromosomie 19 sekwencja *trs*. Kompleksy białek Rep oddziałują nie tylko z chromosomowym RBE, ale także z wirusowymi strukturami ITR. Przypuszcza się, że kompleks Rep-ITR może być jednostką mającą zdolność oddziaływania z chromosomowym fragmentem RBE, tym samym proces tworzenia kompleksów Rep-RBE może być czynnikiem regulującym ukierunkowaną integrację wirusa.

Badania wskazują, iż w procesie specyficznej miejscowo integracji wirusa biorą udział nie tylko białka Rep78, Rep68 i sekwencje ITR. Przeprowadzone przez Philpott i wsp. [18,19] badania wskazują, iż do wydajnej specyficznej integracji niezbędny jest promotor p5. Autorzy podkreślają, iż obecność fragmentu p5 o wielkości 138 par zasad, określanego jako IEE (ang. *integration efficiency element*) zdecydowanie zwiększa efektywność integracji AAV do 19 chromosomu człowieka. Według badaczy w obecności p5IEE dochodzi do efektywnej i niezależnej od sekwencji ITR integracji AAV do genomu. Wskazuje się, iż ITR najprawdopodobniej pełni również funkcje stabilizatorów włączonego genomu i biorą udział w przejściu z fazy lizogenicznej w lityczną. Francois i wsp. [34] wykazali natomiast, iż p5 jest niezbędny także do efektywnej replikacji wirusa AAV w obecności wirusa pomocniczego. Badacze uważają, że najmniejszy niezbędny do replikacji element p5 funkcjonujący zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* składa się z 55 par zasad i zawiera kasetę TATA-box (*in vivo*), *rep-binding site*, *trs*¹ (*trs* obecne w miejscu inicjacji transkrypcji) i region o długości 17pz, który potencjalnie

może przybierać strukturę spinki do włosów otaczającą *trs*. Według autorów, do efektywnej replikacji AAV niezbędna jest także obecność białek TBP (ang. *TATA binding protein*), które stymulują wiązanie białek Rep do RBS oraz regulują procesem nacinania *trs*. Prawdopodobnie wynika to ze stabilizującego wpływu TBP na kompleks białek Rep z DNA. Mechanizm nie jest znany, możliwe jest jednak, że oddziaływanie pomiędzy Rep a TBP indukuje zmianę konformacji DNA, która ułatwia „wypchnięcie” i rozpoznanie *trs*⁺ przez Rep.

Hamilton i wsp. [35] w swojej pracy wskazują na zależność między użytym w doświadczeniach MOI (ang. *multiplicity of infection*) preparatu wirusa a wydajnością infekcji, integracji i zdolności uwalniania genomu AAV z DNA gospodarza. W przeprowadzonym przez autorów doświadczeniu zwiększanie MOI powodowało wzrost liczby zakażonych komórek, dochodzący do 80% komórek zakażonych przy MOI równym 10. Dalszy wzrost MOI nie powodował znacznego zwiększenia liczby zakażonych komórek. W przeciwieństwie do zakażenia, integracja przy MOI poniżej 10 okazała się bardzo niska, przy MOI równym 10, przy którym odnotowano około 80% zakażonych komórek, mniej niż 5% komórek zawierało zintegrowane DNA wirusowe, podczas gdy przy MOI równym i większym od 10 obserwowano zdecydowany wzrost liczby komórek posiadających DNA wirusowe. Integracja i zdolność wirusa do ponownego uwalniania własnego genomu wykazywały dużą korelację – blisko 75% zintegrowanych wirusów była zdolna do uwolnienia swojego DNA. Analiza DNA pozwoliła stwierdzić, że wszystkie integracje AAV do genomu były integracjami miejscowo specyficznymi (w *AAVS1*), aczkolwiek okazało się, że uległo im zaledwie 40% komórek, podczas gdy 80% komórek (100% komórek zakażonych) wykazywało przeorganizowanie DNA w obrębie *AAVS1*. Co ciekawe, linie komórkowe, w których zaobserwowano zmiany w obrębie *AAVS1*, zarówno w obecności zintegrowanego DNA wirusowego, jak i jego braku wykazywały dużą zmienność w ilości DNA obecnego w obrębie *AAVS1*. Fakt ten mógłby wskazywać na zdolność Rep do indukowania amplifikacji w obrębie *AAVS1* i jego przebudowy pod nieobecność wirusowych substratów do integracji. Autorzy utrzymują, iż za przebudowę *AAVS1*, również w nieobecności insertów będących pod kontrolą promotora p5 w wektorach AAV, odpowiedzialne są białka Rep78 i Rep68. W obecności, wspomnianego wcześniej, p5IEE w wektorze jedynie połowa z komórek, w których stwierdzono przeorganizowanie *AAVS1* posiadała inserty wirusowego DNA [35]. Dane te są spójne z badaniami dotyczącymi dzikich typów AAV, gdzie również integracja wirusowego DNA dotyczyła połowy komórek, w których zaobserwowano przeorganizowanie *AAVS1*. W dalszym ciągu nie wiadomo jakie są poszczególne etapy włączania wirusowego materiału genetycznego do specyficznego miejsca w DNA gospodarza, jednak autorzy przedstawiają hipotetyczną wersję poszczególnych kroków. Utrzymują oni, że czynnikiem potencjalnie ograniczającym skuteczność transportu wirusowego DNA do jądra i zrzucania kapsydu jest wirusowe MOI. Po wnikięciu do jądra, prawdopodobnie dzięki komórkowym mechanizmom replikacji i/lub naprawy DNA, syntetyzowana jest druga nić wirusowego DNA. Po uformowaniu dwuniciowej cząsteczki DNA, promotor p5

jest aktywowany do transkrypcji genu białka Rep. Transkrypcja z promotora p5 i translacja mRNA genu kodującego Rep prowadzi do powstania wielofunkcyjnych białek Rep. Utworzenie dwuniciowej cząsteczki wirusowego DNA jest wstępnym warunkiem niezbędnym do transkrypcji genu *rep* z promotora p5 i prawdopodobnie zwiększa wydajność integracji AAV z genomem gospodarza. Przypuszcza się, że są trzy miejsca, z którymi Rep mogą się wiązać w sposób istotny dla specyficznego integracji. Są to sekwencje DNA w obrębie *AAVS1* na chromosomie 19 gospodarza, RBS w obrębie p5 wirusa i RBS w obrębie ITR wirusa. Inna hipoteza zakłada, że włączenie genomu wirusa do DNA gospodarza jest związane z powstawaniem w DNA gospodarza pęknięć w dwuniciowej cząsteczce DNA (DSB, ang. *double-strand break*) i jest wynikiem działania mechanizmów naprawczych gospodarza na drodze rekombinacji homologicznej i niehomologicznej. Miller i wsp. [36] wskazują na korelację między ilością DSB w DNA a częstością integracji AAV do genomu gospodarza. Przypuszczalnie może to świadczyć o zaangażowaniu w mechanizm integracji wirusa czynników niezbędnych do naprawy DNA gospodarza. Możliwy jest tu udział takich czynników zaangażowanych w homologiczną rekombinację jak białka rodziny Rad52. Po powstaniu DSB endonukleaza degraduje jedną z nici na każdym końcu pęknięcia, generując jednoniciowe zakończenia DNA, które mogą ulegać parowaniu z homologicznymi odcinkami pojedynczej nici DNA wirusa AAV. Jeśli takie parowanie ma miejsce, naprawa pęknięcia chromosomowego DNA w nici komplementarnej do DNA wirusa może przebiegać poprzez syntezę, gdzie jako matryca zostanie wykorzystany właśnie fragment wirusowego genomu. Druga chromosomowa nić może zostać naprawiona poprzez syntezę DNA na matrycy świeżo naprawionej nici, bądź na zasadzie podwójnego *crossing-over* i wymiany homologicznego odcinka genomu wirusowego [36]. DSB mogą odgrywać tu rolę czynników umożliwiających powstawanie jednoniciowych fragmentów DNA gospodarza i/lub angażujących białka niezbędne do procesów naprawczej syntezy DNA [36]. Do podobnych wniosków doszli Vasileva i wsp. [37]. Jak już wspomniano, wiele białek z grupy RAD52 odgrywa istotną rolę w homologicznej naprawie DSB w DNA. Autorzy zaobserwowali zdecydowanie mniejszą (6-krotnie) zdolność wbudowania wektora AAV do DNA komórek linii komórkowych z wyciszonym genem białka RAD54B, jak również RAD52L. Zależność między poziomem białek RAD, a częstością integracji wirusa sugerować może istotny wpływ mechanizmu rekombinacji homologicznej komórki na skuteczne wbudowanie genomu AAV. Autorzy nie zaobserwowali natomiast podobnej zależności w przypadku DNA-PK (ang. *DNA-dependent protein kinase*), co mogłoby sugerować brak udziału drogi rekombinacji niehomologicznej w integracji AAV [36]. Według Dutheil i wsp. [38] miejsce integracji wirusów AAV jest ściśle związane z mięśniowo-specyficznym genem *TNNT1*. Troponina i tropomiozyna budują Ca²⁺-wrażliwy kompleks regulujący kurczenie mięśni. Badacze wskazują, iż wymiana DNA następuje w jednym miejscu pomiędzy AAV, a *AAVS1* (w pobliżu RBS) i w drugim – między AAV a, intronem 13 genu *TNNT1*. Autorzy opisują, iż w dwóch na cztery badane linie komórkowe, w których wystąpiła specyficzna integracja wirusowego DNA do *AAVS1* wystąpiło także przeorganizowanie DNA w obrębie *TNNT1*.

Ekspresja genów troponin jest ściśle regulowana w zależności od tkanki i etapu rozwoju organizmu. U osobników dorosłych *TNNT1* ulega ekspresji wyłącznie w mięśniach szkieletowych, podczas gdy *TNNI3* wyłącznie w mięśniu sercowym. Wykazano obecność DNA wirusów AAV w 17% preparatów biopsyjnych pobranych z prawidłowych tkanek mięśniowych. Badacze przypuszczają, że tkanka mięśniowa jest naturalną tkanką docelową wirusów AAV w cyklu lizogennym. Możliwym jest także, że integracja DNA wirusa w pobliżu lub w obrębie *TNNI1* może powodować zmianę poziomu ekspresji tego genu. Ponieważ jednak komórki mięśniowe są komórkami wielojądrowymi, przerwanie ciągłości jednego allelu *TNNT1* może nie powodować zmian fenotypowych w komórce. Schnepf i wsp. [39] natomiast uważają, że AAV do genomu gospodarza integruje rzadko, za to dużo częściej jest obecny w komórce gospodarza jako element pozachromosomowy, jako wolna forma kolistego DNA. Badacze nie wykluczają jednak, że postać ta może być formą pośrednią w procesie integracji. Według autorów pracy, kolista forma może być wynikiem oddziaływania między komórkowymi enzymami naprawiającymi pęknięcia dwuniciowej cząsteczki DNA, a genomem AAV [39].

PODSUMOWANIE

Rozwój terapii genowej, utożsamiany z wprowadzaniem preparatów genowych do kliniki, uzależniony jest bezpośrednio od badań podstawowych poświęconych poszukiwaniu nowych genów o znaczeniu terapeutycznym oraz wydajnych systemów ich transportu do komórek. Wektory konstruowane w oparciu o genom wirusów związanych z adenowirusami (rAAV) są wykorzystywane obecnie w próbach klinicznych terapii genowej. Badania są w toku, wstępne obserwacje wskazują, iż rAAV są bezpieczne dla pacjentów i efektywnie transdukuje głównie komórki mięśni szkieletowych, komórki nerwowe oraz nowotworowe, a ekspresja wprowadzanych przez AAV rekombinowanych genów jest najczęściej długotrwała [40,41]. Wykorzystanie rAAV w klinice wymaga znajomości molekularnych podstaw cyklu życiowego AAV, głównie mechanizmów odpowiedzialnych za wnikanie AAV do komórki, transport wewnątrzkomórkowy oraz integrację DNA wirusowego do genomu gospodarza. Badania podstawowe wnoszą wiele informacji dotyczących biologii AAV; niektóre z nich, np. dotyczące miejscowo-specyficznej integracji AAV, wydają się mieć szczególne znaczenie dla konstruowania rekombinowanych wektorów AAV dla terapii genowej, które miałyby właściwość wnoszenia transgenów w określone miejsca genomu człowieka.

PIŚMIENICTWO

- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Roesberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul J, Morgan RA, Anderson WF (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480
- Grieger JC, Samulski RJ (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 119-145.
- Lehrman S (1999) Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401: 517-8
- Marshall E (2003) Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 299: 320
- Le Bec C, Douar AM (2006) Gene therapy progress and prospects-vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther* 13: 805-813
- Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10: 3941-3950
- Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE (2002) Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* 21: 895-913
- Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149: 754-756
- Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 1467-1474
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14: 316-327
- Chiorini JA, Kim F (1999) Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol* 73: 1309-1319
- Arruda VR, Xiao W (2007) It's all about clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. *J Thromb Haemost* 5: 12-15
- Goncalves MA (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2: 43
- Ni TH, McDonald WF, Zolotukhin I, Melendy T, Waga S, Stillman B, Muzyczka N (1998) Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol* 72: 2777-2787
- Chiorini JA, Wiener SM, Yang L, Smith RH, Safer B, Kilcoin NP, Liu Y, Urceley E, Kotin RM (1996) The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Curr Top Microbiol Immunol* 218: 25-33
- Young SM, McCarty DM, Degtyareva N, Samulski RJ (2000) Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol* 74: 3953-3966
- Kyostio SR, Wonderling RS, Owens RA (1995) Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) P5 promoter involves both the P5 rep binding site and the consensus ATP-binding motif of the AAV Rep68 protein. *J Virol* 69: 6787-6796
- Philpott N, Gomos J, Berns KI, Falsk-Pedersen E (2002) A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12381-12385
- Philpott NJ, Giraud-Wali C, Dupois C, Gomos J, Hamilton H, Berns KI, Falck-Pedersen E (2002) Efficiency integration of recombinant AAV DNA vectors requires a p5-rep sequence in cis. *J Virol* 76: 5411-5421
- Needham PG, Casper JM, Kalman-Maltese V, Verrill K, Dignam JD, Trempe JP (2006) Adeno-associated virus rep protein-mediated inhibition of transcription of adenovirus major late promoter in vitro. *J Virol* 80: 6207-6217
- Huttner NA, Girod A, Schnitter S, Schoch C, Hallek M, Buning H (2003) Analysis of site-specific transgene integration following co-transduction with recombinant adeno-associated virus and Rep encoding plasmid. *J Gene Med* 5: 120-129
- Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75: 1824-1833
- Hansen J, Qing K, Srivastava A (2001) Infection of purified nuclei by adeno-associated virus type 2. *Mol Ther* 4: 289-296
- Ni TH, Zhou X, McCarty DM, Zolotukhin I, Muzyczka N (1994) In vitro replication of adeno-associated virus DNA. *J Virol* 68: 1128-1138
- Huser D, Weger S, Heilbronn R (2002) Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J Virol* 76: 7554-7559
- Huser D, Weger S, Heilbronn R (2003) Packaging of human chromosome 19-specific adeno-associated virus (AAV) integration sites in AAV virions during AAV wild-type and recombinant AAV vector production. *J Virol* 77: 4881-4887

27. Russell DW, Alexander IE, Miller AD (1995) DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5719-5723
28. Russell DW (2003) AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34: 241-242
29. Im DS., Muzyczka N (1992) Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* 66: 1119-1128
30. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA (1994) Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5808-5812
31. Yoon M, Smith DH, Ward P, Medrano FJ, Aggarwal AK, Linden RM (2001) Amino-terminal domain exchange redirects origin-specific integrations of adeno-associated virus rep78 in vitro. *J Virol* 75: 3230-3239
32. Wonderling RS, Owens RA (1997) Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J Virol* 71: 2528-2534
33. Young SM, McCarty DM, Degtyereva N, Samulski RJ (2000) Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol* 74: 3953-3966
34. Francois A, Guilbaud M, Awedikian R, Chadeuf G, Moullier P, Salvetti A (2005) The cellular TATA binding protein is required for Rep-dependent replication of minimal adeno-associated virus type2 p5 element. *J Virol* 79: 11082-11094
35. Hamilton H, Gomos J, Berns KI, Falck-Pedersen E (2004) Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J Virol* 78: 7874-7882
36. Miller DG, Petek LM, Russell DW (2003) Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 23: 3550-3557
37. Vasileva A, Linden RM, Jessberger R (2006) Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res* 34: 3345-3360
38. Dutheil N, Shi F, Dupressoir L, Linden RM (2000) Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4862-4866
39. Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 79: 14793-14803
40. Malecki M (2004) Wirusowe strategie w terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (AAV). *Post Biol Kom* 31: 47-57
41. Kamieniarz K, Gozdzicka-Jozefiak A (2005) Zastosowanie AAV jako wektorów w terapii genowej. *Biotechnologia* 68: 79-94

Adeno-associated viruses (AAV)

Maciej Malecki^{1,2,✉}, Agnieszka Wozniak², Przemyslaw Janik¹

¹Department of Cell Biology, Centre of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, 5 Roentgena St., 502-781 Warsaw, Poland

²Department of Biochemistry and Clinical Chemistry, Medical University, 1 Banacha St., 02-097 Warsaw, Poland

✉ e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Key words: adeno-associated virus vectors, DNA maintenance and integration, gene therapy

ABSTRACT

Recombinant adeno-associated virus derived vectors (rAAV) are thought to be the most promising candidates for gene therapy applications. Their nonpathogenic nature as well as the encouraging capability to infect both proliferating and non proliferating cells are advantages for gene therapy applications. Here, we summarize the potential mechanisms responsible for AAV maintenance and site-specific integration to the human genome. The role of Rep proteins, inverted terminal repeats and p5 promoter sequences for chromosomal incorporation of AAV are discussed. Making the site-specific integrative recombinant AAV vectors for gene therapy seems to be closely dependent on the development of viral vectorology.

Cezary Bregier

Barbara Kupikowska

Hanna Fabczak

Stanisław Fabczak

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

✉ Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 5892317, e-mail: h.fabczak@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 8 października 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 23 listopada 2007 r.

Wykaz skrótów: ARL2 – małe białko G; CCT – chaperoniny typu II; CK2 – kazeinowa kinaza białkowa 2; GimC – homolog prefoldyny u drożdży; GroEL – chaperoniny typu I; GroES – białko współdziałające z GroEL; HMM – ciężki łańcuch meromiozyny; Hsp – białka szoku cieplnego; MtGimC – homolog prefoldyny u Archea; PhLPs – białka podobne do fosducyny; PFD – prefoldyna; RNAi – interferencja RNA; Ssb1/2 – system białek opiekuńczych Hsp70/Hsp40; WD-40 – 7-krotnie powtórzony motyw sekwencyjny, bogaty w β -pasma; VHL (ang. *von Hippel-Lindau disease*) – białko supresorowe, którego mutacja jest przyczyną choroby von Hippela i Lindaua

Słowa kluczowe: aktywa, białka podobne do fosducyny (PhLPs), chaperoniny CCT, fałdowanie białek, G β , prefoldyna, tubulina

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego na finansowanie badań wspólnych sieci naukowej „Mechanizmy Ruchów Komórkowych (Mobilitas.pl)” uzyskanych z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Chaperoniny są dużymi oligomerami utworzonymi z dwóch przeciwstawnie ułożonych pierścieni, w których zachodzi fałdowanie białek. Podzielono je na 2 grupy: chaperoniny typu I oraz typu II. Chaperoniny typu I występują w mitochondriach i chloroplastach (Hsp60), a także w cytoplazmie komórek bakteryjnych (GroEL). Typ II chaperonin (CCT) zlokalizowano natomiast w cytoplazmie Archea i w komórkach eukariotycznych. Fałdowanie białek katalizowane przez chaperoniny odbywa się w skutek zmian konformacyjnych zachodzących w nich po związaniu i hydrolizie ATP. Mechanizm zwijania polipeptydów jest odmienny w obu typach chaperonin. Chociaż CCT razem z prefoldyną bierze udział głównie w fałdowaniu aktyny i tubuliny, badania ostatnich lat wykazały, że wiele białek posiadających w swojej strukturze motyw WD-40 jest również substratami CCT. Ponadto, oprócz prefoldyny, również białka podobne do fosducyny współdziałają z CCT, regulując ich aktywność.

WPROWADZENIE

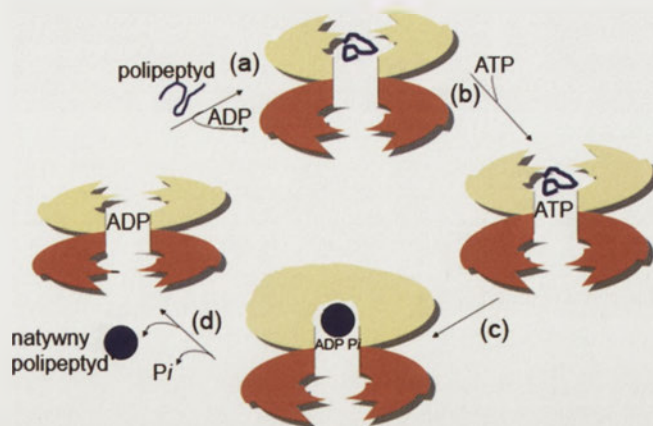
Chaperoniny typu II, opisane jako CCT (ang. *Chaperonin-Containing TCP-1*), znane również pod nazwami TriC lub c-cpn, to duże kompleksy białkowe występujące w cytoplazmie komórek eukariotycznych, których masa cząsteczkowa osiąga około 900 kDa. Białka z tej rodziny należą do grupy chaperonów molekularnych i wykazują niewielką zmienność ewolucyjną. Ułatwiają one zwijanie białek *in vivo*, jak również zapobiegają tworzeniu agregatów nieprawidłowo sfalutowanych polipeptydów, czyli formowaniu amyloidów, będących podłożem wielu chorób „konformacyjnych” (choroba prionowa, Alzheimer, Parkinsona, cukrzyca typu II). Homologami chaperonin typu II w komórkach prokariotycznych są chaperoniny typu I z najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem tej grupy – GroEL, znanym również jako Hsp60, występującym u *Escherichia coli*. Chaperoniny typu I występują także w chloroplastach i mitochondriach [1,2]. Chaperoniny I i II są identyczne zaledwie w 15-20%, co sugeruje ich bardzo wczesne oddzielenie od wspólnego przodka w procesie ewolucji, które mogło nastąpić około dwóch miliardów lat temu [3,4]. Wspólną cechą chaperonin obu typów jest ich budowa. Składają się one z dwóch pierścieni ustawionych przeciwległe względem siebie. Parę zasadniczych cech różni je jednak od siebie. Po pierwsze, chaperoniny I posiadają 7-krotną oś symetrii, podczas gdy pierścień chaperoniny II składa się najczęściej z 8 podjednostek. Po drugie, do niedawna sądzono, że typ II chaperonin nie jest wspomagany przez białka współdziałające (ang. *cochaperons*), z wyjątkiem prefoldyny, która towarzyszy fałdowaniu jedynie białek cytoszkieletalnych, aktyny i tubuliny. Ponadto, typ I chaperonin wymaga zawsze do swojej aktywności udziału dodatkowego białka, którym w przypadku GroEL jest białko GroES [2-10], podczas gdy w CCT funkcję „pokrywy” zamykającej kanał chaperoniny pełni jej apikalna domena. Obecnie przypuszcza się, że chaperoniny II mogą współpracować także z innymi białkami, których przykładem mogą być białka podobne do fosducyny (PhLPs) (ang. *Phosducin-Like Proteins*), z rodziny fosducyn. Poziom CCT w komórce eukariotycznej jest w porównaniu z prokariotycznym GroEL 10 razy niższy i wynosi około 0.1% wszystkich białek rozpuszczalnych. Ponadto synteza chaperonin CCT w komórkach nie zmienia się pod wpływem stresu [1].

CCT - STRUKTURA I FUNKCJA

Struktura przestrzenna CCT przypomina cylinder o kształcie baryłkowatym, którego średnica wynosi około 150 Å, a wysokość 160 Å. Każdy z dwóch pierścieni cylindra składa się z ośmiu różnych, homologicznych, kodowanych przez odrębne geny podjednostek: CCT α , CCT β , CCT δ , CCT ϵ , CCT γ , CCT η , CCT θ oraz CCT ζ [4]. Każdy monomer pojedynczego pierścienia oddziałuje tylko z jedną podjednostką drugiego, a jego położenie w pierścieniu jest ściśle określone. W obrębie podjednostki wyróżnić można trzy domeny: bazalną, apikalną oraz łączącą je domenę środkową. Część bazalna posiada miejsce wiązania ATP i jest odpowiedzialna za oddziaływanie pomiędzy podjednostkami, zarówno w obrę-

bie jednego pierścienia, jak również pomiędzy nimi. Domena apikalna stanowi zaś miejsce wiązania niesfałdowanego polipeptydu [2,4]. Szacuje się, że około 10% nowo syntetyzowanych białek może być fałdowane przez CCT. Ponieważ brak jest wspólnej cechy łączącej substraty fałdowane przez CCT, zarówno na poziomie struktury, jak i ich sekwencji, nieznan jest sposób, w jaki chaperoniny rozpoznają wśród wielu nowo syntetyzowanych polipeptydów swoje substraty. Wykazano, że CCT zdolne jest przejąć odłączający się od rybosomu łańcuch polipeptydowy bezpośrednio lub też za pośrednictwem systemu białek Hsp70, czy prefoldyny (GimC u drożdży), jak ma to miejsce w przypadku fałdowania aktyny i tubuliny [11,12]. Analogicznie do chaperonin typu I, miejscem rozpoznawania i wiązania substratu jest część apikalna CCT. Proponowane są 3 hipotezy dotyczące sposobu wiązania polipeptydu. Według pierwszej propozycji, może się to odbywać przy udziale dwóch helis zlokalizowanych na obwodzie domeny apikalnej chaperoniny. Alternatywnie, w oparciu o elastyczny i hydrofobowy charakter helisy zlokalizowanej na obwodzie uważa się, że to ona może być miejscem wiązania substratu. Jednak z drugiej strony nie stwierdzono ograniczenia zdolności wiązania polipeptydów w chaperoninach pozbawionych tej helikalnej wypustki. Trzecia propozycja zakłada, że miejsce wiązania substratu zlokalizowane jest po wewnętrznej stronie kanału i budują je polarne, posiadające ładunek reszty aminokwasowe. Struktura taka może ułatwiać rozpoznanie tych samych obszarów eksponowanych na powierzchni substratu będącego w konformacji quasi natywnej [13]. Na podstawie wyników ostatnich badań, przeprowadzonych na dwóch różnych białkach będących substratami CCT (β -podjednostki białka G ($G\beta$) oraz białka VHL) wykazano, że chaperonina rozpoznaje hydrofobowe fragmenty swoich substratów [1].

Wiązanie polipeptydu do CCT może nastąpić pod warunkiem, że apikalna część chaperoniny występuje w konformacji „otwartej”, tzn. wówczas, gdy do domeny bazalnej nie jest przyłączony nukleotyd, a domeny apikalne znajdują się w takim położeniu, że wnętrze kanału CCT jest dostępne dla substratu [13]. Następnym etapem jest związanie i hydroliza ATP, powodująca rozległe zmiany konformacyjne domeny apikalnej, które prowadzą do zamknięcia wnętrza kanału chaperoniny i uwięzienia w nim polipeptydu. Minimalizuje to entropię i stwarza optymalne warunki do jego fałdowania. Proces ten ma miejsce dzięki występowaniu na szczycie domeny apikalnej CCT dodatkowego regionu, który pełni funkcję swoistej pokrywy [5,14]. Po uwolnieniu Pi -fosforanu, chaperonina ponownie przybiera konformację otwartą (Ryc. 1). Cykl hydrolizy ATP w CCT trwa około 4 min. i jest znacznie wolniejszy niż ma to miejsce w GroEL lub innych białkach opiekuńczych. Badania biofizyczne wykazały, że CCT najdłużej przebywa w stanie zamkniętym, co sugeruje, że czynnikiem ograniczającym cykl jest proces otwierania chaperoniny. Prawdopodobnie związane jest to z rozerwaniem wysoko uporządkowanej struktury pierścienia o konformacji β -kartki. Zjawiska, które inicjują otwarcie „pokrywy” nie są szczegółowo poznane. CCT może przyjmować otwartą konformację w obecności Mg^{2+} -ADP, co wskazuje na istotną w tym procesie rolę zerwania wiązania oraz dysocjacji Pi podczas otwarcia pokrywy. Z drugiej strony, zmiana konformacji indukowana przejściowym stanem



Rycina 1. Model przedstawiający cykl zmian konformacyjnych zachodzących w CCT w wyniku wiązania i hydrolizy ATP. (a) CCT w konformacji otwartej, niesfałdowany substrat może przylgnąć się do właściwych miejsc wiązania w CCT; (b) związanie ATP nie jest czynnikiem wystarczającym do wywołania zmian konformacyjnych w CCT; (c) hydroliza związanego ATP wywołuje zmianę konformacji przestrzennej CCT, co prowadzi do zamknięcia polipeptydu wewnątrz tunelu; (d) odłączenie nieorganicznego fosforanu Pi umożliwia powrót pierścienia CCT do konformacji otwartej, a tym samym uwolnienie polipeptydu do cytoplazmy. Powyżej przedstawiony cykl zmian konformacyjnych zachodzi w sposób asymetryczny, jednak mechanizm utrzymujący oba pierścienie w różnym stanie aktywności nie został w pełni wyjaśniony. Na modelu przedstawiono zmiany zachodzące tylko w jednym z pierścieni CCT (wg [14], zmodyfikowane).

hydrolizy ATP może być utrzymana po zerwaniu wiązania, pod warunkiem, że Pi pozostaje nadal w kieszeni wiązania nukleotydu, tak jak w przypadku termosomów [3].

Zastanawiające jest, w jaki sposób zmiany konformacyjne indukowane hydrolizą ATP są skoordynowane pomiędzy podjednostkami tworzącymi CCT. Wiadomo, że każdy monomer, wchodzący w skład jednego pierścienia, może podczas cyklu konformacyjnego wiązać i hydrolizować jedną cząsteczkę ATP. Dlatego do zorganizowanego działania podjednostek, zarówno w obrębie pierścienia, jak i pomiędzy nimi, wymagane są prawdopodobnie połączenia allosteryczne. Badania kinetyczne i genetyczne wykazały, że podjednostki jednego pierścienia wiążą i hydrolizują ATP, a zmiany konformacyjne w poszczególnych monomerach przebiegają w sposób sekwencyjny, a nie jednocześnie, jak w przypadku GroEL [1,14]. Ponadto stwierdzono, że pierścienie w obrębie CCT aktywowane są w sposób naprzemienny i tylko jeden z nich w danym momencie może być zaangażowany w fałdowanie polipeptydu. Doświadczalnie wykazano występowanie asymetrycznej konformacji CCT, w której pokrywa jest zamykana tylko w jednym pierścieniu. Wynika to z faktu, że po związaniu ATP do jednego pierścienia siła wiązania nukleotydu w pierścieniu przeciwnym ulega obniżeniu. Wydaje się zatem wielce prawdopodobne, że CCT posiada wewnętrzny mechanizm odpowiedzialny za generowanie asymetrycznych zmian konformacyjnych, które utrzymują oba pierścienie w różnych stanach podczas cyklu fałdowania [14].

SUBSTRATY I BIAŁKA REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ CHAPERONIN CCT

Wiele białek, zaangażowanych w różne procesy komórkowe, fałdowanych jest przy udziale CCT. Substratami chaperonin są białka biorące udział w sygnalizacji komórkowej

Tabela 1. Substraty CCT.

Białko	Masa cząsteczkowa (kDa)*	Powtórzenia WD
α aktyna, β aktyna	42.1, 41.7	Nie
α tubulina, β tubulina, γ tubulina	50.2, 49.8, 51.2	Nie
Ciężki łańcuch miozyny	223.0	Nie
4-monooksygenaza lucyferyny	60.1	Nie
G α -transducyna	40.0	Nie
VHL (ang. von Hippel-Lindau disease tumor suppressor)	24.2	Nie
G1-S-specyficzna cyklina E1	47.1	Nie
Kofilina	18.5	Nie
Czynnik 1 depolimeryzujący aktynę	16.1	Nie
Centraktyna (ang. actin-related protein V)	42.6	Nie
Białko kapsydu wirusa Hepatitis B	20.9	Nie
Białko jądrowe EBNA-3	89.1	Nie
Poliproteina Gag M-PMV	73.1	Nie
Deacetylaza histonu 3	48.8	Nie
Białko 3 domeny SET	85.5	Nie
Deacetylaza histonu HOS2	51.5	Nie
Cdc20p (ang. cell division control protein 20)	67.4	Tak
Cdh1p (ang. cell division control protein 15)	110.4	Tak
Cdc55 (podjednostka regulatorowa B fosfatazy białkowej PP2A)	59.6	Tak
Pex7p (ang. Peroxisomal targeting signal 2 receptor)	42.3	Tak
PRP46 (ang. Pre-mRNA splicing factor)	50.7	Tak
Sec27p (coatomer β' subunit)	99.4	Tak

* Na podstawie sekwencji aminokwasowej (wg [13], zmodyfikowano)

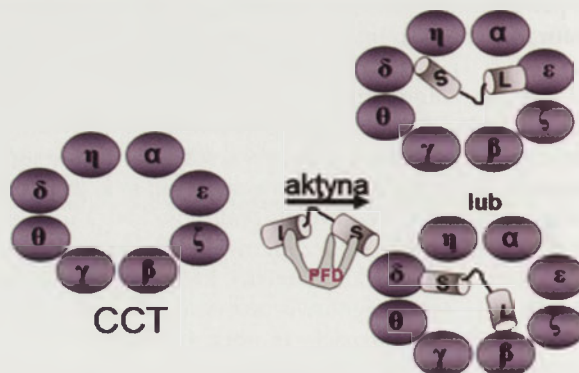
(α - i β -podjednostki białek G, G α i G β), regulacji cyklu komórkowego (cyklina E), jak również białka cytoszkieletalne, takie jak ciężki łańcuch meromiozyny (HMM), czynnik 1, depolimeryzujący aktynę, kofilina oraz najważniejsze z nich aktyna i α -, β - i γ - tubulina. Lista potencjalnych substratów chaperonin stale się wydłuża (Tab. 1) [14]. Weryfikacji ulega również opinia, że jedynym białkiem współdziałającym z CCT jest prefoldyna/GimC, która towarzyszy CCT przy zwijaniu białek cytoszkieletalnych [4]. Kolejnymi białkami pełniącymi funkcję regulatora aktywności CCT są białka podobne do fosducyny [7-10].

FAŁDOWANIE BIAŁEK CYTOSZKIELETU

Prefoldyna (PFD) to białko, które stabilizuje i transportuje aktynę i tubulinę do chaperonin, pełniąc funkcję białka opiekuńczego. Nie zidentyfikowano jej u Prokaryota, a forma PFD występująca u Archea nie jest taka sama jak ta, którą znaleziono w komórkach eukariotycznych. U Archea, homolog PFD – MtGimC ma masę cząsteczkową 87 kDa i tworzą go 2 podjednostki α i 4 podjednostki β . W skład PFD, mającej u Eukariota masę około 200 kDa, wchodzi 6 różnych podjednostek (2 podobne do α -podjednostki i 4 podobne do β -podjednostki), nazwane PFD 1- 6. Masa cząsteczkowa pojedynczej podjednostki waha się od 14 do 25 kDa i każdy polipeptyd występuje w kompleksie w równym stosunku. PFD u Archea może służyć jako białko opiekuńcze współpracujące z CCT w czasie fałdowania bardzo wielu substratów. W komórkach eukariotycznych zaś, PFD towarzyszy tylko fałdowaniu tubuliny i aktyny [15].

Analiza sekwencji aminokwasowych podjednostek prefoldyny wykazała, że jest to białko zachowane w ewolucji, podobnie jak CCT i inne białka opiekuńcze. Porównanie trójwymiarowej struktury cząsteczki PFD Eukariota i MtGimC wykazało brak zasadniczych różnic w budowie obu tych cząsteczek [17]. O podobieństwie PFD pomiędzy gatunkami, może świadczyć możliwość częściowego zastąpienia podjednostek Gim z drożdży przez podjednostki MtGimC z Archea [4,18]. Badania krystalograficzne PFD z Archea pokazały, że kompleks ten przypomina kształtem meduzę, której podstawę formuje struktura podwójnej β -baryłki. Wyrasta z niej 6 wypustek o strukturze „coiled-coil”, przypominających macki. Każda z nich odpowiada jednej podjednostce. Dwie podjednostki α umieszczone są w centrum i otaczają je cztery peryferycznie zlokalizowane podjednostki β [16].

PFD spełnia swoją funkcję w komórce wspomagając fałdowanie białek cytoszkieletalnych. Wiąże się ona stabilnie do krótkiego niesfałdowanego łańcucha aktyny (145 reszt aminokwasowych) w momencie, gdy polipeptyd związany jest z polirybosomem i pozostaje z nim połączona, aż do momentu dostarczenia do chaperoniny. Badania *in vitro* sugerują, że rola PFD nie ogranicza się tylko do transportu substratu z rybosomu do CCT, ale efektywnie uczestniczy ona także w kolejnych cyklach fałdowania i skierowuje białka do ewentualnego ponownego fałdowania [4]. W aktynie

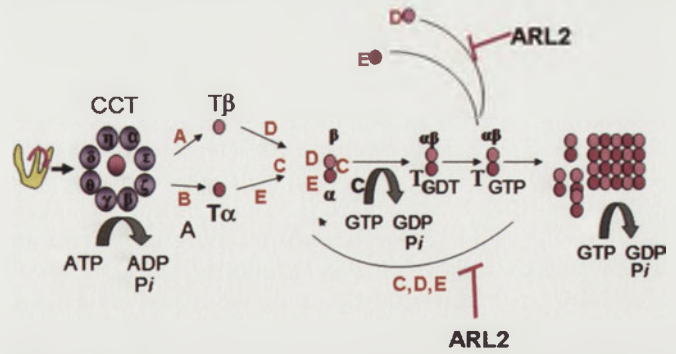


Rycina 2. Dwa możliwe sposoby oddziaływania aktyny z CCT (wg [19], zmodyfikowane).

wyodrębniono trzy hydrofobowe domeny zlokalizowane pomiędzy 125-179, 244-285 oraz 340 -375 resztami aminokwasowymi, które są odpowiedzialne za wiązanie się do CCT δ i CCT β lub CCT ϵ (Ryc. 2). Oddziaływanie CCT z tubuliną jest bardziej skomplikowane, gdyż dwie domeny tubuliny oddziałują z pięcioma podjednostkami CCT: CCT α , CCT η , CCT β , CCT ζ oraz CCT γ lub też CCT δ , CCT θ , CCT β , CCT ζ oraz CCT ϵ [19].

Kontrowersyjnym problemem pozostaje kwestia, w jakiej postaci aktywna i tubulina wiążą się do CCT, to znaczy czy posiadają one strukturę quasi natywną, czy też występują w formie zupełnie niesfałdowanej. Z jednej strony, aktywna wiązana do CCT jest bardzo wrażliwa na działanie proteaz [14], można więc wysunąć wniosek, że występuje ona w formie niesfałdowanej. W przeciwieństwie do tego spostrzeżenia pozostają badania przy użyciu mikroskopu krio-elektronowego, które pokazują, że zarówno aktywna, jak i tubulina wiążąc się do CCT posiadają prawie natywną formę [19]. Wydaje się zatem, że tylko kolejne dowody doświadczalne pomogą rozwiązać tę zagadkę.

Fałdowanie tubuliny i formowanie dimeru z α i β podjednostek jest procesem złożonym. Obie podjednostki tubuliny są białkami wiążącymi GTP, z tą różnicą, że związana do α -tubuliny cząsteczka nukleotydu nie ulega, ani wymianie, ani hydrolizie, podczas gdy przyłączona do β -tubuliny cząsteczka GTP podlega wymianie, a jej hydroliza jest związana z polimeryzacją heterodimeru $\alpha\beta$ -tubuliny i tworzeniem mikrotubul. Zanim jednak w wyniku polimeryzacji powstanie mikrotubula, oba jej komponenty (α - i β -tubulina) zostają poddane przebiegającemu w kilku cyklach procesowi fałdowania przy udziale CCT, a następnie odłączają się od chaperoniny w stanie quasi natywnym, który umożliwia utworzenie heterodimeru. W kolejnym etapie wymagany jest udział specyficznych dla tubuliny białek opiekuńczych, znanych jako kofaktory A, B, C, D, E. Na Ryc. 3 schematycznie przedstawiono proces formowania dimeru i polimeryzacji mikrotubul. Tubulina β w quasi natywnej formie opuszczając CCT jest przechwytywana i stabilizowana przez kofaktor A lub D, natomiast jej izoforma α – przez B lub E. $E\alpha$ - i $D\beta$ - podjednostki tubuliny tworzą multikompleks, zdolny przyłączyć kofaktor C. W ten sposób powstaje superkompleks, od którego w wyniku hydrolizy GTP następuje odłączenie natywnego heterodimeru α - i β -tubuliny. Ponieważ żaden z kofaktorów nie posiada miejsc wiązania GTP, a α -tubulina wiąże GTP, które nie podlega ani wymianie, ani hydrolizie, to jedynym ulegającym hydrolizie źródłem GTP jest nukleotyd związany z β -tubuliną. Superkompleks pełni funkcję białka aktywującego hydrolizę GTP, GAP (ang. *GTP-ase Activating Protein*). Wydaje się, że proces ten jest kluczowym etapem prowadzącym do dysocjacji heterodimeru od superkompleksu. Jest to spowodowane niższym powinowactwem kofaktorów, wchodzących w skład superkompleksu, do tubuliny związanej z GDP niż z GTP [4]. Ponadto konieczność hydrolizy GTP w celu uwolnienia się heterodimeru od superkompleksu może pełnić rolę punktu kontroli „jakości”. Brak zdolności hydrolizy GTP i tym samym niemożność włączenia dimeru w formującą się mikrotubulę zabezpiecza komórkę przed konsekwencjami polimeryzacji mikrotubul z tubuliny o nieprawidłowej konformacji. Te przypuszczenia popierają wyniki doświadczeń przeprowadzonych



Rycina 3. Schemat fałdowania tubuliny i tworzenia $\alpha\beta$ -dimeru. Opis w tekście. Kolorem żółtym zaznaczono prefoldynę, CCT i kofaktory A-E oznaczono właściwymi literami, T $\alpha\beta$ oznacza tubulinę. Po prawej stronie ryciny przedstawiono polimeryzację heterodimeru GTP-tubuliny prowadzącą do powstania mikrotubul (wg [4], zmodyfikowane).

na mutantach charakteryzujących się brakiem aktywności GTP-azy. W tak zmienionych komórkach tubulina nie była wbudowywana do mikrotubul, co pokazały badania *in vivo*, a w badaniach *in vitro* dowiedziono, że heterodimer α - β -tubuliny nie był również uwalniany z superkompleksu [20].

Wydaje się, że kofaktory A-E nie tylko pełnią funkcję białek opiekuńczych podczas powstawania heterodimeru, ale mogą również kontrolować proces depolimeryzacji mikrotubul. Bezpośrednie związanie kofaktorów D i E z natywnym heterodimerem α - i β -podjednostki tubuliny ($D\beta$ tubulina, $E\alpha$ tubulina) prowadzi do destabilizacji natywnej formy białka. W konsekwencji α - i β -podjednostki tubuliny nie są w stanie tworzyć dłużej dimeru, następuje jego rozzerwanie i ponowne wejście tych podjednostek w cykl fałdowania przez CCT. W ten sposób można wytłumaczyć fakt, że monomery α - i β -tubuliny w stabilnej, natywnej formie nie występują oddzielnie i nigdy nie udało się ich wyizolować niezależnie. Udział kofaktorów D i E w dezintegracji heterodimeru wykazały doświadczenia, w których doprowadzono do nadekspresji genów tych białek opiekuńczych. Tak zmienione komórki charakteryzowały się znacznie mniejszą ilością mikrotubul lub ich całkowitym brakiem. Musi istnieć zatem w komórce jakiś dodatkowy mechanizm nadzorujący prawidłową polimeryzację mikrotubul. Wydaje się, że tym zabezpieczeniem w oddziaływaniu kofaktorów z natywnymi mikrotubulami mogą być małe białka G, ARL2 (ang. *ADP-ribosylation factor like 2*) [4,21]. Wiążąc się do kofaktora D hamują one aktywność superkompleksu GAP, uniemożliwiając odłączenie od niego heterodimeru $\alpha\beta$ -tubuliny. W przypadku nadekspresji kofaktora D, ARL2 wiążąc się do niego, uniemożliwia jego destrukcyjne działanie na mikrotubule [22].

FAŁDOWANIE BIAŁEK Z POWTÓRZENIAMI WD40

Podjednostka β białka G ($G\beta$) należy do nadrodziny białek posiadających na C-końcu, przypominający turbinę, sekwencyjny motyw, powtórzony 7-krotnie. Fragment ten jest bardzo bogaty w β -pasma. Te wielokrotne powtórzenia sekwencji, nazwane powtórzeniami typu WD40, są charakterystyczne dla wielu innych białek, znanych pod wspólną nazwą białek z powtórzeniami WD40 [23]. W badaniach *in vitro*, z wykorzystaniem systemu translacyjnego wolnego

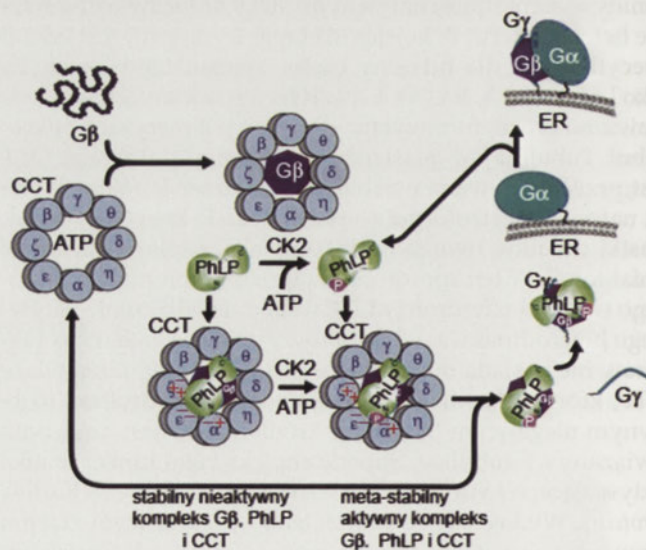
od innych białek opiekuńczych, analizowano niezależnie mechanizm fałdowania oraz możliwość rozpoznawania substratu przez CCT. Wykazano, że chaperonina preferencyjnie wiąże się do nowo syntetyzowanych substratów, posiadających w swojej strukturze β -pasma, zapobiegając ich agregacji, jak i do częściowo zwiniętego łańcucha polipeptydowego $G\beta$, który eksponuje hydrofobowe fragmenty na zewnątrz [24]. W badaniach *in vivo*, przeprowadzonych na komórkach HEK-293 potwierdzono obserwacje na modelach pozakomórkowych i wykazano, że CCT jest odpowiedzialne za fałdowanie $G\beta$, a ponadto pośredniczy w tworzeniu dimeru $G\beta\gamma$ [25]. Zastosowanie techniki RNAi i wyciszenie ekspresji genu kodującego CCTa w komórkach HEK293, skutkowało zmniejszeniem poziomu $G\beta$ i w konsekwencji zaburzeniem szlaków sygnalizacyjnych z udziałem dimeru $G\beta\gamma$ [26]. Wiele, ale nie wszystkie białka WD40 są substratami CCT (Tab. 1) [12]. Dwa białka należące do rodziny WD40: Cdc4 i Bub3 nie oddziałują z CCT. Wydaje się, że chaperoniny rozpoznają białka posiadające określony rodzaj β -pasm. W przypadku $G\beta$, WD2 jest szczególnie ważnym rejonem w oddziaływaniu chaperonina - polipeptyd, a punktowa mutacja 118 reszty aminokwasowej (D118A) drastycznie obniża zdolność wiązania $G\beta$ do CCT [24]. Wykazano także, że w warunkach fizjologicznych chaperonina może zarówno ko-translacyjnie wiązać się do nowo syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego, jak również oddziaływać z polipeptydem uwolnionym z rybosomu [12]. W tym drugim przypadku CCT nie działa samotnie podczas fałdowania białek z rodziny WD40, ale towarzyszy mu system białek opiekuńczych Hsp70/Hsp40 (Ssb1/2), związanych z rybosomami [2]. Białka te wiążą się do syntetyzowanego substratu na całej długości i stabilizują powstający łańcuch polipeptydowy na rybosomie. Prawdopodobnie ich funkcja nie ogranicza się tylko do zabezpieczenia polipeptydu przed agregacją, lecz mogą one również brać udział w potranslacyjnym fałdowaniu białek i organizacji kompleksów polipeptydów.

BIAŁKA PODOBNE DO FOSDUCYNY (PhLPs) JAKO NOWY REGULATOR CCT

Badania ostatnich dwóch lat wykazały, że CCT jest regulowane nie tylko przez PFD oraz Ssb1/2. Ważnym czynnikiem kontrolującym funkcję chaperoniny okazały się również być białka podobne do fosducyny (PhLPs), z rodziny fosducyn. Do tej pory stwierdzono, że obecność tych regulatorów jest wymagana podczas fałdowania $G\beta$, aktywny i tubuliny. PhLPs, podobnie jak pozostałe białka biorące udział w fałdowaniu polipeptydów, są zachowane w ewolucji i zidentyfikowano je zarówno u pierwotniaków, jak i u człowieka [27-30]. PhLPs przypisywano wielorakie funkcje w komórkach [29,30], jednak ostatnie doniesienia wskazują, że mogą one brać udział w regulacji aktywności CCT. Wykazano, że chaperonina oddziałuje z PhLPs [7,8], które wiążą się do jej apikalnej części. Przyłączenie PhLP powoduje zamknięcie kanału, w którym zachodzi fałdowanie polipeptydów [8]. U *Dictyostelium* wykazano, że mutanty pozbawione tego białka mają zaburzone szlaki sygnalizacyjne z udziałem $G\beta$. Przyczyną tego zjawiska było nieprawidłowe rozmieszczenie $G\beta$ w komórce oraz niezdolność tworzenia kompleksu z γ podjednostką białka G ($G\gamma$) [31]. Przepuszczalna rola PhLPs, jako regulatora aktywności CCT podczas fałdowa-

nia $G\beta$, została potwierdzona w badaniach na modelowych komórkach CHO i HEK-293. Stosując technikę RNAi, wykazano że obniżenie ekspresji genu kodującego PhLP powoduje zmniejszenie ilości kompleksu $G\beta\gamma$ w komórce i w efekcie zahamowanie aktywności szlaków biochemicznych z nim związanych [10]. Przyczyną tego zjawiska była niezdolność tworzenia dimeru $G\beta\gamma$. Kluczowym punktem w tym procesie wydaje się być fosforylacja trzech reszt seryny w białku PhLP (Ser18-20) przez kinazę kazeinową 2 (CK2). Kontynuacja tych badań pozwoliła autorom skonstruować model współdziałania PhLP i CCT podczas fałdowania $G\beta$ i tworzenia dimeru $G\beta$ z $G\gamma$ (Ryc. 4) [9].

PhLP może występować w komórce w dwóch formach: nieufosforylowanej oraz ufosforylowanej na resztach serynowych N-końca (Ser 18-20). PhLP ma zdolność wiązania się do chaperoniny niezależnie od stopnia fosforylacji, jednak w formie ufosforylowanej i pod nieobecność $G\beta$, takie wiązanie jest znacznie efektywniejsze. Ta niekonsekwencja w funkcjonowaniu PhLP może być wyjaśniona przez analizę obrazu w mikroskopie krio-elektronowym [8]. Wiązanie ufosforylowanego PhLP z CCT może następować w dwóch konformacjach. PhLP przyłącza się w pobliżu apikalnych domen podjednostek CCTa i CCTe lub CCT ζ i CCT β . Wszystkie powierzchnie wiążące podjednostek chaperoniny charakteryzują się wysoką polarnością. CCTa i CCTe posiadają ładunek ujemny, podczas gdy CCT ζ wykazuje wysoki ładunek dodatni. Konsekwencją fosforylacji reszt serynowych na N-końcu PhLP (¹⁸SSSDEDESD²⁶) jest nagromadzenie ujemnego ładunku w tym rejonie, co z pewnością ułatwia silne oddziaływanie między dodatnio naładowanym fragmentem podjednostki CCT ζ i PhLP. Przy braku $G\beta$ w kanale



Rycina 4. Model formowania dimeru $G\beta\gamma$. Nowo powstała podjednostka β białka G tworzy potrójny kompleks z CCT i PhLP. Gdy PhLP nie jest w stanie ufosforylowanym, kompleks jest stabilny i PhLP- $G\beta$ nie odłącza się od CCT. Fosforylacja PhLP destabilizuje kompleks i umożliwia dysocjację PhLP- $G\beta$ od CCT. PhLP- $G\beta$ po połączeniu z $G\gamma$ przemieszcza się w pobliże błony plazmatycznej, gdzie dimer $G\beta\gamma$ tworzy kompleks z $G\alpha$. PhLP zostaje odłączone i może wejść w kolejny cykl formowania dimeru $G\beta\gamma$. Przybliżona lokalizacja miejsca fosforylacji reszt serynowych 18-20 jest zaznaczona pomarańczowym owalem i literą P. Proporcje między dodatnimi i ujemnymi ładunkami na domenach apikalnych CCT, które kontaktują się z domeną N-końcową PhLP zostały również zaznaczone na rycinie (wg [10], zmodyfikowane).

CCT preferowana jest konformacja, w której PhLP wiąże się do CCT ζ . Jednak w przypadku, kiedy G β jest związane z chaperoniną, możliwość rotacji PhLP na szczycie CCT jest ograniczona. PhLP wiąże się wówczas w pobliżu apikalnych domen podjednostki CCT α i CCT ϵ , co powoduje odpychanie elektrostatyczne pomiędzy ujemnie naładowanym, ufosforylowanym regionem PhLP a obdarzonymi takim samym ładunkiem podjednostkami chaperoniny. W efekcie następuje uwolnienie kompleksu sfałdowanej podjednostki G β i PhLP. Nie jest do końca wyjaśnione, czy fosforylacja PhLP następuje przed związaniem, czy po utworzeniu kompleksu z CCT. Sfałdowana podjednostka G β będąc w kompleksie z PhLP łączy się poza CCT z podjednostką G γ , tworząc tym samym dimer G $\beta\gamma$ gotowy do asocjacji z podjednostką G α w funkcjonalny heterotrimer białka G [10].

Funkcja PhLP jako regulatora chaperonin nie ogranicza się tylko do towarzyszenia im podczas fałdowania G β . Kolejnymi substratami CCT, których fałdowanie jest regulowane przez PhLP są aktyna i tubulina. Wykazano, że w komórkach CHO nadekspresja PhLP powodowała obniżenie zdolności do fałdowania nowo syntetyzowanej aktyny o 80% [7]. W celu wyjaśnienia roli PhLP podczas fałdowania białek cytoszkieletalnych użyto komórek drożdży, w których syntetyzowane są dwie jego izoformy, PhLP3 oraz PhLP2, kodowane odpowiednio przez geny *plp1* i *plp2* [32]. Mutacja prowadząca do wyłączenia ekspresji *plp2* okazała się dla komórek letalna, a nadekspresja genu *plp1*, kodującego drugą izoformę nie zastępowała braku PhLP2 [32]. Po wprowadzeniu mutacji, polegającej na usunięciu jednej podjednostki PFD, w komórkach drożdży *PAC10* stwierdzono obniżony poziom sfałdowanej α -tubuliny, lecz nie jej izoformy β . Nadmiar β -tubuliny nie jest tolerowany przez drożdże, co fenotypowo objawiało się nadwrażliwością na benomyl, substancję depolimeryzującą mikrotubule. Okazało się, że komórki z podwójną mutacją (*PAC10 Δ* i *PLP1 Δ*), wykazywały większą odporność na benomyl niż *PAC10 Δ* , a przyczyną tego zjawiska była zmniejszona ekspresja sfałdowanej β -tubuliny. Wbrew temu, co wykazały badania *in vitro*, PhLP3 w komórkach drożdży raczej wspomaga fałdowanie β -tubuliny [33] podobnie jak PhLP2 [34]. Ponadto, w badaniach *in vitro* wykazano, że izoformy PhLP wiążą się do CCT, ale nie do białkowych substratów chaperonin (aktyny, α - i β -tubuliny). Nie dowiedziono również oddziaływań między PhLP i heterodimerem tubuliny. Stwierdzono też, że PhLP3 wiąże się do kompleksu CCT- substrat i hamuje aktywność ATP-azową chaperoniny, a tym samym proces fałdowania aktyny i tubuliny [33,34]. Wykluczające się doniesienia uniemożliwiają więc jednoznaczne określenie, jaką rolę pełnią PhLPs podczas fałdowania białek cytoszkieletalnych [7,24-32]. Z pewnością dodatkowe badania, być może na innych modelach komórkowych będą bardziej pomocne w rozwiązaniu tego problemu.

PODSUMOWANIE

Wprawdzie badania genetyczne, biochemiczne i proteomiczne wniosły nowe informacje na temat fizjologicznej roli chaperonin CCT i mechanizmu ich funkcjonowania, jednak wciąż wiele aspektów dotyczących oddziaływania chaperonin z substratem pozostaje niewyjaśnionych. Dalsze badania nad funkcją tych kompleksów w fałdowaniu białek

mogą przynieść odpowiedzi na wiele nurtujących naukę i medycynę pytań, a odkrywanie nowych substratów CCT i białek regulujących ich aktywność stanowi wyzwanie dla badaczy.

PIŚMIENNICTWO

- Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 115-145
- Bregier C, Fabczak H, Fabczak S (2007) Białka opiekuńcze – „molekularne przyzwoitki” w fałdowaniu białek. *Kosmos* 56: 409-419
- Gutsche I, Essen LO, Baumeister W (1999) Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *J Mol Biol* 293: 295-312
- Cowan NJ, Lewis SA (2001) Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv Protein Chem* 59: 73-104
- Valpuesta JM, Martin-Benito J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR (2002) Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett* 529: 11-16
- Levy-Rimler G, Bell RE, Ben-Tal N, Azem A (2002) Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett* 529: 1-5
- McLaughlin JN, Thulin CD, Hart SJ, Resing KA, Ahn NG, Willardson BM (2002) Regulatory interaction of phospho- β -tubulin-like protein with the cytosolic chaperonin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7962-7967
- Martin-Benito J, Bertrand S, Hu T, Ludtke PJ, McLaughlin JN, Willardson BM, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2004) Structure of the complex between the cytosolic chaperonin CCT and phospho- β -tubulin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17410-17415
- Lukov GL, Baker CM, Ludtke PJ, Hu T, Carter MD, Hackett RA, Thulin CD, Willardson BM (2006) Mechanism of assembly of G protein betagamma subunits by protein kinase CK2-phosphorylated phospho- β -tubulin-like protein and the cytosolic chaperonin complex. *J Biol Chem* 281: 22261-22274
- Lukov GL, Hu T, McLaughlin JN, Hamm HE, Willardson BM (2005) Phospho- β -tubulin-like protein acts as a molecular chaperone for G protein betagamma dimer assembly. *EMBO J* 24: 1965-1975
- Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* 15: 17-29
- Siegers K, Bolter B, Schwarz JP, Bottcher UM, Guha S, Hartl FU (2003) TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J* 22: 5230-5240
- Spiess C, Meyer AS, Reissmann S, Frydman J (2004) Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol* 14: 598-604
- Meyer AS, Gillespie JR, Walther D, Millet IS, Doniach S, Frydman J (2003) Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell* 113: 369-381
- Martin-Benito J, Gomez-Reino J, Stirling PC, Lundin VF, Gomez-Puertas P, Boskovic J, Chacon P, Fernandez JJ, Berenguer J, Leroux MR, Valpuesta JM (2007) Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart. *Structure* 15: 101-110
- Siebert R, Leroux MR, Scheufler C, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell* 103: 621-632
- Martin-Benito J, Boskovic J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Simons CT, Lewis SA, Bartolini F, Cowan NJ, Valpuesta JM. (2002) Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J* 21: 6377-6386
- Leroux MR, Fandrich M, Klunker D, Siegers K, Lupas AN, Brown JR, Schiebel E, Dobson CM, Hartl FU (1999) MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *EMBO J* 18: 6730-6743
- Llorca O, Martin-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J, Hynes G, Willison KR, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2000) Eukaryotic chape-

- ronin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO J* 19: 5971-5979
20. Zabala JC, Fontalba A, Avila J (1996) Tubulin folding is altered by mutations in a putative GTP binding motif. *J Cell Sci* 109: 1471-1478
 21. Zhou C, Cunningham L, Marcus AI, Li Y, Kahn RA (2006) Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell* 17: 2476-87
 22. Burd CG, Strohlic TI, Gangi Setty SR (2004) Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. *Trends Cell Biol* 14: 687-94
 23. Fabczak H, Sobierajska K, Fabczak S. (2004): Dimer $\beta\gamma$ białka G- cząsteczka sygnałowa. *Kosmos* 53: 355-372
 24. Kubota S, Kubota H, Nagata K (2006) Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of G β from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8360-8365
 25. Wells CA, Dingus J, Hildebrandt JD (2006) Role of the chaperonin CCT/TRiC complex in G protein $\beta\gamma$ -dimer assembly. *J Biol Chem* 281: 20221-20232
 26. Humrich J, Bermel C, Bunemann M, Harmark L, Frost R, Quittner U, Lohse MJ (2005) Phosducin-like protein regulates G-protein $\beta\gamma$ folding by interaction with tailless complex polypeptide-1 α : dephosphorylation or splicing of PhLP turns the switch toward regulation of G $\beta\gamma$ folding. *J Biol Chem* 280: 20042-20050
 27. Blaauw M, Knol JC, Kortholt A, Roelofs J, Ruchira, Postma M, Visser AJ, van Haastert PJ (2003) Phosducin-like proteins in *Dictyostelium discoideum*: implications for the phosducin family of proteins. *EMBO J* 22: 5047-5057
 28. Fabczak H, Sobierajska K, Fabczak S (2004) Identification of possible phosducins in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Protist* 155: 181-192
 29. Fabczak H, Sobierajska K., Fabczak S (2003): Fosducyna i jej izoformy – regulatory aktywności białek G. *Postępy Biologii Komórki* 30: 745-761
 30. Schulz R (2001) The pharmacology of phosducin. *Pharmacol Res* 43: 1-10
 31. Knol JC, Engel R, Blaauw M, Visser AJ, van Haastert PJ (2005) The phosducin-like protein PhLP1 is essential for G $\beta\gamma$ dimer formation in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 25: 8393-400
 32. Flanary PL, DiBello PR, Estrada P, Dohlman HG (2002) Functional analysis of Plp1 and Plp2, two homologues of phosducin in yeast. *J Biol Chem* 275: 18462-18469
 33. Stirling PC, Cuellar J, Alfaro GA, El Khadali F, Beh CT, Valpuesta JM, Melki R, Leroux MR (2006) PhLP3 modulates CCT-mediated actin and tubulin folding via ternary complexes with substrates. *J Biol Chem* 281: 7012-7021
 34. Stirling PC, Srayko M, Takhar KS, Pozniakovsky A, Hyman AA, Leroux MR (2007) Functional interaction between phosducin-like protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 18: 2336-2345

CCT chaperonins and their cochaperons

Cezary Bregier, Barbara Kupikowska, Hanna Fabczak[✉], Stanisław Fabczak

Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., PL-02-093 Warszawa, Poland

[✉]e-mail: h.fabczak@nencki.gov.pl

Key words: actin, CCT chaperonins, G β , PhLP, prefoldin, protein folding, tubulin

ABSTRACT

Chaperonins are large oligomers consisting of two superimposed rings, each enclosing a cavity used for the folding of other proteins. They have been divided into two groups. Chaperonins of type I were identified in mitochondria and chloroplasts (Hsp60) or bacterial cytosol (GroEL) as well. Chaperonins type II were found in Archea and the eukaryotic cell cytosol (CCT). Protein folding occurs in the chaperonin after its conformational changes induced upon ATP binding. Mechanism of the protein folding, although still poorly defined, clearly differs from the one established for GroEL. Although CCT with prefoldin seems to be mainly involved in the folding of actin and tubulin, other substrates engaged in various cellular processes are beginning to be characterized, including proteins possessing WD40-repeats. Moreover, several lines of evidence suggest that beside prefoldin, CCT may work in concert with phosducin-like proteins (PhLPs).

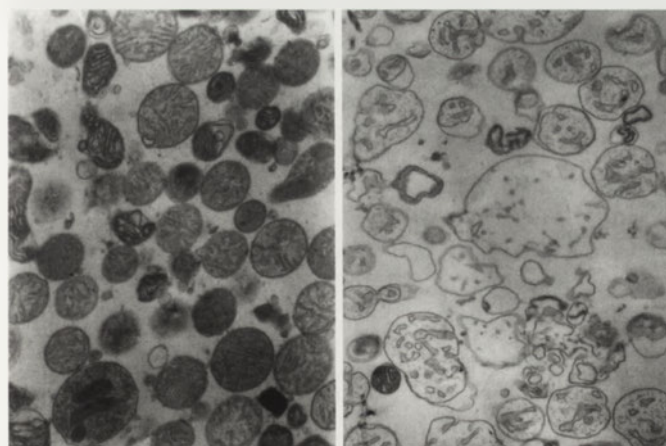
Mitochondrialny megakanal jest skomplikowaną strukturą białkową, która tworzy się w miejscu bliskiego kontaktu zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Decyduje on o wielu aspektach życia komórki, a ewentualną konsekwencją jego otwarcia może być ochrona bądź skazanie komórki na śmierć. Niniejsza praca przeglądowa przedstawia aktualny stan wiedzy na temat budowy i funkcji mitochondrialnego megakanalu w komórce.

WPROWADZENIE

Mitochondria są strukturami komórkowymi zbudowanymi z dwóch błon, zewnętrznej i wewnętrznej, które zawierają charakterystyczne zestawy enzymów, umożliwiające pełnienie im określonych funkcji. Zewnętrzna błona mitochondrialna ma właściwości sita molekularnego, co sprawia, że do przestrzeni międzybłonowej przez porynę (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*) mogą przenikać tylko cząsteczki o masie mniejszej niż 5 kDa. Z tego powodu skład jonowy przedziału międzybłonowego jest podobny do cytosolu. Natomiast wewnętrzna błona mitochondrialna jest bardzo szczelna i selektywna w stosunku do przepuszczanych substancji. Czasami jednak dochodzi do rozszczelnienia wewnętrznej błony mitochondrialnej, za co odpowiedzialny jest otwierający się kanal o wysokim przewodnictwie, potocznie nazywany megakanalem (PTP, ang. *permeability transition pore*). Megakanal opisywany jest jako niespecyficzny kanal o wysokim przewodnictwie, łączący cytosol bezpośrednio z macierzą mitochondrialną. Badania prowadzone na izolowanych mitochondriach wykazały, że PTP jest wielobiałkowym kompleksem, który w określonych warunkach, np. w obecności jonów wapnia i nieorganicznego fosforanu, może tworzyć por, poprzez który przemieszczają się cząsteczki o masie do 1,5 kDa. Wyniki badań Huntera i wsp. [1] pokazały, że otwarty megakanal ma średnicę około 3 nm. Uprzepuszczalnienie wewnętrznej błony mitochondrialnej (WBM) na taką skalę wywołuje pęcznienie mitochondriów, co w konsekwencji prowadzi do rozerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej (ZBM) i uwolnienia białek obecnych w przestrzeni międzybłonowej (Ryc. 1).

CZYNNIKI REGULUJĄCE OTWIERANIE I ZAMYKANIE MEGAKANALU

To czy megakanal otworzy się, czy też pozostanie zamknięty, zależy od wielu czynników. Najważniejsze z nich to potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej (depolaryzacja błony faworyzuje otwarcie, natomiast wysoki $\Delta\Psi$ utrzymuje PTP w stanie zamkniętym), pH macierzy mitochondrialnej, obecność dwudodatnich jonów metali i nukleotydów adeninowych (przeładowanie mitochondriów jonami wapnia otwiera megakanal, podczas gdy jony magnezu oraz nukleotydy



kontrola

pęcznienie wywołane otwarciem PTP

Rycina 1. Fotografia w mikroskopie elektronowym mitochondriów mózgu szczura przed i po otwarciu mitochondrialnego megakanalu. Pęcznienie wywołano dodaniem jonów wapnia w obecności fosforanu. Powiększenie 12 000x. Zdjęcie wykonane przez dr Annę Broniszewską z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

Mariusz R. Więckowski

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: m.wieckowski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 29 listopada 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 4 lutego 2008 r.

Wykaz skrótów: AIF – czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*); ANT – translokaza nukleotydów adeninowych; Bcl-2 – białka z rodziny Bcl-2; Cyp-D – cyklofilina D; ER – siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*); HK – heksokinaza; IAP – białko hamujące apoptozę (ang. *inhibitory apoptosis protein*); IP₃R – receptor 1,4,5-trisfosfoinozytolu; MAC – kanal powstający w procesie apoptozy (ang. *mitochondrial apoptosis induced channel*); MCU – uniporter wapniowy (ang. *mitochondrial Ca²⁺ uniporter*); PBR – receptor benzodiazepiny; PM – błona plazmatyczna; PMB – przestrzeń międzybłonowa; PTP – megakanal (ang. *permeability transition pore*); ROS – reaktywne formy tlenu; SERCA – ATPaza wapniowa obecna w błonach siateczki śródplazmatycznej (ang. *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*); SOC – kanal wapniowy obecny w błonie plazmatycznej aktywowany spadkiem zawartości wapnia w siateczce śródplazmatycznej (ang. *store operated channel*); VDAC – poryna (ang. *voltage dependent anion channel*); WBM – wewnętrzna błona mitochondrialna; ZBM – zewnętrzna błona mitochondrialna

Słowa kluczowe: mitochondria, megakanal, apoptoza, mitochondrialne miejsca kontaktowe

Podziękowania: Autor pragnie podziękować panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi za dyskusję i cenne uwagi w trakcie pisania tej pracy

adeninowe sprzyjają utrzymaniu go w stanie zamkniętym) [2,3]. Istotny może być także stan oksydoredukcyjny oraz obecność antyoksydantów, dlatego też do efektorów PTP zalicza się także reaktywne formy tlenu (ROS), które utleniając grupy sulfhydrylowe seryn w translokazie nukleotydów adeninowych promują powstawanie mostków dwusiarczkowych, przez co zwiększają prawdopodobieństwo otwarcia się megakanalu. Jednym z najbardziej popularnych inhibitorów PTP jest cyklosporyna A [4] oraz kwas bongkrekowy, (toksyna produkowana przez bakterie *Burkholderia cocovenenans*). Do znanych aktywatorów PTP zalicza się także atraktylozyd i nieorganiczny fosforan, jeżeli podaje się je w kombinacji z jonami wapnia.

BUDOWA MEGAKANAU

Budowa i rola megakanalu w warunkach normy i patologii badana jest już od ponad trzydziestu lat, co zaowocowało powstaniem na ten temat wielu opracowań. Obserwacje opierające się na wpływie różnego typu efektorów na megakanal oraz próby jego oczyszczenia i charakterystyki przy pomocy przeciwciał pozwoliły na stworzenie modelu tej struktury. Przypuszcza się, że w pełni funkcjonalny megakanal składa się z kilku białek, z których dwa są kluczowe dla tworzenia zrębu kanału. Są to translokaza nukleotydów adeninowych (ANT) oraz poryna. Pozostałe białka tworzące kompleks pełnią funkcje regulatorowe.

TRANSLOKAZA NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH

Translokaza nukleotydów adeninowych jest białkiem o masie 30 kDa, zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, którego sekwencja kodowana jest w genomie jądrowym. ANT umożliwia wymianę nukleotydów adeninowych (ADP i ATP) pomiędzy macierzą mitochondrialną a cytoplazmą. Translokaza w mitochondriach jest aktywna jako homodimer albo homotetramer. Obecnie znane są trzy izoformy tego białka. U ludzi ANT1 występuje głównie w sercu i w mięśniach szkieletowych, przez co uważa się ją za izoformę specyficzną dla komórek mięśniowych [5], chociaż niewielki jej poziom odnaleziono także w innych tkankach. ANT2 występuje w tkankach charakteryzujących się dużą zdolnością do proliferacji i regeneracji (np. wątroba, nerki, śledziona i fibroblasty) [5]. Natomiast trzecia izoforma, ANT3, odnajdywana jest w niewielkiej ilości we wszystkich tkankach [5-7]. Pomimo specyficzności tkankowej wydaje się, że wszystkie izoformy translokazy współwystępują w tym samym mitochondrionie. Ich charakterystyczna lokalizacja w mitochondrium może być częściowo związana z pełnionymi przez nie funkcjami. ANT2 jest obecna głównie w grzebieniach mitochondrialnych, natomiast ANT1 i ANT3 w peryferycznych obszarach wewnętrznej błony mitochondrialnej biorących udział w tworzeniu mitochondrialnych miejsc kontaktowych [8,9]. Według Vyssokikh'iego i Brdiczki [10] taka lokalizacja może świadczyć, że ANT1 i ANT3 są izoformami, które wchodzi w skład megakanalu. Badania z użyciem przeciwciał specyficznych wobec ANT1, ANT2 i ANT3 wydają się to potwierdzać. Hipoteza zaproponowana przez tych autorów znalazła również potwierdzenie w obserwacjach poczynionych przez Więckowskiego i wsp. [11]. Halestrap i wsp. [12,13], poprzez pokazanie, że atraktylozyd otwiera megakanal, podczas gdy kwas bongkrekowy i ADP

mają przeciwne działanie, dowodzą, że ANT jest jednym ze składników PTP. Nieco później Brustovetsky i Klingenberg, wykorzystując metodę „patch-clamp” wykazali, że wbudowana do liposomów ANT tworzy w obecności jonów wapnia kanał o wysokim przewodnictwie, który jest podobny do megakanalu [14]. Należało by jednak wspomnieć, że translokaza nukleotydów adeninowych nie jest białkiem w pełni specyficznym wobec ADP i ATP. Zdziwiające jest, że oprócz nukleotydów może transportować anionową formę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, fosfoenolpirogonian oraz pirofosforan [15,16]. Zdolność do transportu anionowej formy kwasu tłuszczowego sprawia, że translokaza nukleotydów adeninowych jest jednym z kilku białek biorących udział w rozprzęganiu oksydacyjnej fosforylacji przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe [17].

PORYNA

Poryna (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*) jest białkiem o masie 30 -35 kDa, które tworzy w zewnętrznej błonie mitochondrialnej zależny od potencjału kanał anionowy. U ssaków zostały odnalezione i opisane trzy izoformy poryny, VDAC1, VDAC2 i VDAC3, które różnią się między sobą właściwościami elektrofizjologicznymi [18]. Obecność poryny w zewnętrznej błonie mitochondrialnej sprawia, że błona ta nie ogranicza dostępności substratów oddechowych do mitochondriów, jednocześnie umożliwiając wydobawanie się różnych metabolitów z mitochondriów do cytosolu. Wykazano, że wbudowana do liposomów poryna, może występować w kilku stanach, różniących się między sobą stopniem otwarcia kanału, które charakteryzują się różnym przewodnictwem oraz selektywnością względem przepuszczanych substancji. VDAC w stanie wysokiego przewodnictwa jest wysoce selektywny w stosunku do anionów, natomiast w miarę zmniejszania się przewodnictwa, selektywność ta zmienia się na korzyść kationów [19]. W przeciwieństwie do ATN, która zlokalizowana jest tylko w mitochondriach, poryna odnajdywana jest także w błonie plazmatycznej, endosomach i w siateczce śródplazmatycznej [20]. W literaturze dostępnych jest wiele opracowań opisujących oddziaływanie VDAC z białkami takimi jak ANT, receptor benzodiazepiny, heksokinaza, kinaza glicerolowa i kreatynowa oraz z białkami z rodziny Bcl-2 [21,10]. Oddziaływanie te są dynamiczne i mogą zmieniać się w zależności od stanu metabolicznego komórki. Są dowody, że poprzez kanał VDAC może być uwalniany do cytosolu powstający w mitochondriach anionorodnik ponadtlenkowy [22]. Dodatkowo uważa się, że VDAC jest tym miejscem na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie dochodzi do spotkania się różnych efektorów i inhibitorów apoptozy.

Istnieje kilka dowodów na udział poryny w tworzeniu megakanalu. Oczyszczony VDAC wbudowany do dwuwarstwy lipidowej tworzy kanały o średnicy od 2.5 do 3 nm czyli podobnej do tej jaką posiada megakanal. Dodatkowo zarówno VDAC jak i PTP są regulowane przez te same efekторы, takie jak NADH, glutaminian i jony wapnia.

INNE BIAŁKA WCHODZĄCE W SKŁAD MEGAKANAU

Oprócz białek ANT i VDAC w skład kompleksu megakanalu mogą wchodzić enzymy o funkcjach regulatorowych.



Rycina 2. Schemat budowy mitochondrialnego megakanalu. Dokładny opis struktury megakanalu znajduje się w tekście pracy. Objasnienia skrótów: translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), poryna (VDAC), cyklofilina D (Cyp-D), heksokinaza (HK), receptor benzodiazepiny (PBR), białka z rodziny Bcl-2 (Bcl-2), cytochrom c (cyt. c), wewnętrzna błona mitochondrialna (WBM), zewnętrzna błona mitochondrialna (ZBM), przestrzeń międzybłonowa (PMB) (wg [94], zmodyfikowane za zgodą autorów i wydawnictwa).

Do białek oddziałujących z poryną należy kinaza kreatynowa (CK), heksokinaza (HK), kinaza glicerolowa (GK) oraz białka z rodziny Bcl-2 (np. Bcl-2 lub Bax). Z translokazą nukleotydów adeninowych po stronie macierzy mitochondrialnej może oddziaływać cyklofilina D [23] (Ryc. 2).

KONTROWERSJE DOTYCZĄCE BUDOWY MEGAKANALU

Pomimo wielu lat badań nad zrozumieniem biochemicznych i molekularnych podstaw tworzenia się w mitochondriach pora o tak wysokim przewodnictwie, nadal pojawia się wiele kontrowersji co do jego budowy. Na szczególną uwagę zasługują doniesienia, że takie integralne składniki megakanalu jak ANT, VDAC i Cyp-D nie są niezbędne do otwierania się pora [24-26]. Mitochondria wyizolowane z wątroby myszy pozbawionych ANT (a dokładnie dwóch jej izoform ANT1 i ANT2) nadal wykazują obecność funkcjonalnego megakanalu, która przejawia się indukowanym przez jony wapnia i wrażliwym na cyklosporynę A pęcznieniem mitochondriów. Autorzy tłumaczą to zjawisko możliwością zastępowania translokazy przez inne białka o podobnej strukturze, znajdujące się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [24]. Najprawdopodobniej mogą to być nośnik fosforanowy (najbardziej zbliżony do ANT pod względem strukturalnym), a także nośniki dikarboksylowy lub glutaminianowy [27]. Dodatkowo funkcję tę może pełnić trzecia izoforma translokazy nukleotydów adeninowych (ANT3). W mitochondriach pozbawionych ANT1 oraz ANT2 to ona może tworzyć wraz z innymi białkami megakanal.

Podobne wątpliwości dotyczą poryny. Mitochondria izolowane z narządów myszy pozbawionych VDAC1 zachowują się tak samo jak mitochondria kontrolne [25]. W tym przypadku VDAC1 jest prawdopodobnie zastępowany przez pozostałe izoformy tego białka, VDAC2 i VDAC3. Podobnie jest w przypadku VDAC3, ponieważ jego brak nie ma większego wpływu na funkcjonowanie komórki. Niestety, sprawdzenie w podobny sposób, czy VDAC2 jest tym elementem, który wchodzi w skład PTP, jest niemożliwe,

ponieważ pozbawienie zwierząt VDAC2 jest letalne już w stadium embrionalnym.

Wyniki innych badań wskazują, że w mitochondriach pozbawionych cyklofiliny D (Cyp-D) także może dochodzić do otwierania się megakanalu, lecz potrzebne są do tego wyższe stężenia jonów wapnia. Może to świadczyć o tym, że Cyp-D niesłusznie uważana jest przez niektórych badaczy za integralny składnik megakanalu, a jej rola ogranicza się wyłącznie do regulacji wpływu jonów wapnia na PTP [26].

Jaka jest więc naprawdę budowa megakanalu? Biorąc pod uwagę wyniki ostatnich badań oraz dane przedstawione przez Kinnally i McEnery'ego [28,29] stworzono hipotetyczny model megakanalu, który przedstawiono na Rycinie 1. Pomimo pojawiających się kontrowersji uważa się, że w skład megakanalu wchodzi translokaza nukleotydów adeninowych oddziałująca z białkami zewnętrznej błony mitochondrialnej, receptorem benzodiazepiny (PBR) i poryną. Od strony macierzy mitochondrialnej translokaza oddziałuje z cyklofiliną D (Cyp-D), a Cyp-D wiąże się cyklosporyną A. VDAC oddziałuje dodatkowo z heksokinazą i białkami z rodziny Bcl-2.

CZY MITOCHONDRIALNE MIEJSCA KONTAKTOWE TO MEGAKANAL?

Ważne pod względem strukturalnym i funkcjonalnym dla mitochondriów są miejsca, w których błona zewnętrzna i błona wewnętrzna ściśle do siebie przylegają. Połączenia tego rodzaju nazywane są mitochondrialnymi miejscami kontaktowymi. Wiadomo, że odgrywają one istotną rolę w regulacji metabolizmu oraz w procesie transportu białek do mitochondriów. Znane są dwa rodzaje mitochondrialnych miejsc kontaktowych. Pierwszy, gdzie strukturą łączącą jest kompleks TIM/TOM, biorący udział w transporcie białek do mitochondriów. Kompleks o nazwie TOM (*ang. translocase of the outer membrane*), zlokalizowany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, oddziałuje z kompleksem TIM (*ang. translocase of the inner membrane*), znajdującym się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [30]. Drugi rodzaj miejsc kontaktowych tworzony przez białka obecne w WBM i ZBM, budową bardzo przypomina megakanal. Wyniki badań tego typu miejsc kontaktowych pokazały, że można wyróżnić dwa rodzaje kompleksów białkowych obecnych w miejscach bliskiego kontaktu błon mitochondrialnych. Są one do siebie bardzo podobne pod względem budowy, a różni je tylko rodzaj kinazy, która z nimi oddziałuje. W skład jednego z nich wchodzi heksokinaza (kompleks HK-VDAC-ANT-CyP-D), natomiast w skład drugiego kinaza kreatynowa (kompleks VDAC-CK-ANT) (Ryc. 3) [31].

W przeciwieństwie do wolnej poryny występującej w postaci dimerów tworzących kanały o wysokim przewodnictwie i selektywności anionowej, VDAC w kompleksie z ANT (kompleks HK-VDAC-ANT-CyP-D) występuje w stanie niskiego przewodnictwa i wykazuje selektywność kationową. Zmiana struktury poryny (wynikająca z oddziaływania z ANT) istotnie zwiększa jej powinowactwo do heksokinazy I. Oprócz tetrameru HK, kompleks ten dodatkowo zawiera dużo związanego cytochromu c, co będzie dyskutowane

później [32,33]. Z poryną może także oddziaływać receptor benzodiazepiny i białka z rodziny Bcl-2. W komórkach nowotworowych stwierdzono zwiększone wiązanie heksokinazy do mitochondriów, co może mieć związek z wysoką aktywnością glikolityczną.

W kompleksie VDAC-CK-ANT VDAC nie oddziałuje bezpośrednio z ANT. Łączy je oktamer kinazy kreatynowej. VDAC łącząc się z CK przyjmuje konformacje uniemożliwiająca mu jednoczesne oddziaływanie z HK. Z tego powodu nie spotyka się kompleksów poriny i translokazy zawierających jednocześnie obie te kinazy. Interesujące wydaje się, że w skład tego kompleksu nie wchodzi cyklofilina D.

Beutner i wsp. [21] wykazali, że w określonych warunkach, wyżej opisane kompleksy wbudowane w dwuwarstwę lipidową wykazują klasyczne właściwości megakanalu. Zależne od jonów wapnia otwieranie się megakanalu, w przypadku kompleksu zawierającego heksokinazę, jest hamowane przez ATP i glukozę. Natomiast struktura zawierająca oktamer kinazy kreatynowej nie wykazuje aktywności megakanalu, dopóki CK nie rozpadnie się do formy dimerycznej. Pomimo braku Cyp-D w kompleksie zawierającym CK, otwieranie się pora pod wpływem jonów wapnia jest hamowane przez cyklosporynę A. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że cyklosporyna A poprzez bezpośrednie oddziaływanie z dimerem CK stymuluje jego oligomeryzację do oktameru, który, jak już wspomniano, nie sprzyja otwieraniu się megakanalu.

Obecny stan wiedzy pozwala z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że kompleks zawierający heksokinazę i megakanal to ta sama struktura. Przemawia za tym to, że efekторы PTP mają dokładnie taki sam wpływ na kompleksy białkowe wyizolowane z mitochondrialnych miejsc kontaktowych. Wskazuje to na ich bardzo podobną budowę i organizację w błonach mitochondrialnych. Dlatego też wyizolowane, a następnie wbudowane do liposomów tego typu kompleksy białkowe stanowią doskonały model do badania właściwości megakanalu [21].

ROLA MEGAKANALU W FIZJOLOGII I PATOLOGII

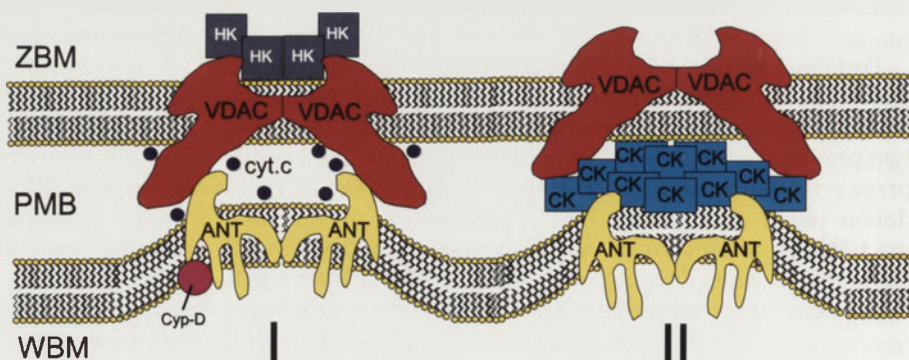
Od kiedy zaczęto kojarzyć pęcznienie mitochondriów z megakanalem, próbowano przypisać temu zjawisku jakąś konkretną funkcję. Z początku zjawisko to uważano jedynie za artefakt wynikający z prowadzenia badań na izolowanych mitochondriach i nie przypisywano mu żadnego znaczenia ani konkretnych funkcji. Później wykazano jed-

nak, że do otwierania mitochondrialnego megakanalu dochodzi także *in vivo* i ma to duży wpływ na metabolizm mitochondriów oraz całej komórki. Obecnie uważa się, że w zależności od sposobu otwarcia się megakanalu może on brać udział w procesie inicjacji apoptozy zależnej od mitochondriów bądź nekrozy. Otwieranie się megakanalu zaobserwowano w wielu stanach patologicznych i chorobowych [34]. Ponadto potwierdzono jego rolę w utrzymywaniu prawidłowego sprzężenia mitochondriów [35], co ma istotne znaczenie dla komórki, bowiem determinuje odpowiednią produkcję ATP. Niewielkie rozprężenie oksydacyjnej fosforylacji może także przyczyniać się do obniżenia produkcji wolnych rodników tlenowych w mitochondriach [36]. W literaturze możemy również odnaleźć dowody na udział megakanalu w procesie autofagii mitochondriów [37,38].

ROZPRZĘGANIE FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ

Badania z wykorzystaniem techniki "patch-clamp" wykazały, że otwarty megakanal może występować w dwóch stanach – w trybie wysokiego bądź niskiego przewodnictwa [39-41] i w zależności od tego, różne mogą być konsekwencje jego otwarcia. Zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej łańcuch oddechowy wytwarza gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. W wyniku tego obserwuje się powstawanie potencjału elektrycznego i gradientu pH w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, który wykorzystywany jest do syntezy ATP. W przypadku gdy PTP jest otwarty w trybie niskiego przewodnictwa, obserwujemy zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów. W ten sposób, gradient protonowy jest znoszony (podobnie jak przez klasyczne rozpręgacze), co prowadzi do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej ($\Delta\Psi$) oraz wzrostu szybkości zużycia tlenu przez mitochondria. Natomiast w trybie wysokiego przewodnictwa, oprócz wyżej wymienionych symptomów, obserwuje się dodatkowo pęcznienie mitochondriów. Szczególnie istotne dla komórki może mieć znaczenie, jak długo pory pozostają otwarte. Jego permanentne otwarcie obserwuje się często w stanach patologicznych. Jednakże badania z użyciem radioaktywnej deoksyglukozy pokazały, że także w warunkach fizjologicznych może dochodzić do otwierania się PTP w modzie wysokiego przewodnictwa, jednak bez tragicznych dla komórki konsekwencji. Sekret tkwi w kontrolowaniu czasu otwarcia megakanalu. Krótkotrwałe epizody uprzeszczalnienia wewnętrznej błony mitochondrialnej nie muszą wcale być niekorzystne dla mitochondriów [42].

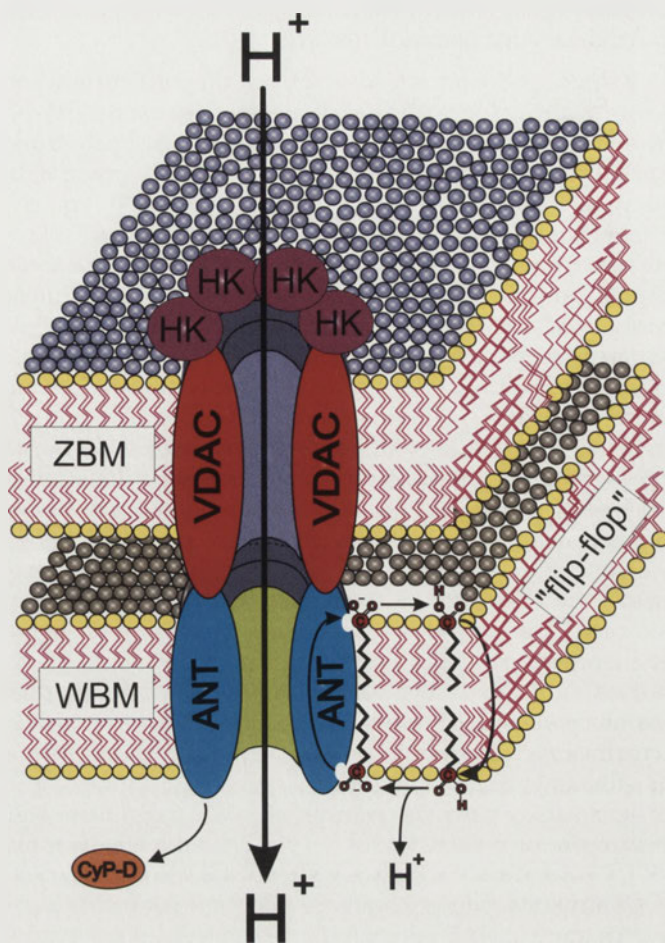
Rycina 3. Budowa mitochondrialnych miejsc kontaktowych. Wyjaśnienia: typ I – kompleks zawierający tetramer heksokinazy, cytochrom c i cyklofilinę D; typ II – kompleks zawierający oktamer kinazy kreatynowej. Skróty: translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), poryna (VDAC), cyklofilina D (Cyp-D), heksokinaza (HK), kinaza kreatynowa (CK), cytochrom c (cyt. c), wewnętrzna błona mitochondrialna (WBM), zewnętrzna błona mitochondrialna (ZBM), przestrzeń międzybłonowa (PMB).



Wydajność fosforylacji oksydacyjnej jest bardzo istotnym parametrem, a utrzymywanie tego wskaźnika na optymalnym poziomie jest niezwykle ważne dla komórki. Jak wykazał Stucki [43], maksymalna szybkość syntezy ATP przez mitochondria jest uzyskiwana przy wartości sprzężenia energetycznego trochę mniejszej niż maksymalna. Znaczący to, że mitochondria rozprężone w niewielkim stopniu, szybciej syntetyzują ATP, niż mitochondria sprzężone w 100%. Megakanal, poprzez subtelne kontrolowanie stanu sprzężenia mitochondriów, może więc utrzymywać produkcję ATP oraz wolnych rodników tlenowych (powstających w wyniku niedoskonałego funkcjonowania łańcucha oddechowego) na optymalnym dla komórki poziomie. Aby było to jednak możliwe, w komórce muszą znajdować się czynniki regulujące aktywność megakanala.

Oprócz jonów Ca^{2+} , cyklofiliny D oraz wolnych rodników tlenowych za endogenne modulatory PTP uznaje się także wolne długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (FFA) oraz ich pochodne. Dodanie kwasów tłuszczowych do mitochondriów uprzednio inkubowanych z niewielką ilością jonów wapnia powoduje obniżenie $\Delta\Psi$, zwiększenie szybkości oddychania i pęcznienie mitochondriów. Efekt ten częściowo może być cofnięty przez cyklosporynę A (CsA) – inhibitor megakanala. Może to świadczyć o tym, że obniżenie potencjału nie było spowodowane jedynie protonoforowym działaniem kwasów tłuszczowych na mitochondria, lecz także otwarciem PTP (Ryc. 4) [44-46]. Jak już wcześniej wspomniano, zwiększone prawdopodobieństwo otwarcia megakanala zachodzi w przypadku obniżenia $\Delta\Psi$ na wewnętrznej błonie mitochondrialnej [3]. Wydaje się więc, że kwasy tłuszczowe, obniżając potencjał przyczyniają się do otwarcia PTP, potęgując dzięki temu swoje protonoforowe właściwości. Jednak porównanie zdolności do otwierania PTP klasycznych rozpręgaczy takich jak FCCP czy CCCP z kwasami tłuszczowymi pokazuje, że kwasy tłuszczowe znacznie silniej otwierają megakanal niż by to wynikało ze stopnia obniżenia $\Delta\Psi$ [47]. Oznacza to, że istnieje dodatkowy mechanizm otwierania PTP przez FFA. Z literatury wiadomo, że kwasy tłuszczowe wykazują wysokie powinowactwo do transporterów mitochondrialnych (między innymi do ANT) [48], dlatego też działanie FFA może być porównywane do atraktylozydu, który otwiera PTP poprzez utrzymywanie translokazy nukleotydów adeninowych w konformacji „c”, preferującej otwieranie się pory [6]. Najbardziej przekonującym dowodem na bezpośredni wpływ FFA na PTP (niezależnie od $\Delta\Psi$) są eksperymenty przeprowadzone na megakanale wbudowanym w liposomy [46]. Potwierdzające tę hipotezę badania pokazały, że endogenne kwasy tłuszczowe – produkt reakcji katalizowanej przez fosfolipazę A2 (PLA2) w obecności jonów wapnia także otwierają megakanal [46]. Może to być kolejny dowód na bezpośredni udział kwasów tłuszczowych w otwieraniu PTP. Zawsze jednak do otwarcia megakanala przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe niezbędna jest obecność jonów Ca^{2+} . Podobnie jest w przypadku, gdy do otwarcia PTP wykorzystywany jest nieorganiczny fosforan bądź atraktylozyd.

Proponowany mechanizm pęcznienia mitochondriów pod wpływem wolnych kwasów tłuszczowych nie jest je-



Rycina 4. Mechanizm rozpręgnięcia fosforylacji oksydacyjnej przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe z udziałem ANT i megakanala. Uprotonowana forma kwasu tłuszczowego łatwo i bardzo szybko przemieszcza się z zewnętrznej warstwy błony do warstwy wewnętrznej (tzw. „flip-flop”) z jednoczesnym oddysocjowaniem protonu w macierzy mitochondrialnej. Następnie zdeprotonowana (anionowa) forma zostaje wytransportowana na zewnątrz przy udziale niektórych nośników mitochondrialnych, np. ANT, gdzie ulega ponownemu uprotonowaniu i może z powrotem ulegać zjawisku „flip-flop”, przenosząc kolejne protony. Dodatkowo, kwasy tłuszczowe i niektóre ich pochodne oddziałując z translokazą nukleotydów adeninowych przyczyniają się do otwarcia mitochondrialnego megakanala. W ten sposób gradient protonowy wytwarzany przez łańcuch oddechowy jest znoszony, co prowadzi do spadku potencjału na błonie mitochondrialnej [28,30,35]. Skróty: translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), poryna (VDAC), cyklofilina D (Cyp-D), heksokinaza (HK), wewnętrzna błona mitochondrialna (WBM), zewnętrzna błona mitochondrialna (ZBM), przestrzeń międzybłonowa (PMB).

dynam, jaki opisano. Eksperymenty przeprowadzone na „nieoddychających” mitochondriach inkubowanych w buforze octanowym wykazały, że pęcznienie mitochondriów wywołane przez kwas tłuszczowy może mieć inne podłoże niż otwarcie PTP [45]. Jedną z możliwości może być oddziaływanie kwasu tłuszczowego z kanałem IMAC (Inner Membrane Anion Carrier) [49]. Z drugiej jednak strony obecność kwasu tłuszczowego może prowadzić do obniżenia poziomu jonów Mg^{2+} wewnątrz macierzy mitochondrialnej, co może przyczyniać się do otwarcia PTP [50]. Hipotezę o udziale kanału IMAC dodatkowo potwierdzają doświadczenia z dicykloheksylokarbodiimidem (inhibitorem kanału IMAC), który efektywnie hamuje pęcznienie mitochondriów [45]. Jednakże w warunkach najbardziej zbliżonych do fizjologicznych, najbardziej prawdopodobny wydaje się mechanizm, gdzie kwas tłuszczowy poprzez bezpośrednie

oddziaływanie z ANT powoduje otwarcie się megakanalu i pęcznienie mitochondriów [46,51].

Bardzo podobne właściwości do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych mają ich niektóre pochodne [51]. N-acyloetanoloaminy (NAE) są związkami, w których grupa karboksylowa kwasu tłuszczowego łączy się z grupą aminową etanoloaminy wiązaniem amidowym. Tego typu pochodne długołańcuchowych kwasów tłuszczowych obecne są w różnych tkankach ssaków w ilościach wahających się od 0,1 do ponad 20 nmoli na gram tkanki [52]. Ich ilość może wzrastać dramatycznie (nawet do 500 nmoli/g tkanki) w sercu podczas ischemii [53]. Podwyższenie ilości NAE obserwuje się także w neuronach, w których zainicjowano apoptozę [54] oraz podczas epizodów niedokrwiennych mózgu [55]. Funkcja NAE w komórkach nie jest do końca poznana, a w literaturze występują rozbieżne doniesienia o ich właściwościach. N-acyloetanoloaminy mogą swobodnie penetrować komórki i przemieszczać się z miejsc objętych uszkodzeniem do obszarów przyległych [56,57], gdzie pełnią nie tylko funkcję sygnałową bądź cytoprotekcyjną, ale mogą też wywoływać apoptozę [58]. Dane dostępne w literaturze pokazują, że mechanizm działania NAE na mitochondria może być bardzo skomplikowany. Z jednej strony, podobnie jak wolne kwasy tłuszczowe, wywołują wrażliwe na cyklosporynę A pęcznienie mitochondriów, z tą jednak różnicą, że amplituda pęcznienia jest mniejsza. Z drugiej zaś, w pewnych warunkach NAE mogą hamować pęcznienie wywołane wysokimi stężeniami jonów wapnia [51]. Dodatkowo, badania z wykorzystaniem radioaktywnego atraktylozydu pokazały, że podobnie jak wolne kwasy tłuszczowe, NAE oddziałują z translokazą nukleotydów adeninowych [51]. Efekt jaki NAE wywołują związany jest więc prawdopodobnie z ich bezpośrednim oddziaływaniem z megakanalem. Można więc przypuszczać, że zarówno wolne kwasy tłuszczowe, jak i ich pochodne mogą być naturalnym regulatorem PTP, a ich funkcja polega na kontrolowaniu stanu, w jakim znajduje się megakanal.

HOMEOSTAZA WAPNIOWA

Stan fizjologiczny komórki zwierzęcej kontrolowany jest przez sygnał wapniowy, który odgrywa podstawową rolę w takich procesach jak: ruch, podział czy też skurcz komórki. Jony wapnia mogą wpływać na stan metaboliczny komórki poprzez regulację syntezy ATP w mitochondriach. Dzieje się tak dlatego, gdyż aktywność niektórych enzymów mitochondrialnych wzrasta podczas odpowiedzi komórki na sygnał wapniowy. Do tych enzymów należą wrażliwe na stężenie jonów wapniowych trzy dehydrogenazy (pirogrobianowa, izocytrynianowa oraz 2-oksoglutaranowa). Mitochondria akumulują jony Ca^{2+} , gdy zostaną spełnione dwa warunki: i) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej obecny jest wysoki potencjał elektryczny, $\Delta\psi$, ii) stężenie jonów Ca^{2+} w cytosolu osiągnie poziom co najmniej 400 nM. Napływ jonów wapniowych do mitochondriów zależy od uniportera wapniowego, który jest elektrogennym nośnikiem działającym jednokierunkowo (transportuje wapń tylko z cytosolu do macierzy mitochondrialnej) [59].

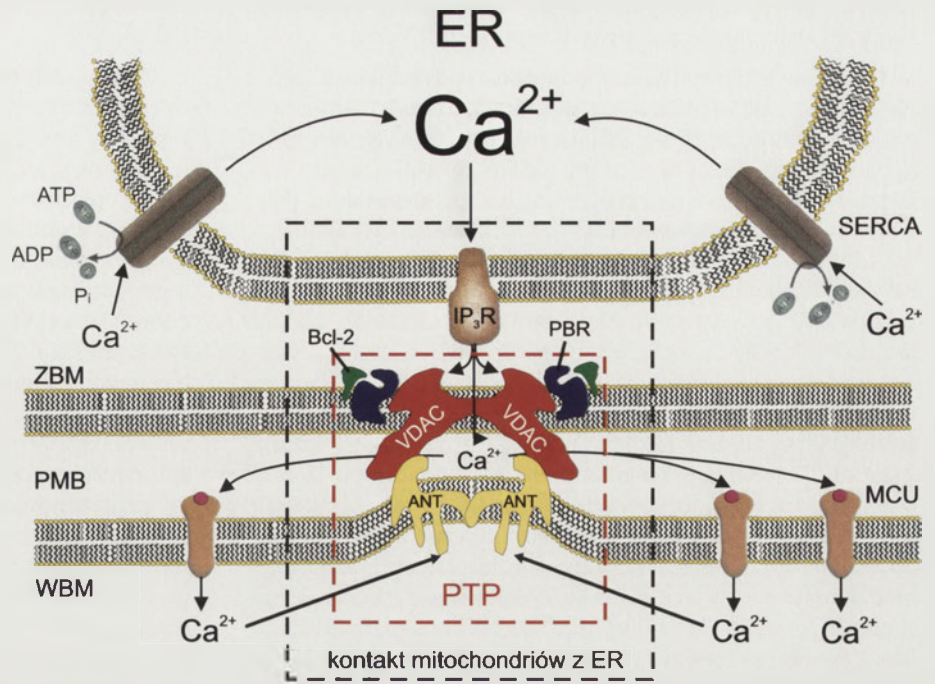
W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie udziałem mitochondriów i megakanalu w utrzymaniu

homeostazy wapniowej. Do niedawna uważano, że w homeostazie wapniowej mitochondria wykorzystywane są jedynie jako mechanizm obronny, tzn. pobierają nadmiar jonów wapniowych, gdy ich stężenie w cytosolu osiągnie dla komórki niebezpiecznie wysoki poziom. Niskie powinowactwo uniportera wapniowego w stosunku do jonów Ca^{2+} ($K_d = 10 \mu\text{M}$) oraz to, że stężenie jonów wapnia w cytosolu waha się od 0,1 μM do 1 μM , sprawiło, że długo nie przypisywano mitochondriom istotnej roli w regulacji homeostazy wapniowej. Pogląd ten zmienił się po odkryciu nowych sond wapniowych. Ich wykorzystanie przyczyniło się do wykazania, że bezpośrednie oddziaływania mitochondriów z ER i błoną plazmatyczną mogą mieć decydujące znaczenie dla generowania sygnału wapniowego w komórce. Sprawilo to, że mitochondria znalazły się w centrum uwagi jako potencjalny czynnik regulujący pobudzenie komórki, który kontroluje napływ jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Stymulacja komórek elektrycznie niepobudliwych prowadzi do przejściowego podwyższenia poziomu jonów wapnia w cytosolu. Początkowo spowodowane jest to uwolnieniem jonów wapnia z ER, a następnie napływem jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego [60,61]. Oba te procesy zachodzą dzięki obecności wyspecjalizowanych kanałów: w błonie ER- receptora 1,4,5-trisfosfoinozytolu (IP_3R), natomiast w błonie komórkowej kanału SOC (Store Operated Channel), który jest aktywowany opróżnieniem ER z jonów wapniowych. Ze względu na niskie powinowactwo uniportera wapniowego w stosunku do Ca^{2+} , tylko mitochondria zlokalizowane w pobliżu błony plazmatycznej bądź siateczki śródplazmatycznej, gdzie lokalne stężenia wapnia w czasie pobudzenia komórki osiągają nawet 50 μM , mogą efektywnie, a zarazem bezpiecznie dla komórki akumulować Ca^{2+} [62-65]. Bezpiecznie, ponieważ przepływ jonów wapnia pomiędzy mitochondriami i ER zachodzi w ograniczonej przestrzeni, a tworząca się mikrodomena jonów wapnia (o wysokim stężeniu) ma zasięg lokalny. Aby mitochondria pobierały jony wapnia, nie musi więc za każdym razem dochodzić do wzrostu stężenia globalnego Ca^{2+} w zakresie, który może być niebezpieczny dla komórki (Ryc. 5).

Bliskie umiejscowienie mitochondriów względem wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych i kanałów wapniowych obecnych w błonie plazmatycznej może mieć także inne konsekwencje. Należy bowiem pamiętać, że megakanal jest strukturą aktywowaną między innymi wysokim stężeniem jonów Ca^{2+} . Jeżeli więc megakanal znalazłby się w pobliżu tworzącej się mikrodomeny jonów wapnia, w sprzyjających warunkach istnieje duże prawdopodobieństwo jego otwarcia się. Wywołane w ten sposób obniżenie $\Delta\psi$ doprowadza w rezultacie do uwolnienia Ca^{2+} z mitochondriów. Niekiedy udaje się zaobserwować przejściową fragmentację sieci mitochondrialnej zsynchronizowaną ze spadkiem potencjału [66]. Zastosowanie cyklosporyny A częściowo niweluje efekt obniżenia $\Delta\psi$, dzięki czemu obserwuje się wzrost pobierania jonów Ca^{2+} przez mitochondria [11].

Podniesienie w komórce poziomu białek wchodzących w skład megakanalu wpływa na metabolizm wapniowy. Zwiększenie ilości VDAC1 w komórkach HeLa sprawia, że podczas pobudzenia mitochondria sprawniej pobierają

Rycina 5. Schemat przedstawiający miejsce bliskiego oddziaływania mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną. Bliskie umiejscowienie mitochondriów względem siateczki śródplazmatycznej zapewnia efektywne pobieranie jonów wapnia przez mitochondria. Tworząca się na styku dwóch błon mikrodomena wysokiego stężenia Ca^{2+} , w sprzyjających warunkach może doprowadzać do otwarcia mitochondrialnego megakanalu w trybie niskiego przewodnictwa, chroniąc mitochondria przed nadmierną akumulacją jonów wapniowych. Wywołane obniżenie $\Delta\Psi$ doprowadza w rezultacie do uwolnienia Ca^{2+} z mitochondriów [60]. Zastosowane na rycinie skróty: megakanal (PTP, ang. *permeability transition pore*), translokaza nukleotydów adeninowych (ANT), poryna (VDAC), heksokinaza (HK), receptor benzodiazepiny (PBR), białka z rodziny białek Bcl-2 (Bcl-2), wewnętrzna błona mitochondrialna (WBM), zewnętrzna błona mitochondrialna (ZBM), przestrzeń międzybłonowa (PMB), (MCU, ang. *mitochondrial Ca^{2+} uniporter*), receptor 1,4,5-trisfosfoinozytoli (IP₃R), Ca^{2+} -ATPaza obecna w błonach siateczki śródplazmatycznej (SERCA, ang. *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*).



iony wapnia [67]. W tym przypadku nie dochodzi więc do zwiększenia się ani liczby megakanalów w mitochondriach, ani do wzrostu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej. Jedynym wytłumaczeniem tego zjawiska jest zwiększenie przewodnictwa zewnętrznej błony mitochondrialnej dla Ca^{2+} w miejscach kontaktu mitochondriów z ER. VDAC umożliwia więc szybkie przemieszczanie się jonów wapnia między mitochondriami, siateczką śródplazmatyczną oraz cytosolem, co czyni go ważnym elementem w homeostazie wapniowej. Inaczej sprawa wygląda w przypadku ANT. Podniesienie poziomu dwóch izoform translokazy (ANT1 i ANT3) znacząco obniża pobieranie wapnia przez mitochondria [11]. Wydaje się więc, że w przypadku komórek z podniesioną ekspresją ANT1 i ANT3 może zachodzić uprzepuszczalnienie wewnętrznej błony mitochondrialnej w wyniku otwarcia być może większej liczby megakanalów. Przemawiają za tym doświadczenia z użyciem CsA, w których preinkubacja z tym inhibitorem megakanalu częściowo przywraca mitochondriom zdolność do akumulacji jonów Ca^{2+} [11]. Dalsze badania wykazały, że obniżone pobieranie jonów wapnia przez mitochondria nie jest spowodowane częściowym opróżnieniem magazynów wapniowych, obniżonym $\Delta\Psi$, czy też zmniejszonym napływem Ca^{2+} do komórki w wyniku przeprowadzonej transfekcji komórek, co wskazuje na udział megakanalu w tym procesie [11]. Efekt jaki wywołuje podniesienie poziomu poszczególnych izoform ANT potwierdza obserwacje Brdiczki i wsp. [8] o różnej roli jaką pełnią poszczególne izoformy translokazy nukleotydów adeninowych w mitochondriach.

MEGAKANAL – APOPTOZA CZY NEKROZA

W organizmie wielokomórkowym nieprzerwanie zachodzą cztery procesy: podział komórek, ich różnicowanie, dojrzewanie i śmierć. Zachowanie proporcji pomiędzy nimi jest niezwykle istotne dla organizmu. Śmierć komórki może przebiegać na różne sposoby. Jednym z nich jest apoptoza czyli programowana śmierć komórki. Charakterystycznymi

epizodami w przebiegu apoptozy są zachodzące w następującej kolejności: kondensacja chromatyny, obkurczenie i fragmentacja jądra komórkowego oraz tworzenie ciałek apoptotycznych, które zawierają pofragmentowaną chromatynę i organelle komórkowe. Dodatkowo, ten typ śmierci komórkowej charakteryzuje się brakiem stanu zapalnego w miejscu, gdzie dochodzi do umierania komórek, bowiem ciała apoptotyczne są fagocytowane przez sąsiadujące komórki bądź makrofagi. Obecnie znane są trzy główne szlaki apoptozy. Są to: i) szlak receptorowy (zewnętrzny), ii) szlak mitochondrialny (wewnętrzny) oraz iii) pseudoreceptorowy [68]. Postuluje się też istnienie czwartego szlaku, w którym główną rolę odgrywa siateczka śródplazmatyczna [69].

Mitochondrialny szlak apoptozy jest tym, w którym udział mitochondrialnego megakanalu jest wciąż dyskutowany. Do jego aktywacji może dochodzić między innymi w wyniku stresu oksydacyjnego, bądź podwyższonego stężenia jonów Ca^{2+} . Kluczowym momentem w szlaku apoptozy zależnej od mitochondriów jest uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów proapoptotycznych białek takich jak: czynnik indukujący apoptozę (AIF – apoptosis inducing factor) [70], endonukleaza G [71] i cytochrom c [72]. Cytochrom c wraz z białkiem Apaf-1 wiąże się z prokaspazą 9 tworząc apoptosom. Najważniejszą rolę apoptosomu jest aktywacja kaspaz wykonawczych, co warunkuje dalszy przebieg procesu apoptozy [73]. Nasuwa się jednak pytanie, czy każde, nawet przypadkowe uwolnienie z mitochondriów cytochromu c inicjuje śmierć komórki? Zapewne nie, bowiem w komórkach znajdują się białka (z rodziny IAP) hamujące apoptozę, które jak się wydaje stanowią ochronę przeciwko przypadkowej aktywacji kaspaz [74]. Uważa się zatem, że uwalnianie z mitochondriów cytochromu c nie jest jedynym i niezbędnym warunkiem do zapoczątkowania apoptozy. Oprócz cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej wydostaje się również białko *diablo*, inaczej nazywane SMAC (Mitochondria-derived Activator of Caspase), które

hamuje aktywność wspomnianych inhibitorów apoptozy, umożliwiając dalsze zachodzenie apoptozy [75,76].

Od czasu zidentyfikowania apoptozy zależnej od mitochondrialnych zastanawiano się nad mechanizmem uwalniania cytochromu c. Przez długi czas uważano, że aby proapoptyczne białka wydostały się do cytosolu, konieczne jest rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej [77]. Kluczową rolę w tym procesie przypisywano megakanalowi, który według badaczy w krytycznym momencie otwierał się doprowadzając do pęcznienia mitochondrialnych i do przerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej. Model ten wydawał się świetnie pasować do doświadczeń wykonywanych na izolowanych mitochondriach. W przypadku modelu komórkowego problem polega na tym, że w trakcie apoptozy pęcznienie mitochondrialnych nie zawsze związane jest z otwieraniem się megakanalu [78]. Dodatkowo, w niektórych liniach komórkowych nie obserwowano obniżenia $\Delta\Psi$ [79], co wydawałoby się nieuniknione w przypadku otwarcia PTP. W związku z tym, rola mitochondrialnego megakanalu w inicjacji procesu apoptozy na jakiś czas została zanegowana. Aby wyjaśnić mechanizm specyficznego dla czynników proapoptycznych uprzepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej zaproponowano kilka modeli opisujących uwalnianie cyt. c. Przypuszczano, że VDAC poprzez oddziaływanie z białkami z rodziny Bcl-2 [80], bądź też białka te samodzielnie mogą tworzyć kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej specyficzne dla cytochromu c [81]. Na szczególną uwagę zasługuje także model, w którym kluczową rolę odgrywa kanał MAC (Mitochondrial Apoptosis Induced Channel) [79]. Czynnikiem odpowiedzialnym za zapoczątkowanie uwalniania cytochromu c z mitochondrialnych są białka Bax i Bak (należące do rodziny białek Bcl-2), które pod wpływem białka Bid wbudowują się do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie oligomeryzując mogą brać udział w formowaniu kanału MAC [82].

Późniejsze badania wykazały jednak, że nie musi dochodzić do otwarcia się megakanalu, aby brał on udział w procesie uwalniania cytochromu c. Prace zespołu Brdiczki, jak również nasze, pokazały, że do zależnego od białka Bax uwalniania cytochromu c z mitochondrialnych niezbędna jest obecność kompletnej struktury megakanalu. Nie dochodzi wtedy do otwarcia poru ani w trybie niskiego ani wysokiego przewodnictwa [32, 83]. Ponadto, w obecności białka Bax megakanal wbudowany do pęcherzyków fosfolipidowych wypełnionych cytochromem c wykazywał takie same właściwości. Tworząca się struktura białkowa wydaje się być niezwykle specyficzna wobec cytochromu c. W przypadku, gdy pęcherzyki z wbudowanym PTP wypełniono kinazą adenylanową białko Bax, nie uwalniało jej na zewnątrz. Dodatkowo, wykazano, że niekompletne miejsca kontaktowe, kompleks VDAC-Bax bądź samo białko Bax, nie są w stanie doprowadzić do wypływu cytochromu c. [83]. Szczegółowe badania pokazały, że z mitochondrialnych i pęcherzyków zawierających PTP, białko Bax uwalnia tylko cytochrom c związany z miejscami kontaktowymi. Interesujące wydaje się, że substraty dla heksokinazy (ATP, glukoza) hamują uwalnianie cytochromu c przez białko Bax. Zjawisko to można wytłumaczyć silniejszym wiązaniem się aktywnej heksokinazy do VDAC, co zmniejsza jego dostępność dla białka Bax. Dodatkowo produkowane przez heksokinazę

ADP obniża prawdopodobieństwo otwarcia megakanalu [32,33].

Uwalnianie cytochromu c przez białko Bax z mitochondrialnych miejsc kontaktowych wydaje się współgrać z hipotezą występowania dwóch epizodów „wycieku” cytochromu c w procesie apoptozy. Pierwszy, z przestrzeni międzybłonowej mitochondrialnych pod wpływem białka Bid lub Bax, wydostaje się tylko niewielka ilość cytochromu c, np. związanego z mitochondrialnymi miejscami kontaktowymi, co nie wymaga uszkodzenia zewnętrznej błony mitochondrialnej [84]. Ilość ta jest wystarczająca do zainicjowania tworzenia się apoptosomu i, co najważniejsze, uwolnienie jej nie wywołuje upośledzenia działania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Nie dochodzi zatem do obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, co umożliwia zajęcie procesu apoptozy do końca. Należy bowiem pamiętać, że programowana śmierć komórki jest procesem, który wymaga ATP. W drugiej fazie obserwuje się już masowe uwolnienie cytochromu c, związanego z powierzchnią grzebieni mitochondrialnych, któremu często towarzyszy otwieranie się megakanalu (pęcznienie mitochondrialnych i rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej) [23]. Dwuetapowe uwalnianie cytochromu może być uwarunkowane jego rozmieszczeniem. Uważa się, że w mitochondrialnych obecne są dwie pule cytochromu c. Aż 85% cytochromu może być „uwięziona” w przestrzeniach pomiędzy grzebieniami mitochondrialnymi. Reszta, około 15%, znajduje się w przestrzeni międzybłonowej. Cytochrom c, zarówno w uchyłkach grzebieni mitochondrialnych, rejonie przestrzeni międzybłonowej, jak i w miejscach kontaktowych może być związany z błoną poprzez oddziaływanie z kardiolipliną [85]. Organizacja i struktura wewnętrznej błony mitochondrialnej jest utrzymywana i kontrolowana przez białka OPA1 i PARL. Aby doszło do uwolnienia znaczącej ilości cytochromu c zmianie musi ulec jej struktura, tak aby wcześniej „ukryta” pula cytochromu c stała się dostępna dla powstających w zewnętrznej błonie mitochondrialnej systemów umożliwiających jego wydostawanie się na zewnątrz. Interesujące jest, że cyklosporyna A hamuje ten etap, co by wskazywało na udział megakanalu w drugiej fazie uwalniania cytochromu c z mitochondrialnych [86].

W przypadku, gdy już na samym początku mamy do czynienia z otwieraniem się megakanalu, rozerwaniem zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz masowym uwolnieniem cytochromu c, mitochondria przestają zaopatrywać komórkę w ATP. Spadek poziomu ATP przyczynia się do tego, że komórka umiera śmiercią nekrotyczną. W przeciwnieństwie do apoptozy, nekroza związana jest z powstawaniem stanu zapalnego w miejscu martwicy. Nie powstają bowiem ciała apoptotyczne, a zawartość umierającej komórki uwalniana jest do przestrzeni pozakomórkowej, co wywołuje stan zapalny.

Opisane modele uwalniania cytochromu c, włącznie z otwieraniem się PTP i pęcznieniem mitochondrialnych, nie wykluczają się wzajemnie. Wszystkie te zjawiska mogą występować niezależnie, bądź współdziałać w zależności od rodzaju komórek i czynnika wywołującego apoptozę [82]

Otwieranie megakanału obserwuje się w wielu stanach patologicznych. Do najważniejszych można zaliczyć uszkodzenie neuronów wywołane hipo- lub hiperglikemią, dystrofię mięśniową związaną z niedoborem kolagenu IV oraz ischemię i następującą po niej reperfuzję. Należy jednak zaznaczyć, że do otwarcia PTP nie dochodzi w czasie ischemii, ale dopiero podczas procesu reperfuzji. Najprawdopodobniej jest to spowodowane obniżeniem pH wnętrza komórki, które towarzyszy procesowi ischemii [87,88]. Czynniki, które przyczyniają się do otwierania megakanału podczas reperfuzji, są: podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} oraz zwiększona produkcja wolnych rodników tlenowych. Obniżenie prawdopodobieństwa otwarcia się PTP poprzez zastosowanie cyklosporyny A pozwala na zmniejszenie uszkodzeń zachodzących podczas epizodów ischemii i reperfuzji [89]. Megakanał może być również zaangażowany w proces hartowania (ang. *preconditioning*), co czyni go idealną strukturą docelową dla związków farmakologicznych wykorzystywanych np. w kardioprotekcji [90]. Efekt ochronny cyklosporyny A obserwowany jest także w przypadku uszkodzeń wątroby wywołanych działaniem etanolu lub zakażeniem wirusem żółtaczki typu C [91,92]. Cyklosporyna A wykorzystywana jest z powodzeniem w transplantologii. Traktowanie narządów przeznaczonych do transplantacji CsA zmniejsza zakres uszkodzeń organów oczekujących na przeszczep [93].

UWAGI KOŃCOWE

Jak przedstawiono w niniejszym artykule, mitochondrialny megakanał może pełnić w komórce niezwykle ważne funkcje. Poprzez regulację sprzężenia mitochondriów ma wpływ na parametry energetyczne komórki oraz produkcję wolnych rodników tlenowych. Jego lokalizacja w miejscach kontaktu mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną i błoną plazmatyczną sprawia, że ma on duży udział w utrzymaniu homeostazy wapniowej komórki. Dodatkowo, przypuszcza się, że we współdziałaniu z białkami z rodziny Bcl-2 odgrywa kluczową rolę w uwalnianiu cytochromu c, co zapoczątkowuje zależny od mitochondriów proces apoptozy. W przypadku, kiedy otwarcie PTP w trybie wysokiego przewodnictwa doprowadzi do rozerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej i zaburzenia podstawowych funkcji związanych z produkcją ATP, komórka umiera śmiercią nekrotyczną. Pojawiło się też wiele doniesień potwierdzających udział mitochondrialnego megakanału w wielu chorobach i stanach patologicznych. Wszystko to świadczy o tym, że mimo upływu trzydziestu lat od zaobserwowania po raz pierwszy fenomenu megakanału, nadal stanowi on niezwykle atrakcyjny przedmiot badań.

PIŚMIENICTWO

- Hunter DR, Haworth RA, Southard JH (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251: 5069-77
- Hunter DR, Haworth RA (1979) The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 195: 453-459
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* 267: 2934-9

- Fournier N, Ducet G, Crevat A (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr* 19: 297-303
- Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U, Schultheiss HP (1997) Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett* 414: 258-262
- Schultheiss HP, Klingenberg M (1984) Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *Eur J Biochem* 143: 599-605
- Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 267: 14592-14597
- Vysokikh MY, Katz A, Rueck A, Wuensch C, Domer A, Zorov DB, Brdiczka D (2001) Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J* 358: 349-358
- Klingenberg M (1980) The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol* 56: 97-105
- Vysokikh MY, Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 50: 389-404
- Wieckowski MR, Szabadkai G, Wasilewski M, Pinton P, Duszyński J, Rizzuto R (2006) Overexpression of adenine nucleotide translocase reduces Ca^{2+} signal transmission between the ER and mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 393-399
- Halestrap AP, Davidson AM (1990) Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160
- Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP (1997) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272: 3346-3354
- Brustovetsky N, Klingenberg M (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry* 35: 8483-8488
- Shug AL, Shrago E (1973) Inhibition of phosphoenolpyruvate transport via the tricarboxylate and adenine nucleotide carrier systems of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 53: 659-665
- D'Souza MP, Wilson DF (1982) Adenine nucleotide efflux in mitochondria induced by inorganic pyrophosphate. *Biochim Biophys Acta* 680: 28-32
- Wojtczak L, Wieckowski MR (1999) The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31: 447-455
- De Cerquiera Cesar M, Wilson JE (2004) All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. *Arch Biochem Biophys* 422: 191-196
- Shoshan-Barmatz V, Gincel D (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 39: 279-292
- Shoshan-Barmatz V, Hadad N, Feng W, Shafir I, Orr I, Varsanyi M, Heilmeyer LM (1996) VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* 386: 205-210
- Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368: 7-18.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278: 5557-5563
- Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS (2006) Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 148-163

24. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427: 461-465
25. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P (2006) Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757: 590-595
26. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280: 18558-18561
27. Halestrap AP (2004) Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature* 430: 983
28. Kinnally KW, Campo ML, Tedeschi H (1989) Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr* 21: 497-506
29. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder H (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3170-3174
30. Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W, Meisinger C (2003) Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J* 22: 5370-5381
31. Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D (1997) Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore. *Biochem Soc Trans* 25: 151-157
32. Vyssokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jürgensmeier JJ, Brdiczka D (2002) Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect. *Mol Biol Rep* 29: 93-96
33. Vyssokikh M, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jürgensmeier J, Schreiner D, Brdiczka D (2004) The intra-mitochondrial cytochrome c distribution varies correlated to the formation of a complex between VDAC and the adenine nucleotide translocase: this affects Bax-dependent cytochrome c release. *Biochim Biophys Acta* 1644: 27-36
34. Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12: 815-833
35. Smaili SS, Russell JT (1999) Permeability transition pore regulates both mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca²⁺ signals in oligodendrocyte progenitors. *Cell Calcium* 26: 121-130
36. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15-18.
37. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462: 245-253
38. Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ (2004) Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2463-2472
39. Zoratti M, Szabó I (1994) Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26: 543-553
40. Zoratti M, Szabó I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176
41. Loupatatzis C, Seitz G, Schönfeld P, Lang F, Siemen D (2002) Single-channel currents of the permeability transition pore from the inner mitochondrial membrane of rat liver and of a human hepatoma cell line. *Cell Physiol Biochem* 12: 269-278
42. Piwocka K, Zabłocki K, Więckowski MR, Skierski J, Feiga I, Szopa J, Drela N, Wojtczak L, Sikora E (1999) A novel apoptosis-like mechanism, independent of mitochondria and caspases, induced by curcumin in human lymphoblastoid T (Jurkat) cells. *Exp Cell Res* 249: 299-307
43. Stucki JW (1980) The thermodynamic-buffer enzymes. *Eur J Biochem* 109: 257-267
44. Wieckowski MR, Wojtczak L (1998) Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 423: 339-342
45. Schönfeld P, Wieckowski MR, Wojtczak L (2000) Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett* 471: 108-112
46. Wieckowski MR, Brdiczka D, Wojtczak L (2000) Long-chain fatty acids promote opening of the reconstituted mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 484: 61-64
47. Schönfeld P, Bohnensack R (1997) Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett* 420: 167-170
48. Schönfeld P, Ježek P, Belyaeva EA, Borecký J, Slyshenkov VS, Więckowski MR, Wojtczak L (1996) Photomodification of mitochondrial proteins by azido fatty acids and its effect on mitochondrial energetics. Further evidence for the role of the ADP / ATP carrier in fatty - acid - mediated uncoupling. *Eur J Biochem* 240: 387-393
49. Schönfeld P, Sayeed I, Bohnensack R, Siemen D (2004) Fatty acids induce chloride permeation in rat liver mitochondria by activation of the inner membrane anion channel (IMAC). *J Bioenerg Biomembr* 36: 241-248
50. Schönfeld P, Schüttig R, Wojtczak L (2002) Rapid release of Mg²⁺ from liver mitochondria by nonesterified long-chain fatty acids in alkaline media. *Arch Biochem Biophys* 403: 16-24
51. Wasilewski M, Wieckowski MR, Dymkowska D, Wojtczak L (2004) Effects of N-acylethanolamines on mitochondrial energetics and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1657: 151-163
52. Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G (2000) N-Acylethanolamines and precursor phospholipids-relation to cell injury. *Chem Phys Lipids* 108: 135-150
53. Epps DE, Schmid PC, Natarajan V, Schmid HHO (1979) N-Acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 90: 628-633
54. Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Schousboe A, Petersen G (1999) Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. *Lipids* 34: 327-330
55. Moesgaard B, Jaroszewski JW, Hansen HS (1999) Accumulation of N-acyl-ethanolamine phospholipids in rat brains during post-decapitative ischemia: a ³¹P NMR study. *J Lipid Res* 40: 515-521
56. Hillard CJ, Jarrhian A (2000) The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids* 108: 123-134
57. Fowler CJ, Jacobsson SO (2002) Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide-targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 66: 193-200
58. Schwarz H, Blanco FJ, Lotz M (1994) Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. *J Neuroimmunol* 55: 107-115
59. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427: 360-364
60. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Maldolesì J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74: 595-636
61. Berridge MJ (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312: 1-11.
62. Varadi A, Cirulli V, Rutter GA (2004) Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca²⁺ entry in HeLa cells. *Cell Calcium* 36: 499-508
63. Landolfi B, Curci S, Debellis L, Pozzan T, Hofer AM (1998) Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells. *J Cell Biol* 142: 1235-1243
64. Frieden M, Arnaudeau S, Castelbou C, Demaurex N (2005) Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 280: 43198-43208
65. Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R (2006) Chaperone-mediated co-

- upling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *J Cell Biol* 175: 901-911
66. Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, Rizzuto R (2006) Mitochondrial dynamics and Ca^{2+} signaling. *Biochim Biophys Acta* 1763: 442-449
 67. Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird GS, Tuft RA, Fogarty KE, Rizzuto R (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca^{2+} microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 159: 613-624
 68. Green DR, Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell* 1: 19-30
 69. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103
 70. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184: 1331-1341
 71. Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99
 72. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132
 73. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15: 1481-1486
 74. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG (2007) The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12: 1543-1568
 75. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42
 76. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53
 77. Skulachev VP (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 397: 7-10
 78. Azzone GF, Azzi A (1965) Volume changes in liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 1084-1089
 79. Martinez-Caballero S, Dejean LM, Jonas EA, Kinnally KW (2005) The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 37: 155-164
 80. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4997-5002
 81. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2: 553-555
 82. Kinnally KW, Antonsson B (2007) A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12: 857-868
 83. Wieckowski MR, Vyssokikh M, Dymkowska D, Antonsson B, Brdiczka D, Wojtczak L (2001) Oligomeric C-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome c but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes *FEBS Lett* 505: 453-459
 84. von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150: 1027-1036
 85. Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinovich H, Amoscato AA, Yin XM (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome c release. *Mol Biol Cell* 15: 3061-3072
 86. Scorrano L, Ashiya M, Buttke K, Weiler S, Oakes SA, Marnella CA, Korsmeyer SJ (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2: 55-67
 87. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ (1991) Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 798-803
 88. Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ (1993) Intracellular pH and Ca^{2+} homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 265: 129-137
 89. Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1461-1469
 90. Javadov S, Karmazyn M (2007) Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 20: 1-22
 91. Pastorino JG, Marcineviciute A, Cahill A, Hoek JB (1999) Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 405-409
 92. Korenaga M, Okuda M, Otani K, Wang T, Li Y, Weinman SA (2005) Mitochondrial dysfunction in hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 39: 162-166
 93. Plin C, Haddad PS, Tillement JP, Elimadi A, Morin D (2004) Protection by cyclosporin A of mitochondrial and cellular functions during a cold preservation-warm reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 495: 111-118
 94. Wojtczak L, Zablocki K (2007) Chapter 1: Basic mitochondrial physiology in cell viability and death, W: Will Y, Dykens JA, (red) Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. John Wiley and Sons, New Jersey, USA, w druku (autor ryciny Mariusz R. Wieckowski)

The role of mitochondrial permeability transition pore in physiology and pathology of the cell

Mariusz R. Więckowski 

Laboratory of Bioenergetic and Biomembranes, Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Pasteur 3 Dł., 02-093 Warsaw, Poland

✉ e-mail: m.wieckowski@nencki.gov.pl

Key words: mitochondria, megachannel, apoptosis, mitochondrial contact sites

ABSTRACT

Mitochondrial megachannel, a multiprotein complex, is localized in close contacts of the outer and the inner mitochondrial membranes. It plays important role in many aspects of cell physiology and its opening can have different consequences. This review summarizes the present knowledge about structure and function of the megachannel in the cell.

Ekspresja genów kodujących białka morfogenetyczne kości, metaloproteiny i inhibitory metaloproteinaz w nowotworach płuc i ich znaczenie rokownicze

Magdalena Bieniasz

Jacek Bartkowiak

Janusz Szemraj

Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel.: (042) 678 06 20, faks: (042) 678 24 65, e-mail: madicom@wp.pl

Artykuł otrzymano 2 sierpnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 30 października 2007 r.

Słowa kluczowe: metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, tkankowe inhibitory metaloproteinaz, białka morfogenetyczne kości, nowotwór płuca

Wykaz skrótów: BMP (ang. *bone morphogenetic protein*) – białka morfogenetyczne kości; ECM (ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa; MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej; MT-MMP (ang. *membrane type matrix metalloproteinase*) – metaloproteiny powierzchniowe; NSCLC (ang. *non-small cell lung cancer*) – niedrobnokomórkowy rak płuca; SCLC (ang. *small cell lung cancer*) – drobnokomórkowy rak płuca; TIMP (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego MNiSW 2PO5A14129

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinase*) oraz ich tkankowe inhibitory (TIMP, ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) wzbudzają szczególne zainteresowanie naukowców zajmujących się rakiem płuc. W nowotworze tym występuje wyraźna tendencja w kierunku wzrostu ekspresji genów kodujących niektóre metaloproteiny i ich inhibitory. Ponadto, istotna jest zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją genów kodujących TIMP-1 i MMP-2 w tkance nowotworowej płuc a krótszym czasem przeżycia oraz zwiększoną ekspresją genów kodujących TIMP-1 i MMP-7 a stopniem zaawansowania choroby. Niewiele wiadomo na temat udziału białek morfogenetycznych kości (BMP, ang. *bone morphogenetic protein*) w patogenezie chorób nowotworowych płuc; z dotychczas opublikowanych prac wynika, że geny kodujące BMP-2 i BMP-4 ulegają nadekspresji. Wykazano również, że BMP-2 stymuluje wzrost raka płuc, podczas gdy BMP-4 go hamuje. W niniejszym artykule omówiono przede wszystkim profil ekspresji genów kodujących MMP, TIMP i BMP w nowotworze płuc i potencjalny udział tych białek w kancerogenezie.

WPROWADZENIE

Metaloproteiny zwane inaczej matryksynami, tkankowe inhibitory metaloproteinaz oraz białka morfogenetyczne kości, odrywają znaczącą rolę zarówno w prawidłowym rozwoju, jak i procesach chorobowych. Metaloproteiny i ich tkankowe inhibitory od lat były intensywnie badane w szeregu chorób. Analizie poddano różne typy histologiczne raka płuc pod względem ekspresji i aktywności MMP i TIMP. We wszystkich tych licznych pracach wyniki nie są jednoznaczne. Natomiast białka morfogenetyczne kości nie wzbudziły dużego zainteresowania naukowców. Do tej pory niewiele artykułów ukazało się na temat roli BMP w nowotworze płuc. Nie mniej jednak, MMP, TIMP oraz BMP ze względu na swoje złożone i nie do końca jeszcze poznane właściwości mogą okazać się istotnym ogniwem w patogenezie raka płuc.

NOWOTWORY PŁUC

Na świecie rak płuc jest najczęstszą przyczyną śmierci, jeśli chodzi o nowotwory złośliwe. W Polsce, w roku 2002 zapadalność na tę chorobę wynosiła 81,9/100 000 mężczyzn i 22,2/100 000 kobiet. U obu płci 5-letni okres przeżycia jest najkrótszy w Europie [1]. Około 80% nowotworów płuc stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC, ang. *non-small cell lung cancer*), który dzieli się na typy histopatologiczne takie jak rak płaskonabłonkowy, wielkokomórkowy, gruczolakorak oraz typ mieszany gruczolowo-płaskonabłonkowy. Natomiast pozostałe 20% klasyfikuje się jako drobnokomórkowy rak płuc (SCLC, ang. *small cell lung cancer*) [2]. Leczenie raka płuc zależy przede wszystkim od jego typu histologicznego i stopnia zaawansowania. Zasadniczym sposobem leczenia niedrobnokomórkowego raka płuc jest zabieg chirurgiczny. Stosunkowo nową metodą postępowania jest zastosowanie chemioterapii przed resekcją, tzw. leczenie neoadiuwantowe, które w istotny sposób poprawiło wyniki leczenia u chorych z NSCLC. Kolejną metodą leczniczą jest radioterapia, którą najczęściej stosuje się u pacjentów w zaawansowanym stadium choroby lub u tych, którzy nie mogą poddać się operacji. Dobre wyniki daje połączenie radioterapii i chemioterapii. Jeśli chodzi o drobnokomórkowego raka płuca to wyniki resekcji guza i radioterapii jako samodzielnych metod leczenia są złe ze względu na duży stopień złośliwości procesu. Rak ten jest natomiast guzem wrażliwym na leczenie chemiczne. W ostatnich latach podjęto próby zastosowania tzw. terapii celowanej, czyli skierowanej bezpośrednio na mechanizmy wzrostu i inwazyjność raka. Jedne z leków, które wprowadzono do użycia to inhibitory angiogenezy, cyklooksygenazy, naskórkowego receptora wzrostu i metaloproteinaz. Do tej pory nie wykazano jednak, aby te leki istotnie poprawiły czas przeżycia pacjentów [3].

METALOPROTEINAZY - KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej należą do rodziny enzymów zależnych od cynku – metyzyń. Są to endopeptydazy, których główną, ale nie jedyną funkcją jest proteoliza składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) [4,5]. Pierwszą odkrytą metaloproteinazą była kolagenaza w ogonie kijanki przechodzącej metamorfozę [6]. W organizmie człowieka zidentyfikowano co najmniej 24 formy kolagenaz [7]. Ze względu na specyficzność substratową, podobieństwo w sekwencji i organizację domen metaloproteiny można podzielić na następujące grupy: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny, matrylizyny, metaloproteiny powierzchniowe (MT-MMP, ang. *membrane type matrix metalloproteinase*) i inne [4].

MMP syntetyzowane są w komórkach jako wydzielnicze lub błonowe proenzymy i przekształcane do aktywnych form poprzez usunięcie propeptydu z N-końca cząsteczki przez odpowiednie osoczowe lub tkankowe proteazy. Propeptyd utrzymuje enzym w formie nieaktywnej (latencji) poprzez interakcję z aktywnym miejscem metaloproteiny [5]. Komórki, które syntetyzują metaloproteiny to m. in. fibroblasty, makrofagi, neutrofile i komórki nabłonka. Ekspresja genów kodujących metaloproteiny jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcji i translacji poprzez cytokiny, hormony oraz przez specyficzne inhibitory tkankowe – TIMP [8-10].

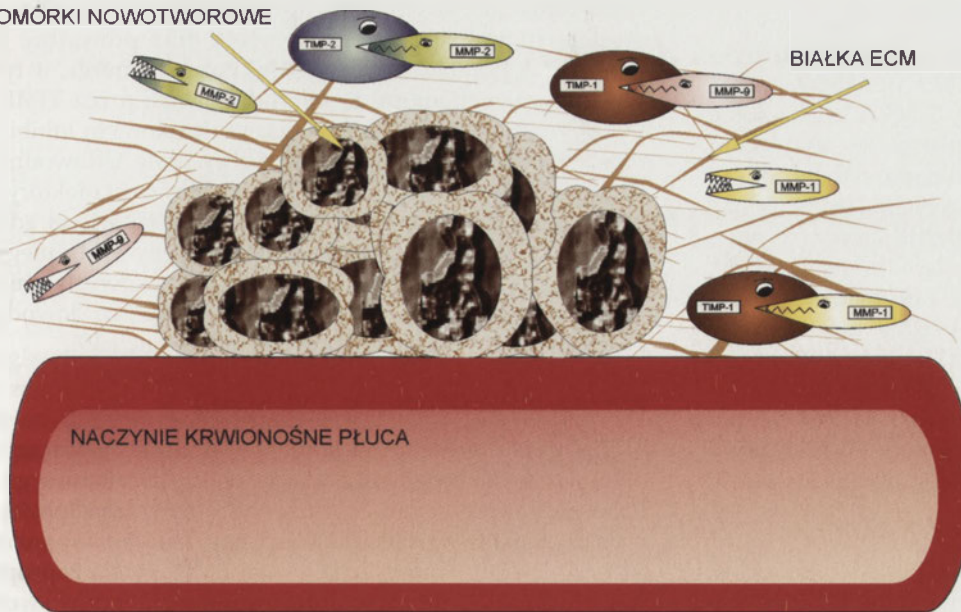
Matryksyny regulują wiele procesów fizjologicznych, do których można zaliczyć: embriogenezę, implantację blastocysty, owulację, morfogenezę organów, rozwój kości i zębów, leczenie ran, angiogenezę oraz przebudowę tkanki łącznej [5,9]. Jednakże niekontrolowana degradacja białek macierzy związana z nadmierną ekspresją genów kodujących niektóre metaloproteiny przyczynia się do wielu stanów chorobowych, takich jak zapalenie stawów, nerek, mózgu i rdzenia oraz choroby sercowo-naczyniowe i nowotwory [9].

Wyniki szeregu przeprowadzonych badań wskazują na ważną rolę metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju nowotworu płuc [5,12]. Podczas inwazji, komórki muszą przełamać bariery, którymi są błony podstawne, białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz połączenia międzykomórkowe. Pokonywanie barier odbywa się przez ich proteolizę zapoczątkowaną przez enzymy uwalniane z komórek nowotworowych i podścieliska, którymi są przede wszystkim metaloproteiny. W procesie powstawania nowotworu dochodzi do zmian w ekspresji genów tych enzymów. Badania nad mechanizmami progresji guzów złośliwych początkowo skupiały się na procesie niszczenia błon podstawnych podczas inwazji i tworzenia przerzutów. Ostatnio poczynione obserwacje wskazują, że MMP są zaangażowane we wcześniejsze etapy rozwoju nowotworów. Udział MMP w transformacji nowotworowej jest dobrze udokumentowany. Poziom ekspresji genów wszystkich MMP został zanalizowany w różnych nowotworowych liniach komórkowych. Naukowcy spekulują, że ekspresja genów kodujących enzymy proteolityczne w komórkach nowotworowych jest decydującym warunkiem w procesie transformacji. Ponadto ekspresja genów kodujących matryksyny nie jest ograniczona tylko do komórek nowotworowych, ale często dotyczy również komórek podścieliska w obrębie guza, takich jak fibroblasty, makrofagi, neutrofile oraz komórki nabłonka [10].

Guzy złośliwe są mieszaniną komórek nowotworowych i białek macierzy połączonych wzajemnymi zależnościami, osadzonych w dynamicznym podścielisku, które już dawno straciło miano biernego rusztowania. MMP są istotne na każdym etapie nowotworzenia, uczestniczą we: wzroście nowotworu poprzez ułatwianie degradacji ECM, proliferacji poprzez pobudzanie uwalniania czynników wzrostu, takich jak np. zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*), angiogenezie poprzez stymulację uwalniania czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz uczest-

KOMÓRKI NOWOTWOROWE

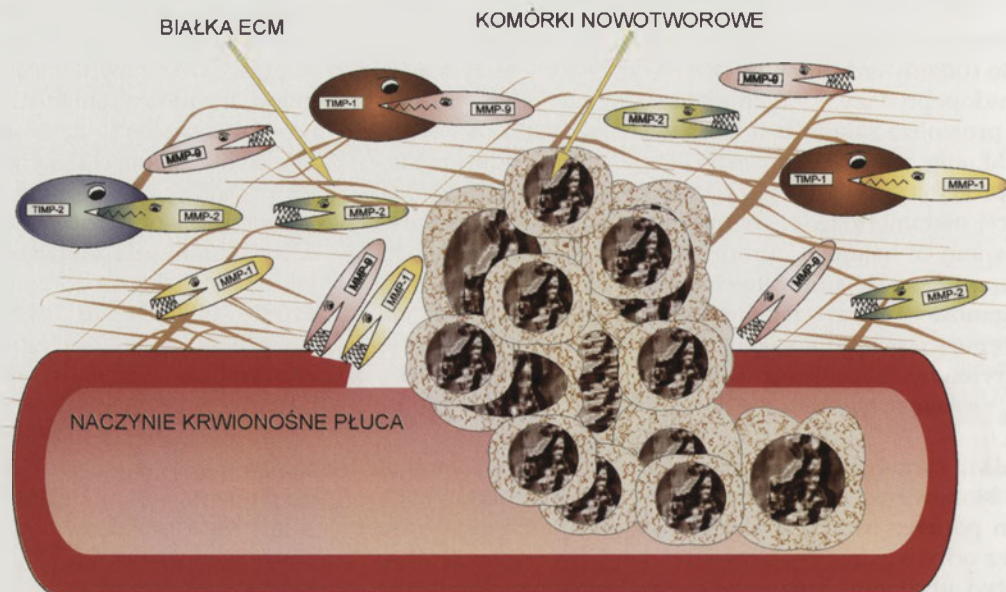
BIĄŁKA ECM



NACZYNIK KRWIONOŚNE PŁUCA

Rycina 1. Stan równowagi pomiędzy ekspresją genów metaloproteinaz (MMP) i ich tkankowych inhibitorów (TIMP) w ognisku nowotworowym w płucach. Nadmierna ilość matryksyn jest usuwana przez tkankowe inhibitory. TIMP-1 inaktywuje MMP-1 i MMP-9, a TIMP-2 hamuje aktywność MMP-2. W przypadku przedstawionym na schemacie komórki nowotworowe nie przekroczyły jeszcze błony podstawnej naczynia krwionośnego.

Rycina 2. Zaburzenie równowagi pomiędzy syntezą metaloproteinaz (MMP) i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP). Zwiększenie syntezy matryksyn, przy niedostatecznej syntezie ich tkankowych inhibitorów, sprzyja inwazji nowotworu. Szybciej dochodzi do przekroczenia błon podstawnych naczyń krwionośnych i tworzenia przerzutów odległych.



niczą w destrukcji błon podstawnych podczas tworzenia przerzutów [10,13,14].

INHIBITORY METALOPROTEINAZ

Aktywność metaloproteinaz jest regulowana przez dwa główne typy endogennych inhibitorów: tkankowe inhibitory metaloproteinaz oraz enzymy proteolityczne o szerokiej swoistości np. α_2 -makroglobulina. Podczas gdy α_2 -makroglobulina i inne niespecyficzne proteazy są podstawowymi regulatorami aktywności matryksyn w osoczu, TIMP uważane są za główne inhibitory tkankowe tych białek [4,9]. U kręgowców zidentyfikowano cztery izoformy tkankowych inhibitorów metaloproteinaz: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 [4,8,9]. TIMP wiążą się niekowalencyjnie z metaloproteinazami w stosunku stechiometrycznym 1:1, dopasowując się swym kształtem do miejsca aktywnego enzymu i inaktywują go. Jest to mechanizm na zasadzie konkurencji z substratem [4,9].

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz charakteryzują się zdolnością do inaktywowania poszczególnych matryksyn z różnym nasileniem oraz wysokim powinowactwem do tych enzymów [9]. Przykładowo, TIMP-1 ma wysokie powinowactwo do tworzenia kompleksu ze wszystkimi aktywnymi, wydzielniczymi MMP, ale jest słabym inhibitorem metaloproteinaz powierzchniowych. TIMP-2 wiąże się szczególnie silnie z MMP-2 i proMMP-2 oraz, w przeciwieństwie do TIMP-1, jest silnym inhibitorem MT-MMP. TIMP-3 oprócz dużego powinowactwa do matryksyn wydzielniczych i błonowych posiada również zdolność do oddziaływania z adamalizinami (ADAM, ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain*), które podobnie jak metaloproteinazy należą do rodziny białek zależnych od cynku - metyzyn [9,11]. Natomiast niedawno poznany TIMP-4, który swą strukturą zbliżony jest do TIMP-2, hamuje aktywność MMP-2 i proMMP-2 [11].

Profil ekspresji genu kodującego TIMP został zbadany w wielu komórkach, takich jak fibroblasty, komórki nabłonka,

chondrocyty i komórki mięśni gładkich naczyń [11]. Podobnie jak w przypadku matryksyn, transkrypcja genów tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych podlega kontroli, co warunkuje równowagę w metabolizmie ECM. Zakłócenie tej równowagi prowadzi do chorób związanych z niekontrolowaną destrukcją białek macierzy zewnątrzkomórkowej [9]. W warunkach fizjologicznych synteza MMP i TIMP jest skoordynowana na poziomie ekspresji genów. Taka ekspresja gwarantuje prawidłową strukturę tkanek i funkcję narządów oraz zapobiega zarówno nadmiernemu gromadzeniu się białek macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i zwiększonej ich degradacji. W płucach zaburzenia tej równowagi często są związane z różnymi chorobami zapalnymi i nowotworami. Ponadto zmiany w stosunku MMP/TIMP na korzyść syntezy metaloproteinaz ułatwiają inwazję przez błony podstawne [15]. Z wielu przeprowadzonych badań wynika, że TIMP hamują rozwój nowotworów, tworzenie przerzutów oraz angiogenezę, co można częściowo przypisać zdolnościom do inaktywowania matryksyn. Ponadto białka te mogą redukować sygnały stymulujące wzrost komórek oraz prowadzić do ich śmierci. Przykładowo, w wielu typach komórek, w tym nowotworowych apoptoza jest indukowana przez TIMP-3 [9,12]. W innych pracach przypisano tkankowym inhibitorom metaloproteinaz zupełnie przeciwną rolę. Udowodniono, że TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-3 promują wzrost niektórych linii komórkowych działając jako mitogeny. Co więcej, zdolność ta utrzymuje się nawet wtedy, gdy geny *TIMP* ulegną mutacji, która znosi działanie hamujące tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w stosunku do MMP, co dowodzi, że te dwie cechy są niezależnie względem siebie [9].

BIAŁKA MORFOGENETYCZNE KOŚCI

Białka morfogenetyczne kości są wielofunkcyjnymi czynnikami wzrostu będącymi jednocześnie cząsteczkami sygnalizacyjnymi należącymi do dużej nadrodziny transformujących czynników wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor* β) [16-20]. Historyczna nazwa BMP została zaproponowana przez Urist i współpracowników, którzy w swojej

Tabela 1. Ekspresja genów kodujących metaloproteinazy i ich tkankowe inhibitory w NSCLC.

MMP	Większa ekspresja MMP lub TIMP w raku płuca niż w zdrowym płucu	Ekspresja MMP lub TIMP obecna u ponad 50% badanych	Ekspresja MMP lub TIMP obecna u mniej niż 50% badanych	Jednakowa ekspresja MMP lub TIMP w raku płuca i zdrowym płucu	Mniejsza ekspresja MMP lub TIMP w raku płuca niż w zdrowym płucu	Brak ekspresji MMP lub TIMP w zdrowym płucu
MMP-1	[2,27,28,34]	[27,41]		[15,30]		
MMP-2	[15, 27,30-35,37,44,50,58]	[27,29,32,35,37,41,43,44,46,57,58]	[51]	[28,29]		
MMP-3		[57]	[41]	[28,30]		
MMP-7	[27,32,38,45]	[27,38,41]	[32]	[28]		
MMP-8	[27]			[28]		[15]
MMP-9	[2,28,30,31,33,34,36,38,39,49,58,59]	[29,36,38,40,46,49,57-59]	[51,54]	[15]		[33]
MMP-10	[27,40,55]	[27,57]		[28]		
MMP-11	[30,31,37,40,50]	[37]		[28]		
MMP-12	[28]					
MMP-13		[41,57]		[28,30]	[27]	
MMP-14	[30,37,44]	[37,41,44]		[28,30]	[27]	
MMP-15		[41]		[28]	[27]	
MMP-16				[27,28]		
MMP-17				[27,28]		
MMP-19				[27,28]		
MMP-23				[27,28]		
MMP-24				[28]	[27]	
MMP-25				[28]		
MMP-26				[28]		
MMP-27				[28]		
MMP-28				[28]		
TIMP-1	[2,30,31,39,42,43]	[41,43,46]		[15]		
TIMP-2	[29-32]	[32,41]			[2]	[15]
TIMP-3	[30,58]	[58]				
TIMP-4	[30]					

pionierskiej pracy udowodnili, że wszczepienie gryzoniom podskórnie ekstraktu ze zdeminalizowanych kości powoduje tworzenie kości *de novo* [21]. Jak wszyscy członkowie nadrodziny TGF- β , białka morfogenetyczne kości są syntetyzowane jako duże, wydzielnicze cząsteczki prekursorowe [17]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 30 tego typu białek. BMP mogą być zasadniczo podzielone na 3 grupy ze względu na podobieństwo strukturalne. Do pierwszej grupy zalicza się BMP-2 i BMP-4 (80% homologii), druga grupa obejmuje BMP-5, BMP-6 i BMP-7 (78% homologii), trzecia grupa to BMP-3, które znacząco różni się od innych [17].

BMP najbardziej znane są z udziału w różnicowaniu i proliferacji komórek mezenchymalnych, tworzeniu kości oraz chrząstki, a także ich przebudowie. Jednakże profil ekspresji tych białek oraz ich funkcje nie są sztywno przypię-

sane rozwojowi kośćca. BMP wpływają również na rozwój narządów wewnętrznych oraz regulują wzrost, różnicowanie i apoptozę różnych typów komórek takich jak: komórki mezenchymalne, osteoblasty, chondroblasty, komórki nerwowe i nabłonkowe. Białka morfogenetyczne kości wywierają swoje działanie poprzez wiązanie się z receptorem błonowym typu I lub II, który posiada aktywność kinazy serynowo-treoninowej. Po związaniu z receptorem BMP powodują inicjację wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej przez ścieżkę sygnałową białek Smad lub ścieżkę niezależną od tych białek. W efekcie dochodzi do zmiany ekspresji genów, co powoduje zmianę aktywności komórki wliczając wzrost, różnicowanie oraz syntezę różnych białek [19,20]. Faktem jest, że białka morfogenetyczne kości mają istotny udział w embriogenezie. Na wczesnych etapach rozwoju płuca geny kodujące BMP ulegają ekspresji ze zróżni-

cowanym nasileniem i w ściśle określonych rejonach dróg oddechowych. Przykładowo, geny kodujące BMP-5 i BMP-7 ulegają ekspresji w mezenchymie i nabłonku płuca. Natomiast gen kodujący BMP-4 wykazuje przestrzenny i zmienne w czasie rozwoju profil ekspresji w tkance płucnej [22]. Ponadto BMP-2 i BMP-4 działają jako morfogeny w czasie powstawania tego narządu [23]. W świetle wyżej przedstawionych faktów białka morfogenetyczne kości mają istotny udział w rozwoju płuc, co skłoniło naukowców do poszukiwania związku tych białek z procesami patologicznymi.

Udział białek morfogenetycznych kości w rozwoju nowotworów złośliwych został potwierdzony w wielu przeprowadzonych doświadczeniach. Jeśli chodzi o raka płuc to najważniejsze znaczenie w jego powstawaniu pełnią BMP-2 i BMP-4; pozostałe białka z tej grupy nie mają prawdopodobnie większego znaczenia [24]. Zaobserwowano udział BMP-2 we wroście raka, co tłumaczy się stymulowaniem przez BMP-2 powstawania naczyń krwionośnych. Stwierdzono również, że wzrost syntezy BMP-2 przyczynia się do znacznego zwiększenia dostawy krwi do ogniska nowotworowego [25]. Jednakże, inni donoszą, że BMP mogą hamować wzrost różnych nowotworów [26].

EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH MMP I TIMP W RAKU PŁUC

Najwięcej artykułów na temat ekspresji genów kodujących matryksyny w raku płuc dotyczy MMP-2 i MMP-9. Nieco mniej badań przeprowadzono w celu oceny ekspresji genów metaloproteinaz, takich jak MMP-1, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-14. Pozostałe MMP (MMP-3, MMP-8, MMP-12, MMP-13 oraz MMP-15 – MMP-28) nie były intensywnie badane, a z nielicznych prac wynika, że ich ekspresja pozostaje na tym samym poziomie, zarówno w raku, jak i zdrowych płucach (Tabela 1). Ekspresja genów metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów oceniana była różnymi metodami. Dominująca technika polegała na barwieniu immunohistochemicznym (IHC) z użyciem przeciwciał przeciwko konkretnym MMP i TIMP. W pracach, w których zastosowano tę metodę porównano stopień intensywności zabarwienia oraz ilość zabarwionych komórek nowotworowych w wycinku raka płuc z tkanką kontrolną, którą był najczęściej fragment zdrowych płuc oddalony od ogniska nowotworowego lub komórki podścieliska w otoczeniu guza, takie jak np. fibroblasty i makrofagi [27-31,33,37-42,44-58]. W nielicznych pracach badano ekspresję genów kodujących matryksyny i tkankowe inhibitory metaloproteinaz przy użyciu metody Western blot [15,41,55], RT-PCR [28,27,41,45], Northern blot [2,31,37,42,50] i mikromacierzy RNA [27]. Do genów metaloproteinaz, które wykazują zwiększoną ekspresję w nowotworowej tkance płucnej w porównaniu ze zdrową należą: MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9-MMP-12 i MMP-14. Natomiast ekspresja genów matryksyn, takich jak: MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-15 – MMP-28 jest jednakowa w obydwu tych tkankach. W nielicznych artykułach opisano zmniejszony poziom ekspresji genów kodujących niektóre MMP w raku płuc w porównaniu ze zdrową tkanką. Są to geny kodujące MMP-13, MMP-14, MMP-15 i MMP-24, których ekspresję badano przy pomocy mikromacierzy RNA [27]. Przy zastosowaniu tej samej metody inni badacze stwierdzili jednak brak zmian [28].

Różnice w poziomie RNA badanych genów mogą wynikać z różnic populacyjnych, wynikających z doboru grupy badanej (pacjenci z Niemiec [28] versus pacjenci z Tajwanu [27]). W przypadku tkankowych inhibitorów metaloproteinaz tylko w jednym przypadku, z zastosowaniem techniki Northern blot, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genu TIMP-2 w komórkach raka płuc w porównaniu ze zdrową tkanką [2]. W innych przypadkach, przy użyciu metody barwienia immunohistochemicznego, zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu kodującego ten inhibitor [29-32]. Różnice mogą wynikać z zastosowanej metody badawczej.

Geny kodujące wszystkie MMP i TIMP ulegają ekspresji w zdrowej tkance płuc (Tabela 1). Jedynie Brown i współpracownicy stwierdzili brak aktywności MMP-9 w zdrowych płucach, stosując technikę zymografii żelatynaz [33]. Natomiast w innej pracy nie zaobserwowano syntezy białka TIMP-2 w popłuczynach oskrzelowych, stosując metodę Western blot [15]. W obu przypadkach wynikiem rozbieżnych wniosków może być użycie odmiennych metod badawczych, niż barwienie immunohistochemiczne stosowane przez większość badaczy [27-31,34-38,40,41,43,44,46,49,51-56,58,59] oraz wybór innego materiału badanego [15].

W celu oszacowania, jaki jest udział poszczególnych komórek stanowiących tkankę płucną w syntezie metaloproteinaz zbadano ich ekspresję w komórkach nowotworowych, fibroblastach podścieliska i prawidłowych, nieobjętych procesem nowotworowym komórkach nabłonkowych płuca. Nie ulega wątpliwości, że komórki rakowe wykazują zwiększoną ekspresję genu MMP w stosunku do zdrowych i przez wielu badaczy uważane są za głównych producentów MMP [34-36], które pełnią ważną rolę w progresji raka płuc. Ostatnie badania ujawniły, że podścielisko również jest miejscem syntezy matryksyn, szczególnie MMP-2 i odgrywa dużą rolę w rozwoju tej choroby [29]. Ponadto niektórzy przypisują jednakże większą rolę fibroblastom w procesie nowotworzenia, które nie tylko biorą udział w syntezie metaloproteinaz, ale mogą dodatkowo stymulować komórki nowotworowe do ich produkcji [29,34,35,37].

Najczęściej występującymi typami histologicznymi raka płuc są gruczolakorak i rak płaskonabłonkowy płuca [3]. Porównywano ekspresję genów wybranych metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów w tych dwóch typach rozrostów. Stwierdzono większą ekspresję genów matryksyn, takich jak MMP-1 [30], MMP-7 [32,38], MMP-9 [39], MMP-10 [40], MMP-11 [30,40], MMP-13 [30], MMP-14 [30,41], TIMP-1 [30,42], TIMP-2 [42,43] w gruczolakoraku w porównaniu z płaskonabłonkowym rakiem płuca. W innych pracach wskazano na większą ekspresję genu MMP-2 [44], TIMP-3 [9] w typie płaskonabłonkowym w porównaniu z gruczolakorakiem. Jak wynika z wyżej przedstawionych faktów, gruczolakorak charakteryzuje się większą ekspresją wielu genów MMP, w porównaniu z typem płaskonabłonkowym, co może mieć związek z jego agresywnym charakterem. Mimo, że jest jednym z najwolniej rosnących guzów płuc to wykazuje znaczną tendencję do tworzenia przerzutów. Cechą raka płaskonabłonkowego płuc jest natomiast lepsze rokowanie; przerzuty zarówno do regionalnych węzłów chłonnych, jak i odległe występują później niż w innych ty-

Tabela 2. Zależności pomiędzy ekspresją genów kodujących wybrane MMP i TIMP a różnymi parametrami kliniczno-patologicznymi w NSCLC.

Zwiększona ekspresja genu MMP lub TIMP w NSCLC											
MMP	Krótszy czas przeżycia		Większy rozmiar guza nowotworowego		Większa skłonność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych		Większa skłonność do tworzenia przerzutów odległych		Wyższy stopień zaawansowania choroby		
	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak korelacji	Korelacja	Brak	Korelacja	Brak korelacji	
MMP-1	[27]	[2]		[2]						[2]	[34]
MMP-2	[35,37,44,46]	[29,56]		[35,44,50]		[35,44,50]		[35,44]		[37]	[34,35,44,46]
MMP-3	[41]	[40]		[40]		[40]		[40]			[40]
MMP-7	[41]	[38, 40]		[40,45]	[45]	[38, 40]		[40]		[40, 45]	[38]
MMP-9	[39,46,49,52,53]	[2,29,38,56,59]	[2,52]	[38,39,49,59]	[36, 39]	[2,38,49,54,59]				[36,39,52]	[2,34,38,54,59]
MMP-10		[40,55]		[40,55]	[40]	[55]		[40]			[40]
MMP-11		[40,56]		[40,50]	[40]			[40]		[37]	[40]
MMP-13	[41]										
MMP-14				[44]		[44]	[44]			[37]	[44]
TIMP-1	[2,42,43]		[39]	[2, 42]	[39]	[2,42]		[2]		[30,39]	[15]
TIMP-2		[2]		[2]		[2]		[2]		[30]	

pach histologicznych. Ponadto odznacza się podobnie jak gruczolakorak powolnym wzrostem [3].

ZWIĄZEK POMIĘDZY EKSPRESJĄ WYBRANYCH GENÓW KODUJĄCYCH MMP I TIMP A PARAMETRAMI KLINICZNO-PATOLOGICZNYMI W RAKU PŁUC

Poszukiwano zależności pomiędzy ekspresją genów dla poszczególnych matryksyn i ich tkankowych inhibitorów a różnymi czynnikami kliniczno-patologicznymi w niedrobnokomórkowym raku płuc, takimi jak czas przeżycia, wielkość guza, przerzuty do węzłów chłonnych, przerzuty odległe i stopień zaawansowania choroby (Tabela 2). Podsumowując wyniki analiz dotyczących zależności pomiędzy ekspresją genów kodujących wybrane MMP i TIMP z parametrami kliniczno-patologicznymi w NSCLC, brak jest jednoznacznych wniosków. Istnieje wiele przeciwstawnych wyników badań, które zapewne mają swoje źródło w różnicach w doborze grupy badanej, materiału badanego, metody badawczej oraz testu statystycznego. Można jedynie zaznaczyć wyraźną zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją *TIMP-1* a krótszym czasem przeżycia [2,42,43]. Inne zależności warte odnotowania to zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją genów *TIMP-1* [30,39] i *MMP-7* [40,45], a wyższym stopniem zaawansowania choroby oraz zwiększoną ekspresją genu *MMP-2* [27,35,44,46], a krótszym czasem przeżycia.

EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH BMP-2 I BMP-4 W RAKU PŁUC

Przeprowadzono niewiele badań dotyczących analizy ekspresji genów kodujących białka morfogenetyczne kości w raku płuca. W pracach tych skupiono się przede wszystkim na roli wysoce homologicznych względem siebie BMP-

2 i BMP-4 [22-26,47,48,59]. Stwierdzono nadekspresję genu *BMP-2* we wszystkich typach histologicznych NSCLC [24,48], z wyjątkiem oskrzelowo-pęcherzykowego raka płuc, gdzie była ona obniżona [24]. Natomiast nie zaobserwowano istotnej syntezy tego enzymu w zmianach łagodnych oraz w zdrowej tkance płuc, co wskazuje na udział tego enzymu w rozwoju tylko złośliwych nowotworów [24,48]. Ponadto istnieją prace, w których opisano dwie formy białka *BMP-2*: niedojrzałą, glikozylowaną (17 kDa) i dojrzałą, nie glikozylowaną (14kDa); zaobserwowano najwyższy poziom w NSCLC tej drugiej formy [48]. Zaobserwowano, że *BMP-2* stymuluje wzrost nowotworu przez mechanizmy autokryne i parakryne oraz odgrywa rolę raczej w progresji guza niż w jego tworzeniu [24,48]. Ponadto wykazano, że *BMP-2* stymuluje migrację nowotworowej linii komórkowej płuc – A549, co sugeruje rolę w inwazji. Jednakże te same badania dowodzą, że w wysokich stężeniach *BMP-2* hamuje wzrost komórek A549 [48].

W innej pracy poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy białko *BMP-2* stymuluje czy hamuje wzrost nowotworu płuc. Stwierdzono, że enzym ten przyczynia się do wzrostu raka płuc po części przez pobudzanie proliferacji komórek nowotworowych [23]. Co więcej zaobserwowano, że białko to wiąże się ze strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej. To oddziaływanie wpływa na przedłużoną aktywność *BMP-2*. Jednakże efekt jego działania na proliferację komórek jest przejściowy, co wskazuje na to, że enzym ten nie jest silnym miogieniem [23]. Ponadto sugeruje się, że *BMP-2* może stymulować wzrost nowotworu również przez inne mechanizmy, takie jak zwiększenie przeżycia komórek nowotworowych, ułatwianie uwalniania różnych cytokin i być może regulacyjną rolę w stosunku do komórek macierzystych [23]. Inni badacze dowodzą, że *BMP-2* promuje wzrost nowotworu poprzez stymulację tworzenia naczyń

krwionośnych [25]. Sugeruje się, że białko to bierze udział raczej w dojrzewaniu naczyń krwionośnych niż zapoczątkowaniu ich powstawania. Pobudzana przez BMP-2 angiogeneza jest regulowana przynajmniej po części przez aktywację komórek nabłonkowych. Faktem jest, że BMP-2, BMP-4, BMP-6 i BMP-7 indukują ekspresję genu *VEGF* w osteoblastach. Dlatego przypuszcza się, że BMP-2 może stymulować transkrypcję genu *VEGF* w komórkach nowotworu i prawidłowych komórkach parenchymy w jego otoczeniu, które także biorą udział w angiogenezie. Ponadto białko BMP-2 służy jako czynnik chemotaktyczny dla monocytów, które wydzielają cytokiny mające zdolność do nasilania tworzenia sieci naczyń krwionośnych [25].

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że gen kodujący BMP-4 nie ulega znaczącej ekspresji w raku płuc, w przeciwieństwie do genu kodującego BMP-2 [48]. Natomiast inni badacze, którzy badali funkcje BMP-4 w liniach komórkowych A549 dowodzą, że BMP-4 zmniejsza tempo wzrostu komórek A549, redukuje aktywność telomerazy oraz zwiększa syntezę β -galaktozydazy. Stwierdzono, że BMP-4 posiada zdolność kontrolowania wzrostu pewnych typów raka płuc [26].

UWAGI KOŃCOWE

W ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w dziedzinie onkologii molekularnej. Nieustannie prowadzone są badania nad mechanizmami rozwoju i progresji nowotworów płuc. Dużym zainteresowaniem cieszą się metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, szczególnie żelatynazy (MMP-2, MMP-9), które pełnią istotne funkcje zarówno w prawidłowym rozwoju, jak i w procesach patologicznych. Nie ma wątpliwości co do faktu, że komórki nowotworowe płuc charakteryzują się nadekspresją genów kodujących matryksyny, w porównaniu z prawidłowymi komórkami nabłonkowymi tego narządu. Jednakże związek pomiędzy ekspresją określonych genów a parametrami kliniczno-patologicznymi nie jest oczywisty. Istnieje szereg badań, na podstawie których wyciągnięto przeciwstawne wnioski. O konkretnych związkach można będzie mówić po przeprowadzeniu badań na większą skalę w kilku ośrodkach referencyjnych, z użyciem tych samych metod badawczych. Jednak warto zaznaczyć, że pewne zależności zostały potwierdzone niezależnie przez kilka zespołów badaczy. Mianowicie matryksyny takie jak, MMP-1 [27], MMP-2 [27,29,35] i MMP-9 [36,46,49] uznano za niezależne markery złego rokowania. Zauważono również wyraźną zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją genu *TIMP-1*, a krótszym czasem przeżycia [2,42,43]. Inne wyniki badań warte odnotowania to związek pomiędzy zwiększoną ekspresją genów *TIMP-1* [30,39] i *MMP-7* [40,45], a wyższym stopniem zaawansowania choroby oraz zwiększoną ekspresją genu *MMP-2* [27,35,44,46], a krótszym czasem przeżycia.

Jeśli chodzi o tkankowe inhibitory metaloproteinaz, pojawiło się bardzo niewiele prac na temat roli *TIMP-2* i *TIMP-3* w rozwoju raka płuc. Natomiast do tej pory nikt nie podjął się badań dotyczących ekspresji genu *TIMP-4* w tej chorobie, prawdopodobnie ze względu na niski poziom ekspresji tego genu [47].

Duże zainteresowanie metaloproteinazami oraz badania potwierdzające udział tych enzymów w procesie nowotworzenia skłoniło naukowców do pracy nad lekami będącymi inhibitorami matryksyn. W związku z powyższym w ramach terapii celowanej wprowadzono do użycia kilka tego typu leków. Początkowo były to leki o szerokim spektrum działania, które hamowały większość MMP, np. marimastat. Jednakże ze względu na uciążliwe skutki uboczne oraz słaby efekt terapeutyczny rozpoczęto badania nad bardziej selektywnymi inhibitorami, i tak powstały BMS-275291 i neovastat (dodatkowo posiadają zdolność do hamowania angiogenezy) oraz prinomastat [7]. Mimo pewnych postępów, leki te nadal istotnie nie poprawiły czasu przeżycia pacjentów. Obecnie uważa się matryksyny za wielofunkcyjne cząsteczki, które uwikłane są w sieć wzajemnych zależności i trudno jest uzyskać pożądany efekt leczniczy, skupiając się tylko na wybranych, jednostkowych cechach tych enzymów. Badania dotyczące terapii celowanej znajdują się w fazie początkowej, budzą jednak nadzieję na znaczny postęp w leczeniu raka płuc.

Białka morfogenetyczne kości, oprócz ważnej roli w procesie tworzenia kości, odgrywają rolę w rozwoju układu oddechowego w okresie embriogenezy, a także, być może, w rozwoju nowotworów płuc. Warto wspomnieć o dwóch przedstawicielach nadrodziny TGF- β : BMP-2 i BMP-4. Zostało udowodnione, że BMP-2 przyczynia się do stymulacji wzrostu raka płuc poprzez pobudzenie angiogenezy, zwiększenie przeżycia komórek nowotworowych oraz stymulację syntezy różnych cytokin [23]. Natomiast BMP-4 hamuje wzrost pewnych typów raka płuc [26].

Podsumowując, nie ma wątpliwości co do roli metaloproteinaz i ich inhibitorów w patogenezie nowotworów płuc, jakkolwiek niezbędne są dalsze, szczegółowe badania w celu poznania wzajemnych oddziaływań pomiędzy metaloproteinazami, ich tkankowymi inhibitorami oraz podścieliskiem, które jak wspomniano wcześniej, aktywnie uczestniczy we wszystkich procesach związanych z nowotworzeniem. Jest to ważne tym bardziej, przy tworzeniu nowych leków. Konieczna jest też dalsza poprawa właściwości terapeutycznych już istniejących na rynku inhibitorów metaloproteinaz. Natomiast znaczenie białek morfogenetycznych kości w raku płuc stoi pod znakiem zapytania.

PIŚMIENNICTWO

1. Kosacka M, Jankowska R (2007) Epidemiologia raka płuc. *Pneumonol Alergol Pol* 75: 76-80
2. Mino N, Takenaka K, Sonobe M, Miyahara R, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F (2007) Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 95: 250-257
3. Januszewicz W, Kokot F (2006) *Interna*, t. I. Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, str. 471-487
4. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839
5. Vu TH, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14: 2123-2133
6. Gross J, Lapiere CM (1962) Catalytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014-1022

7. Ohbayashi H (2002) Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 3: 409-421
8. Ziemka-Nałęcz M (2003) Metaloproteazy w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego. *Postepy Biochem* 30: 721-734
9. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-283
10. Coussens L M, Werb Z (1996) Matrix metalloproteinases and development of cancer. *Chem Biol* 3: 895-904
11. Cox G, Steward WG, O'Byrne KJ (1999) The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax* 54: 169-179
12. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516
13. Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Cur Opin Cell Biol* 16: 558-564
14. Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25: 9-34
15. Reichenberger F, Eickelberg O, Wyser C, Perruchoud AP, Roth M, Tamm M (2001) Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer. *Swiss Med Wkly* 131: 273-279
16. Miyazono K, Maeda S, Imamura T (2005) BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 251-263
17. Ducey P, Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57: 2207-2214
18. Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 22: 233-241
19. Rengachary SS (2002) Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus* 13: e2
20. Dimitriou R, Giannoudis PV (2005) Discovery and development of BMPs. *Injury* 36: 28-33
21. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899
22. Zhu NL, Li C, Huang HH, Sebald M, Londhe VA, Heisterkamp N, Warburton D, Bellusci S, Minoo P (2007) TNF-alpha represses transcription of human bone morphogenetic protein-4 in lung epithelial cells. *Gene* 393: 70-80
23. Langenfeld EM, Kong Y, Langenfeld J (2005) Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of Smad-1/5. *Oncogene* 25: 685-692
24. Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J (2005) Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 80: 1028-1032
25. Langenfeld EM, Langenfeld J (2004) Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2: 141-149
26. Buckley S, Shi W, Driscoll B, Ferrario A, Anderson K, Warburton D (2004) BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: 81-86
27. Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, Chow KC (2004) Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 12: 717-723
28. Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taeye G, Simm A, Silber RE, Burdach S (2005) Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11: 1086-1092
29. Ishikawa S, Takenaka K, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Otake Y, Hasegawa S, Wada H, Tanaka F (2004) Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10: 6579-6585
30. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 190: 150-156
31. Karameris A, Panagou P, Tsilalis T, Bouros D (1997) Association of expression of metalloproteinases and their inhibitors with the metastatic potential of squamous-cell lung carcinomas. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1930-1936
32. Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H (1997) Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms. *Hum Pathol* 28: 613-622
33. Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Galler KC, Carmichael J (1993) Association between expression of activated 72-Kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 574-578
34. Schütz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinnert M (2002) Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumor Biol* 23: 179-184
35. Passlick B, Siel W, Seen-Hibler R, Wöckel W, Thetter O, Mutschler W, Pantel K (2000) Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6: 3944-3948
36. Cox G, Jones JL, O'Byrne KJ (2000) Matrix metalloproteinase 9 and epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2349-2355
37. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier JM, Birembaut P (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer* 72: 556-564
38. Leinonen T, Pirinen R, Böhm J, Johansson R, Ropponen K, Kosma V (2006) Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer. Relation to clinicopathological factors, β -catenin and prognosis. *Lung Cancer* 51: 313-321
39. Simi L, Andreani M, Davini F, Janni A, Pazzagli M, Serio M, Orlando C (2004) Simultaneous measurement of MMP9 and TIMP1 mRNA in human non-small cell lung cancers by multiplex real time RT-PCR. *Lung Cancer* 45: 171-179
40. Kren L, Goncharuk VN, Krenová Z, Stratil D, Hermanová M, Skricková J, Sheenhan CE, Ross JS (2006) Expression of matrix metalloproteinases 3, 10 and 11 (stromelysins 1, 2 and 3) and matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) by cancer cells in non-small cell lung neoplasms. *Clinicopathologic studies. Cesk Patol* 42: 16-19
41. Hsu CP, Shen GH, Ko JK (2006) Matrix metalloproteinase-13 expression is associated with bone marrow microinvolvement and prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 52: 349-357
42. Fong KM, Kida Y, Zimmerman PV, Smith PJ (1996) TIMP1 and adverse prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1369-1372
43. Aljada IS, Ramnath N, Donohue K, Harvey S, Brooks JJ, Wiseman SM, Khoury T, Loewen G, Slocum HK, Anderson TM, Bepler G, Tan D (2004) Upregulation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein is associated with progression of human non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22: 3218-3229
44. Yamamura T, Nakanishi K, Hiroi S, Kumaki F, Sato H, Aida S, Kawai T (2002) Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase -2 in nonsmall cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 35: 249-255
45. Sasaki H, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, Kiriya M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y (2001) Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res* 101: 242-247
46. Hoikkala S, Paakkö P, Soini Y, Mäkitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T (2006) Tissue MMP-2/TIMP-2-complex are better prognostic factors than serum MMP-2, MMP-9 or TIMP-1 in stage I - III lung carcinoma. *Cancer Lett* 236: 125-132

47. Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM (1997) Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal Hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J Biol Chem* 272: 15496-15500
48. Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J (2003) The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24: 1445-1454
49. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, Klein C, Passlick B, Pantel K (2003) Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 103: 647-651
50. Delebecq TJ, Porte H, Zerimech F, Copin MC, Gouyer V, Dacquembonne E, Balduyck M, Wurtz A, Huet G (2000) Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 6: 10086-1092
51. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H (1997) Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 47; 461-469
52. Pinto CA, Carvalho PE, Antonângelo L, Garippo A, Da Silva AG, Soares F, Younes R, Beyruti R, Takagaki T, Saldiva P, Vollmer RT, Capelozzi VL (2003) Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 9: 3098-3104
53. Yamaguchi NH, Lichtenfels AJ, Demarchi LM, Da Silva AP, Garippo AL, Alves VF, Michelin C, Azevedo PM, Moya T, Takagaki T, Saldiva PH, Vollmer RT, Capelozzi VL (2004) COX-2, MMP-9, and noguchi classification provide additional prognostic information about adenocarcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 121: 78-86
54. Fujise N, Nanashima A, Taniguchi Y, Matsuo S, Hatano K, Matsumoto Y, Tagawa Y, Ayabe H (2000) Prognostic impact of cathepsin B and matrix metalloproteinase-9 in pulmonary adenocarcinomas by immunohistochemical study. *Lung Cancer* 27: 19-26
55. Gill JH, Kirwan IG, Seargent JM, Martin SW, Tijani S, Anikin VA, Mearns AJ, Bibby MC, Anthoney A, Loadman PM (2004) MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia* 6: 777-785
56. Drác P, Klein J, Tichý T, Kolek V, Skarda J (2007) Prognostic impact of matrix metalloproteinases 2, 9, and 11 in stromal cells stage I non-small cell lung cancer. *Cas Lek Cesk*. 146: 45-47
57. Bodey B, Bodey B, Gröger AM, Siegel SE, Kaiser HE (2001) Invasion and metastasis: the expression and significance of matrix metalloproteinases in carcinomas of the lung. *In Vivo* 15: 175-180
58. Fernández CA, Moses MA (2006) Modulation of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 523-529
59. Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Vollmer RT, Schreiber EG, Oosterwijk E, Kelley MJ (2005) Expression of HIF-1 α , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 49: 325-335

Expression of bone morphogenetic proteins, matrix metalloproteinases and inhibitors of matrix metalloproteinases in lung cancers and their prognostic significance

Magdalena Bieniasz[✉], Jacek Bartkowiak, Janusz Szemraj

Department of Medical Biochemistry, Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz

[✉]e-mail: madicom@wp.pl

Key words: bone morphogenetic protein, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, lung cancer

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMP) and their tissue inhibitors (TIMP) are one of the molecules that have become a topic of great interest among scientists studying lung cancers. There is a distinct tendency toward higher expression of selected MMP and TIMP in tumor lung tissue. Furthermore, there is a significant correlation between high expression of TIMP-1 or MMP-2 in lung cancer and shortened survival and between high expression of TIMP-1 or MMP-7 in lung cancer and higher stage of disease. There have been only a few articles about the role of bone morphogenetic proteins (BMP) in lung cancer pathogenesis published so far in which BMP-2 or BMP-4 were overexpressed. It was also shown that BMP-2 stimulates tumor growth while BMP-4 inhibits it. This article is mainly concentrated on the expression of MMP, TIMP and BMP in lung cancers, but also it shows the significance of these proteins.

Mechanizmy chroniące przed toksycznością homocysteiny

Podwyższone stężenie homocysteiny (Hcy) jest skorelowane z występowaniem u ludzi chorób, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, choroby neurodegeneracyjne oraz choroby nerek. Hcy występuje we krwi w kilku formach. Najbardziej reaktywną formą Hcy jest tiolakton homocysteiny (HcyTI). Związek ten spontanicznie wiąże się z białkami (homocysteinylacja), upośledzając ich funkcje. Skoro organizmy przeżywają mimo toksyczności HcyTI podejrzewano, że istnieją mechanizmy chroniące je przed szkodliwym działaniem tego związku. Jako pierwszy odkryto mechanizm hydrolizy HcyTI do Hcy przez enzym zależny od jonów wapnia, występujący w surowicy ssaków, paraoksonazę. Do momentu odkrycia mechanizmu hydrolizy HcyTI fizjologiczna funkcja paraoksonazy była nieznana. Inne mechanizmy obronne, wykryte w późniejszym okresie, obejmują wydalanie HcyTI z moczem i rozkład HcyTI do Hcy przez wewnątrzkomórkowy enzym, hydrolazę bleomycyny. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat toksyczności Hcy i mechanizmów obronnych, ze szczególnym uwzględnieniem hydrolazy bleomycyny/tiolaktonazy homocysteiny.

WPROWADZENIE

Hcy występuje we krwi człowieka w kilku formach, jako tiolakton homocysteiny (HcyTI), w połączeniu z białkami przez grupę ϵ -aminową lizyny lub wiązaniami disiarczkowymi, w formie homocystyny, w połączeniu z cysteiną wiązaniami disiarczkowymi oraz w formie niezwiązanej [1]. Najbardziej reaktywną formą Hcy jest HcyTI, który wiąże się spontanicznie z białkami (w reakcji homocysteinylacji), upośledzając funkcje tych białek [1]. Stężenie HcyTI w kulturach komórkowych i tkankowych *in vitro* jest proporcjonalne do stężenia Hcy [2,3]. Homocysteinylację białek obserwowano w kulturach tkankowych zawierających nawet niewielkie, fizjologiczne stężenia HcyTI; wzrost stężenia HcyTI wzmacniał homocysteinylację [3]. Z tego względu uważa się, że to właśnie HcyTI jest czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane anomalie towarzyszące wzrostowi stężenia Hcy [3]. W ostatnim okresie w polskich czasopiśmie naukowych opublikowano prace omawiające metabolizm homocysteiny oraz molekularne mechanizmy jej biotoksyczności [4], homocysteinylację białek w rozwoju miażdżycy [5] oraz udział HcyTI w niektórych chorobach człowieka [6]. W niniejszym artykule przeglądowym opisano mechanizmy detoksykacji HcyTI ze szczególnym uwzględnieniem nowego, niedawno odkrytego mechanizmu

Jarosław Zimny

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań; e-mail: zimny@au.poznan.pl

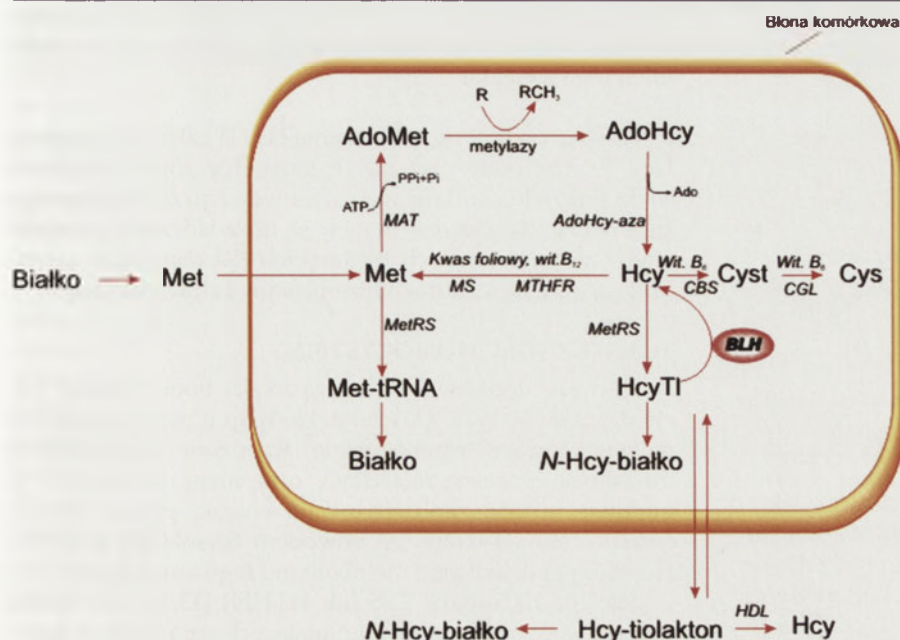
Artykuł otrzymano 21 sierpnia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 10 października 2007 r.

Słowa kluczowe: homocysteina, tiolakton homocysteiny, hydrolaza bleomycyny, tiolaktonaza, choroba Alzheimera, choroby serca.

Stosowane skróty: BLH – hydrolaza bleomycyny; CBS – syntaza β -cystationinowa; Hcy – homocysteina; HcyTI – tiolakton homocysteiny; IleRS – syntetaza izoleucylo-tRNA; LeuRS – syntetaza leucylo-tRNA; MetRS – syntetaza metionilo-tRNA; MS – syntetaza metioniny; MTHFR – reduktaza metylenotetrahydrofolianu; tHcy – homocysteina całkowita

Podziękowanie: Autor dziękuje prof. dr hab. Andrzejowi Guranowskiemu za pomoc przy pisaniu artykułu

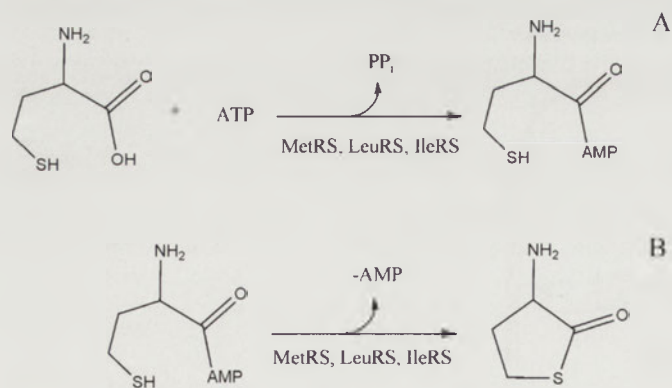


Rycina 1. Metabolizm homocysteiny. Opis w tekście. Przy tworzeniu ryciny korzystano z wielu źródeł, m. in. [7,8].

hydrolizy enzymatycznej, który powszechnie występuje w komórkach eukariotycznych.

METABOLIZM HOMOCYSTEINY

Homocysteina jest uznawana za niebiałkowy amino-kwas będący metabolitem pośrednim na szlakach przemian metioniny i cysteiny. Powstaje z przyjmowanej w pokarmie metioniny. Po strawieniu białek część metioniny jest wykorzystywana do biosyntezy nowych białek a część jest adenylowana przez transferazę adenozylo-metioninową (EC 2.5.1.6, MAT) do S-adenozylometioniny (AdoMet), która jest przede wszystkim uniwersalnym donorem grupy metylowej. Biorcami grupy metylowej mogą być fosfolipidy, białka, polisacharydy, kreatyna, karnityna, DNA i RNA. Po oddaniu grupy metylowej z AdoMet powstaje S-adenozylhomocysteina (AdoHcy), która dzięki reakcji katalizowanej przez swoistą hydrolazę jest następnie rozkładana do homocysteiny i adenozyliny. Homocysteina jest dalej metabolizowana głównie w trzech procesach: a) transulfuracji do cysteiny, b) remetylacji do metioniny oraz c) cyklizacji do tiolaktonu homocysteiny (HcyTI). W wyniku reakcji transulfuracji, katalizowanej przez syntazę β -cystationinową (EC 4.2.1.22, CBS), homocysteina przekształcana jest do cystationiny (Cyst), a następnie, przy udziale γ -liazy cystationinowej (EC 4.4.1.1, CGL), do cysteiny (Cys). Do zajścia tych reakcji niezbędna jest witamina B₆. Remetylacja do metioniny zachodzi w reakcjach katalizowanych przez syntazę metioniny (EC 4.2.99.10, MS) oraz reduktazę metylenotetrahydrofolianu (EC 1.5.1.20, MTHFR). Do przeprowadzenia tych reakcji niezbędne są kwas foliowy i witamina B₁₂. Trzecie przekształcenie, jakiemu podlega Hcy w komórkach, to cyklizacja do tioestru: tiolaktonu. Katalizują ją niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA. Mianowicie syntetazy: metionyno-tRNA (EC 6.1.1.10, MetRS), leucylo-tRNA (EC 6.1.1.4, LeuRS) i izoleucylo-tRNA (EC 6.1.1.5, IleRS) [9] (Reakcja 1). Wymienione procesy zachodzą u drożdży i ssaków [1-3].



Reakcja 1. Synteza HcyTI przez niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA. A - błędna aktywacja homocysteiny, B - synteza HcyTI.

W normie, Hcy jest metabolizowana przede wszystkim na drodze transulfuracji oraz remetylacji. Jednak w sytuacji, gdy jedna lub obie te przemiany zostaną upośledzone, np. przez obniżenie stężeń koenzymów i w konsekwencji obniżenie aktywności kluczowych enzymów tych szlaków lub przez polimorfizm, mający wpływ na efektywność enzymów katalizujących te kluczowe reakcje, wzrasta się

Tabela 1. Zestawienie zależności pomiędzy genotypem a stężeniami HcyTI w surowicy człowieka [9,10].

Genotyp	Liczba obiektów	Stężenie tiolaktonu Hcy (nM)		
		Średnia (SD)	Mediana	Przedział
MTHFR -/- CBS +/+	4	15,0 (21,6)	4,9	2,9-47,8
MTHFR -/+ CBS +/+	6	0,5 (0,29)	0,5	0,1-1,0
MTHFR +/+ CBS +/+	9	0,2 (0,14)	0,15	0,1-0,4
MTHFR +/+ CBS -/-	14	14,4 (30,4)	2,8	<0,1-100,8

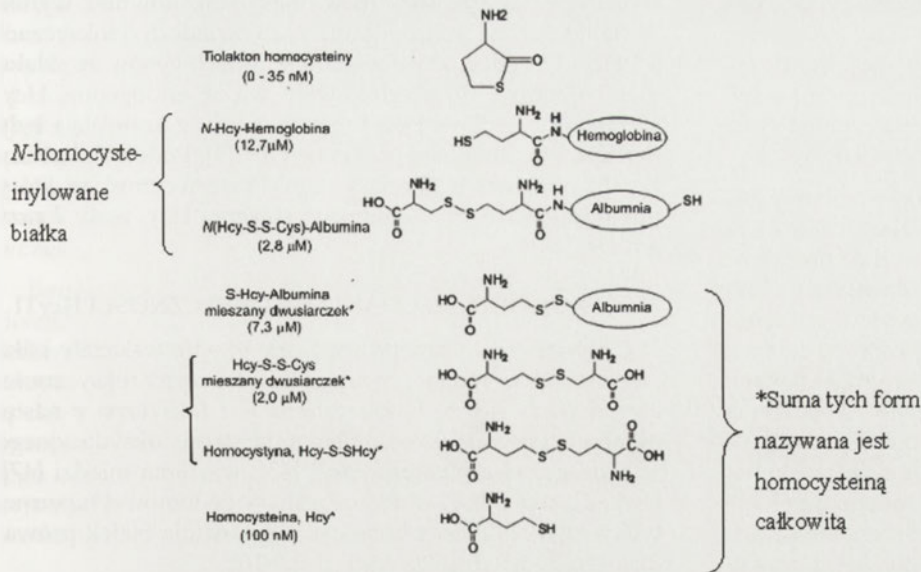
przekształcanie Hcy do HcyTI (Tabela 1). U osób posiadających nieaktywne wersje genów kodujących MTHFR lub CBS zaobserwowano podwyższone stężenie HcyTI w surowicy. Najwyższe stężenie HcyTI stwierdzono u osób będących homozygotami względem genu kodującego nieaktywną MTHFR lub CBS. Najniższe stężenie HcyTI w surowicy miały osoby posiadające po dwie kopie genów kodujących aktywne warianty MTHFR i CBS [9,10].

Homocysteina występuje w krwi człowieka w kilku formach (Ryc. 2) [1]: jako tiolakton homocysteiny (forma 1, w stężeniach 0-35 nM); w połączeniu z białkami przez grupę ϵ -aminową lizyny (forma 2, w stężeniu ok. 15,5 μ M); w połączeniu z białkami wiązaniami disiarczkowymi (forma 3, w stężeniu ok. 7,3 μ M); jako homocystyna oraz połączona z cysteiną wiązaniami disiarczkowymi (forma 4, w stężeniu ok. 2 μ M); w formie wolnej (forma 5, w stężeniu ok. 0,1 μ M). Homocysteina w formach 3-5 jest oznaczana w standardowych testach i określana jako homocysteina całkowita (tHcy) [11,12]. Jednak w tych standardowych pomiarach tHcy, polegających na pomiarze stężenia homocysteiny we krwi w warunkach redukujących, pomija się około 60% Hcy obecnej we krwi, ale związanej kowalencyjnie z białkami. Niskie stężenie HcyTI w krwi człowieka tłumaczy się istnieniem mechanizmów hydrolizy enzymatycznej oraz wydalaniem tego związku.

Wewnątrzkomórkowe stężenie HcyTI zależy od stężenia Hcy. *In vitro* podwyższenie stężenia Hcy poprzez dodanie jej do pożywki skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia HcyTI. Dowodem na to są doświadczenia przeprowadzone na drożdżach piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) [2] oraz na kulturach fibroblastów człowieka [3,9].

TOKSYCZNOŚĆ HOMOCYSTEINY

Pierwsze doniesienia o toksyczności homocysteiny pochodzą z lat 60-tych XX wieku, kiedy to u osób cierpiących na występujące równocześnie wrodzone upośledzenie umysłowe, wczesną miażdżycę oraz nieprawidłowości w budowie kości, zaobserwowano wysoki poziom homocysteiny. Stwierdzono, że powodem wysokiego poziomu Hcy było upośledzenie metabolizmu tego aminokwasu polegające na dysfunkcji CBS lub MTHFR [13,14]. Do dzisiaj przeprowadzono wiele badań mających sprawdzić te korelacje oraz wyjaśnić ich charakter. Wyodrębniono jednostkę chorobową charakteryzującą się podwyższonym stężeniem



Hcy i nazwano ją homocystynurią (hiperhomocysteinemią; HHcy). Za normalne stężenie Hcy, oznaczanej we krwi po zredukowaniu mostków disiarczkowych, przyjęto $<10 \mu\text{M}$. Stężenie od 10 do $50 \mu\text{M}$ to umiarkowana hiperhomocysteinemia, która może być wynikiem powodowanego heterozygotycznością niedoboru CBS, homozygotycznością częstej mutacji C677C→T w genie kodującym MTHFR, niedoczynnością nerek lub niedoborem kwasu foliowego, wit. B₆ i wit. B₁₂. Stężenie Hcy $>50 \mu\text{M}$ to ciężki wariant hiperhomocysteinemii powodowany występowaniem pod postacią homozygoty wadliwej wersji genu kodującego CBS lub MTHFR [7,15]. Podwyższone stężenie Hcy u ludzi ma poważne konsekwencje. Wyniki badań potwierdzają, że może ono mieć związek z co najmniej trzema kategoriami chorób.

Pierwszą są choroby sercowo-naczyniowe, dla których HHcy stanowi niezależny czynnik ryzyka pozwalający przewidzieć podwyższoną śmiertelność u chorych ze stwierdzoną chorobą wieńcową [16]. Podwyższone stężenie Hcy występuje u chorych z chorobą niedokrwienną serca [17,18] oraz po udarze [19]. Badania populacyjne prowadzone przez 8 lat na osobach po 60. roku życia wykazały, że podwyższone stężenie Hcy sprzyja występowaniu choroby niedokrwiennej serca [20]. Wykazano też, że podwyższenie stężenia Hcy u zdrowych osób powoduje dysfunkcje śródbłonna [21].

Druga kategoria chorób skorelowanych z HHcy to choroby neurodegeneracyjne oraz psychiczne [15,22]. Podwyższone stężenie Hcy jest czynnikiem wskazującym ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera [23]. HHcy zaobserwowano u chorych na chorobę Parkinsona i depresję [24]. Wykazano, że podwyższone stężenie Hcy obniża sprawności funkcjonowania mózgu u osób w podeszłym wieku [25]. Wyniki najnowszych badań wykazały, że dzieci matek z HHcy mających podwyższone stężenie Hcy w trzecim trymestrze ciąży dwukrotnie częściej zapadały na schizofrenię w porównaniu z kontrolą [26].

Trzecia grupa chorób to choroby nerek, w których podwyższone stężenie Hcy może mieć związek z upośledze-

niem wydalania tego aminokwasu [9]. Chorzy poddawani hemodializie mieli średnio pięciokrotnie wyższe stężenie tHcy w porównaniu z osobami zdrowymi [27]. Wykazano również toksyczność podwyższonego poziomu Hcy u chorych poddawanych dializie [28,29]. Badania dializowanych pacjentów dowiodły, że HHcy pozwala przewidzieć śmiertelność z powodu niedoczynności serca [30].

Podjezwano też, że podwyższone stężenie Hcy wpływa negatywnie na układ kostny ludzi w podeszłym wieku. W celu sprawdzenia wpływu Hcy na mineralną gęstość kości, ryzyko złamań i obrót kostny (*bone turnover*), przeprowadzono badanie 996 kobiet w wieku 75 lat. W ciągu trwającego 7 lat eksperymentu stwierdzono, że podwyższone stężenie Hcy, powoduje przyspieszony obrót kostny i przyczynia się do zmniejszenia gęstości mineralnej kości. Nie stwierdzono jednak związku pomiędzy Hcy a ryzykiem złamań kości [31].

W Norwegii od 1992 roku trwają badania populacyjne (Hordaland Homocysteine Study) nad homocysteiną i jej związkiem z chorobami człowieka. W sumie w badaniach tych uczestniczyło ponad 18000 osób. Stwierdzono, że wysokie stężenie Hcy w surowicy jest zależne m. in. od ilości wypalanych papierosów, filiżanek wypitej kawy, podwyższonego ciśnienia krwi oraz całkowitego stężenia cholesterolu. Obniżeniu stężenia Hcy sprzyja aktywność fizyczna, kwas foliowy i witamina B₁₂. Wykazano, że istnieje związek pomiędzy podwyższonym stężeniem Hcy a śmiertelnością spowodowaną niewydolnością sercowo naczyniową i pomiędzy podwyższonym stężeniem Hcy a śmiertelnością z pozostałych powodów. Porównano osoby mające stężenie tHcy w przedziałach 9,0-11,9; 12,0-14,9; 15,0-19,9 lub $\geq 20 \mu\text{M}$ z osobami mającymi stężenie tHcy $<9 \mu\text{M}$. Wzrost stężenia tHcy o $5 \mu\text{M}$ skorelowano z 49% wzrostem ogólnej śmiertelności, a w szczególności z 50% wzrostem śmiertelności z powodu niewydolności sercowo naczyniowej, 26% wzrostem śmiertelności spowodowanej nowotworami i 104% wzrostem śmiertelności z innych powodów. Autorzy omawianych badań doszli do wniosku, że podwyższone stężenie Hcy we krwi pozwala przewidzieć ryzyko śmier-

ci w populacji osób pomiędzy 65 a 72 rokiem życia. Poza tym skorelowano podwyższone stężenie tHcy z częstym występowaniem komplikacji natury medycznej, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, depresja, osteoporoza lub komplikacje podczas ciąży, natomiast niskie stężenie tHcy z lepszym zdrowiem psychicznym i fizycznym [32].

W krwi człowieka stężenie Hcy związanej z białkami jest związane ze stężeniem tHcy [33]. Z kolei wzbogacenie diety witaminami B₆, B₁₂ i kwasem foliowym powoduje obniżenie stężenia Hcy w osoczu [34]. W celu sprawdzenia czy obniżenie stężenia Hcy we krwi może być korzystne przeprowadzono badania populacyjne z udziałem osób po udarze. Przez 7 lat trwania eksperymentu, u osób, którym podawano witaminę B₁₂ i kwas foliowy (co doprowadziło do obniżenia stężenia Hcy) zaobserwowano mniejszą częstość występowania ponownego udaru, zawału lub śmierci, w porównaniu z kontrolą [19]. Również pacjenci z chorobami nerek zyskali na podawaniu kwasu foliowego. Po dwóch miesiącach terapii doprowadzono do stanu normalnego N-homocysteinylicacji białek w ich osoczu i zredukowano stężenie Hcy-S-S-białek [28]. Od 1998 roku w Stanach Zjednoczonych i w Kanadzie rozpoczęto dodawanie kwasu foliowego do mąki. Przyczyniło się to w znacznym stopniu do zredukowania liczby zgonów spowodowanych udarem. W USA przed rokiem 1998 spadek śmiertelności spowodowanej udarem wynosił 0,3% na rok, natomiast w latach 1998–2000 odnotowano spadek śmiertelności wynoszący 2,9% na rok. Podobnie w Kanadzie spadek śmiertelności zmienił się z 1% przed rokiem 1998 na 5,4% w okresie dodawania kwasu foliowego do mąki. W krajach tych w latach 1998–2000 nie stwierdzono zmiany innych niezależnych czynników wpływających na ryzyko wystąpienia udaru, które mogłyby wpłynąć na wynik eksperymentu. W tym samym czasie w Anglii i Walii, gdzie nie wzbogacano diety kwasem foliowym, nie odnotowano zmian śmiertelności w wyniku udaru [35].

Podwyższone stężenie homocysteiny jest również korażone z uszkodzeniami płodu i zaburzeniami ciąży [36,37]. W badaniach nad płodami kurczaków wykazano zależną od stężenia toksyczność HcyTI w zakresie od 0,5 do 20 μM [38]. Jak dotąd jednak nie udało się potwierdzić bezpośredniego wpływu Hcy, w fizjologicznych stężeniach, na powstawanie wad embrionów ssaków *in vitro* [39,40]. Różnica pomiędzy embrionami ptaków i ssaków może być spowodowana tym, że we krwi ptaków nie ma enzymu hydrolizującego HcyTI, który jest obecny we krwi ssaków [41].

Wyniki doświadczeń na liniach komórkowych również wskazują na toksyczność Hcy. W kulturach neuronów, Hcy indukowała śmierć komórek i powodowała wzrost toksyczności β-amyloidu [23]. Hcy indukowała też apoptozę komórek śródbłonna człowieka [42]. W innych badaniach komórki śródbłonna człowieka poddane działaniu Hcy w stężeniach od 0,2 do 5 mM wykazywały zależne od stężenia hamowanie wzrostu, spadek syntezy DNA oraz zmianę profilu ekspresji genów [43]. Hcy powodowała uszkodzenia DNA i zaburzenia w namnażaniu limfocytów T *in vitro* [44]. Dodatek Hcy w formie tiolaktonu Hcy do pożywki w stężeniu od 50 do 400 μM powodował, zależne od stężenia, zahamowanie wzrostu trofoblastów człowieka *in vitro*, stres siateczki śródplazmatycznej oraz syntezę białek charaktery-

stycznych dla apoptozy (p53 i Bak) [45]. Również wyniki doświadczeń na mikroorganizmach świadczą o toksyczności Hcy. Drożdże, które w skutek mutacji genów ze szlaku metabolizmu Hcy, produkowały więcej endogennej Hcy, wzrastały o 16% wolniej w porównaniu z kontrolą i były bardziej wrażliwe na egzogenną Hcy [3]. Podobnie kultury *E. coli* hodowane w obecności 8 mM kwasu octowego, który powoduje wzrost endogennego stężenia Hcy, rosły 2 razy wolniej [46].

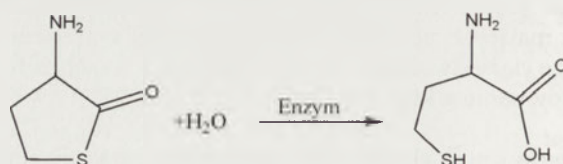
MOLEKULARNY MECHANIZM TOKSYCZNOŚCI HcyTI

Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* wskazały kilka mechanizmów mogących wyjaśnić przyczyny toksyczności Hcy. Uważa się, że homocysteina jest toksyczna z następujących powodów: wywoływania stresu oksydacyjnego w siateczce śródplazmatycznej [43], wiązania miedzi [47], uszkodzenia DNA [44,48], udziału w genomowej hipermetylacji DNA [49] oraz homocysteinyłowania białek prowadzącego do ich dezaktywacji [1-6,8-10].

Spośród zaproponowanych, homocysteinyłacja białek jest uważana za najbardziej prawdopodobną przyczynę toksyczności homocysteiny [3]. Pozostałe procesy były bowiem obserwowane dopiero przy wysokich stężeniach Hcy rzędu 100–1000 μM, podczas gdy homocysteinyłację białek można było obserwować w kulturach tkankowych zawierających zaledwie 0,2 nM stężenie HcyTI, a wzrost stężenia HcyTI wzmacniał homocysteinyłację [3]. Znaczącym argumentem przemawiającym za istotnością tego właśnie procesu są wyniki badań wykazujące konsekwencje homocysteinyłacji. Udowodniono, że N-homocysteinyłowane białka występują w krwi człowieka [33]. Dowiedziono również, że takie N-Hcy-białka jak hemoglobina, albumina i cytochrom c łatwiej agregują [1], a N-homocysteinyłowana albumina oraz fibrynogen wykazują zmniejszoną podatność na proteolizę [50]. Ponadto stwierdzono, że homocysteinyłacja wpływa na stan oksydoredukcyjny cytochromu c [51], a także indukuje tworzenie przeciwciał swoistych wobec N-homocysteinyłowanych białek [52]. Przeciwciała te występują w surowicy człowieka; ich podwyższony poziom obserwowano u osób z chorobami serca lub po udarze [53]. Z tego względu przeciwciała te mogłyby być wykorzystywane jako marker wskazujący na niekorzystne zmiany sercowo-naczyniowe ([52], patrz także [1]).

MECHANIZMY OCHRONY PRZED TOKSYCZNOŚCIĄ HOMOCYSTEINY

Doniesienia o potencjalnej toksyczności tiolaktonu homocysteiny spowodowały wzrost zainteresowania metabolizmem tego związku. W 2000 roku Jakubowski odkrył w surowicy człowieka aktywność hydrolizującą HcyTI do Hcy (Reakcja 2) [41]. Własność tę ma białko o masie 45-kDa. Ta



Reakcja 2. Enzymatyczny rozkład HcyTI.

aktywność tiolaktonazowa jest zależna od jonów wapnia. Enzym charakteryzuje się wąską specyficznością substratową. Syntetyzowany jest w wątrobie. Występuje w surowicy innych ssaków i jest składnikiem HDL (ang. *high density lipoprotein* – lipoproteiny o wysokiej gęstości). Okazał się identyczny z wykrytą wcześniej, występującą w surowicy paraoksonazą (EC 3.1.1.2): enzymem hydrolizującym fosforany organiczne. Jego naturalny substrat oraz funkcja były wcześniej nieznanne.

Badania potwierdzają związek pomiędzy aktywnością tiolaktonazy/paraoksonazy a chorobami serca [54] oraz arteriosklerozą [55]. Myszy pozbawione genu kodującego ten enzym były podatne na arteriosklerozę [56]. Badania prospektywne, w których mierzono aktywność tiolaktonazy/paraoksonazy u ludzi wykazały, że obniżona aktywność tego enzymu pozwala przewidzieć wystąpienie chorób naczyniowych [57]. Wyniki tych doświadczeń są kolejnym dowodem pośrednim na toksyczność homocysteiny.

Jak wspomniano wcześniej, w kulturach fibroblastów człowieka zaobserwowano zależność pomiędzy stężeniem Hcy a stężeniem HcyTl. Jednak nie znaleziono korelacji pomiędzy stężeniem tHcy a stężeniem HcyTl w osoczu człowieka [58]. Stężenie HcyTl w osoczu człowieka jest dużo niższe niż można by się tego spodziewać na podstawie analizy kultur fibroblastów czy śródbłonna pępowiny [1]. Sugerowało to istnienie efektywnego mechanizmu wydalania HcyTl z organizmu człowieka. Brakującą pulę HcyTl odnaleziono w moczu, gdzie stężenie HcyTl okazało się być ~100 razy wyższe niż we krwi [58].

Opisane mechanizmy detoksykacji HcyTl, takie jak wydalanie z moczem oraz rozkład enzymatyczny, dotyczą w zasadzie tylko ssaków. Wydawało się więc prawdopodobne, że organizmy niższe ewolucyjnie rozwinęły jakiś inny mechanizm obronny przed toksycznością HcyTl. Mógłby na przykład istnieć wewnątrzkomórkowy enzym usuwający HcyTl. Białko posiadające taką aktywność odkryto w drożdżach. Po oczyszczeniu do homogenności i analizie na spektrometrze mas okazało się ono być tożsame ze, znaną od dawna, wewnątrzkomórkową proteazą cysteinową – hydrolazą bleomycyny (BLH) [59,60]. Niedługo potem wyizolowano ten enzym również z łożyska człowieka i potwierdzono jego aktywność tiolaktonazową [60,61].

HYDROLAZA BLEOMYCYNY

Hydrolaza bleomycyny jest białkiem, które wzbudziło zainteresowanie badaczy ze względu na katalizowanie hydrolizy bleomycyny – glikopeptydu produkowanego przez *Streptomyces verticillus*, wykorzystywanego w chemioterapii nowotworów ze względu na zdolność hydrolizowania podwójnej nici DNA. Hydrolaza bleomycyny dezaktywuje bleomycynę hydrolizując jej grupę amidową [62]. BLH jest silnie zachowana ewolucyjnie, jej ortologii znaleziono u bakterii [63], drożdży [64], ptaków [36] i ssaków [65]. Choć jej funkcja fizjologiczna nie była znana, wiadomo było, że jest to białko istotne dla życia organizmów, gdyż gen BLH okazał się potrzebny dla prawidłowego rozwoju prenatalnego myszy [66]. Pojedyncza podjednostka BLH człowieka

(hBLH) ma masę 52 kDa i składa się z 455 aminokwasów. Białko to tworzy heksamer o masie 310 kDa [67].

Hydrolaza bleomycyny jest syntetyzowana wewnątrz komórki. Występuje w wielu tkankach człowieka [67]. Wysoką ekspresję genu kodującego BLH zaobserwowano w jądrach, mięśniach szkieletowych i trzustce a niską w okrężnicy i w leukocytach [65]. Gen kodujący hBLH zlokalizowano na 17 chromosomie [68,69]. Drożdżowe białko (yBLH), znane pod nazwą Gal6, wykazuje 40% podobieństwa sekwencji aminokwasów do hBLH [68]. Zarówno yBLH, jak i hBLH posiadają centrum aktywne charakterystyczne dla rodziny papainowych proteaz cysteinowych. W ich centrach aktywnych występują cysteiny, które są niezbędne dla zachowania aktywności. Przypuszczalnie aktywność tiolaktonazowa i proteazowa BLH są zależne od tego samego centrum aktywnego, gdyż mutacje w rejonie uznanym za centrum aktywności proteazowej [70] powodują utratę obydwu aktywności [60].

Hydrolazy bleomycyny mają aktywność endopeptydazową, która jest nieodwracalnie hamowana przez takie inhibitory proteaz cysteinowych jak E-64 i jodoacetamid [65]. Związki te hamują również aktywność tiolaktonazową yBLH [60]. Wyniki eksperymentów z różnymi wariantami BLH nadprodukowanymi w *E. coli* oraz eksperymentów ze znanymi inhibitorami aktywności BLH potwierdziły, że obserwowana aktywność tiolaktonazowa jest nową właściwością hydrolazy bleomycyny [60].

Warto wspomnieć, iż nie zaobserwowano aktywności tiolaktonazowej u *E. coli*¹, mimo, że w genomie bakterii występuje gen *PEPC*, będący bakteryjną wersją BLH [63]. Wydaje się więc, że bakteryjna BLH, w przeciwieństwie do drożdżowej, nie bierze udziału w metabolizmie HcyTl. W doświadczeniach na drożdżach wykazano, że BLH spełnia funkcję ochronną przed toksycznością homocysteiny. Udowodniono, że szczep zmutowanych drożdży pozbawionych genu *BLH1* rósł wolniej na pożywkach zawierających Hcy, niż szczep dziki oraz stwierdzono mniejszą przeżywalność szczepu bez BLH, na pożywkach zawierających 10 mM Hcy, w porównaniu ze szczepem posiadającym hydrolazę bleomycyny [60].

Istnieją przesłanki, aby podejrzewać, że u ludzi BLH może mieć związek z rozwijaniem się choroby Alzheimera. Enzym ten zlokalizowano bowiem w złogach neuronalnych (ang. *senile plaques*) u chorych na Alzheimera [70]. Ze względu na aktywność proteolityczną hydrolazy bleomycyny zakładano, że może ona przyczyniać się do powstawania β -amyloidu z białka prekursorowego. Odkryto polimorfizm genu kodującego hBLH i skojarzono go z występowaniem choroby Alzheimera [69]. Polimorfizm ten nie powoduje jednak zmiany konformacji białka [67]. Wyniki doświadczeń *in vitro* wykazały udział BLH w dojrzewaniu β -amyloidu [16], jednak nie stwierdzono zwiększonej ilości mRNA tego enzymu w mózgach osób chorych [71]. Obecność BLH w mózgach osób chorych na Alzheimera, w kontekście detoksykacji Hcy, jest kolejnym wątkiem łączącym podwyższone stężenie homocysteiny z tą chorobą. Jak bowiem wspomniano wyżej hiperhomocysteinemię kojarzy

¹ Zimny, Guranowski, dane niepublikowane.

się od kilku lat z chorobami neurodegeneracyjnymi w tym z chorobą Alzheimera [15,24]. Dodatkowym elementem łączącym podwyższone stężenie Hcy z chorobą Alzheimera jest białko Herp (ang. *homocysteine-induced-endoplasmic-reticulum-protein*). Odkryte w 2000 roku białko Herp pod wpływem podwyższonego stężenia homocysteiny ulega syntezie i jest zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej [72]. W mózgach chorych na chorobę Alzheimera, stwierdzono podwyższony poziom białka Herp, co może mieć wpływ na powstawanie β -amyloidu [73,74].

METABOLIZM HcyTI U ROŚLIN

Jako uzupełnienie należy dodać, że HcyTI może pojawiać się również u roślin. W siewkach łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) rosnącego w obecności aminopteryny, powodującej akumulację Hcy poprzez zablokowanie szlaku remetylacji Hcy do metioniny, obserwowano nagromadzenie się HcyTI. Metionina hamowała proces syntezy HcyTI, co wskazywało na udział syntetazy metionyl-tRNA. Syntetaza metionyl-tRNA z ryżu (*Oryza sativa*) eksprymowana w *E. coli* syntetyzowała HcyTI *in vitro*. Dalsze badania dowiodły, że rośliny są zabezpieczone przed toksycznym działaniem HcyTI, posiadają bowiem enzym degradujący ten związek do Hcy [75]. Roślinna tiolaktonaza różni się od opisanych wyżej tiolaktonaz z surowicy i od BLH przede wszystkim szerszą specyficznością substratów. Poza łubinem żółtym hydrolazę HcyTI odkryto u przedstawicieli dyniowatych [Grzechowiak i Zimny, dane nieopublikowane]. Dotychczas nie badano toksyczności HcyTI u roślin.

PERSPEKTYWY

W niniejszym artykule przeglądowym starano się przybliżyć obecny stan wiedzy o mechanizmach chroniących przed toksycznością homocysteiny. Skupiono się głównie na biochemicznych mechanizmach usuwania HcyTI obserwowanych u człowieka i w drożdżach, gdyż u tych organizmów zostały one najlepiej poznane. Wyniki prezentowane w cytowanych publikacjach pozwalają wytyczyć nowe kierunki wartych podjęcia badań. Szczególnie interesujące wydają się być badania funkcji ochronnej BLH przed toksycznością homocysteiny u człowieka. Ciekawe wydaje się również zbadanie zależności pomiędzy poziomem syntezy i aktywnością BLH, a chorobami neurodegeneracyjnymi.

Hydrolaza bleomycyny stała się przedmiotem badań, gdyż powoduje odporność wielu typów nowotworów na chemioterapeutyk, bleomycynę. Wydaje się, że można by spróbować zastosować HcyTI w terapii nowotworów wrażliwych na bleomycynę, po uprzednim ustaleniu w nich poziomu aktywności BLH i jej ewentualnym zablokowaniu. Tym bardziej, że w wielu tkankach nowotworowych stwierdzono podwyższone stężenie endogennej tiolaktony homocysteiny [76], co może czynić te tkanki bardziej wrażliwymi na toksyczne działanie egzogennej HcyTI. Należałoby jednak wziąć wówczas pod uwagę ryzyko wystąpienia chorób, spowodowanych podwyższonym stężeniem HcyTI, u osób poddawanych terapii.

Zastanawiające jest też to, czy powstawanie HcyTI oraz modyfikacje białek, które związek ten powoduje są tylko

przypadkowymi zjawiskami mającymi negatywne konsekwencje, czy też procesy te mają inne, nieznanne dotąd, znaczenie. Neutralna cząsteczka swobodnie dyfundująca przez błony biologiczne w fizjologicznym pH, ze zdolnością do modyfikacji białek mogłaby być np. elementem układu sygnałowego. Zastosowanie coraz czulszych metod analitycznych pozwalających śledzić losy niemal pojedynczych cząsteczek z pewnością przybliży nas do znalezienia odpowiedzi na te i inne pytania dotyczące metabolizmu Hcy.

PIŚMIENNICTWO

1. Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H (2007) Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 32: 561-572
2. Jakubowski H (1991) Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 10: 593-598
3. Jakubowski H (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures: Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 272: 1935-1941
4. Turski AT, Bald E (2005) Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny – fakty i hipotezy. *Postepy Biochem* 51: 395-406
5. Beltowski J (2005) Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? *Postepy Hig Med Dosw* 59: 392-404
6. Sikora M, Twardowski T, Jakubowski H (2006) Rola tiolaktonu homocysteiny w niektórych chorobach człowieka. *Postepy Biochem* 52: 417-423
7. Lentz SR (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3: 1646-54
8. Jakubowski H (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 136: 1741S-1749S
9. Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 61: 470-487
10. Chwatko G, Boers GH, Strauss KA, Shih DM, Jakubowski H (2007) Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine β -synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J* 21: 1707-1713
11. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow RM, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattström L, Wilcken B, Wilcken DEL, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1704-1706
12. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygård O, Vollset SE (2006) The Hordaland homocysteine study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 136: 1731S-1740S
13. Carson NA, Cusworth DC, Dent CE, Field CM, Neill DW, Westall RG (1963) Homocystinuria: a new inborn error of metabolism associated with mental deficiency. *Arch Dis Child* 38: 425-436
14. McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 56: 111-128
15. Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 580: 2994-3005
16. Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Bair TL, Madsen TE, Pearson RR (2000) Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 102: 1227-1232
17. Giusti B, Marcucci R, Lapini I, Sestini I, Lenti M, Yacoub M, Pepe G (2004) Role of hyperhomocysteinemia in aortic disease. *Cell Mol Biol* 50: 945-952
18. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG (2002) MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 288: 2023-2031


19. Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin intervention for stroke prevention trial; an efficacy analysis. *Stroke* 36: 2404-2409
20. Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Wilson PW (2003) Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA* 289: 1251-1257
21. Chambers JC, Obeid OA, Kooner JS (1999) Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2922-2927
22. Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26: 137-146
23. Seshadri S (2006) Elevated plasma homocysteine levels: Risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 9: 393-398
24. Bottiglieri T (2005) Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1103-1112
25. Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, Breteler MM (2002) Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam scan study. *Neurology* 59: 1375-1380
26. Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, Quensberry CP Jr, Liu L, Brenahan M, Susser ES (2007) Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 64: 31-39
27. Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, de Santo NG (2006) Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney* 69: 869-876
28. Perna AF, Capasso R, Acanfora F, Satta E, Lombardi C, Ingrosso D, Violetti E, Romano MM, De Santo NG (2006) Toxic effects of hyperhomocysteinemia in chronic renal failure and in uremia: cardiovascular and metabolic consequences. *Semin Nephrol* 26: 20-23
29. Perna AF, Capasso R, Lombardi C, Acanfora F, Satta E, Ingrosso D (2005) Hyperhomocysteinemia and macromolecule modifications in uremic patients. *Clin Chem Lab Med* 43: 1032-1038
30. Mallamaci F, Zoccali C, Tripepi G, Fermo I, Benedetto FA, Cataliotti A, Bellanuova I, Malatino LS, Solderini A (2002) Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 61: 609-614
31. Gerdhem P, Ivaska KK, Isaksson A, Pettersson K, Väänänen HK, Obrant KJ, Åkesson K (2007) Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality, and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res* 22: 127-134
32. Refsum H, Nurk E, Smith A D, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygård O, Vollset SE (2006) The Hordaland homocysteine study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 136: 1731S-1740S
33. Jakubowski H (2002) The determination of homocysteine thiolactone in biological samples. *Anal Biochem* 308: 112-119
34. Selhub J (2006) The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *J Nutr* 136: 1726S-1730S
35. Yang Q, Botto L, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H, Friedman JM (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990-2002. *Circulation* 113: 1335-1343
36. Adachi H, Tsujimoto M, Fukasawa M, Sato Y, Arai H, Inoue K, Nishimura T (1997) cDNA cloning and expression of chicken aminopeptidase H, possessing endopeptidase as well as aminopeptidase activity. *Eur J Biochem* 245: 283-288
37. Medina MÁ, Urdiales JL, Amores-Sánchez MI (2001) Roles of homocysteine in cell metabolism Old and new functions. *Eur J Biochem* 268: 3871-3882
38. Rosenquist TH, Ratashak SA, Shelub J (1996) Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15227-15232
39. Greene NDE, Dunlevy LPE, Copp AJ (2003) Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anat Embryol* 206: 185-191
40. Hansen DK, Graaflton TF, Melnyk S, James SJ (2001) Lack of embryotoxicity of homocysteine thiolactone in mouse embryos in vitro. *Reprod Toxicol* 15: 239-244
41. Jakubowski H (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. *J Biol Chem* 275: 3957-3962
42. Zheng W, Johnston SA, Joshua-Tor L (1998) The unusual active site of Gal6/bleomycin hydrolase can act as a carboxypeptidase, aminopeptidase, and peptide ligase. *Cell* 93: 103-109
43. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer IS, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94: 959-967
44. Picerno I, Chirico C, Condello S, Visalli G, Ferlazzo N, Gorgone G, Caccamo D, Ientile R (2007) Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? *Biogerontology* 8: 111-119
45. Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: A mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 191: 563-571
46. Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, Booth IR, (2002) Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology* 148: 2215-2222
47. Linnebank M, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Noelker C, Struys E, Jakobs C, Klockgether T, Evert BO, Kunz WS, Wüllner U (2006) Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells. *Neurobiol Dis* 23: 725-730
48. Huang RS, Huang S, Lin B, Wie J, Liu T (2001) Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 68: 2799-2811
49. Bönsch D, Lenz B, Kornhuber J, Bleich S (2004) Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 111: 1611-1616
50. Glowacki R, Jakubowski H (2003) Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 279: 10864-10871
51. Perla-Kaján J, Marczak L, Kajan L, Skowronek P, Twardowski T, Jakubowski H (2007) Modification by Homocysteine Thiolactone Affects Redox Status of Cytochrome c. *Biochemistry* 46: 6225-6231
52. Undas A, Jankowski M, Twardowska M, Padjas A, Jakubowski H, Szczeklik A (2005) Antibodies to N-homocysteinylation albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men. *Thromb Haemost* 93: 346-50
53. Undas A, Perla J, Laciniski M, Trzeciak W, Kazmierski R, Jakubowski H, (2004) Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 35: 1299-1304
54. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberds DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI (2001) Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1451-1457
55. Heinecke JW, Lusic AJ (1998) Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Am J Hum Genet* 62: 20-24
56. Shih DM, Gu L, Xia Y, Navab M, Li W, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusic AJ (1998) Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394: 284-287
57. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation* 107: 2775-2779
58. Chwatko G, Jakubowski H (2004) The determination of homocysteine thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 337: 271-277
59. Zimny J, Iwanowska D, Starzyńska E, Jakubowski H, Guranowski A (2005) Homocysteine thiolactone is a substrate of bleomycin hydrolase/cysteine protease/gal6 protein. *Clin Chem Lab Med* 43: A23

60. Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H (2006) Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 281: 22485-22492
61. Perdziak M, Zimny J, Jakubowski H, Guranowski A (2005) Human placental protein purified as homocysteine-thiolactone hydrolase has been identified as human bleomycin hydrolase. *Acta Biochim Polon* 52 Suppl 1: 184
62. Sebt SM, Mignano JP, Jani JP, Srimatkandada S, Lazo JS (1989) Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. *Biochemistry* 28: 6544-6548
63. Vesanto E, Vermanen P, Steele JL, Palva A (1994) Characterization and expression of the *Lactobacillus helveticus* pepC gene encoding a general aminopeptidase. *Eur J Biochem* 224: 991-997
64. Enenkel C, Wolf DH (1993) BLH1 codes for a yeast thiol aminopeptidase, the equivalent of mammalian bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 268: 7036-7043
65. Bromme D, Rossi AB, Smeekens SP, Anderson DC, Payan DG (1996) Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry* 35: 6706-6714
66. Schwartz DR, Homanics GE, Hoyt DG, Klein E, Abernethy J, Lazo JS (1999) The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4680-4685
67. O'Farrell PA, Gonzalez F, Zheng W, Johnston SA, Joshua-Tor L (1999) Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease. *Struct Fold Des* 7: 619-627
68. Ferrando AA, Pendast AM, Llano E, Velasco G, Liderau R, Lopez-Otin C (1997) Gene characterization, promoter analysis and chromosomal localization of human bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 272: 33298-33304
69. Montoya SE, Ferrell RE, Lazlo JS (1997) Genomic structure and genetic mapping of the human neutral cysteine protease bleomycin hydrolase. *Cancer Res* 57: 4191-4195
70. Namba Y, Ouchi Y, Takeda A, Ueki A, Ikeda K (1999) Bleomycin hydrolase immunoreactivity in senile plaque in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 830: 200-222
71. Lefterof IM, Koldamova RP, Lefterova MI, Schwartz DR, Lazlo JS (2001) Cysteine 73 in bleomycin hydrolase is critical for amyloid precursor protein processing. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 994-999
72. Malherbe P, Faull RLM, Grayson Richards J (2000) Regional and cellular distribution of bleomycin hydrolase mRNA in human brain: comparison between Alzheimer's diseased and control brains. *Neurosci Lett* 281: 37-40
73. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T (2000) Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 275: 32846-32853
74. Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, Strooper B, Yanagisawa K, Komano H (2002) Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein. *J Biol Chem* 277: 12915-12920
75. Jakubowski H, Guranowski A (2003) Metabolism of homocysteine-thiolactone in plants. *J Biol Chem* 278: 6765-6770
76. Jakubowski H (1997) Synthesis of homocysteine thiolactone in normal and malignant cells W: Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine, Rosenberg I H, Graham I, Ueland P M, Refsum H (red) Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, str. 157-165

Mechanisms that protect against homocysteine toxicity

Jaroslaw Zimny 

University of Agriculture in Poznan, 35 Wołyńska St., 60-637 Poznań, Poland

 e-mail: zimny@au.poznan.pl

Key words: homocysteine, homocysteine thiolactone, bleomycin hydrolase, thiolactonase, Alzheimer's disease, heart disease

ABSTRACT

Elevated concentrations of homocysteine (Hcy) in human tissues have been correlated with some diseases, such as cardio-vascular, neurodegenerative, and kidney disorders. Hcy occurs in human blood in several forms. The most reactive is homocysteine thiolactone (HcyTI). It spontaneously homocysteinylates proteins impairing their functions. As has been evidenced recently, organisms developed protective mechanisms against the HcyTI toxicity. The first mechanism discovered was the calcium-dependent enzyme occurring in mammalian sera, known till then as paraoxonase, which hydrolyzes HcyTI to Hcy. Chronologically second mechanism discovered was urinary excretion of HcyTI. The third protective mechanism is the HcyTI hydrolysis catalyzed by intracellular enzyme known as bleomycin hydrolase. This review outlines current knowledge of the Hcy toxicity and of the three aforementioned protective mechanisms, emphasizing the role of bleomycin hydrolase/homocysteine-thiolactonase.

Etylen uczestniczy w regulacji wielu procesów wzrostu i rozwoju roślin. Szlaki sygnalizacyjne tego hormonu aktywuje pięć zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej receptorów, które swą budową przypominają bakteryjne dwuskładnikowe kinazy histydynowe. W stanie podstawowym receptory etylenu aktywują białko CTR1, które jest negatywnym regulatorem (represorem) jądrowego białka EIN2, będącego z kolei aktywatorem kaskady czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów odpowiedzi roślin na etylen. Poziom białka EIN3, jak i innych elementów szlaku sygnalizacyjnego etylenu, podlega złożonym regulacjom na poziomie transkrypcyjnym i potranslacyjnym, w które zaangażowane są różne czynniki wewnętrzne i środowiskowe.

WPROWADZENIE

Etylen, gazowy hormon roślinny, odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu rośliny na wszystkich etapach jej rozwoju. Wpływa m.in. na kiełkowanie nasion, wzrost, starzenie roślin oraz dojrzewanie owoców [1,2]. Bierze również udział w reakcjach rośliny na różne biotyczne, jak i abiotyczne czynniki środowiskowe. Biosynteza etylenu została już przez nas szczegółowo opisana wcześniej [3]. Jednym z najlepiej znanych efektów fizjologicznych działania etylenu jest, tzw. potrójna odpowiedź. U rosnących w ciemności siewek *Arabidopsis thaliana* przejawia się ona nadmiernym wygięciem haczykowatego zagięcia szczytowej części pędu, radialnym grubieniem hypokotyli i zahamowaniem jego wzrostu wydłużeniowego, a także zahamowaniem wzrostu korzenia. Zastosowanie najnowszych technik biologii molekularnej, genetyki i biochemii w znaczącym stopniu umożliwiły poznanie szlaku przekazywania sygnału etylenowego. Wiedzie on od siateczki śródplazmatycznej (ER) do jądra, gdzie dochodzi do zmian poziomu ekspresji odpowiednich genów, co przekłada się na powstawanie specyficznych odpowiedzi morfologicznych i fizjologicznych. W stanie podstawowym (brak etylenu) aktywność receptora blokuje szlak prowadzący do aktywacji genów odpowiedzi na etylen, a związanie hormonu prowadzi do jego dezaktywacji, co w konsekwencji znosi represję szlaku (derepresja). Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wyników najnowszych badań dotyczących funkcjonowania szlaku sygnalizacyjnego etylenu, a także jego oddziaływań ze szlakami sygnalizacyjnymi innych hormonów.

RECEPTORY ETYLENU

Pierwsze wzmianki o receptorze etylenu pochodzą z lat 60. XX wieku. [4]. Jednak zidentyfikowano go dopiero na przełomie lat 80. i 90., dzięki wyselekcjonowaniu mutanta *A. thaliana* niewrażliwego na etylen – *etr1* (ang. *ethylene response1*) [5,6]. Białko ETR1 kodowane jest przez gen *ETR1*. W późniejszym czasie odkryto cztery kolejne receptory: ETR2 (ang. *ethylene response2*), EIN4 (ang. *ethylene insensitive4*), ERS1 (ang. *ethylene resistant1*), ERS2 (ang. *ethylene resistant2*) oraz potwierdzono ich zdolność wiązania etylenu *in planta* [7-10].

Receptory etylenowe składają się z 3 domen: sensorowej, kinazowej i odbiorczej (regulator odpowiedzi). Domena sensorowa obejmuje N-koniec białka, gdzie zlokalizowane są regiony transbłonowe oraz domena GAF [11-13]. Struktury te biorą udział w zakotwiczeniu receptora w błonach ER, co umożliwia łatwy i szybki dostęp liganda. Ponadto, w obrębie odcinków transbłonowych znajdują się miejsca odpowiedzialne za wiązanie hormonu – EBD (ang. *ethylene binding domain*), wiązanie kofaktora – Cu(I) oraz dimeryzację receptorów [8,14,15].

Domena kinazowa wykazuje wysokie podobieństwo do kinaz histydynowych, u których w centrum katalitycznym występuje 5 kluczowych dla ich aktywności regionów (H, N, G1, F, G2) [13]. Tylko ETR1 i ERS1 posiadają wszystkie wymienione regiony. Pozostałe receptory mimo braku niektórych z nich mogą, podobnie jak fitochromy, funkcjonować jako kinazy Ser/Thr [16,17]. Taką ak-

Kamil Frankowski[✉]

Jacek Kęsy

Wojciech Kotarba

Jan Kopcewicz

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

[✉]Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl, tel. (056)6114446, fax (056) 6114772

Słowa kluczowe: hormony roślinne, etylen, przekazywanie sygnału

Wykaz skrótów: CTR1 (ang. *constitutive triple response1*) – kinaza Ser/Thr tworząca kompleks z receptorami etylenu; EBF1, EBF2 (ang. *EIN3 binding factor*) – białka z domeną F-box będące składnikami kompleksu ligazy E3 typu SCF; EIN2 (ang. *ethylene insensitive2*) – element szlaku sygnalizacyjnego etylenu odbierający sygnał od kompleksów receptory/CTR1; EIN3 (ang. *ethylene insensitive3*); białka EIL (ang. *EIN3-like*) – czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów indukowanych przez etylen; ER – siateczka śródplazmatyczna; ERF (ang. *ethylene response factor*) – białka z rodziny EREBP (ang. *ethylene response element binding protein*) wiążące się do promotorów genów regulowanych przez etylen; ETR1 (ang. *ethylene response1*), ETR2 (ang. *ethylene response2*), EIN4 (ang. *ethylene insensitive4*), ERS1 (ang. *ethylene resistant1*), ERS2 (ang. *ethylene resistant2*) – receptory etylenu

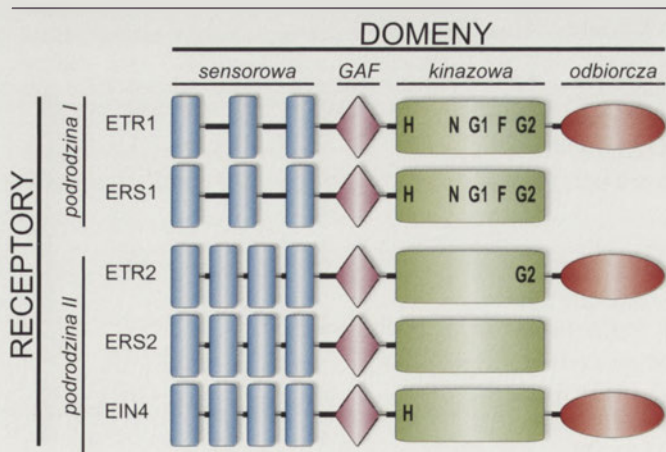
tywność wykazano w przypadku receptora etylenu NTHK1 z tytoniu [18].

Domena odbiorcza receptorów etylenu jest podobna do regulatora odpowiedzi bakteryjnych kinaz dwuskładnikowych. Jest ona zlokalizowana na końcach C trzech spośród pięciu receptorów (ETR1, ETR2 i EIN4) [13,16].

Na podstawie struktury i podobieństwa sekwencji receptory etylenu podzielono na dwie podrodziny (Ryc.1) [9]. Podrodzina I obejmuje ETR1 i ERS1, które posiadają konserwowaną domenę kinazy His oraz 3 hydrofobowe regiony transbłonowe w N-końcowej części białka. W skład podrodziny II wchodzi natomiast ETR2, ERS2 i EIN4 zawierające na N-końcu zdegenerowaną domenę kinazy His oraz 4 hydrofobowe regiony transbłonowe.

Prawdopodobnie obie klasy receptorów uzupełniają się wzajemnie, gdyż zarówno podwójne (*etr1:ers1*), jak i potrójne (*etr2:ers2:ein4*) mutanty *Arabidopsis thaliana* reagują na egzogeny etylen [20]. Receptory z podrodziny I odgrywają większą rolę w percepcji etylenu u roślin rosnących na świetle. Wykazano bowiem, że na świetle u podwójnych mutantów *A. thaliana etr1:ers1* nadekspresja genów kodujących receptory etylenu z podrodziny II nie była w stanie przełamać ich charakterystycznego fenotypu (miniaturowa rozeta, obniżona płodność, zmieniona morfologia kwiatu) [20,21].

Wszystkie receptory etylenu ulegają autofosforylacji, a obecność funkcjonalnej domeny kinazowej jest konieczna dla przekazywania sygnału [22-25]. Miejscem fosforylacji w ETR1 jest zachowana ewolucyjnie reszta His, natomiast pozostałe receptory *in vitro* wykazują aktywność kinazy serynowej. Niemniej jednak autofosforylacja reszty Ser w ERS1 przypuszczalnie nie ma istotnego znaczenia *in vivo*, gdyż okazało się, że receptor ten ma również aktywność kinazy His [23].



Rycina 1. Rodzina receptorów etylenu u *Arabidopsis thaliana*. Receptory z podrodziny I posiadają wszystkie zachowane ewolucyjnie motywy charakterystyczne dla kinaz histydynowych oraz trzy odcinki transbłonowe w obrębie domeny sensorowej. Receptory z podrodziny II posiadają zdegenerowaną domenę kinazową oraz cztery odcinki transbłonowe w obrębie domeny sensorowej. Domena odbiorcza (regulator odpowiedzi) jest obecna w trzech białkach receptorowych: ETR1, ETR2 i EIN4. Wszystkie receptory posiadają domenę GAF o nieznannej funkcji. Szczegółowy opis w tekście [19], zmodyfikowane).

Domena regulatora odpowiedzi białek ETR1, ETR2 i EIN4 nie odgrywa zasadniczej roli w przekazywaniu sygnału etylenowego, choć w niektórych reakcjach roślin (np. wydłużanie hypocotyła) wymagana jest zarówno domena kinazowa, jak i odbiorcza [24-30]. Zarówno domena regulatora odpowiedzi, jak i domena kinazy His receptorów są istotne w przekazywaniu sygnału na kolejne elementy szlaku, jednakże mechanizm tego oddziaływania jest ciągle niezny.

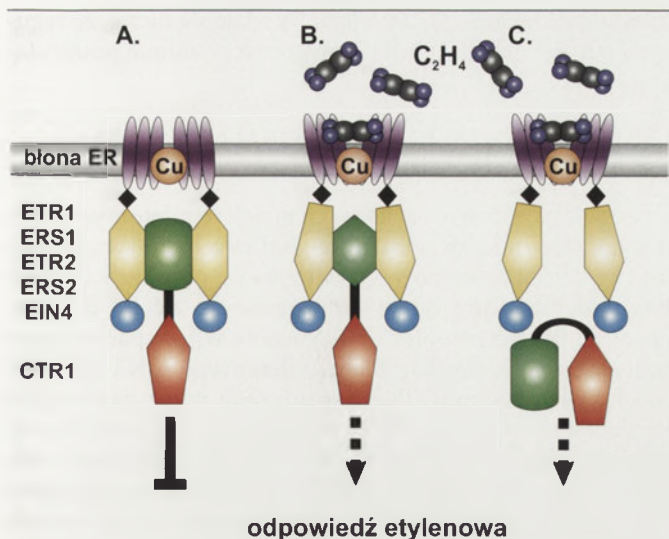
Funkcja leżącej między odcinkiem sensorowym a kinazowym domeny GAF nie jest do końca jasna. Domena ta występuje w różnych białkach sygnałowych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych [31]. Wydaje się, że może ona wiązać małe ligandy, jak np. tetrapiole czy nukleotydy, stanowiąc miejsce dodatkowej regulacji aktywności receptorów.

W badaniach z genetycznie zmodyfikowanym białkiem ETR1 wykazano, że do związania etylenu istotnych jest 7 reszt aminokwasowych zlokalizowanych w obrębie pierwszego (Asp²⁵, Tyr³², Ile³⁵, Pro³⁶) i drugiego (Ile⁶², Cys⁶⁵, His⁶⁹) odcinka transbłonowego [32]. Regiony te prawdopodobnie tworzą kieszeń wiążącą etylen i jony Cu(I). Trzeci region transbłonowy przypuszczalnie stabilizuje strukturę kieszeni. W wiązaniu Cu(I) uczestniczą Cys⁶⁵ i His⁶⁹ [14]. W dostarczaniu jonów miedzi uczestniczy białkowy transporter – RAN1 (ang. *responsive to antagonist 1*) [33]. Utworzenie kompleksu hormon-kofaktor-receptor prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie miejsca wiązania, które zapoczątkowują kaskadę sygnałową [14].

BIAŁKO CTR1

Pierwszym po receptorze składnikiem łańcucha przekazywania sygnału etylenowego jest białko CTR1 (ang. *constitutive triple response 1*). Funkcjonuje ono jako negatywny regulator (represor) aktywności kolejnego składnika szlaku. Gen kodujący białko CTR1 zidentyfikowano analizując genom mutantu *ctr1 A. thaliana*, odznaczającego się fenotypem ciągłej odpowiedzi etylenowej, nie ustępującej nawet po podaniu inhibitorów biosyntezy etylenu [34]. CTR1 jest kinazą Ser/Thr, której koniec C jest podobny do białek z rodziny kinaz Raf. Za oddziaływania z receptorami etylenu odpowiada domena zlokalizowana na N-końcu białka. Oddziaływania te sprawiają, że CTR1 uznawane jest za białko błonowe, mimo braku w cząsteczce odcinków transbłonowych [35]. Związanie receptorów z CTR1 jest na tyle silne, że funkcjonują one w postaci kompleksów (sygnalozomów). Podwójne i potrójne mutacje genów kodujących receptory oraz mutacje końca N białka CTR1 powodują jego akumulację w cytosolu. W konsekwencji prowadzi to do utraty funkcji CTR1 i wykształcenia fenotypu ciągłej odpowiedzi etylenowej [35-38].

Początkowo zakładano, że związanie etylenu powoduje oddysocjowanie CTR1 od kompleksu sygnałowego. Obecnie przyjmuje się, że derepresja szlaku sygnałowego następuje wskutek zmian konformacyjnych powstałych w obrębie kompleksu receptor/CTR1 po związaniu etylenu



Rycina 2. Mechanizm oddziaływania receptorów etylenu z białkiem CTR1. Receptory etylenu funkcjonują jako dimery w błonie ER. Koniec N wszystkich receptorów odpowiada za wiązanie etylenu oraz kofaktora – jonów Cu(I). A. Pod nieobecność etylenu receptory oddziałują z N-końcową częścią CTR1. Oddziaływanie to utrzymuje CTR1 w stanie aktywności blokując powstawanie reakcji na hormon. B. Związanie etylenu z receptorem wywołuje zmiany konformacyjne receptora i CTR1 powodując dezaktywację tego ostatniego, co pozwala na powstanie odpowiedzi etylenowej (model I). C. Po związaniu etylenu, zmiany konformacyjne receptorów powodują oddysocjowanie CTR1 od kompleksu i jego dezaktywację, doprowadzając do powstania odpowiedzi etylenowej (model II). Receptory: fioletowy – regiony transbłonowe domeny sensorowej, czarny – domena GAF, żółty – domena kinazowa, niebieski – domena odbiorcza; CTR1: zielony – koniec N, czerwony – koniec C. Szczegółowy opis w tekście (wg [35,39], zmodyfikowane).

(Ryc. 2) [35]. Do prawidłowego funkcjonowania CTR1 niezbędna jest natomiast jego aktywność kinazowa.

Zakłada się, że CTR1 oddziałuje bezpośrednio z białkiem EIN2 (ang. *ethylene insensitive2*). Jednakże w ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że w szlaku sygnałowym etylenu u *A. thaliana* białko CTR1 może funkcjonować jako składnik kaskady kinaz MAP fosforylującej, m.in. białko MPK6 [40]. Okazało się jednak, że zarówno obniżenie, jak i zahamowanie ekspresji *MPK6* nie zaburza odpowiedzi roślin na etylen [41-43]. Wydaje się więc, że *MPK6* bierze udział raczej w regulacji biosyntezy etylenu, a nie w przekazywaniu sygnału etylenowego, natomiast podobieństwo CTR1 do kinaz MAP ogranicza się jedynie do podobieństwa sekwencji [41]. Szczegółowe wyjaśnienie tych oddziaływań wymaga dalszych badań.

BIAŁKO EIN2

Kolejnym elementem szlaku sygnalizacyjnego etylenu jest białko EIN2 (ang. *ethylene insensitive2*) [44]. Wszystkie znane reakcje roślin wywoływane przez etylen wymagają obecności tego białka, stąd wydaje się ono stanowić kluczowy element szlaku.

Struktura EIN2 jest wysoce zróżnicowana. Koniec N białka, na którym zlokalizowanych jest 12 hydrofobowych domen transbłonowych, odpowiada za odbiór sygnału od kompleksów receptory/CTR1 [44]. Domena ta wykazuje podobieństwo do transporterów jonów metali ciężkich należących do rodziny *NRAMP* (ang. *natural resistance-associated macrophage proteins*) [45,46]. Białka z tej rodziny są istotne dla utrzymania homeostazy jonów kadmu i żelaza w

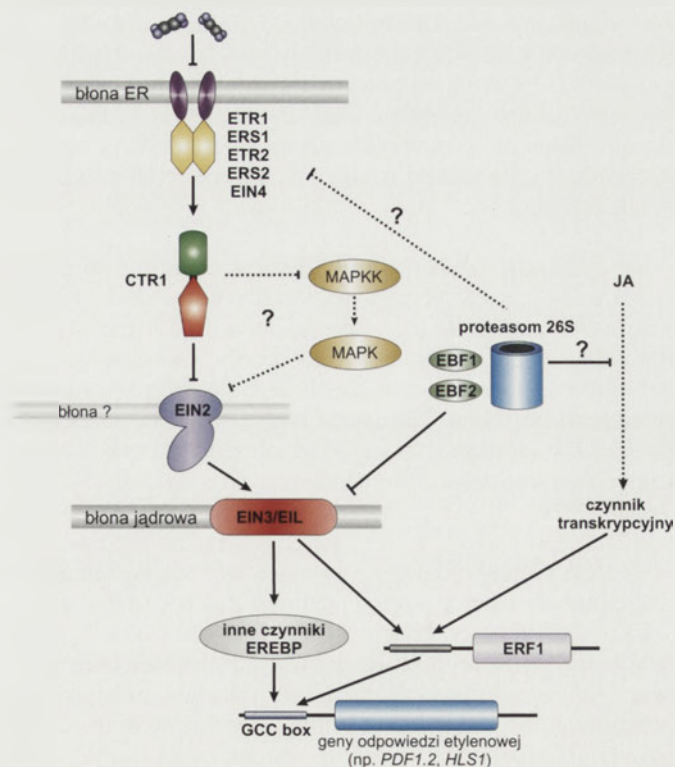
komórce. Jak dotychczas u EIN2 nie wykazano właściwości transportera jonów.

Koniec karboksylowy EIN2 zawiera domenę „coiled-coil”, która jest odpowiedzialna za oddziaływania białko-białko [44]. Przyjmuje się, że ta część peptydu odpowiada za przekazywanie sygnału do kolejnych komponentów szlaku, gdyż transgeniczne linie *A. thaliana* z nadekspresją C-końcowego fragmentu białka EIN2 charakteryzowały się konstytutywną aktywacją odpowiedzi etylenowych. Mimo znacznego postępu w badaniach nad przekazywaniem sygnału etylenowego, molekularny mechanizm działania oraz subkomórkowa lokalizacja EIN2 nadal pozostają niejasne.

KASKADA CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

EIN2 aktywuje jądrowe białko EIN3 (ang. *ethylene insensitive3*), które zapoczątkowuje kaskadę czynników transkrypcyjnych (Ryc. 3) [47]. U *A. thaliana* EIN3 kodowane jest przez gen należący do małej rodziny, w skład której wchodzi dodatkowo *EIL1-EIL5* (ang. *EIN3-like*). Czynniki transkrypcyjne kodowane przez te geny stanowią kolejne elementy kaskady regulującej ekspresję genów indukowanych przez etylen [47-49]. Białka EIN3 i EIL1 charakteryzują się największym podobieństwem i przypisuje się im udział w większości reakcji na etylen [39]. Geny kodujące białka spokrewnione z EIN3 znaleziono również u tytoniu, pomidora i fasoli [50-52]. Poziom i wzorec ekspresji tych genów u poszczególnych gatunków roślin jest zróżnicowany.

Opisane wyżej czynniki transkrypcyjne wiążą się bezpośrednio do sekwencji PERE (ang. *primary ethylene response element*) promotorów genów z rodziny *EREBP* (ang. *ethylene response element binding protein*) [39]. Białka *EREBP* są cha-



Rycina 3. Szlak przekazywania sygnału etylenowego. Szczegółowy opis w tekście (wg [39,57], zmodyfikowane).

rakterystyczne tylko dla roślin. Pierwotnie zidentyfikowano je u tytoniu i stwierdzono, że wiążą się one do sekwencji GCC promotorów genów regulowanych przez etylen [53]. EIN3, EIL1 i EIL2 wiążą się w postaci homodimerów do krótkiego palindromowego regionu promotora genu *ERF1* (ang. *ethylene response factor1*) – EBS (ang. *EIN3-binding site*) [49]. *ERF1* jest białkiem z rodziny EREBP, które uczestniczy w reakcjach zahamowania wzrostu korzeni i hypokotyła, ale nie uczestniczy w tworzeniu haczykowatego zagięcia pędu [47,49]. Stwierdzono, że poznane dotychczas białka *ERF1*, *ERF2* i *ERF5* pełnią funkcję aktywatorów, natomiast białka *ERF3*, *ERF4*, *ERF7-ERF12* – represorów genów wtórnych odpowiedzi etylenowych [54,55]. Ponieważ część genów aktywowanych przez etylen nie zawiera w swoich sekwencjach promotorowych zarówno miejsc EBS, jak i kaset GCC, oznacza to, że ich regulacja odbywa się z pominięciem EIN3 i *ERF1* [56].

REGULACJA SZLAKU SYGNAŁOWEGO ETYLENU

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH ELEMENTY SZLAKU SYGNAŁOWEGO ETYLENU

Wykazano, że zarówno u *A. thaliana*, jak i pomidora ekspresja genów kodujących receptory etylenu zachodzi w całej roślinie. Jej poziom jest jednak zróżnicowany i zależy od rodzaju tkanki i etapu rozwojowego [9,58,59]. Jednym z czynników indukujących ekspresję *ERS1*, *ETR2* i *ERS2* jest sam etylen [9]. Zwiększanie ilości receptorów (będących negatywnymi regulatorami szlaku) prowadzi z kolei do obniżenia wrażliwości na ten hormon (desensytyzacja). Jak wykazano, mechanizm taki ogranicza rozprzestrzenianie się nekrozy u pomidora, będącej następstwem infekcji patogenami [60]. Indukowane przez etylen powstawanie nowej puli receptorów ma również inne znaczenie dla funkcjonowania jego szlaku sygnałowego. Badania pokazują, że wiązanie etylenu z receptorami jest stosunkowo trwałe. W przypadku *ETR1* okres połowicznego rozpadu kompleksu hormon/receptor wynosi ponad 12 godzin [11]. W takiej sytuacji tylko synteza nowych receptorów umożliwia roślinie natychmiastową reakcję na spadek stężenia etylenu (resensytyzacja) [25,29].

W reakcjach rośliny na abiotyczne czynniki stresowe (stres solny i osmotyczny) dochodzi natomiast do hamowania ekspresji *ETR1* [61]. Zmniejszona ilość negatywnych regulatorów szlaku, jakimi są receptory etylenu powoduje, że odpowiedź rośliny na stres następuje już przy niskich stężeniach hormonu. Hamujący wpływ etylenu na ekspresję *ETR1* stwierdzono również w obrębie haczykowatego zagięcia wierzchołka pędu etiolowanych siewek *Arabidopsis thaliana* [62].

Istnieje niewiele danych doświadczalnych na temat regulacji na poziomie transkrypcyjnym dalszych elementów szlaku sygnałowego etylenu. Etylen wpływa na ekspresję genów *LeCTR1* w niedojrzałych owocach i liściach pomidora oraz *EIN2* w zarodkach kukurydzy, jednakże takiej aktywności nie udało się wykazać u innych roślin, m.in. u *A. thaliana* [16,35,63,64]. Mimo, że u *A. thaliana* ekspresja *EIL1* jest zależna od etylenu, to ogólnie przyjmuje się, że nie wpływa on bezpośrednio na ekspresję czynników transkrypcyjnych

z rodziny *EIN3/EIL* [47,50,52,65]. Wydaje się raczej, że regulacja ich stężenia zachodzi głównie na poziomie potranslacyjnym [29].

POTRANSLACYJNA REGULACJA BIAŁEK SZLAKU ETYLENOWEGO

Regulacja aktywności licznych białek regulatorowych będących składnikami szlaków sygnałowych auksyn, gibberelin czy kwasu jasmonowego odbywa się poprzez ich selektywną degradację z udziałem proteasomu 26S [66-68]. Mechanizm ten ma również zastosowanie w przypadku regulacji stężenia składnika szlaku etylenowego EIN3 [47]. Pod nieobecność etylenu EIN3 jest wiązane przez zawierające kasetę F białka EBF1 i EBF2 (ang. *EIN3 binding factor*) i przy udziale kompleksu ligazy E3 typu SCF wyznaczane do degradacji przez proteasom 26S [57,69,70]. Podanie egzogenego etylenu powoduje zahamowanie degradacji i wzrost poziomu EIN3. Szczegółowy mechanizm blokowania degradacji EIN3 przez ten hormon nie jest jasny. Może on polegać na wzroście trwałości białka EIN3, bądź też obniżeniu poziomu i/lub aktywności białek EBF lub innych składników kompleksu ligazy E3 typu SCF. Przypuszcza się, że EBF1 kontroluje poziom EIN3 przy niskich stężeniach etylenu, natomiast EBF2 przy wyższych stężeniach [57,69,70]. Taki układ pozwala roślinie efektywniej reagować na zmiany stężenia tego hormonu. Obserwowany wzrost poziomu EIN3 po podaniu etylenu u podwójnych mutantów *ebf1:ebf2* oraz roślin transgenicznych z nadekspresją *EIN3* sugeruje istnienie również innego, niż selektywna degradacja w proteasomie, mechanizmu regulującego aktywność tego białka [47,70].

WSPÓLDZIAŁANIE SZLAKU SYGNAŁOWEGO ETYLENU Z INNYMI SZLAKAMI

Etylen moduluje ekspresję 3 - 7% wszystkich genów zaangażowanych w regulację różnych procesów biologicznych u *A. thaliana* [65,71,72]. Poziom ekspresji części z tych genów jest obniżany, a części podwyższany, co wskazuje na znaczenie zarówno aktywatorów, jak i represorów w powstawaniu reakcji na etylen. W regulacji ekspresji genów zależnych od etylenu, mają znaczenie również czas ekspozycji na hormon, jego stężenie, rodzaj tkanki oraz faza rozwoju rośliny [19]. Wyniki badań pokazują, że etylen uczestniczy w kontroli wzrostu, rozwoju oraz reakcjach roślin na bodźce środowiskowe poprzez rozległe oddziaływania swojego szlaku sygnalizacyjnego ze szlakami sygnalizacyjnymi uruchamianymi, m.in. przez światło, auksyny, gibbereliny, kwas jasmonowy, kwas salicylowy, cytokininy i cukry (Ryc.4) [73].

Współdziałanie etylenu z auksynami zostało poznane najlepiej na przykładach hamowania przez etylen wzrostu korzenia i tworzenia haczykowatego zagięcia wierzchołka pędu. W pierwszym z tych przypadków etylen specyficznie indukuje w wierzchołku korzenia ekspresję genów *WEI2* i *WEI7* (ang. *weak ethylene insensitive*) kodujących podjednostki α i β syntazy antranilowej, katalizującej biosyntezę tryptofanu – prekursora w biosyntezie auksyn [74]. W konsekwencji dochodzi do akumulacji auksyny i zahamowania wzrostu korzenia. Mutanty *wei2* i *wei7* są niewrażliwe na

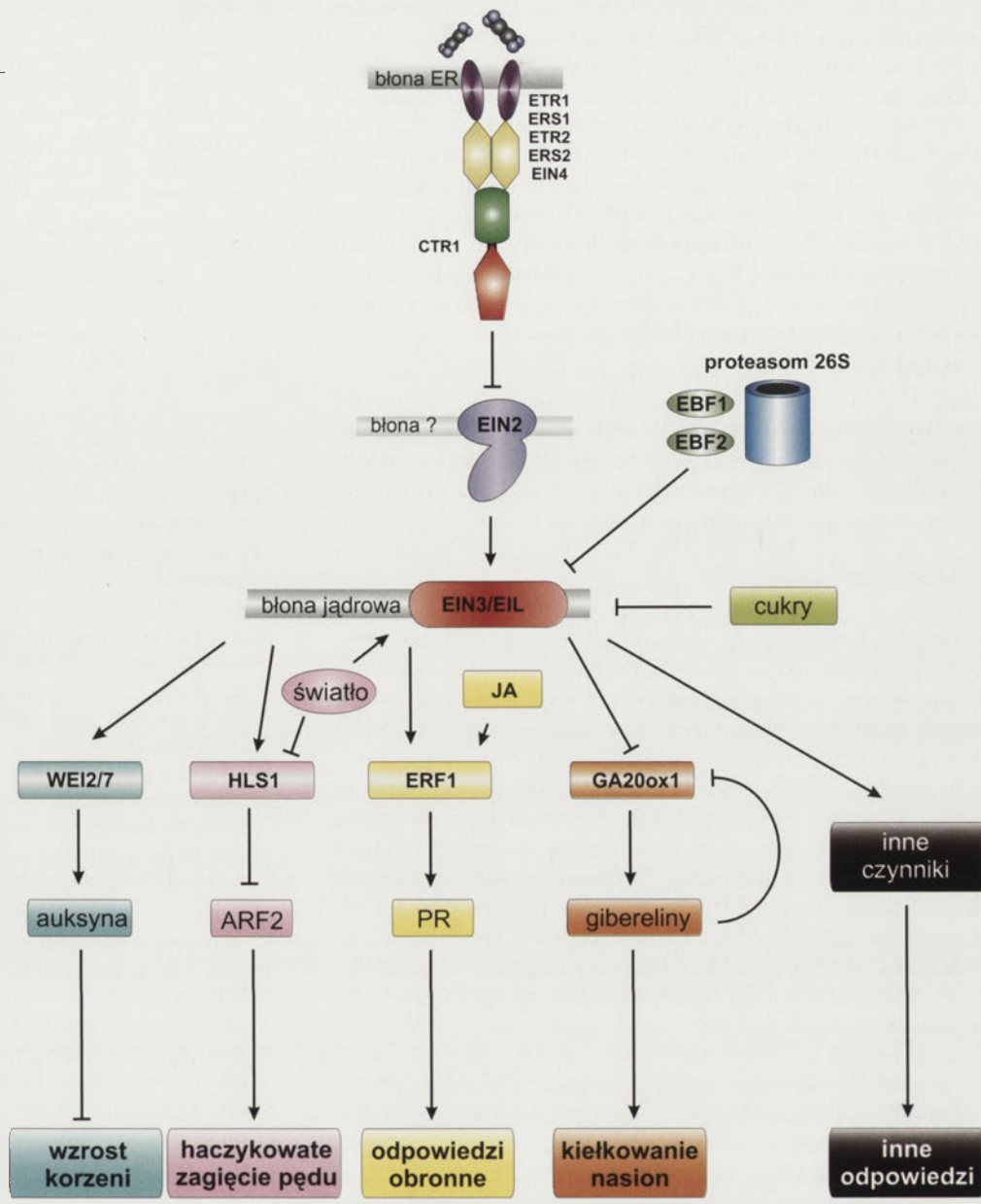
Rycina 4. Udział etylenu w regulacji różnych procesów wzrostu i rozwoju roślin.

etylen i nie obserwuje się u nich akumulacji auksyn w wierzchołku wzrostu korzenia [75].

Tworzenie haczykowatego zagięcia pędu zabezpiecza wierzchołek wzrostu przed uszkodzeniem podczas kiełkowania. Istotną rolę w tworzeniu tej struktury u *A. thaliana* odgrywa białko HLS1 (ang. *hookless1*) będące N-acetylotransferazą [6]. HLS1 bierze udział w regulacji stężenia ARF2 (ang. *auxin response factor2*), będącego regulatorem odpowiedzi auksynowych. Wykazano, że etylen stymuluje ekspresję genu *HLS1*, przez co wpływa również na poziom ARF2. Białko ARF2 odpowiada za asymetryczną dystrybucję auksyny w obrębie tego fragmentu pędu, prowadząc do nierównomiernego wydłużania się komórek i wytworzenia zagięcia [62,76]. Istotną rolę w tworzeniu haczykowatego zagięcia wierzchołka pędu odgrywają również światło i gibereliny. Homologiczne do *HLS1* geny znaleziono także u grochu (*Ps-HLS1* i *Ps-HLS2*). Ich ekspresja jest także aktywowana przez etylen [77].

Jak przedstawiono wcześniej, regulacja wielu odpowiedzi na etylen zachodzi poprzez czynnik transkrypcyjny ERF1. Białko to wiąże się także do promotorów kilku genów odpowiedzi na patogeny, m.in. *PDF1.2* (ang. *plant defensin 1.2*) i *PR-4* (ang. *patogen-related 4*) [53,78,79]. W promotorze obu genów zlokalizowana jest kasetka GCC. Okazuje się jednak, że poza etylenem do indukcji tych odpowiedzi konieczny jest także kwas jasmonowy [80,81]. Przypuszcza się, że ekspresja *ERF1* jest wynikiem synergistycznego działania obu hormonów, gdyż zarówno mutacje zaburzające przekazywanie sygnału etylenowego, jak i kwasu jasmonowego hamują reakcje obronne. Wydaje się zatem, że ERF1 jest istotnym elementem integrującym szlaki sygnałowe etylenu i kwasu jasmonowego.

Istotne znaczenie oddziaływań etylenu i cukrów w regulacji wzrostu i rozwoju roślin odkryto stosunkowo niedawno. Istotą tych oddziaływań jest ich antagonistyczny wpływ na stabilność białka EIN3 [82]. Etylen obniża, a glukoza przy udziale receptora – heksokinazy (*AtHXK1*) – zwiększa szybkość degradacji tego białka. Wydaje się, że zwiększona degradacja EIN3 w obecności glukozy przyczynia się do promocji wzrostu rośliny wskutek zahamowania niektórych



odpowiedzi etylenowych, jak choćby hamowania wydłużania się komórek [82]. Prawdopodobnie oddziaływania między etylenem i cukrami odbywają się nie tylko na poziomie degradacji EIN3. Zauważono bowiem, że glukoza hamuje transkrypcję genów, których produkty zaangażowane są zarówno w biosyntezę etylenu, jak i przekazywanie sygnału etylenowego [83].

Ogromne znaczenie w regulacji wzrostu i rozwoju roślin mają także oddziaływania etylenu z giberelinami. Odpowiedzialne m.in. za regulację wzrostu wydłużeniowego komórek gibereliny, funkcjonują zazwyczaj antagonistycznie do etylenu. Jednakże rolę jaką odgrywają gibereliny w tworzeniu haczykowatego zagięcia pędu wskazuje na znacznie bardziej złożone oddziaływania obu hormonów. W badaniach nad przejściem nasion *Fagus sylvatica* (buk zwyczajny) ze stanu spoczynku do kiełkowania pokazano, że etylen i gibereliny regulują ekspresję kluczowych genów biorących udział w biosyntezie tych hormonów – *FsACO1* i *FsGA-*

20ox1 [84,85]. Traktowanie nasion *F. sylvatica* inhibitorami biosyntezy giberelin (PCB – paklobutrazol) i etylenu (AOA – kwas aminooksyoctowy) prowadziło do wzrostu poziomu ekspresji *FsGA20ox1* [84]. Jednocześnie zaobserwowano, że GA₃ odwraca efekt AOA, a aplikacja etefonu (źródła etylenu) – efekt PCB. Wynika stąd, że zarówno gibereliny, jak i etylen hamują ekspresję genu *FsGA20ox1*. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku wpływu obu hormonów na ekspresję *FsACO1*, którego produkt katalizuje ostatni etap biosyntezy etylenu [85]. Zarówno gibereliny, jak i etylen znacząco zwiększały poziom ekspresji *FsACO1*, co związane było ze wzrostem produkcji etylenu.

Wydaje się, że oddziaływanie etylenu z giberelinami odbywa się na poziomie białek DELLA, będących negatywnymi regulatorami szlaku odpowiedzi na gibereliny [86]. Dowodów na potwierdzenie tego dostarczają wyniki ostatnich badań nad rolą giberelin i etylenu w reakcji na stres solny oraz w regulacji kwitnienia u *A. thaliana* [87,88].

PODSUMOWANIE

Prosta budowa i nieskomplikowany szlak biosyntezy etylenu sprawiają, że w porównaniu z innymi hormonami roślinnymi, mechanizmy regulujące jego zawartość w komórce są stosunkowo dobrze poznane. Istotny postęp dokonał się również w rozumieniu mechanizmów percepcji i przekazywania sygnałów wywoływanych przez etylen. Okazuje się, że poza sprzężeniem zwrotnym pozytywnie regulującym biosyntezę etylenu, istnieje cały szereg innych mechanizmów modulujących funkcjonowanie samego szlaku. Ma to miejsce zarówno na poziomie percepcji, jak i przekazywania sygnału. Wśród tych mechanizmów ważną rolę odgrywa, podlegająca dodatkowym regulacjom, proteolityczna degradacja czynników transkrypcyjnych z rodziny EIN3.

Regulacja wzrostu i rozwoju roślin z udziałem etylenu odbywa się poprzez bezpośredni wpływ na ekspresję odpowiednich genów efektorowych, ale również poprzez wpływ na biosyntezę, dystrybucję oraz szlaki sygnalizacyjne innych hormonów i cząstek sygnałowych (np. NO). Liczne oddziaływania etylenu z innymi szlakami sygnałowymi funkcjonującymi w roślinie świadczą o jego znaczącej roli w regulacji wzrostu i rozwoju. Szczegółowy przebieg wielu z tych oddziaływań wymaga jeszcze dogłębnego poznania. Wyjaśnienia wymaga również funkcjonowanie samego szlaku sygnalizacyjnego, jak chociażby, w jaki sposób receptory modulują wzajemną aktywność czy jaki jest dokładny mechanizm oddziaływań receptorów i CTR1.

PIŚMIENNICTWO

- Abeles F, Morgan P, Saltveit M (1992) Ethylene in Plant Biology, vol.2. Elsevier Science & Technology, Academic Press, San Diego, California
- Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18
- Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2007) Regulacja biosyntezy etylenu u roślin. *Postepy Biochem* 53: 66-73
- Burg SP, Burg EA (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol* 42: 144-152
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241: 1086-1089
- Guzman P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544
- O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleecker AB (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *Plant J* 41: 651-659
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM (1998) *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1321-1332
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5812-5817
- Schaller GE, Bleecker AB (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* 270: 1809-1811
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 19861-19866
- Klee HJ (2002) Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *J Exp Bot* 53: 2057-2063
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996-998
- Schaller GE, Ladd AN, Lanahan MB, Spanbauer JM, Bleecker AB (1995) The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 270: 12526-12530
- Klee HJ (2004) Ethylene signal transduction. Moving beyond *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135: 660-667
- Frankowski K, Kęsy J, Kopcewicz J (2001) Fitochrom i transdukcja sygnału świetlnego. *Postepy Biochem* 47: 184-191
- Xie C, Zhang JS, Zhou HL, Li J, Zhang Z, Wang D, Chen S (2003) Serine/threonine kinase activity in the putative histidine kinase-like ethylene receptor NTHK1 from tobacco. *Plant J* 33: 385-393
- Etheridge N, Hall BP, Schaller GE (2006) Progress report: ethylene signaling and response. *Planta* 223: 387-391
- Hall AE, Bleecker AB (2003) Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell* 15: 2032-2041
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleecker AB (2003) Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 352-357
- Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *PNAS* 95: 7825-7829
- Moussatche P, Klee HJ (2004) Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *J Biol Chem* 279: 48734-48741
- Qu X, Schaller GE (2004) Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiol* 136: 2961-2970
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C (1998) Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5401-5406
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3: reviews 3013.1-3013.8
- Hass C, Lohrmann J, Albrecht V, Sweere U, Hummel F, Yoo SD, Hwang I, Zhu T, Schafer E, Kudla J, Harter K (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J* 23: 3290-3302

28. Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005) Ethylene signal transduction. *Ann Bot* 95: 901–915
29. Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3007–3018
30. Binder BM, O'Malley RC, Wang W, Moore JM, Parks BM, Spalding EP, Bleecker AB (2004) *Arabidopsis* seedling growth response and recovery to ethylene. A kinetic analysis. *Plant Physiol* 136: 2913–2920
31. Mason MG, Schaller GE (2005) Histidine kinase activity and the regulation of ethylene signal transduction. *Can J Bot* 83: 563–570
32. Wang W, Esch JJ, Shiu S-H, Agula H, Binder BM, Chang C, Patterson SE, Bleecker AB (2006) Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3429–3442
33. Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97: 383–393
34. Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427–441
35. Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem* 278: 34725–34732
36. Cancel JD, Larsen PB (2002) Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 1557–1567
37. Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J, Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 221–233
38. Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261–271
39. Guo H, Ecker JR (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* 7: 40–49
40. Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J* 22: 1282–1288
41. Menke FLH, van Pelt JA, Pieterse CMJ, Klessiga DF (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 897–907
42. Ecker JR (2004) Reentry of the ethylene MPK6 module. *Plant Cell* 16: 3169–3173
43. Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386–3399
44. Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148–2152
45. Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4991–4996
46. Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 34: 685–695
47. Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133–1144
48. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Nature* 408: 796–815
49. Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* 12: 3703–3714
50. Lee JH, Kim WT (2003) Molecular and biochemical characterization of VR-EILs encoding mung bean ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE proteins. *Plant Physiol* 132: 1475–1488
51. Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ (2001) Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J* 26: 47–58
52. Rieu I, Mariari C, Weterings K (2003) Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses. *J Exp Bot* 54: 2239–2244
53. Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173–182
54. Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2000) *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393–404
55. Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D, Wu K (2005) *Arabidopsis* ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol Biol* 58: 585–596
56. Stepanova AN, Ecker JR (2000) Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol* 3: 353–360
57. Guo H, Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCFEBF1/EBF2-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667–677
58. Tieman DM, Klee HJ (1999) Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol* 120: 165–172
59. Lashbrook CC, Tieman DM, Klee HJ (1998) Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J* 15: 243–252
60. Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ (2000) Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol* 123: 81–92
61. Zhao XC, Schaller GE (2004) Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 562: 189–192
62. Raz V, Ecker JR (1999) Regulation of differential growth in the apical hook of *Arabidopsis*. *Development* 126: 3661–3668
63. Adams-Phillips L, Barry C, Kannan P, Leclercq J, Bouzayen M, Giovannoni J (2004) Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Mol Biol* 54: 387–404
64. Gallie DR, Young TE (2004) The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Genet Genomics* 271: 267–281
65. De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van Der Straeten D (2004) Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J* 39: 537–559
66. Kepiński S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446–451
67. Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Suna T (2004) The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392–1405
68. Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1919–1935
69. Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S, Vierstra RD (2004) *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6803–6808

70. Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679–689
71. Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Nadubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657
72. Zhong GV, Burns JK (2003) Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol Biol* 53: 117–131
73. Stepanova AN, Alonso JM (2005) Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiol Plant* 123: 195–206
74. Bartel B (1997) Auxin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 51–66
75. Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2230–2242
76. Li H, Johnson P, Stepanova A, Alonso JM, Ecker JR (2004) Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 7: 193–204
77. Du Q, Kende H (2001) Expression of two *HOOKLESS* genes in peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol* 42: 374–378
78. Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1020–1032
79. Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11: 184–191
80. Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165–178
81. Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: S153–S164
82. Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425: 521–525
83. Price J, Laxmi A, St. Martin SK, Jang JC (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2128–2150
84. Calvo AP, Nicolas C, Nicolas G, Rodriguez D (2004) Evidence of a cross-talk regulation of a GA 20-oxidase (FsGA20ox1) by gibberellins and ethylene during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* seeds. *Physiol Plant* 120: 623–630
85. Calvo AP, Nicolas C, Lorenzo O, Nicolas G, Rodriguez D (2004) Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of ACC oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J Plant Growth Regul* 23: 44–53
86. Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816–2825
87. Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91–94
88. Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T, Harberd NP (2007) The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6484–6489

Ethylene signal transduction pathway

Kamil Frankowski[✉], Jacek Kęsy, Wojciech Kotarba, Jan Kopcewicz

Department of Physiology and Molecular Biology of Plants, Institute of General and Molecular Biology, Nicolaus Copernicus University, 9 Gagarina St, 87-100 Toruń, Poland

[✉]e-mail: Kamil.Frankowski@uni.torun.pl

Key words: plant hormones, ethylene, signal transduction

ABSTRACT

Ethylene is involved in the regulation of many growth and developmental processes in plants. Signaling pathways of the hormone are activated by five receptors, which are localized in membranes of endoplasmic reticulum and are similar to bacterial two-component histidine kinases. In the air, ethylene receptors activate CTR1 protein, which is a negative regulator (repressor) of nuclear protein – EIN2. In turn, EIN2 is an activator of transcriptional factors cascade responsible for the regulation of the expression of ethylene response genes. The level of EIN3, as well as other elements of ethylene signal transduction pathway, is subjected to complicated regulations on transcriptional and posttranslational levels, in which other internal and environmental factors are involved.

Mikromacierze DNA - perspektywy wykorzystania w badaniach skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leków

Technologia mikromacierzy stanowi unikalne narzędzie badania ekspresji genów na poziomie informacyjnego RNA (mRNA), umożliwiające wysokowydajną analizę ekspresji tysięcy genów w pojedynczym doświadczeniu. Jednym z ważniejszych zastosowań technologii mikromacierzy DNA, w odniesieniu do badania efektywności leków i oceny ich bezpieczeństwa, jest użycie jej do identyfikacji szlaków biochemicznych, potencjalnych celów nowoczesnych terapii molekularnych, do identyfikacji molekularnych mechanizmów toksyczności oraz do zrozumienia i przewidywania indywidualnej wrażliwości i oporności. Celem napisania niniejszego artykułu było przedstawienie użyteczności technologii mikromacierzy DNA na wszystkich etapach procesu powstawania i wdrażania leku.

WPROWADZENIE

Poznanie i zrozumienie funkcji genów jest jednym z głównych post-genomowych wyzwań świata nauk biologicznych i medycznych, które rozszyfrowując sekwencję ludzkiego genomu, spektakularnie wkroczyły w XXI wiek. Ostatnie dziesięciolecie, w tym ostateczne ogłoszenie na początku 2003 roku [1] zakończenia projektu: „*Human Genome Project*” i opublikowanie sekwencji genomu człowieka oraz opracowanie technologii wysokowydajnego badania ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy, otworzyło nowe perspektywy dla badań z zakresu wielu dziedzin nauk biomedycznych.


Pomysł jednoczesnego badania ekspresji wielu genów pojawił się za sprawą Augenlichta i jego współpracowników w 1987 r., tj. zaledwie 4 lata po wynalezieniu przez Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy. W 1995 roku zespół naukowców ze Stanford University opublikował pracę zatytułowaną „*Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*” [2]. Autorzy opisali w niej użycie automatycznego systemu nakładania fragmentów DNA na szkło. Znakowane cDNA, które otrzymano z różnych próbek mRNA *Arabidopsis thaliana*, zhybrydyzowano z sondami DNA na płytkach. Przedstawione przez autorów rozwiązanie stało się inspiracją dla kolejnych przedsięwzięć badawczych, o czym świadczy liczba cytowań ich publikacji (ponad 4 tysiące).

Pod koniec lat 90. wysiłek naukowców skupiony był na udoskonalaniu techniki syntezy *in situ*, na małych płytkach szklanych, krótkich oligonukleotydów, o sekwencjach homologicznych do sekwencji poznawanych genów. Dzięki połączonym siłom wielu specjalistów z różnych dziedzin: biologii molekularnej, informatyki, chemii oraz nowoczesnych mikro- i nanotechnologii, udało się skonstruować płytki, zawierające na swojej powierzchni sondy odpowiadające wszystkim znanym transkryptom badanego organizmu. Aktualnie, mikromacierze DNA, ze względu na swoją elastyczność, umożliwiającą dostosowywanie profilu analizy (poprzez nanoszenie odpowiednich sond) do własnych potrzeb, stały się już standardową techniką wykorzystywaną w badaniach molekularnych.

Mikromacierze DNA okazały się niezwykle przydatne w badaniach biologii komórki i zaburzeń w jej funkcjonowaniu. Identyfikacja charakterystycznych zmian w ekspresji genów w stanach patologicznych umożliwia szybsze i skuteczniejsze diagnozowanie chorób, prognozowanie ich przebiegu oraz dopasowanie terapii (poprzez wybór leków) do indywidualnych potrzeb pacjenta. Ponadto umożliwiły poszukiwanie zupełnie nowych celów terapeutycznych, wykorzystywanych w projektowaniu leków oraz wstępną ocenę toksyczności związków farmakologicznie czynnych. Wykorzystywane są także w badaniach nad mechanizmem działania leków oraz związanym z ich aktywnością zjawiskiem powstawania oporności na lek. Mikromacierze ułatwiają poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, często stawiane przez farmakogenomikę: dlaczego lek

Iza Roman 

Narodowy Instytut Leków, Warszawa

 Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; tel.: (022) 851 52 21, e-mail : izar@il.waw.pl

Artykuł otrzymano 10 sierpnia 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 13 grudnia 2007 r.

Słowa kluczowe: mikromacierze DNA, ekspresja genów, farmakogenomika, toksykogenomika

stosowany w tej samej jednostce chorobowej u dwóch pacjentów, przynosi u jednego pożądane efekty, a u drugiego nie.

TECHNOLOGIE MIKROMACIERZY DNA

Powszechne zastosowanie znalazły dwa główne typy mikromacierzy, które odróżnia rodzaj i pochodzenie cząsteczek umieszczonych na stałym podłożu: mikromacierze cDNA oraz macierze oligonukleotydowe, zwane też „chipami DNA”.

W pierwszym przypadku rolę sond odgrywają fragmenty cDNA, zwykle o długości 0,5-2,0 kbp, będące najczęściej produktami amplifikacji PCR, uzyskanymi z bibliotek cDNA lub zbioru klonów, w reakcji ze starterami specyficznymi dla wektora lub genu. W drugim przypadku, sondy stanowią krótkie oligonukleotydy, zazwyczaj o długości 10-25 bp, otrzymane na drodze syntezy fotolitograficznej *in situ* na powierzchni płytki. Nie tylko rodzaj sond odróżnia oba typy mikromacierzy, również ich konstrukcja przebiega w zdecydowanie odmienny sposób [3,4]. Zwykle, w przypadku mikromacierzy cDNA, jeden gen na płycie jest reprezentowany przez jeden rodzaj sond naniesionych w formie kropelki – „spotu”, w ściśle określonym miejscu, zdefiniowanym współrzędnymi [5,6]. Typowa wielkość średnicy „spotów” wynosi 100-150 μm .

W przypadku drugiego rozwiązania, zaproponowanego przez firmę Affymetrix, znanego pod nazwą „chipy DNA”, dla zapewnienia odpowiednio wysokiej specyficzności, projektowanych jest od kilku do kilkunastu rodzajów sond, pokrywających łącznie kilkusetnukleotydowy odcinek danego genu. Dodatkowo projektowany jest drugi zestaw sond, z których każda różni się od sondy w pełni komplementarnej tylko z jednym nukleotydem. W ten sposób jeden gen jest reprezentowany na chipie przez kilkanaście par różnych oligonukleotydów [7]. W tym przypadku wielkość średnicy „spotów” mieści się w granicach 2-20 μm . W zależności od ilości „spotów”, występujących na zdefiniowanej powierzchni, wyróżnia się mikromacierze oligonukleotydowe wysokiej (>10 tys./ cm^2), średniej (1 – 10 tys./ cm^2) i niskiej (< 1 tys./ cm^2) gęstości.

Oprócz dwóch powyżej opisanych i najszerzej stosowanych systemów, warto wspomnieć również o innowacyjnym rozwiązaniu [8], polegającym na wykorzystaniu techniki hybrydyzacji *in situ*, umożliwiającej jednoczesne badanie nawet 1000 fragmentów tkankowych pod kątem delekcji i amplifikacji fragmentów genomu oraz zmian w ekspresji mRNA. Istotnym jest, że przy użyciu tej techniki możliwe jest różnicowanie typów komórek w pobranym fragmencie tkanki nowotworowej [9]. Mikromacierze tkankowe stanowią płytki zawierające od kilkudziesięciu do kilkuset małych wycinków tkanek różnego typu. Oferowane zestawy mikromacierzy tkankowych obejmują wycinki z tkanek prawidłowych oraz tkanek patologicznych (stadia nowotworowe komórek z różnych organów). Umożliwiają badanie białek, RNA lub DNA.

Wszystkie eksperymenty z zastosowaniem mikromacierzy składają się z kilku etapów: 1) postawienia celu badania,

2) przygotowania mikromacierzy (wydrukowania lub zakupu komercyjnie dostępnej mikromacierzy), 3) przygotowania prób (izolacja materiału genetycznego, oczyszczanie, odwrotna transkrypcja, znakowanie, fragmentacja), 4) hybrydyzacji znakowanych prób do sond na mikromacierzy, 5) detekcji i wizualizacji danych, 6) analizy bioinformatycznej i interpretacji wyników [7].

Materiał wyjściowy stanowi zwykle RNA wyizolowany z komórek pobranych od badanego osobnika lub z hodowli *in vitro*. Szczegółowy opis sposobu postępowania dostępny jest obecnie w wielu podręcznikach oraz na stronach internetowych producentów mikromacierzy DNA. We wszystkich tych opracowaniach szczególną uwagę zwraca się na odpowiednią jakość, tj. czystość i integralność izolowanego materiału genetycznego oraz zapewnienie powtarzalności warunków eksperymentalnych. Prawdziwym jednak wyzwaniem dla eksperymentów wykorzystujących mikromacierze DNA jest analiza i obróbka otrzymanych danych, po pierwsze ze względu na ich ogromną ilość, po drugie ze względu na zagrożenia wynikające z zastosowania niewłaściwych algorytmów do hierarchizacji danych i związane z tym ryzyko wyciągnięcia błędnych wniosków. Sposób postępowania powinien być wybrany zależnie od postawionego celu. Najbardziej podstawową i jednocześnie najprostszą analizą jest odnalezienie różnic w ekspresji tych samych genów, występujących w próbie badanej i kontrolnej. Innym z podejść jest przyjrzenie się wielokrotnym doświadczeniom i ułożenie lub stworzenie zbiorów podobieństwa (klasterów) danych z ekspresji genów w małe homogenne grupy. Dysponując małymi zbiorami danych można podjąć próbę „ręcznej” oceny, w przypadku jednak badania większej ilości genów – całego genomu – wymagane jest zastosowanie zaawansowanych algorytmów statystycznych. Dyskusja dotycząca wypracowania standardów w analizie bioinformatycznej ciągle toczy się w gronie specjalistów zajmujących się tymi problemami.

WYKORZYSTANIE MIKROMACIERZY DNA W BADANIACH LEKÓW

Przegląd literatury ukazuje jak liczne i różnorodne korzyści może przynieść zastosowanie w badaniach molekularnych techniki mikromacierzy DNA [10,11]. Znajomość poziomu ekspresji określonych genów oraz sekwencji homologicznych od znanego genu może znacząco skrócić drogę odkrywania mechanizmów leżących u podstaw pojawiania się i rozwoju wielu chorób [12]. Obserwuje się szerokie wykorzystanie techniki mikromacierzy, otwierające zupełnie nowe perspektywy w medycynie oraz farmacji, w szczególności w dyscyplinach takich jak: farmakologia i toksykologia. Współczesna medycyna wykorzystuje mikromacierze m.in. w profilaktyce (wykrywanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, mogących stanowić źródło chorób) [13,14], w diagnostyce (wykrywanie i identyfikacja patogenów, klasyfikacja nowotworów, w szczególności histologicznie nierozróżnialnych, o różnym zachowaniu klinicznym) [15-17], w procesie leczenia (dobór indywidualnej terapii, standaryzacja metod leczenia, ocena zgodności tkankowej w transplantologii) [18] oraz w prognostyce (ocena prawdopodobieństwa wznowy procesu chorobowego) [19,20]. Przemysł farmaceutyczny zaadaptował no-

wości biologii molekularnej związane z wysokowydajnym badaniem przesiewowym i wykorzystał je właściwie na wszystkich etapach powstawania nowego leku, na drodze, która prowadzi od pomysłu do zastosowania klinicznego oraz podczas poszukiwania nowych wskazań, badania powstawania mechanizmu oporności na lek i kontrolowania bezpieczeństwa substancji czynnych już istniejących, w tym występowania działań niepożądanych np. kardiotoksyczności czy hepatotoksyczności [21].

W badaniach rozwojowych nad lekiem wyróżnić można kilka obszarów, w których znalazła zastosowanie technologia mikromacierzy DNA. Są to m.in.: identyfikacja celów terapeutycznych, projektowanie leków, badanie mechanizmów działania leków, badanie skuteczności terapeutycznej leków, ocena bezpieczeństwa leków (toksyczność, działania niepożądane) oraz ocena biorównoważności/biopodobności. Wymienione obszary zastosowań nie stanowią całkiem odrębnych dziedzin, ale są ze sobą bardzo powiązane, np. podczas identyfikacji nowych celów terapeutycznych pojawiają się pomysły na nowe leki, a badanie mechanizmu działania może dostarczać wiedzy o potencjalnej skuteczności, oddziaływaniach oraz ewentualnej toksyczności związków.

POSZUKIWANIE NOWYCH CELÓW TERAPEUTYCZNYCH I PROJEKTOWANIE LEKÓW

Wyprodukowanie nowego leku i doprowadzenie do dopuszczenia go do obrotu zajmuje zazwyczaj około 10-15 lat. Tysiące wstępnie wyselekcjonowanych związków farmakologicznie czynnych jest odrzucanych na różnych etapach badań doświadczalnych. Setki z nich są dopuszczone do badań przedklinicznych, kilkanaście z nich przechodzi badania kliniczne I, II i III fazy, a zaledwie kilka trafia na półki aptek. Dzięki stworzeniu technologii mikromacierzy ta droga może być pokonana zdecydowanie szybciej. Pomysł na nowy lek najczęściej pojawia się na skutek odkrycia nowego celu terapeutycznego – stanowiącego „dziurkę do klucza”, dla której poszukiwany jest „klucz” – czyli substancja czynna o określonych właściwościach. We współczesnym procesie odkrywania nowych substancji terapeutycznych obserwuje się znaczny wzrost roli genomiki, o czym świadczy fakt, że w ostatnim czasie prawie 25 % zidentyfikowanych nowych celów terapeutycznych dokonano w oparciu o badania genomiczne [22].

Najwięcej badań w zakresie poszukiwania nowych celów terapeutycznych, a co się z tym wiąże odpowiednich dla nich leków, prowadzonych jest w celach terapii chorób nowotworowych. Jest to zrozumiałe, z uwagi na zasięg problemu oraz na patogenezę tych schorzeń, związaną ze zmianami w budowie DNA, które pociągają za sobą zmiany w ekspresji genów. Podstawowe znaczenie dla rozwoju choroby może mieć zmiana ekspresji nie tyle pojedynczych genów, lecz całych ich zespołów, która to zmiana jest możliwa do zaobserwowania tylko w przypadku jednoczesnego ich badania. Mikromacierzowy pomiar poziomu mRNA w komórkach w bardzo prosty sposób umożliwia identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych poprzez porównanie ze sobą ekspresji genów w tkance prawidłowej i zmienionej chorobowo. Wskazuje się tu około 2-3 tysięcy genów kodu-

jących: receptory związane z białkami G, receptory jądrowe, kanały jonowe, kinazy białkowe i inne enzymy, które stanowią swoiste grupy potencjalnych celów terapeutycznych [23]. Wiele z tych celów jest dobrze poznanych, wiadomo również, że pełnią one funkcję w innych niż nowotworowe procesach chorobowych, w których także wskazywane są jako potencjalne cele terapeutyczne dla nowoczesnego, racjonalnego projektowania leków [24]. Przykładem takich leków, wykazujących terapeutyczną aktywność przeciwnowotworową, związaną z określonym mechanizmem działania, są dopuszczone do obrotu leki Glivec, Herceptin i Iressa [25]. Przewiduje się, że w przypadku leczenia nowotworów, wraz z postępem związanym z możliwością pośredniego śledzenia zmian genowych poprzez pomiar poziomu ekspresji genów (mRNA), nowoczesne terapie będą odchodzić od substancji o nieswoistym działaniu cytotoksycznym w kierunku związków o ukierunkowanym działaniu, skierowanych przeciwko celom terapeutycznym, bezpośrednio związanym z procesem nowotworzenia. Wykorzystanie mikromacierzy do poszukiwania nowych celów terapeutycznych obrazują dwa opisane poniżej przykłady.

W jednej z pierwszych prac wykonanych w celu klasyfikacji nowotworów wykazano [16], że profile ekspresji genów charakteryzujące ostrą białaczkę limfatyczną (ALL) i ostrą białaczkę szpikową (AML) bardzo się od siebie różnią i mogą stanowić podstawę ich klinicznego diagnozowania. Ten zestaw genów zawierał znane komórkowe markery powierzchniowe, geny krytyczne dla fazy remodelowania chromatyny, adhezji komórkowej i niektóre znane onkogeny, takie jak: *C-MYB*, *E2A* i *HoxA9*. W oparciu o powyższe obserwacje, zbadano przy użyciu mikromacierzy, szpik kostny dzieci, u których stwierdzono 6 różnych podtypów ALL [26]. Zidentyfikowano geny, które różnicowały badane nowotwory. Niektóre z tych genów wskazano jako interesujące cele terapeutyczne – dla przykładu gen *C-MER* kodujący – receptorową kinazę tyrozynową, który charakteryzuje się nadekspresją w białaczce limfatycznej związanej z translokacją chromosomalną *E2A-PBX-1*. W omawianym przypadku zahamowanie ekspresji tego genu może zapobiec dalszym zaburzeniom mechanizmów sygnalizacji komórkowej, a w konsekwencji progresji procesu chorobowego. Tym samym gen *C-MER* może stanowić potencjalny cel terapeutyczny dla ostrej białaczki limfatycznej.

Innym przykładem wykorzystania badań profilowania ekspresji genów do określenia potencjalnego celu jest identyfikacja, z użyciem mikromacierzy cDNA, 55 genów charakteryzujących się wysoką ekspresją w komórkach raka prostaty [27]. Najbardziej znaczącym wśród nich był gen *EZH2*, kodujący białko z rodziny *polycomb*, uczestniczące w procesie podtrzymywania pamięci komórkowej. Zaobserwowano, że zakłócenie ekspresji *EZH2*, za pomocą odpowiedniej cząsteczki siRNA, powoduje ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych prostaty, co może wskazywać na *EZH2* jako doskonały cel terapeutyczny.

BADANIE MECHANIZMÓW DZIAŁANIA LEKÓW

Badania mechanizmu działania związków farmakologicznie czynnych aktualne są nie tylko dla nowo odkrywanych substancji, ale także dla wielu istniejących i stosowa-

nych w leczeniu, dla których do tej pory nie udało się tego ustalić. Badanie mechanizmu oparte jest na porównaniu profilu ekspresji genów w komórkach poddanych działaniu badanego związku z profilem uzyskanym dla układu kontrolnego. Możliwe jest także porównywanie profili uzyskanych dla nowych związków z profilami leków o znanym mechanizmie działania. W badaniach mechanizmów działania leków należy mieć na uwadze, że zmiany ekspresji genów, związane z uruchamianiem przez komórkę specyficznych szlaków biochemicznych, będących odpowiedzią na zewnętrzną stymulację, są bardzo dynamiczne, a odpowiedź nie jest stała w czasie. Określa się to często angielskim terminem *snapshot*, tj. „migawkowego zdjęcia” aktywności genów, ze względu na to, że pomiar na mikromacierzy odpowiada jednemu punktowi na osi czasu. W rzeczywistości podczas całego przebiegu badania występuje bardzo wiele takich punktów, charakteryzujących się swoistymi poziomami aktywności poszczególnych genów [21]. Bardzo ważny jest zatem, podczas projektowania doświadczenia, odpowiedni dobór czasu inkubacji i dawki, które pozwolą zaobserwować kaskadę zmian, składających się na odpowiedź komórkową. Istotnym podczas prowadzonych obserwacji jest założenie, że funkcja żadnego genu nie jest odizolowana od pozostałych i jeżeli jakieś geny w tkance włączają się lub wyłączają jednocześnie w odpowiedzi na ten sam bodziec (lek) można wnioskować, że oddziałują one (razem lub kolejno) na ten sam szlak regulacyjny komórki. Prowadzona w ten sposób analiza, nazwana została metodą „winny przez skojarzenie” (ang. *guilt-by-association*) i umożliwia, poprzez odpowiednią obróbkę otrzymanych danych (np. klasteryzację), śledzenie metabolicznej odpowiedzi komórek na lek, w tym również powstawanie mechanizmu oporności.

Przykładem wykorzystania techniki mikromacierzy DNA do badania mechanizmu działania leków może być praca [28], dotycząca mechanizmu działania flawopirydołu będącego inhibitorem cyklino-zależnych kinaz białkowych (CDK), w odniesieniu do jego aktywności przeciwnowotworowej. Podczas badań stwierdzono, że flawopirydol powoduje zdecydowane zahamowanie całkowitej ekspresji genów w komórkach, w odróżnieniu od dwóch innych inhibitorów CDK, którymi są roskowityna i 9-nitropaulon. Profil ekspresji genów po inkubacji z flawopirydołem dokładnie przypominał profile otrzymane dla dwóch znanych inhibitorów transkrypcji: aktynomycyny D i 5,6-dichloro-1- β -D-rybofuranozylu-benzimidazolu (DRB). Zaobserwowane podobieństwo sugeruje, że badany związek również wpływa na całkowite zahamowanie procesu transkrypcji w komórkach. Dalsze badania przeprowadzono w kierunku zbadania czasu życia mRNA w komórkach, który jest istotnym czynnikiem determinującym poziom ekspresji poszczególnych genów. Wykazały one, że efektywność leku jest dużo wyższa w typach nowotworów wysoce zależnych od genów z niestabilnym mRNA.

Mikromacierze zostały wykorzystane również do zidentyfikowania genów regulowanych przez inhibitory deacetylazy histonowej (HDAC) [29]. Porównano profile ekspresji genów komórek nowotworowych pęcherza moczowego T24 i nowotworu piersi MDA, poddanych działaniu pochodnych kwasu hydroksamowego: kwasu suberoiloanikidohydroksamowego i trichostatyny A oraz strukturalnie nowego

inhibitora HDAC – MS-27-275. Wszystkie trzy substancje indukowały w komórkach nowotworowych maksymalny poziom białka p21 po 24 godzinach i powodowały silną hiperacetylację histonu H4. Profile ekspresji genów wszystkich trzech inhibitorów HDAC były generalnie podobne do siebie i istotnie różne od profili uzyskanych do podobnych strukturalnie ich nieaktywnych analogów. Powyższa obserwacja jednoznacznie wskazała, że indukcja zmian w ekspresji genów w komórkach, wywoływanych przez inhibitory HDAC, nie jest spowodowana ich chemiczną strukturą, tylko wynika ze specyficznego mechanizmu działania. Przeprowadzona hierarchiczna klasteryzacja uzyskanych wzorów ekspresji wykazała większe podobieństwo profili ekspresji dla dwóch pochodnych kwasu hydroksamowego niż dla inhibitora MS-27-275. Pewnym zaskoczeniem był fakt, że zmiany w ekspresji genów nie miały charakteru jednokierunkowego, okazało się bowiem, że dla porównywalnej ilości genów zaobserwowano wzrost ekspresji oraz zahamowanie aktywności, w odniesieniu do kontroli, pod wpływem działania inhibitorów HDAC. W odniesieniu do ich funkcji, wskazano 13 genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę i syntezę DNA. Otrzymane wyniki posłużyły zrozumieniu skomplikowanego przebiegu zdarzeń w komórkach, których odpowiedzią na obecność inhibitorów HDAC jest przemodelowanie chromatyny będące bezpośrednią przyczyną ich aktywności przeciwnowotworowej.

Nieodłącznym, choć niepożądanym zjawiskiem, towarzyszącym procesom leczenia nowotworów, jest nabywanie przez komórki oporności na lek, co obniża efektywność terapii. Określenie molekularnego mechanizmu powstawania zjawiska oporności może być kluczowe dla przezwyciężenia tego problemu. Mikromacierze ekspresyjne są doskonałym narzędziem umożliwiającym prowadzenie badań w tym zakresie.

W badaniach mechanizmu nabywania oporności na kamptotecynę, inhibitor topoizomerazy I, której analogi są wykorzystywane w leczeniu nowotworów płuc, piersi, jajników i raka okrężnicy [30] porównano ekspresję genów linii komórek nowotworowych prostaty DU145, z wyselekcjonowaną linią RC0.1 oporną na 9-nitro-kamptotecynę. Zidentyfikowano 181 genów, których ekspresja różnicowała obie linie. Wyselekcjonowana linia była również krzyżowo oporna na różne czynniki stresu, które to cechy miały swoje odzwierciedlenie w zmianach ekspresji genów, indukujących fenotyp mniej podatny na apoptozę. Na podstawie dokonanych obserwacji autorzy zaproponowali dwuetapowy mechanizm powstawania oporności na badany lek. Zaproponowany model jest analogiczny do mechanizmu powstawania nowotworów złośliwych, w których nabyta oporność powoduje deregulację ścieżek sygnałowych, co prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy proliferacją a apoptozą.

BADANIE SKUTECZNOŚCI TERAPEUTYCZNEJ LEKÓW

Istotny wpływ na zróżnicowanie odpowiedzi osobniczej na działanie leków mają czynniki genetyczne. Zagadnienie to znajduje się w obszarze zainteresowań farmakogenetyki, badającej wpływ aktywności pojedynczego genu na od-

powieź organizmu na lek i farmakogenomiki, dla której obiektem zainteresowania jest zróżnicowanie ekspresji wielu genów. Mikromacierze DNA umożliwiające wykrywanie polimorfizmu jednonukleotydowego (SNP), np. Beckman Coulter's SNPstream i Illumina's BeadArray, doskonale sprawdziły się jako nowy typ technologii różnicującej molekularną odpowiedź komórkową, w przypadkach gdy występuje dobra korelacja obserwowanych efektów działania leku ze zmianami w ekspresji genów. Świadomość występowania osobniczej zmienności genetycznej, np. genów kodujących enzymy odpowiedzialne za metabolizm leków, genów kodujących białka transportowe lub genów kodujących inne specyficzne składniki komórkowe stanowiące cel dla leku i znajomość wpływu tych zmian na odpowiedź komórkową są bardzo istotne podczas badania skuteczności leków oraz podczas przewidywania ewentualnego ryzyka wystąpienia objawów niepożądanych. Farmakogenomiczne/genetyczne podejście bardzo szybko znalazło zastosowanie podczas ostatnich etapów procesu wdrażania nowych leków.

Przedstawione poniżej przykłady obrazują przydatność mikromacierzy ekspresyjnych do przewidywania efektywności terapii oraz wykrywania charakterystycznych SNP, co w praktycznym znaczeniu stwarza perspektywę optymalnego doboru leków dla indywidualnego pacjenta. Przy pomocy mikromacierzy DNA wyznaczono wzory ekspresji genów w 60 ludzkich liniach nowotworowych (m.in. nerki, jajników, prostaty, płuc, piersi, a także białaczki i czerniaka), poddanych działaniu różnych cytostatyków (ponad 70 tys. związków chemicznych o udowodnionym lub potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym) [31]. Przeanalizowano uzyskane wzory ekspresji genów pod kątem ich związku z wrażliwością badanych hodowli na zastosowane leki. Okazało się, że otrzymane wzory ekspresji korelowały ze strukturą testowanych związków i były charakterystyczne dla określonego rodzaju komórek. Niosły więc w sobie informację na temat mechanizmu działania leku i oporności komórek na dany lek. Przeprowadzona analiza klastrowa ekspresji genów dla różnych linii komórkowych, w odpowiedzi na badane leki, pozwoliła zaobserwować, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy ekspresją genu *DPYD* (kodującego dehydrogenazę dihydropyrimidynową) a wrażliwością komórek na 5-fluorouracyl. Stwierdzono, że komórki 14 z 18 linii, z niską ekspresją tego genu, są wrażliwe lub silnie wrażliwe na działanie tego związku. Oznacza to, że wykorzystanie *DPYD* jako markera potencjalnej oporności komórek nowotworowych na działanie 5-fluorouracylu mogłoby znacznie podnieść skuteczność stosowanej terapii. Wykazano także, że w przypadku wielu nowotworów, włączając ALL, obserwuje się niedobory w ekspresji genu kodującego syntetazę asparaginową (*ASNS*), co wiąże się z pojawianiem się wrażliwości na terapię L-asparaginą. Podobnie jak dla *DPYD*, stwierdzono przydatność pomiaru ekspresji genu *ASNS* jako markera wrażliwości na leczenie L-asparaginą.

Przydatność techniki mikromacierzy DNA do oceny skuteczności stosowanej terapii może być także wykazana na przykładzie określenia antyapoptotycznego działania deksametazonu, związku o silnym i długotrwałym działaniu przeciwzapalnym, przeciwalergicznym i immunosupre-

syjnym w komórkach raka jajnika pobranych od pacjentek podczas zabiegów operacyjnych [32]. W standardowej terapii raka jajnika deksametazon podawany jest pacjentkom w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia zagrażającej życiu reakcji nadwrażliwości, pojawiającej się w skutek leczenia nowotworu taksanami. W hodowlach poddanych działaniu deksametazonu, przy użyciu techniki mikromacierzy, dokonano oceny ekspresji 8 tys. genów. Stwierdzono, że pod wpływem deksametazonu znacznemu podwyższeniu ekspresji uległo 30 genów, w tym również geny antyapoptyczne, m.in. *MIHC* (ang. *Major Inhibitor of Human Caspases*), *Bcl-2*, *Bcl-XL*, a aktywność kaspazy 3 była zredukowana o 40 %, a więc deksametazon stosowany standardowo w premedykacji przed taksanami, w leczeniu raka jajnika może zmniejszać skuteczność terapii poprzez hamowanie apoptozy.

Pojawienie się mikromacierzy DNA otworzyło nowy rozdział badań z zakresu farmakogenomiki. Przykładem dla zobrazowania starań w kierunku indywidualizacji terapii mogą być prace dotyczące badania wpływu polimorfizmu wybranych genów na skuteczność leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów metotreksatem. Stosowanie tego leku nie zawsze jest skuteczne, czasem związane jest z występowaniem silnych objawów ubocznych i koniecznością przerwania terapii, a czasem jego długie podawanie wywołuje zjawisko oporności. Tak różnorodną odpowiedź u indywidualnych pacjentów upatruje się w występowaniu specyficznych polimorfizmów w genach związanych z metabolizmem i transportem tego leku. Zbadano [33] wpływ polimorfizmu genu *MTHFR*, kodującego reduktazę metylenotetrahydrofolianową, na występowanie u pacjentów efektu toksycznego działania metotreksatu. Stwierdzono, że występowanie, u pacjentów leczonych metotreksatem, polimorfizmu 1298CC było związane z redukcją działań niepożądanych tego związku oraz, że inny rodzaj polimorfizmu, w tym samym rejonie genu (A1298C) może wskazywać na konieczność modyfikowania dawki, w celu osiągnięcia właściwych efektów działania. Wydaje się, że możliwość zastosowania wysokowydajnej techniki wykrywania różnorodnych polimorfizmów genowych, jaką są mikromacierze DNA, pozwoli w przyszłości przewidywać, na podstawie wykrywanych SNP, odpowiedź pacjentów chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów na leczenie metotreksatem.

Prowadzone w ostatnim czasie badania, w kierunku poznania istoty pojawiania się nadciśnienia tętniczego krwi ujawniły występowanie różnych modeli tego schorzenia, związanych również z uwarunkowaniami genetycznymi. Ze zmianami genotypu (w tym również mutacja w pojedynczym genie) wiąże się nie tylko zmiana obrazu fenotypowego choroby ale także zróżnicowana odpowiedź na stosowane w terapii leki. Zaprojektowano [34] mikromacierz do kompleksowego badania 74 pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych, występujących w genach kodujących białka zaangażowane w regulację ciśnienia krwi. Mikromacierz wykorzystana została w pilotowych badaniach, w celu wykazania jej użyteczności do farmakogenetycznej oceny pacjentów z nadciśnieniem. Pacjenci (97) zostali podzieleni na grupy leczone antagonistą receptora typu 1 dla angiotensyny II (irbesartanem) lub selektywnym lekiem β -adrenoli-

tycznym (atenololem). Materiał genetyczny pochodzący od tych pacjentów był poddany genotypowaniu na mikromacierzy. Określono prawie 7200 różnych wariantów genotypów pod względem SNP. Stwierdzono, że profile czterech lub pięciu z tych genotypów mogłyby służyć do prognozowania skuteczności terapii lekami obniżającymi ciśnienie krwi. Na tej podstawie stwierdzono, że technologia mikromacierzy jest użytecznym narzędziem farmakogenetyki do wykrywania SNP i że w przyszłości takie rozwiązanie stanie się rutynowo wykorzystywane w diagnostyce pacjentów z nadciśnieniem, co umożliwi indywidualny dobór leków.

W podsumowaniu tego zagadnienia warto wspomnieć, że amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zaaprobowała już pierwszy test genetyczny, oparty na technologii mikromacierzy DNA, pozwalający przewidzieć, jak organizm pacjenta zareaguje na zastosowane leki. Test opracowany wspólnie przez dwie firmy Affymetrix i Roche o roboczej nazwie AmpliChip CYP450 umożliwia szybką analizę, w pobranej od pacjenta próbce krwi, polimorfizmu genów *CYP2D6* i *CYP2C19*, których ekspresja zachodzi głównie w wątrobie. Produkty tych genów są odpowiedzialne za metabolizm wielu farmaceutyków. Wzmożony, w wyniku mutacji, metabolizm leków, może powodować niemożność osiągnięcia poziomu terapeutycznego, a słaby metabolizm toksyczność działania leków. Możliwość oznaczenia tych mutacji pozwala przewidzieć działanie leku lub brak tego działania i tym samym uczynić terapię bardziej efektywną, poprzez optymalny dobór dawki leku [35].

BADANIE TOKSYCZNOŚCI LEKÓW I DZIAŁAŃ NIEPOŻĄDANYCH

Wiele ksenobiotyków, w tym także leków może indukować specyficzną lub niespecyficzną komórkową kaskadę przekazywania sygnałów, która prowadzi do różnej odpowiedzi, m.in. proliferacji, różnicowania, apoptozy i nekrozy. Dla minimalizowania wpływu ksenobiotyków, tkanki i organy wyposażone są w mechanizmy ochronne, np. transportery błonowe eksportujące ksenobiotyki czy enzymy uczestniczące w detoksykacji [36]. Odpowiedź komórki na stres, związany z pojawieniem się w jej środowisku ksenobiotyku, przejawia się w ekspresji genów kodujących specyficzne białka, uczestniczące w uruchamianych mechanizmach obronnych. W tym kontekście mikromacierze okazały się bardzo użyteczne podczas różnych aplikacji toksykogenomicznych. Wyznaczanie profili mRNA przy użyciu mikromacierzy może potencjalnie zredukować potrzebę wykorzystania modeli zwierzęcych lub badań tkanekowych do wstępnego wykluczenia działania toksycznego w fazie badawczej projektowania leku i późniejszej fazie badań przedklinicznych. Możliwość dokonania wstępnej oceny toksyczności syntetycznego lub naturalnego związku, o potencjalnym działaniu farmakologicznym, pozwala już we wczesnej fazie projektowania wnioskować o jego przydatności terapeutycznej, a znajomość podłoża molekularnego tej toksyczności, umożliwia wykorzystanie istniejącego związku do racjonalnego zaprojektowania bezpieczniejszego pochodnej. Wszystko razem wpływa na podniesienie bezpieczeństwa zastosowania potencjalnego leku w fazie badań klinicznych, w których uczestniczą pacjenci.

Podobnie jak w przypadku badania mechanizmu działania leków, ich potencjalną toksyczność wyznacza się poprzez porównanie profilu ekspresji genów komórek (określonej tkanki/narządu) poddanych działaniu badanego związku z profilami uzyskanymi dla komórek w hodowli kontrolnej (bez obecności leku) lub poddanych działaniu innych związków (leków) o znanym typie toksyczności (np. kardio-, hepato- lub neurotoksycznych), badając ekspresję genów, o których wiadomo, że są markerami powstawania różnego rodzaju działań niepożądanych i/lub uszkodzenia komórek.

Analogicznie do osobniczej zmienności związanej z problemem skuteczności leku, również potencjalna jego toksyczność może wynikać z występowania specyficznych polimorfizmów genowych. Identyfikacja charakterystycznego wzoru ekspresji genów, związanych z metabolizmem badanego leku pozwala uniknąć wyboru związku, który byłby metabolizowany tylko przez jeden polimorficzny gen, co stwarza duże ryzyko, że w przypadku innych indywidualnych polimorfizmów tego genu, może być on kumulowany w komórkach i osiągać toksyczne stężenie lub być przekształcany do wysoce toksycznych pochodnych. W takich przypadkach badania potencjalnej toksyczności leku prowadzone są równolegle z badaniem jego mechanizmu działania i skupione są na identyfikacji genów, których produkty związane są z uruchamianiem specyficznych mechanizmów w komórce na skutek obecności leku.

Na rynku są dostępne mikromacierze, na których reprezentowane są sondy genów ludzkich, związanych ze zjawiskiem toksyczności (np. ToxBlot II, 12564 geny). Takie mikromacierze umożliwiają w warunkach *in vitro* dokonanie symulacji ekspresji genów w komórkach poddanych działaniu nowego związku i dokonanie szczegółowej oceny pod kątem potencjalnie uruchamianych mechanizmów toksyczności. Wspomniana już mikromacierz ToxBlot II była wykorzystana do wyznaczenia profilu ekspresji genów w komórkach fibroblastycznych poddanych działaniu wyciągu z orzecha palmy betelowej (*Areca catechu*), zawierającego alkaloidy, głównie arekolinę, o właściwościach stymulujących, euforyzujących oraz poprawiających pracę układu pokarmowego. Są one silnie toksyczne. Epidemiologiczne badania przeprowadzone w Azji wskazują, że spożywanie tych orzeszków może być związane z podwyższoną zachorowalnością Azjatów na nowotwory jamy ustnej. Wyznaczony profil ekspresji genów w komórkach ludzkich fibroblastów po inkubacji z ekstraktem pochodzącym z orzechów arekowych wskazuje na wzrost ekspresji genu kodującego IL-6 i obniżenie ekspresji genów kodujących PDGFR, KGF-1 i APP-1. Obniżenie ekspresji keratynocytowego czynnika wzrostu (KGF-1), w fibroblastach jamy ustnej, potencjalnie osłabia proliferację keratynocytów, co może częściowo wyjaśniać zjawisko częstego zaniku komórek nabłonkowych, obserwowane u osób notorycznie żujących orzeszki [37, 38].

Problem występowania działań niepożądanych leków jest poważny, ponieważ dla wielu związków skutki uboczne ich stosowania nie od razu uwidaczniają się na początku terapii, a ich wyeliminowanie może wymagać kolejnego

specjalistycznego leczenia. Przykładem takich związków mogą być inhibitory proteazy wirusa HIV, które, ratując życie chorym na AIDS, powodują u nich wzrost poziomu cholesterolu i triglicerydów we krwi oraz nietypowe rozmieszczenie w ciele tłuszczu i oporność na insulinę [39]. Wiedząc, że gospodarka tłuszczami kontrolowana jest przez wątrobę sprawdzono czy jeden z inhibitorów proteazy – ritonawir – wywołuje niektóre z typowych dla tego leku działania niepożądane, właśnie wskutek oddziaływania na wątrobę. Wyznaczono profile ekspresji genów tkanki wątroby, poddanej działaniu związków potencjalnie toksycznych dla tego narządu, które podzielono według podobieństwa wzorów ekspresyjnych, obejmujących około 2400 genów reagujących na te substancje oraz profil dla ritonawiru i porównano go z otrzymanymi poprzednio. Okazało się, że ritonawir powoduje aktywację określonych genów, czego efektem jest podwyższenie poziomu lipidów. Wpływa także na spadek ekspresji składników proteasomów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niepożądane efekty obserwowane u pacjentów, podczas stosowania ritonawiru, związane są z jego mechanizmem działania w wątrobie. W wyniku tego następuje podniesienie poziomu lipidów w wątrobie, a w efekcie także we krwi w skutek zwiększenia ich syntezy i zahamowania rozkładu związanych z nimi białek.

OCENA BIORÓWNOWAŻNOŚCI I BIODOSTĘPNOŚCI LEKÓW

Zasadniczym problemem jaki pojawia się przy dopuszczeniu do obrotu leków odtwórczych jest kwestia ich jakości w porównaniu z lekiem oryginalnym. Przegląd piśmiennictwa medycznego wskazuje na możliwość wystąpienia ryzyka pogorszenia stanu chorego przy zamianie leku oryginalnego na jego odpowiednik lub jednego leku odtwórczego na inny. Problem kliniczny akceptacji leków odtwórczych sprowadza się głównie do wykazania ich biorównoważności z produktem oryginalnym. Zgodnie z wytyczną *Committee for Proprietary Medicinal Products* „Badania biodostępności i biorównoważności” dwa produkty są biorównoważne, jeżeli są farmaceutycznie równoważne lub alternatywne i ich biodostępność, po podaniu w takiej samej dawce jest podobna w takim stopniu, że ich efektywność działania w odniesieniu do skuteczności i bezpieczeństwa jest istotnie taka sama [40]. Ocena biorównoważności leku odtwórczego nie jest sprawą prostą ponieważ mają na nią wpływ zarówno fizykochemiczne właściwości substancji leczniczej i postać leku, jak i stan fizjologiczny pacjenta, czynniki farmakogenetyczne, zaburzenia czynności układu pokarmowego, nerek, wątroby, zaburzenia hormonalne i oddziaływanie z innymi lekami. Między innymi dlatego cytowana wytyczna wskazuje, że fenotypowanie i/lub genotypowanie populacji powinno być brane pod uwagę we wczesnych badaniach biodostępności i dla wszystkich badań wykorzystujących równoległe grupy pacjentów, jak również w badaniach krzyżowych (takich jak badania: biorównoważności, proporcjonalności dawki, interakcji lek-lek oraz lek-żywność), których celem jest wykazanie bezpieczeństwa lub ustalenie farmakokinetyki reakcji. Problem wykazania podobieństwa dwóch leków wydaje się być szczególnie istotny w przypadku leków pochodzenia biotechnologicznego/biologicznego, dla których dokonuje się oceny biopodobieństwa (zamiast biorównoważności).

Mikromacierze w badaniach biorównoważności i biopodobieństwa mogą znaleźć zastosowanie m.in.: do wstępnego genotypowania ochotników zakwalifikowanych do badania, w celu wykluczenia zmienności farmakogenetycznej, do wyznaczania odpowiedzi komórkowej u pacjentów w trakcie badań oraz do wstępnego wykazania podobieństwa mechanizmu działania dwóch leków w modelowych układach *in vitro*. Badania biorównoważności z wykorzystaniem mikromacierzy DNA, prowadzi się w oparciu o założenie, że istnieje korelacja pomiędzy farmakokinetyką związku i charakterystycznym wzorem odpowiedzi na poziomie genomu [41]. Schemat eksperymentu jest stosunkowo prosty, na mikromacierzy zawierającej możliwie najszerszy zestaw sond genowych (dla ludzkiego genomu), dokonuje się porównania wzorów ekspresji genów pochodzących z odpowiednich komórek (np. tkanki, organu, hodowli modelowej, będących celem dla leku) poddanych niezależnie działaniu porównywanych leków: oryginalnego i odtwórczego. Przyjmuje się, że dwa leki wykazują równoważność jeżeli otrzymane dla nich wzory ekspresji genów w komórkach są do siebie podobne.

Wydaje się, że również w tym aspekcie, mikromacierze DNA znajdują praktyczne zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, z uwagi na potencjalną możliwość dokonywania przy ich zastosowaniu oceny podobieństwa leku odtwórczego do już istniejącego leku oryginalnego, w układzie modelowym. Mikromacierze nie zastąpią badań z wykorzystaniem ochotników, ale dopracowanie zasad analizy bioinformatycznej oraz schematów eksperymentalnych dla dokonywania oceny równoważności biologicznej leków, z użyciem tej technologii, być może sprawi, że w przyszłości eksperymenty biorównoważności będą mogły zostać przynajmniej ograniczone pod względem liczby uczestników tych programów.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w tym artykule przykłady jednoznacznie pokazują, że technika mikromacierzy DNA w ostatnich latach, stała się popularnym narzędziem w badaniach ekspresji genów, których profilowanie dostarcza cennej wiedzy na temat potencjalnych celów terapeutycznych, mechanizmu działania nowych leków, skuteczności stosowanej terapii i bezpieczeństwa stosowania leków. Poszukiwanie i sprawdzanie nowych celów terapeutycznych i odpowiednich dla nich leków, w oparciu o różnice wykrywane we wzorach ekspresji genów w komórkach zdrowych i chorobowo zmienionych, staje się powoli standardem w opracowywaniu nowoczesnych terapii. Dla nowo odkrywanych substancji leczniczych, badania zmian w ekspresji genów w komórkach poddanych ich działaniu, dostarczają informacji na temat potencjalnego mechanizmu działania, w szczególności dotyczy to badania efektu włączania i wyłączania określonych genów za pomocą siRNA. Profilowanie ekspresji genów umożliwia charakteryzowanie pod względem farmakogenetycznej skuteczności i potencjalnej toksyczności, związki zakwalifikowane do badań klinicznych. Na wszystkich tych etapach wykorzystanie techniki mikromacierzy DNA podnosi wydajność prowadzonych badań, tym samym skracając czas niezbędny na zebranie odpowiedniej

ilości informacji. Dzięki możliwości równoczesnej oceny ekspresji tysięcy genów, mikromacierze DNA są obecnie jedynym narzędziem, za pomocą którego odkrywane mogą być nawet bardzo subtelne zmiany towarzyszące badanym zjawiskom. Powstanie systemów zdolnych do oceny całego poznanego do tej pory ludzkiego genomu rozwiązuje częsty dylemat badaczy jakie geny zbadać, a jakie pominąć.

Oczywistym jest, że analizy ekspresji genów posiadają swoje ograniczenia. Monitorowanie transkrypcyjnych zmian tylko pośrednio może służyć pomiarowi syntezy białka. Ze względu na fakt, że białka mogą ulegać potranslacyjnym modyfikacjom, wpływającym na ich lokalizację subkomórkową, wydzielanie i tworzenie kompleksów z innymi białkami, poziom mRNA niekoniecznie jest dobrym estymatorem poziomu kodowanego przez niego białka [42]. Dlatego bardzo ważnym podczas analizy wyników jest pełne zrozumienie istoty pomiaru dokonywanego na mikromacierzach genomowych: jakich informacji dostarczają? W najbliższej przyszłości można się spodziewać szybkiego rozwoju techniki mikromacierzy białkowych, które wraz z opisywaną techniką mikromacierzy DNA pozwolą na globalną ocenę molekularnych zjawisk zachodzących w komórkach, podczas powstawania zmian chorobowych i pod wpływem otaczającego środowiska.

Dalsze prace dotyczące rozwoju techniki mikromacierzy DNA będą zapewne zmierzały w kierunku obniżenia kosztów, które są dla powszechnego zastosowania nadal wysokie, podniesienia czułości, powtarzalności, odporności na niewielkie zmiany warunków eksperymentalnych, użyteczności i wzrostu dostępności. Poważnym wyzwaniem są także istniejące ciągle trudności metodologiczne w zakresie prawidłowego opracowania i interpretacji olbrzymiej ilości danych pochodzących z eksperymentów mikromacierzowych. Tym niemniej mikromacierze DNA będą niewątpliwie, w miarę przewyższania powyższych trudności, zajmować coraz bardziej znaczącą pozycję nie tylko w laboratoriach, ale także przy łóżku chorego. Być może już niedługo laserowe czytniki genomowych mikromacierzy zastąpią mikroskopy w pracowniach patomorfologicznych, a lekarze na podstawie wzoru ekspresji genów będą podejmowali decyzje na temat wyboru optymalnej terapii dla swoich pacjentów.

PIŚMIENNICTWO

1. Penisi E (2003) Human genome: Reaching their goal early, sequencing labs celebrate. *Science* 300: 409
2. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470
3. Mirowski M, Bartkowiak J (2000) Mikroprocesory DNA w badaniach biomedycznych. *Postępy Biochem* 46: 272-281
4. Solińska M, Jasińska A, Jackowski G (2004) Technika mikromacierzy DNA w analizie wielkoskalowych zmian ekspresji genów roślinnych w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. *Postępy Biochem* 50: 371-382
5. Hegde PQR, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Nesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 29: 548-562
6. Hsieh HB, Fitch J, White D, Torres F, Roy J, Matusiak R, Krivacic B, Kowalski B, Bruce R, Elrod S (2004) Ultra-high-throughput microarray


- generation and liquid dispensing using multiple disposable piezoelectric ejectors. *J Biomol Screen* 9: 85-94
7. Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* 16: 301-306
8. Kanonen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhost J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847
9. Watson A, Mazumder A, Stewart M, Balasubramanian S (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 9: 609-614
10. Xiang CC, Chen Y (2000) cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnol Adv* 18: 35-46
11. Aitman TJ (2001) DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 323: 611-615
12. Macgregor PF, Squire JA (2002) Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 48: 1170-1177
13. Teh MT, Blyndon D, Chaplin T, Foot NJ, Skoulakis S, Raghavan M, Harwood CA, Proby CM, Philpott MP, Young BD, Kelsell DP (2005) Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res* 65: 8597-8603
14. Wirtenberger M, Hemminki K, Chen B, Burwinkel B (2005) SNP microarray analysis for genome-wide detection of crossover regions. *Human Genetics* 117: 389-397
15. Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, Stilwell JL, Carrano AV, Andersen GL (2002) Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol Cell Probes* 16: 119-127
16. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-537
17. Williams ED, Brooks JD (2001) New molecular approaches for identifying novel targets, mechanisms, and biomarkers for prostate cancer chemopreventive agents. *Urology* 57:100-102
18. Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF (2004) DNA-Microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci* 5: 782-792
19. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM (2003) Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 95: 14-18
20. Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA (2002) High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-Cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 20: 2417-2428
21. Matson RS (2005) Applying genomic and proteomic microarray technology in drug discovery, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC
22. Neamati N, Barchi JJ Jr. (2002) New paradigms in drug design and discovery. *Curr Top Med Chem* 2: 211-227
23. van Durin M, Woolson H, Mallinson D, Black D (2003) Genomics in target and drug discovery. *Biochem Soc Trans* 31: 429-432
24. Katsuma S, Tsujimoto G (2001) Genome medicine promised by microarray technology. *Expert Rev Mol Diagn* 1: 377-382
25. Clarke PA, Poele R, Workman P (2004) Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur J Cancer* 40: 2560-2591
26. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1: 133-143
27. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA,

- Chinnaiyan AM (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629
28. Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltne JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, Wahl LM, Harris ED, Mikovits JA, Monks AP, Hollingshead MG, Sausville EA, Staudt LM (2001) Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2: Research 0041.1-0041.11
 29. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2: 151-163
 30. Reinhold WC, Kouros-Mehr H, Kohn KW, Maunakea AK, Lababidi S, Roschke A, Stover K, Alexander J, Pantazis P, Miller L, Lin E, Kirsch IR, Urasaki Y, Pommier Y, Weinstein JN (2003) Apoptotic susceptibility of cancer cells selected for camptothecin resistance: gene expression profiling, functional analysis, and molecular interaction mapping. *Cancer Res* 63: 1000-1011
 31. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24: 236-244
 32. Runnebaum IB, Walz L, Stickeler E, Möbus VJ, Brüning A (2004) Microarray analysis of apoptosis resistance mediated by dexamethasone in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 22: 5037
 33. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, Abou Atta I, Mevorach D, Friedman G, Ben-Yehuda A (2004) Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 63: 1227-1231
 34. Liljedahl U, Karlsson J, Melhus H, Kurland L, Lindersson M, Kahan T, Nystrom F, Lind L, Syvanen AC (2003) A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics* 13: 7-17
 35. de Leon J (2006) AmpliChip CYP450 test: personalized medicine has arrived in psychiatry. *Expert Rev Mol Diagn* 6: 277-286
 36. Chin KV, Kong AN (2001) Application of DNA microarrays in pharmacogenomics and toxicogenomics. *Pharm Res* 19: 1773-1778
 37. Pennie WD (2002) Custom cDNA microarrays; technologies and applications. *Toxicology* 181: 551-554
 38. Ko SY, Lin SC, Chang KW, Liu CJ, Chang SS, Lu SY, Liu TY (2003) Modulation of KGF-1 gene expression in oral fibroblasts by ripe areca nut extract. *J Oral Pathol Med* 32: 399-407
 39. Ulrich R, Friend SH (2001) Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? *Nat Rev Drug Discov* 1: 84-88
 40. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence". <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>
 41. Chow SC, Shao J, Li L (2004) Assessing bioequivalence using genomic data. *J Biopharm Stat* 14: 1054-3406
 42. Lillie J (1997) Probing the genome for new drugs and targets with DANN arrays. *Drug Dev Res* 47: 160-172

DNA microarrays – perspective of application for drug effectivity and safety evaluation

Iza Roman 

National Medicines Institute, 30/34 Chelmska Str., 00-725 Warszawa, Poland

 e-mail address: izar@il.waw.pl

Key words: DNA microarray, gene expression, pharmacogenomics, toxicogenomics

ABSTRACT:

Microarray technology provides a unique tool for the determination of gene expression at the level of messenger RNA (mRNA). Microarray has been successfully applied to the high throughput simultaneous expression of many thousands of genes in a single experiment. One important application of DNA microarray technology, within the context of drugs effectiveness and safety evaluation studies, is its use as a screening tool for the identification of biochemical pathways, potential targets for novel molecular therapeutics, for the identification of molecular mechanisms of toxicity and to understand and predict individual drug sensitivity and resistance. The purpose of this review is presentation of the utility of DNA microarray technology in all phases of the drug discovery process.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych, krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach oraz listów do Redakcji. Redakcja nie ogranicza objętości manuskryptów, jakkolwiek w każdym przypadku zalecana jest zwięzłość stylu, bez utraty jasności przekazu.

Autorzy odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel i rycin (wykresy, schematy, reakcje, wzory chemiczne, fotografie), w uzasadnionych przypadkach kolorowych. W przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, do czego Redakcja zachęca, należy uzyskać i przekazać nam zgodę na przedruk, zarówno od autorów, jak i z wydawnictwa. Niemniej konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa jest również mile widziane. Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była publikowana ani nie została zgłoszona do publikacji w innym czasopiśmie, natomiast jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”, jej publikacja w całości lub we fragmentach w innym czasopiśmie wymagać będzie uprzedniej zgody Redakcji.

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek od autorskich, Autorzy otrzymują drogą elektroniczną opinię recenzentów i proszeni są o przygotowanie poprawionej wersji manuskryptu i odesłanie go do Redakcji w ciągu 8 tygodni. Ostateczną decyzję o przyjęciu pracy podejmuje Redaktor Naczelny w ciągu 2 tygodni od otrzymania poprawionej wersji manuskryptu.

Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty autorskiej i poinformowania Redakcji o koniecznych zmianach, pocztą elektroniczną lub faksem, w ciągu 3 dni od chwili otrzymania.

Każdy z Autorów otrzymuje jeden egzemplarz numeru „Postępów Biochemii”, w którym ukazał się jego artykuł.

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

Przed przystąpieniem do napisania artykułu Autorzy są proszeni o zapoznanie się z najnowszym numerem „Postępów Biochemii”, aby przygotować pracę pod względem edytorskim, językowym oraz jakością materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

Prosimy o nadsyłanie prac pocztą elektroniczną. W wyjątkowych przypadkach dopuszcza się przysyłanie prac na dyskietce lub płycie CD. Tekst winien być zapisany jako *.doc w formacie IBM PC, a pliki zawierające ryciny jako: *.tif, *.cdr, *.psd lub *.eps. Tekst powinien być napisany z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Times New Roman 12 lub Arial 12. Symbole i znaki specjalne prosimy wstawiać komendą „insert”. W tekście prosimy wskazać miejsce umieszczenia figur i tabel.

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem

telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

Kolejno numerowane strony obejmują streszczenie (do 150 wyrazów), tekst pracy i piśmiennictwo. Na kolejnych stronach winny być umieszczone tabele oraz tytuły i objaśnienia rycin. Ostatnia strona winna zawierać następujące informacje w języku angielskim: tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów oraz miejsca pracy, słowa kluczowe (do 6) i krótkie streszczenie artykułu (do 150 wyrazów).

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych. Redakcja zaleca zacytowanie co najwyżej 70 publikacji, w większości pochodzących z ostatnich 10 lat. Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania. W tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Sposób cytowania prac oryginalnych (1) i przeglądowych (2), książek (3), rozdziałów z książek jednotomowych (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

- Jiang QX, Wang ON, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of Kv AP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
- Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
- Dołowy K, Szewczyk A, Pikula S (2003) *Blony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
- Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum lumenal environment, W: Pochet R (red) *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
- Darżynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) Struktura i funkcja końca 5' (KAPU) mRNA i U snRNA, W: Koroniak H, Barciszewski J (red) *Na pograniczu chemii i biologii, t. IV*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, str. 143-179

Tabele winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami umieszczonymi pod tabelą. Wielkość tabel powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm).

Ilustracje: ryciny winny być zapisane jako: *.tif, *.cdr, *.psd, lub *.eps. Ryciny powinny być wykonane w skali 1:1. Wielkość ryciny powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8 p. Ilustracje i tabele prosimy przysyłać w osobnych plikach. Bitmapy (pliki tif, psd) powinny mieć minimalną rozdzielczość 300 dpi dla obrazów kolorowych i skali szarości (zdjęcia czarno-białe) oraz 600 dpi dla ilustracji czarno-białych (schematy, wzory strukturalne zawierające tylko czerni i biel).

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: postepy@nencki.gov.pl

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysłanie pracy na dyskietce lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

Sławomir Pikula
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

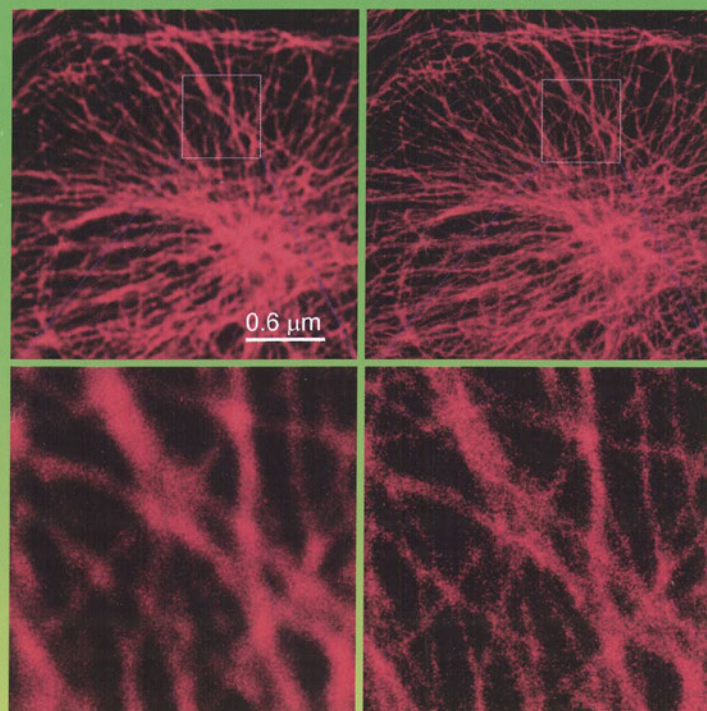
Oplata za druk: Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Oplata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm

Kilkuletnie starania o pozyskanie środków finansowych z funduszy strukturalnych UE w okresie 2004-2006 zakończyły się wielkim sukcesem **Centrum Zaawansowanych Technologii „Biotechnologii, Informatyki Stosowanej i Medycyny - Kampus Ochota”**. W ramach projektu **Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego**, koordynowanego przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, a realizowanego wspólnie z Akademią Medyczną i Uniwersytetem Warszawskim, zrealizowane zostaną inwestycje aparaturowe o wartości ponad 15 milionów złotych. Jest to największy tego typu projekt realizowany w ramach SPO WKP 1.4 w Polsce.

konwencjonalny mikroskop
konfokalny

mikroskop konfokalny
z systemem STED



mikrotubule w komórce nabłonkowej wyznakowane przeciwciałami skoniugowanymi z barwnikiem Atto 647

W ramach projektu zostanie m.in. zakupiony nowoczesny mikroskop konfokalny wyposażony w unikatową technikę STED (ang. *stimulated emission-depletion*) (Leica), pozwalającą na obserwacje z rozdzielczością 90 nm, tzn. 2.5 raza lepszą niż tzw. limit Abbego - wartość od ponad 100 lat uznawana za nieprzekraczalną. Ten przełomowy wynalazek jest dziełem niemieckiego naukowca, Prof. Stefana Hella, pioniera mikroskopii „superrozdzielczej”. Urządzenie, które zostanie zakupione przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, jest jednym z pierwszych na świecie. Mikroskop będzie przystosowany do prowadzenia badań przyżyciowych, obrazowania grubych preparatów (> 200 μm) oraz badań z zastosowaniem technik FRET i FRAP.

W ramach projektu zostaną również zakupione:

- zestaw do badań metodą Tomografii Rezonansu Magnetycznego: pierwszy w Polsce system MRI wykorzystujący 32-kanalową technologię RF
- mikroskop elektronowy transmisyjny z systemem umożliwiającym obrazowanie rozkładu pierwiastków w preparacie biologicznym
- stanowisko umożliwiające archiwizację danych obrazowych w formie cyfrowej oraz zaawansowane przetwarzanie informacji wizualnej w rozproszonym systemie gridowym



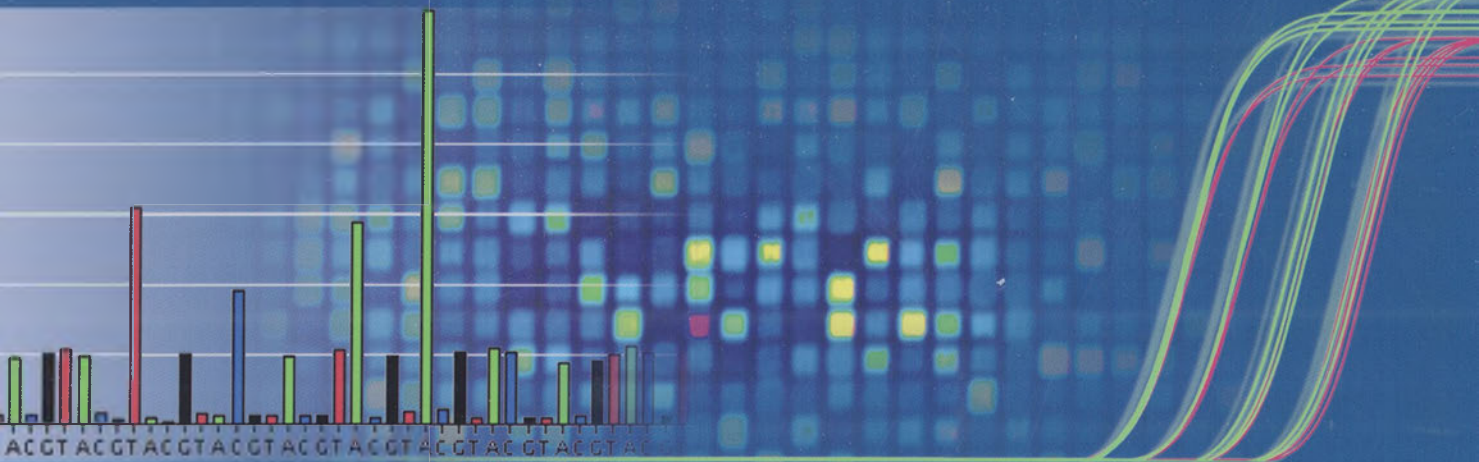
UNIA DLA PRZEDSIĘBIORCZYCH
PROGRAM KONKURENCYJNOŚĆ



Projekt współfinansowany przez
UNIĘ EUROPEJSKĄ
ze środków
Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego

bim
CZT
KAMPUS - OCHOTA

<http://rcin.org.pl>



www.roche-applied-science.com

Technologia umożliwiająca odkrycia w genomice

Od genomu do funkcji genu

Pozostań w czołówce odkryć w genomice stosując precyzyjnie zaprojektowane urządzenia, nowe aplikacje i innowacyjne technologie Roche Applied Science. Łączymy światowej klasy technologie sekwencjonowania, mikromacierzy i PCR w czasie rzeczywistym z szerokim wachlarzem wysokiej jakości odczynników oraz znaną opinią o zaangażowaniu we wspieranie użytkowników naszych produktów, dostarczając najbardziej wszechstronnego z dostępnych zestawu narzędzi:

454
SEQUENCING

Genome Sequencer FLX System

Sekwencjonuj DNA z niezrównaną kombinacją kompletności uzyskiwanych danych i szybkością.

NimbleGen[®]

NimbleGen™ DNA Microarrays

Wybierz za swój cel i analizuj całe genomy lub specyficzne regiony z zastosowaniem długich oligonukleotydów przy wysokiej rozdzielczości (2,1 miliona sond).

LightCycler[®]

LightCycler® 480 Real-Time PCR System

Stosuj PCR w czasie rzeczywistym do ilościowej analizy genów i wykrywania zmienności genetycznej.

Odkrywaj... Analizuj...Potwierdzaj.

Odwiedź naszą stronę internetową www.roche-applied-science.com w celu uzyskania dodatkowych informacji lub by skontaktować się z naszym lokalnym przedstawicielem.

LIGHTCYCLER jest zastrzeżonym znakiem towarowym Roche.

454 i GENOME SEQUENCER są zastrzeżonymi znakami towarowymi 454 Life Sciences Corporation, Branford, CT, USA.

NimbleGen jest zastrzeżonym znakiem towarowym NimbleGen Systems, Inc.

© 2008 Roche Diagnostics GmbH. Wszystkie prawa zastrzeżone.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6B
01-531 Warszawa
www.roche-applied-science.com
tel. 022 481 55 70
fax 022 481 55 92



<http://rcin.org.pl>