

P.2131A

# POSTĘPY BIOCHEMII

27.05.2011

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
WARSZAWA 2010  
TOM 56  
NUMER 3

Stres oksydacyjny w przebiegu hemostazy

Stres oksydacyjny a starzenie się

Dinitrozyłowe kompleksy żelaza



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed  
[www.postepybiochemii.pl](http://www.postepybiochemii.pl)

Numer specjalny pod redakcją Grzegorza Bartosza  
<http://rcin.org.pl>

Część II

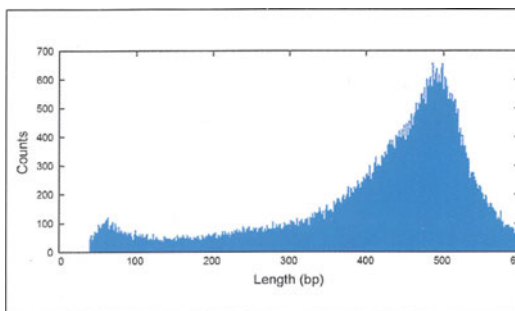


[www.454.com](http://www.454.com)

## GS Junior Sequencing System

Big

# The Next Thing in Sequencing *is small.*



**Figure 1: Example Read Length Distribution of 100,000 reads from *E. coli* K-12 (genome size approximately 4.5 Mb), from a single GS Junior System run.**

Bring the power, performance, speed, and long reads of the GS FLX Titanium chemistry to your benchtop with the newest addition to the Roche genome sequencing portfolio – the GS Junior Sequencing System.

- **Make the most of your sequencing projects with our 400- to 500-base-pair read lengths (Figure 1).**
- **Benefit from established technology that has enabled hundreds of peer-reviewed publications.**
- **Accelerate your next discovery using the system's comprehensive suite of dedicated data analysis software.**

For complete information on the GS Junior System and all of the Roche sequencing solutions, visit [www.gsjunior.com](http://www.gsjunior.com) or contact your local Roche representative today.

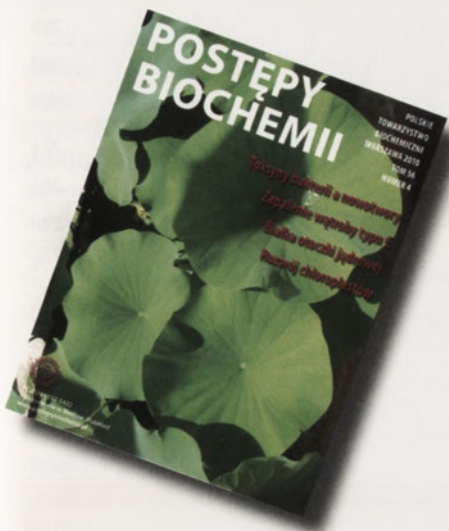
**For life science research only.  
Not for use in diagnostic procedures.**

**454**  
SEQUENCING

454, 454 SEQUENCING, GS JUNIOR, and GS FLX are trademarks of Roche <http://rcin.org.pl>  
© 2010 Roche Diagnostics. All rights reserved.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.  
ul. Wyrzeże Gdynskie 6B  
01-531 Warszawa  
[www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)  
[biologia.molekularna@roche.com](mailto:biologia.molekularna@roche.com)  
tel. 22 481 55 55  
fax. 22 481 55 92





## W NASTĘPNYM NUMERZE:

**Wpływ toksyn bakteryjnych na proces nowotworzenia**

Anna M. Stachowicz, Paweł Łaniewski, Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka

**Przewlekłe zapalenie wątroby i infekcja utajona w przebiegu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C**

Arleta Kowala-Piaskowska, Iwona Mozer-Lisewska, Tram N.Q. Pham, Tomasz I. Michalak

**Białka szkieletu jądrowego i otoczki jądrowej w regulacji ekspresji genów i przebiegu cyklu komórkowego – znane białka w nowych rolach**

Magda Dubińska-Magiera, Magdalena Zaremba-Czogalla, Ryszard Rzepecki

## Rycina na okładce:

Fibroblasty myszy (hodowla pierwotna) z wybarwionymi mitochondriami (czerwone, MitoTracker CMXRos) i filamentami aktynowymi (zielone, falloidyna-Tritc). Fotografię z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 wykonała Joanna Szczepanowska z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie (wykorzystano za zgodą Autorki).

## NUMER SPECJALNY POD REDAKCJĄ GRZEGORZA BARTOSZA

## TEMAT NUMERU – REAKTYWNE POCHODNE TLENU, STRES OKSYDACYJNY, ANTYOKSYDANTY – CZĘŚĆ II

## WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

## Wiadomości krajowe

pod red. Teresy Wesołowskiej

233

## ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

## Stres oksydacyjny w przebiegu hemostazy

Paweł Nowak, Beata Olas, Barbara Wachowicz

239

## Stres oksydacyjny w chorobach neurodegeneracyjnych – potencjalne właściwości antyoksydacyjne katecholamin

Katarzyna Jodko-Piórecka, Grzegorz Litwinienko

248

## Stres oksydacyjny jako uniwersalna przyczyna starzenia się – od somatycznych komórek człowieka do jednokomórkowych drożdży i prokariotycznych komórek bakterii

Krzysztof Książek

260

## Białkowe fosfatazy tyrozynowe – endogenne markery stresu oksydacyjnego

Alicja Kuban-Jankowska, Magdalena Górka, Adam Dębicki, Urszula Popowska, Narcyz Knap, Michał Woźniak

269

## Fenolowe antyoksydanty interwentywne – aktywność i mechanizmy działania

Ewelina Kowalewska, Grzegorz Litwinienko

274

## Znaczenie pro-utleniających właściwości flawonoidów w indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne

Małgorzata Muzolf-Panek, Bożena Tyrakowska

284

## Udział melanocytów w ochronie przed stresem fotooksydacyjnym

Krystyna Stępień

290

## Dinitrozyłowe kompleksy żelaza – budowa i znaczenie biologiczne

Hanna Lewandowska, Kamil Brzośka, Sylwia Męczyńska-Wielgosz, Karolina Rumianek, Grzegorz Wójciuk, Marcin Kruszewski

298

## Homeostaza żelaza – mechanizm obronny w stresie oksydacyjnym

Paweł Lipiński, Rafał R. Starzyński, Agnieszka Styś, Monika Straciło

305

## Budowa i funkcja białek ATP7A i ATP7B – ATPaz transportujących jony miedzi

Małgorzata Lenartowicz, Wojciech Krzeptowski

317

## KWASY NUKLEINOWE

## Udział domen jądrowych w reakcji komórki na uszkodzenia DNA

Daniel Wysokiński, Janusz Błasiak, Katarzyna Woźniak

328

## Termodynamiczne aspekty oddziaływania niskocząsteczkowych ligandów z DNA

Karolina Jagiełło, Anita Dopierała, Jan Mazerski

341

Events/Opinions/Comments	233
<b>REVIEWS</b>	
Oxidative stress in haemostasis	239
Oxidative stress in the neurodegenerative diseases – potential antioxidant activity of catecholamines	248
Oxidative stress as an universal cause of aging – from human somatic cells to the unicellular yeast and bacteria	260
Protein tyrosine phosphatases – endogenous markers of oxidative stress	269
Phenolic chain-breaking antioxidants – their activity and mechanisms of action	274
Role of pro-oxidant properties of flavonoids in the induction of detoxifying enzymes gene expression	284
The role of melanocytes in protection against photooxidative stress	290
Dinitrosyl iron complexes – structure and biological functions	298
Iron homeostasis, a defense mechanism in oxidative stress	305
Structure and function of ATP7A and ATP7B proteins – Cu-transporting ATPases	317
Involvement of nuclear domains in the cellular response to DNA damage	328
Thermodynamics aspects of interactions between small ligands and DNA	341

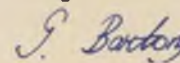
## Stres oksydacyjny

Numer specjalny *Postępów Biochemii* poświęcony reaktywnym pochodnym tlenu, stresowi oksydacyjnemu i antyoksydantom rozrósł się do rozmiarów dwóch numerów i otworzyliście właśnie Państwo drugi z nich. Rozpoczynają go artykuły poświęcone roli reaktywnych pochodnych tlenu w procesach hemostazy (Nowak i wsp.), w chorobach neurodegeneracyjnych (Jodko-Piórecka i Litwienienko) i w starzeniu się (Książek). Artykuł Kuban-Jankowskiej i wsp. przedstawia białkowe fosfatazy tyrozynowe jako czułe endogenne markery stresu oksydacyjnego. Kolejne artykuły poświęcone są antyoksydantom. Pierwszy z nich (Kowalewska i Litwienienko) omawia mechanizmy działania fenolowych antyoksydantów interwencyjnych, drugi (Muzolf-Panek i Tyrakowska) przedstawia dane świadczące o korzystnej roli prooksydacyjnej aktywności flawonoidów, trzeci (Stępień) dyskutuje rolę nie tylko melaniny, lecz w ogóle melanocytów w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Jony metali, zwłaszcza żelaza i miedzi, odgrywają ważną rolę w stresie oksydacyjnym. Ostatnie trzy artykuły poświęcone są tym właśnie metalom: dinitrozylowym kompleksom żelaza (Lewandowska i wsp.), homeostazie żelaza (Lipiński i wsp.) oraz dwóm ATPazom transportującym jony miedzi (Lenartowicz i Krzeptowski).

Przy okazji drobna uwaga terminologiczna. Nie ingerując już w słownictwo stosowane w artykułach, osobiście używam terminu „reaktywne pochodne” zamiast „reaktywne formy” tlenu. Wydaje mi się on bardziej właściwy: wolne rodniki tlenowe lub nadtlenek wodoru to przecież związki, a nie formy tlenu jako pierwiastka.

Mam nadzieję, że lektura numeru specjalnego *Postępów Biochemii* wzbogaci i uaktualni Państwa informacje o stresie oksydacyjnym i o mechanizmach przeciwdziałających temu zjawisku.

Grzegorz Bartosz



### 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 Zielńska

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

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

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

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

Wydawca: Polskie Towarzystwo Biochemiczne; ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel/fax (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.

19 czerwca 2010 r. nagrodę im. Tadeusza Browicza (nagroda Wydziału V Lekarskiego Polskiej Akademii Umiejętności – PAU) za rok 2010 otrzymali profesorowie Józef Dulak i Alicja Józkowicz (Fot. 1) z Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, za „oryginalne i nowatorskie badania nad rolą oksygenazy hemowej w mechanizmach powstawania naczyń krwionośnych”. Nagrodę wręczyli Prezes PAU profesor Andrzej Białas i Dyrektor Wydziału V Lekarskiego PAU profesor Edmund Przegaliński. Druga nagroda, nagroda dla młodego naukowca, została przyznana prof. Tomaszowi Guzikowi, kierownikowi Kliniki i Katedry Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi Collegium Medicum UJ, za oryginalne i nowatorskie badania nad mechanizmami stresu oksydacyjnego w naczyniach krwionośnych w chorobie niedokrwiennej serca. Prof. Tomasz Guzik pełni od bieżącego roku funkcję prezesa Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą; zastąpił prof. Marka Naruszewicza kierującego Towarzystwem od 1992 roku (inicjatora powołania Towarzystwa i dynamicznego przewodniczącego). Profesor Tomasz Guzik przebywa obecnie za granicą i odbierze nagrodę w późniejszym terminie.



Fot. 1. Profesorowie Alicja Józkowicz i Józef Dulak (przy drzwiach z lewej strony) odbierają nagrodę im. Tadeusza Browicza.

W uzasadnieniu stwierdzono: tworzenie nowych naczyń krwionośnych zwane angiogenezą (naczynia powstają już z istniejących kapilar) lub waskulogenezą (powstają z komórek macierzystych) jest niezbędne dla rozwoju organizmu, a w życiu dorosłego człowieka odgrywa kluczową rolę m.in. w prawidłowym gojeniu ran. Zaburzenia tych procesów związane są np. z rozwojem nowotworów, kiedy nowe naczynia stymulują rozwój guza, natomiast niewy-

starzająca angiogeneza i waskulogeneza przyczyniają się do postępu choroby niedokrwiennej serca lub są powodem powstawania niegojących się owrzodzeń u pacjentów z cukrzycą. Laureaci wykazali, że oksygenaza hemowa-1 ma istotne znaczenie w tworzeniu naczyń, dlatego może być celem terapeutycznym w leczeniu cukrzycy i jej powikłań, hamowaniu wzrostu nowotworów czy stymulacji procesów regeneracji mięśnia sercowego po zawale serca. Ponadto okazuje się, że oksygenaza hemowa-1 jest również ważnym enzymem w funkcjonowaniu różnych rodzajów komórek macierzystych, np. szpiku kostnego, które są obecnie obiektem zainteresowania medycyny regeneracyjnej.

Wyniki badań zespołu prof. Józefa Dulaka i prof. Alicji Józkowicz ukazały się drukiem w renomowanych czasopismach, m. in. w *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, *Antioxidants and Redox Signaling*, *Circulation*, *Journal of Experimental Medicine*, *PlosOne* i *American Journal of Pathology*. Badania te będą rozwijane w następnych latach, m.in. dzięki funduszom strukturalnym w ramach projektów badawczych „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” i „Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym”, realizowanych przy wsparciu inwestycyjnych grantów strukturalnych: „Biotechnologia molekularna dla zdrowia”, „Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków” i „Małopolskie Centrum Biotechnologii”. Zakład Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ współpracuje także z przemysłem farmaceutycznym, uczestnicząc w badaniach nad opracowaniem nowych leków przeciwcukrzycowych

i przeciwnowotworowych (na podstawie informacji zamieszczonej w witrynie UJ).

W konkursie „Dziewczyny Przyszłości. Śladami Marii Skłodowskiej-Curie”, ogłoszonym przez redakcję miesięcznika „Elle” oraz Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, laureatką została Malwina Strenkowska (Fot. 2), studentka trzeciego roku Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego. M. Strenkowską nagrodzono za prowadzenie badań w dziedzinie chemii bioorganicznej i biologii molekularnej. Tytuł zwycięskiego projektu to „Synteza i właściwości analogów końca 5' mRNA posiadających podwójną modyfikację tiofosforanową w łańcuchu 5',5'-trifosforanowym”. Celem projektu była synteza chemiczna oraz zbadanie właściwości biochemicznych i biofizycznych serii dinukleotydowych analogów końca 5' mRNA (kapu) posiadających podwójną modyfikację tiofosforanową w pozycjach  $\alpha$  i  $\beta$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  lub  $\alpha$  i  $\gamma$  łańcucha 5',5'-trifosforanowego. Dla otrzymanych związków zostaną przeprowadzone badania pod kątem ich oddziaływania z czynnikiem inicjującym translację (eIF4E), odporności na degradację specyficzną dla kapu pirofosfatazą DcpS, wydajności translacyjnej po wbudowaniu do mRNA oraz właściwości inhibitorowych w procesie translacji *in vitro*. Wyniki wcześniejszych badań dotyczące metylenobisfosfonianowych oraz tiofosforanowych analogów kapu sugerują, że zaprojektowane analogi będą charakteryzowały się podwyższoną odpornością na degradację enzymatyczną oraz będą efektywnie rozpoznawane przez maszynę translacyjną, co pozwoli na zastosowanie ich do otrzymywania *in vitro* mRNA o wysokiej wydajności translacyjnej, jak również jako efektywnych inhibitorów translacji zależnej od kapu. Badania prowadzone są w Laboratorium Ekspresji Genu w Zakładzie Biofizyki



Fot. 2. Malwina Strenkowska.

w Instytucie Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki UW pod opieką dr Jacka Jemielitego. Przedstawione przez M. Strenkowską wyniki badań mogą być w przyszłości wykorzystywane w medycynie, na przykład w terapii genowej, w przypadku uszkodzenia jakiegoś białka (na podstawie informacji uzyskanej od Autorki).

W tym samym konkursie wyróżnienie otrzymała Agata Szade (Fot. 3), studentka Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, za udział w projekcie badawczym „Rola oksygenazy chemowej-1 w indukcji progresywnej raka płaskonabłonkowego” (kierownikiem projektu jest prof. Alicja Józkowicz). Kapituła Konkursu doceniła dojrzałość pracy i ambitny dobór tematyki badawczej. Drugie wyróżnienie otrzymała Joanna Oracz, studentka wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Siedmiu innym młodym badaczkom przyznano nagrody w postaci wyjazdów na europejskie konferencje naukowe.

Celem konkursu „Dziewczyny Przyszłości. Śladami Marii Skłodowskiej-Curie” jest wspieranie młodych kobiet, studentek kierunków inżynierskich, technicznych, matematycznych lub przyrodniczych, które prowadzą samodzielne badania naukowe bądź angażują się w projekty badawcze. Konkurs ma na celu wspieranie i promowanie ambitnych młodych kobiet. Do konkursu swoje prace zgłosiło 131 studentek z kierunków matematycznych, przyrodniczych, ścisłych i technicznych z całego kraju. Oceny i wyboru najlepszych projektów dokonała Kapituła, powołana przez resort i redakcję miesięcznika „Elle”, w skład której weszli znani naukowcy, przedstawiciele środowiska naukowego oraz przedstawiciele Ministerstwa i redakcji czasopisma. Kapituła oceniając projekty, brała pod uwagę między innymi innowacyjność projektu, wkład nowej wiedzy do istniejącego stanu nauki lub techniki oraz stopień zaangażowania studentki w prowadzonych badaniach. Główna nagroda w konkursie wynosiła 15000 zł. Nagrody ufundował miesięcznik „Elle”, który środki na ten cel, zgromadził prowadząc aukcje sukien polskich projektantów. Nagrody dla osób wyróżnionych

w konkursie, sfinansowanie zagranicznych wyjazdów konferencyjnych, ufundowało Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Wyniki Konkursu ogłoszono, zgodnie z decyzją jury, w Warszawie w dniu 11 czerwca b.r., a nagrody wręczono 10 studentkom (na podstawie informacji zamieszczonej w witrynie Nauka w Polsce i witrynie UJ).

Miano Polskiego Produktu Przyszłości w kategorii „Technologia przyszłości w fazie przedwdrożeniowej otrzymała 23 czerwca 2010 roku terapia przeciwnowotworowa stworzona na Uniwersytecie Jagiellońskim. Odkrycie naukowców z UJ oparte jest na modyfikowanym szczepie bakterii *Salmonella*, które wnikają do guza nowotworowego i wywołują jego zniszczenie. Kapituła

Konkursu Polski Produkt Przyszłości przyznała 4 nagrody główne oraz 6 wyróżnień. Organizatorem Konkursu, objętego honorowym patronatem Ministra Gospodarki, jest Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości. W imieniu zespołu zajmującego się projektem na UJ nagrodę odebrały dr hab. Joanna Bereta (koordynator badań) z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ oraz Paulina Chorobik doktorantka dr Michała Berety z Katedry Immunologii Collegium Medicum UJ, pomysłodawcy i twórcy projektu (Fot. 4). Innowacyjna metoda leczenia nagrodzona w Konkursie ma polegać na zastosowaniu specjalnych bakterii *Salmonella*, które dzięki zmianom genetycznym rozpoznają tkankę nowotworową i po wstrzyknięciu do krwiobiegu pacjenta lokalizują się w niej. Dzięki naturalnym mechanizmom inwazyjnym bakterie przenikają do komórek guza, gdzie wywołują apoptozę.

Równocześnie dochodzi do pobudzenia układu odpornościowego i reakcji przeciwnowotworowej. Dotychczas skuteczność prototypowej terapii została potwierdzona badaniami na zwierzętach. Kolejny etap badań to udoskonalenie szczepu *Salmonella*, co pozwoli

przenieść prace nad technologią do etapu badań klinicznych. Technologia może stać się w przyszłości nową szansą leczenia pacjentów cierpiących na nowotwory lite, przede wszystkim jelita grubego, płuc, piersi i żołądka, a prawdopodobnie także innych chorób nowotworowych (m.in. czerniaka). Według Dominika Czaplickiego z Centrum Innowacji, Transferu Technologii i Rozwoju Uniwersytetu (CITTRU) przewidywana wydajność i niskie koszty produkcji sprawiają, że wyniki badań naukowców mają doskonale perspektywy zastosowania przemysłowego. CITTRU zabiega także o ochronę patentową wynalazku (o wspomaganą *Salmonellą* terapii nowotworowej opowiadali w programie 3 Polskiego Radia dr hab. Joanna Bereta oraz Dominik Czaplicki z CITTRU).

Konkurs „Polski Produkt Przyszłości” pod honorowym patronatem Ministra Gospodarki zorganizowano po raz trzynasty. Od 2002 roku organizatorem Konkursu jest Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości (PARP). Celem Konkursu jest promocja i upowszechnianie osiągnięć twórców innowacyjnych technik i technologii, które mają szansę zaistnieć na rynku polskim. Konkurs skierowany jest do innowacyjnych przedsiębiorstw, jednostek badawczo-rozwojowych, instytutów naukowych, zakładów doświadczalnych, a także dla indywidualnych wynalazców z krajów Unii Europejskiej. Warunkiem przystąpienia do Konkursu jest przedstawienie nowego, innowacyjnego wyrobu lub technologii. Do Konkursu mogą być

zgłaszane programy informatyczne, jednak tylko i wyłącznie jako elementy sterowania procesem technologicznym. Nagrodą w Konkursie są statuetka „Polski Produkt Przyszłości” oraz udział w kampaniach promocyjnych organizowanych przez Polską Agencję Rozwoju Przedsiębiorczości, prezentacja na

międzynarodowych targach i wystawach innowacyjności w kraju i za granicą oraz promocja w wydawnictwach i tekstach promocyjnych Agencji. Nagrodzeni wraz z wyróżnionymi otrzymują dyplom i możliwość posługiwania się w korespondencji Znakiem i Hasłem



Fot. 3. Agata Szade.



Fot. 4. Od lewej Dominik Czaplicki (CITTRU), Paulina Chorobik, Joanna Bereta i Maciej Czarnik (CITTRU).

„Polski Produkt Przyszłości” (wiadomości o Konkursie i laureatach można znaleźć na stronach [www.cittru.uj.edu.pl](http://www.cittru.uj.edu.pl), [www.ppp.pi.gov.pl](http://www.ppp.pi.gov.pl)).

Zachodniopomorskie Noble, po raz dziesiąty rozdano 30 maja 2010 r. Mianem tym nazwano nagrody dla najwybitniejszych naukowców województwa zachodniopomorskiego. Wśród laureatów jest pięcioro uczonych ze Szczecina oraz jeden z Koszalina (Fot. 5). Nagrody za 2009 rok przyznano w sześciu kategoriach nauk: medyczne, podstawowe, rolnicze, techniczne, humanistyczne, o morzu. Podczas gali w Teatrze Współczesnym otrzymali je dr n. med. Anna Jakubowska z Pomorskiej Akademii Medycznej za badania dotyczące



Fot. 5. Laureaci Zachodniopomorskich Nobli 2010.

raka, prof. nadzw. dr hab. inż. Bohdan Andriyevksy z Politechniki Koszalińskiej za prace dotyczące struktury elektronowej pasmowej, prof. dr hab. inż. Wiesław F. Skrzypczak z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego za badania nad zwierzętami hodowlanymi we wczesnych etapach życia, dr hab. inż. Zbigniew Czech z ZUT za odkrycia z zakresu technologii produkcji klejów samoprzylepnych, dr hab. Tadeusz Szubka z Uniwersytetu Szczecińskiego za osiągnięcia w zakresie filozofii analitycznej oraz dr hab. inż. Zbigniew Pietrzykowski z Akademii Morskiej za badania dotyczące bezpieczeństwa ruchu.

W Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego został rozstrzygnięty Konkurs wniosków o przyznanie stypendiów naukowych dla wybitnych młodych naukowców. Wnioski na konkurs złożyło 296 młodych naukowców, spośród których wszyscy wyróżniali się wysokim poziomem naukowym. Decyzją Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego stypendium przyznano 32 naukowcom, których praca naukowa została uznana jako wybitna. Jedną ze stypendystek jest dr Agnieszka Łoboda z Zakładu Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotech-

nologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jest to kolejny sukces młodej uczoney.

W V edycji programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej 9 polskich naukowców otrzymało, na utworzenie i rozwój zespołów badawczych, ponad 17 mln złotych. Najwyższe dofinansowanie otrzymała dr hab. Agnieszka Dobrzyń z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, która zbada molekularne i komórkowe mechanizmy patogenezы cukrzycy typu 2. Ponad 2 mln złotych dostali również dr hab. Leszek Fiedor i prof. Jacek Młynarski z Uniwer-

sytetu Jagiellońskiego oraz dr Szymon Świeżewski z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Pozostali nagrodzeni to prof. Joanna Cichy z Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. Tomasz Kapitaniak z Politechniki Łódzkiej i troje naukowców reprezentujących Uniwersytet Warszawski – prof. Ewa Górecka, prof. Wiktor Koźmiński i dr hab. Grzegorz Pietrzyński. W ramach realizowanych badań naukowcy zajmą się m.in. precyzyjną kalibracją kosmicznej skali odległości; rolą chemeryny w procesach fizjologicznych i patogenezы chorób o podłożu odpornościowym; rolą niekodujących RNA w regulacji genomu. Konkurs TEAM ma umożliwić młodym uczonym przeprowadzenie w Polsce najbardziej oryginalnych projektów badawczych w dziedzinach: bio, info, techno. Muszą one odnosić się do zagadnień związanych m.in. z biotechnologią i bioinżynierią, nowymi wyrobami i technikami medycznymi, technologiami informacyjnymi i telekomunikacyjnymi, naukami obliczeniowymi, nowymi materiałami i technologiami, nanotechnologiami, technologią i inżynierią chemiczną. W zespołach badawczych laureatów pracę znajdzie ponad 60 młodych badaczy. Naukowcy nagradzani w programie będą musieli zatrudnić w swych zespołach studentów, którzy ukończyli trzeci rok studiów, doktorantów lub młodych doktorów – do czterech lat od uzyskania stopnia naukowego. Zespół musi liczyć najmniej sześciu młodych uczonych,

wyłonionych w otwartym konkursie. W zespołach badawczych laureatów pracę znajdzie ponad 60 młodych badaczy. W ramach programu zostaną sfinansowane imienne stypendia naukowe dla członków zespołu – od 1000 do 5000 złotych – oraz grant badawczy. Jego ostateczna kwota będzie uzależniona od liczby młodych naukowców pracujących w zespole badawczym.

Fundacja na rzecz Nauki Polskiej (FNP) w czwartej i zarazem ostatniej edycji programu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie (MPD) przyznała 29 mln złotych na prowadzenie projektów doktoranckich ośmiu najlepszym międzynarodowym konsorcjom, koordynowanym przez polskie instytucje naukowe. Najwyższe dofinansowanie uzyskał zespół naukowców reprezentowany przez dr hab. Pawła Moskała z Uniwersytetu Jagiellońskiego. Niewiele mniej otrzymały grupy prof. Elżbiety Malinowskiej z Politechniki Warszawskiej i prof. Krzysztofa Nawotka z Uniwersytetu Wrocławskiego. Koordynatorami pozostałych nagrodzonych projektów są prof. Zbigniew Błocki z Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. Bohdan Grządkowski z Uniwersytetu Warszawskiego, prof. Artur Jarmołowski z Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, prof. Jarosław Marszałek z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUM-ed i dr hab. Sławomir Zadrożny z Instytutu Badań Systemowych PAN. Celem programu MPD jest podniesienie poziomu badań naukowych realizowanych w Polsce przez młodych naukowców w okresie przygotowywania przez nich prac doktorskich oraz intensyfikacja współpracy międzynarodowej polskich jednostek badawczych (więcej informacji można znaleźć na stronie [www.fnp.org.pl](http://www.fnp.org.pl)).

Katarzyna Grubiak z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prowadzi badania przydatne osobom z nietolerancją laktozy. Jej praca badawcza dotyczy zastosowania termofilnej  $\beta$ -galaktozydazy do syntezy sacharydów o właściwościach prebiotycznych. Enzym wprowadzony do mleka pozwala na otrzymanie produktu o obniżonej zawartości laktozy, bezpiecznego dla osób cierpiących na nietolerancję tego cukru, a nadto wzbogacony w galaktooligosacharydy, związki o prozdrowotnych, prebio-

tycznych właściwościach. Prebiotyki są substancjami nietrawionymi ani wchłanianymi w górnej części przewodu pokarmowego, ale mogą być metabolizowane przez mikroflorę jelita grubego, stymulując tym samym jej namnażanie i aktywność. Bakterie te usuwają z organizmu substancje toksyczne, poprawiają wchłanianie wapnia, magnezu, zapobiegają rozwojowi mikroflory chorobotwórczej, stymulują odporność organizmu na choroby. Katarzyna Grubiak otrzymała **stypendium „InnoDoktorant”** przyznane przez zarząd województwa pomorskiego ze środków Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Rozprawę doktorską pt. „Ocena przydatności rekombinantowej  $\beta$ -galaktozydazy z *Pyrococcus woesei* do otrzymywania wybranych sacharydów o właściwościach prebiotycznych” doktorantka przygotowuje pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Synowieckiego. W badaniach swoich poszukuje nowych źródeł enzymów o pożądanym właściwościach, izoluje, oczyszcza wybrane enzymy, oznacza ich aktywność oraz bada właściwości enzymów.

**Nowoczesną metodę diagnostyki nowotworów piersi przy pomocy metod termicznych opracowuje doktorant Mateusz Moderhak** (Fot. 6) z Wydziału Elektroniki, Telekomunikacji i Informatyki Politechniki Gdańskiej. Jest stypendystą, tak jak mgr Katarzyna Grubiak, pierwszej edycji projektu „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów”, w ramach którego zarząd województwa pomorskiego przyznał 50 stypendiów w wysokości 30 tys. zł ze środków Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki na lata 2007–2013. Przy użyciu tej metody zmiany mogą zostać zarejestrowane kilka lat wcześniej niż jest to możliwe przy pomocy standardowych badań. Rozwijający się nowotwór buduje sieć naczyń krwionośnych w zajęтым przez siebie obszarze i uintensyfikuje metabolizm w stosunku do tkanek otoczenia. Powoduje to zmiany rozkładu temperatury na powierzchni piersi. Rozkład ten można zarejestrować przy pomocy kamery termograficznej, która rejestruje te zmiany. Sekwencje termogramów poddaje się analizie komputerowej, a wynikiem jest seria obrazów parametrycznych, podobnie jak w badaniach rezonansu magnetycznego. Dzięki po-



Fot. 6. Mateusz Moderhak.

budzeniu tkanki można otrzymać obraz zależący od jej wewnętrznej struktury. Metoda badawcza jest znana od ponad 20 lat, ale zmienia się sprzęt, pozwalający na wyższą rozdzielczość obrazu i poprawę algorytmów analizy obrazów. W swojej pracy doktorant posiłkuje się nową procedurą, tzw. cyfrową stabilizacją. W modelowaniu matematycznym przyjmuje się, że ciepło będące efektem zwiększonego metabolizmu jest kilkadziesiąt razy większe od otaczających tkanek; powoduje to wzrost temperatury na powierzchni nawet o 2°C, zależnie od budowy, głębokości i średnicy guza. Doktorant przyznaje, iż metoda staje się mniej efektywna w przypadku głęboko położonych guzów. Teoretycznie, stosując odpowiednio długi czas ochładzania, można starać się wykryć głębokie zmiany. Praktycznie jest to jednak bardzo trudne. Mateusz Moderhak pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Antoniego Nowakowskiego pisze pracę pt. „Analiza algorytmów diagnostyki termicznej dla mammografii”. Zakres jego badań to obrazowanie 3D, modelowanie matematyczne i symulacje komputerowe, fizjologia człowieka, procesy termoregulacji, powstawanie nowotworów, akwizycja oraz przetwarzanie danych pomiarowych pod kątem analizy procesów przejściowych, aktywna termografia dynamiczna i tomografia termiczna. Mateusz Moderhak aktualnie rozpoczął staż na Uniwersytecie Laval w Kanadzie.

**Association for Cancer Research 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting “Hallmarks of Cancer: From Mechanisms to Therapies”, Edinburgh, Scotland.** W dniach 13–15 czerwca 2010 roku odbył się rocznicowy zjazd Brytyjskiego Stowarzyszenia Badań nad Rakiem (BACR) (Fot. 7 i 8) z okazji 50-lecia istnienia tego Stowarzyszenia. BACR od pół wieku skupia naukowców nie tylko z Wielkiej Brytanii, ale również całego świata, tworząc użyteczną platformę wymiany myśli naukowej, dającą możliwość prezentowania wyników badań i nawiązania współpracy naukowej, ale również aktywnie wspierając finansowo młodych naukowców poprzez granty konferencyjne czy finansowanie badań w ośrodkach naukowych poza macierzystą uczelnią lub instytutem. Tegoroczny Zjazd był wyjątkowy. Organizatorzy – Komitet BACR – dołożyli wszelkich starań, aby najważniejsze

sesje poprowadzone były przez najwybitniejszych naukowców. W spotkaniu udział wzięło ponad 220 osób, wśród nich większość uczestników z Wielkiej Brytanii, ale również liczni goście ze Stanów Zjednoczonych, Szwajcarii i Włoch. Nie zabrakło oczywiście uczestników z Polski. Rocznicowe spotkanie nie było



Fot. 7. Edynburg – centrum miasta z widokiem na Calton Hill i Partenon.

tylko podsumowanie 50 lat istnienia Stowarzyszenia i jednocześnie półwiecza badań nad rakiem na Wyspach Brytyjskich, ale przede wszystkim było zwrotem ku przyszłości. Szczególny akcent położono na próbę oceny w jakim kierunku powinny zmierzać przyszłe badania. Spotkanie zatytułowano tak samo jak jeden z najbardziej poczytnych artykułów Douga Hanahana i Roberta Weiberga (Hallmarks of cancer, Cell, 2000, 100: 57-70).



Fot. 8. Występ tradycyjnego zespołu szkockiego na stadionie rugby Murrayfield.

Wykład inauguracyjny (Tom Connors Lecture) wygłosił prof. David (Herbie) Newell (Northern Institute for Cancer Research NICR, Newcastle upon Tyne). Prof. Newell przypomniał uczestnikom największe osiągnięcia Toma Connorsa, do których z pewnością należało utworzenie Cancer Research UK – jednej z największych organizacji charytatywnych na świecie, która sponsoruje badania nad rakiem w



Wielkiej Brytanii. Tom Connors wraz z Laszlo Lajtha i Brianem Foxem utworzył również *Phase I/II Committee*, przyczyniając się tym samym do przyspieszenia badań nad nowymi terapiami oraz ich powszechniejszemu testowaniu w badaniach klinicznych. Tym samym Wielka Brytania w ciągu ostatnich 30 lat stała się jednym ze światowych liderów badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi.

Ze szczególnym zainteresowaniem wysłuchano referatu prof. Alana Ashwortha (The Institut for Cancer Research, London), który prowadzi badania nad inhibitorami polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP). Obecnie inhibitory PARP przechodzą badania kliniczne w kombinacji z innymi chemioterapeutykami, blokując naprawę DNA i uwrażliwiając komórki rakowe na jego uszkodzenie oraz jako samodzielne chemioterapeutyki stosowane u kobiet z rakiem piersi oraz jajników, które są nosicielkami mutacji w genach *BRCA1* i/ lub *BRCA2*. Jest to doskonały przykład nowego rodzaju terapii tzw. „*synthetic lethality*” (Fong i wsp. *N Engl J Med*, 2009, 361: 123-134). Prof. Ashworth zapowiedział, że terapia przeciwnowotworowa z zastosowaniem inhibitorów PARP u nosicieli mutacji *BRCA1* i/ lub *BRCA2* w ciągu najbliższych kilku lat ma stać się standardową terapią w Wielkiej Brytanii.

Prof. Bruce Ponder (dyrektor Cambridge Research Institute, Cambridge) wygłosił referat na temat nowoczesnych badań genetycznych w analizie ryzyka zachorowalności na raka, w których uwzględnia się jednocześnie setki różnych genów i ich allele ryzyka (*Genome-wide Association Studies, GWAS*) tworząc indywidualne profile genetyczne w przeciwieństwie do badań prowadzonych na mniejszą skalę, w których analizuje się polimorfizmy kilku genów, a ich znaczenie kliniczne jest znikome i traci moc statystyczną w dużych populacjach.

Dr Mathew Garnett (Sanger Institute, Cambridge) zaprezentował wstępne wyniki projektu The Cancer Translation Project, w którym testowane są antynowotworowe właściwości setek różnych terapeutów oraz substancji mających potencjał terapeutyczny na ponad 1000, scharakteryzowanych pod kątem profilu genetycznego, ludzkich liniach ko-

mórek nowotworowych. Wyniki analiz będą regularnie publikowane na stronie internetowej projektu ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Translation](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Translation)).

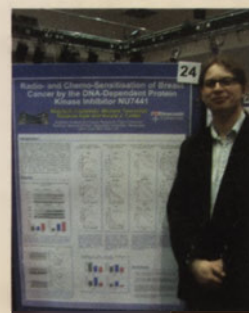
Spśród wielu innych doskonałych referatów na szczególną uwagę zasłużyły następujące prezentacje: Sygnalizacja BRAF i RAS w czerniaku (prof. Richard Marais, The Institute of Cancer Research, London). NRAS jest małym białkiem wiążącym GTP, które występuje w formie zmutowanej u ok. 20% czerniaków, a jego białko efektorowe BRAF jest zmutowane u ok. 50% czerniaków. Mutacje w tych onkogenach prowadzą do proliferacji komórek rakowych. Okrycie roli tej ścieżki sygnałowej stwarza możliwość opracowania leków BRAF selektywnych – będących obecnie w fazie badań przedklinicznych (Huang i Marais, *Nature*, 2009, 459: 336-337); „Nowa endokrynologia nowotworów (prof. Michael Pollak, McGill University, Montreal, Canada). Badania laboratoryjne jak i epidemiologiczne wskazują na istotną rolę insuliny i IGF w chorobie nowotworowej. Dodatkowo kontrowersyjne, ale znaczące badania wskazują na większą zachorowalność na raka wśród diabetyków leczonych insuliną w porównaniu z diabetykami leczonymi metforminą. Odkrycia te poszerzyły dotychczasowy paradygmat o roli hormonów w onkologii, torując ścieżkę do nowych badań klinicznych z udziałem metforminy; Analiza ekspresji genów naprawy DNA w raku jajnika (Monica Ganzinelli i wsp. Istituto di Ricerche Farmacologiche „Mario Negri”, Milano, Italy). Cysplatylna jest jednym z najbardziej efektywnych leków w terapii raka jajnika (70% pacjentów z całkowitą remisją). Niestety, ponad połowa wykazuje nawrót choroby i rozwinięcie oporności na leczenie lekami platynowymi. Poszukiwanie molekularnych markerów wrażliwości/oporności na leczenie ma kluczowe znaczenie w planowaniu terapii. Autorzy wykazali korelację między wysokim poziomem syntezy ERCC1, XPA, FANCC, XPG i PolEta a wzrostem OS i PFS oraz *BRCA1* a wzrostem PFS. **Polskim akcentem była prezentacja wyników mgr Wojciecha Ciszewskiego** (Fot. 9) (Uniwersytet Łódzki, PAN, Łódź) podczas

sesji posterowej. W. Ciszewski przez pół roku realizował projekt badawczy w NICR pod opieką prof. Nicoli Curtin (projekt finansowany z programu Erasmus). Tematem jego badań było uwrażliwianie komórek raka piersi (linie MCF-7, MDA-MB-231 i T47D) na radio- chemioterapię przy użyciu inhibitora DNA-PK NU7441. Wojtek wykazał, iż DNA-PK jest doskonałym celem terapii uwrażliwiającej. Z pewnością badania te przyczynią się do rozwoju kolejnych inhibitorów tej kinazy i ich wprowadzenia do badań klinicznych.

Jako współorganizator konferencji z ramienia Komisji BACR, której członkiem miał przyjemność być przez 2 lata, sesję poświęconą perspektywom kariery po doktoracie poprowadził dr Tomasz Zaremba z Collegium Medium w Bydgoszczy, który wygłosił także referat na podstawie własnego doświadczenia w tej dziedzinie. W trakcie tej sesji referat wygłosił również dr Gareth Veal z NICR, młody, odnoszący sukcesy naukowiec. W bardzo wielu kwestiach poglądy obu badaczy były zgodne w kwestii wyróżnienia elementów istotnych dla rozwoju kariery naukowej, takich jak 1) mobilność – doświadczenie i wiedza zdobyta w różnych zespołach badawczych; 2) publikacje – w wielu renomowanych laboratoriach minimalnym kryterium przyjęcia są 3 publikacje pierwszego autorstwa w dobrych czasopismach naukowych; 3) staż po doktorski w dobrej grupie badawczej. Kariera naukowa nie jest oczywiście jedyną ścieżką – doświadczenie naukowe i wiedza ugruntowane podczas stażu post doktorskiego są często przepustką do działów R&D największych koncer-

nów farmaceutycznych i biotechnologicznych. Również, a może szczególnie w Polsce, należy zachęcać młodych naukowców do zdobywania doświadczenia w wiodących instytucjach naukowych w świecie.

Jednym z najbardziej optymistycznych i napawających ogromną nadzieją na przyszłość był referat Prof. Richarda Peto (Clinical Trial Service and Epidemiological Studies Unit, CTSU, University of Oxford). Prof. Peto przedstawił dane epidemiologiczne z ostatniego półwiecza dotyczące zachorowalności i śmiertelności spowodowa-



Fot. 9. Wojciech Ciszewski.

nej rakiem w populacji brytyjskiej. Na przykład, prawdopodobieństwo śmierci spowodowanej rakiem przed 70 rokiem życia zmalało z 1 na 3 w 1975 roku do 1 na 6 obecnie. Ten pozytywny trend wystąpił przede wszystkim dzięki drastycznemu zmniejszeniu zachorowalności na raka płuc (kampania antynikotynowa, powszechne zakazy palenia, wzrost świadomości społecznej), 7-krotnemu zmniejszeniu zachorowań na raka żołądka (przyczyna nieznaną) oraz zmniejszenie ilości nowotworów ginekologicznych (dzięki profilaktyce badań przesiewowych). Nastąpił niestety wzrost zachorowalności na raka piersi u kobiet oraz jelita grubego, ale dzięki lepszej diagnostyce i postępom leczenia począwszy od lat 90 ogólna śmiertelność w obu przypadkach zmalała. Kluczowym przesłaniem tego interesującego referatu było docenienie wysiłków naukowców na całym świecie, którzy od tylu lat próbują poznać biologię nowotworów i nie ustają w wysiłkach, aby opracować nowe, skuteczne formy terapii. Wprawdzie dotychczas nie było przełomu w leczeniu nowotworów, to jednak małe sukcesy, które regularnie odnosimy, są bardzo jasno widoczne w danych epidemiologicznych. Urzeczywistnia się tym samym prawdopodobna perspektywa, że choroba nowotworowa w przyszłości będzie formą choroby przewlekłej skutecznie kontrolowanej – podobnie jak cukrzyca.

Z pewnością ten rocznicowy zjazd BACR dla uczczenia półwiecza istnienia Stowarzyszenia będzie na długo zapamiętany przez wszystkich uczestników. Udział wielu młodych naukowców daje wszystkim ogromne nadzieje na przyszłość – badania nad rakiem stoją na coraz wyższym poziomie, a historia 50 lat istnienia Stowarzyszenia pokazała, jak wiele już udało się osiągnąć, ale również jak wiele jest jeszcze do zrobienia. Oceniając rolę jaką BACR odgrywało i wciąż odgrywa w brytyjskiej nauce należy wierzyć, że i w naszym kraju uda się dokonać konsolidacji środowiska naukowego zajmującego się badaniami nad rakiem, które skutecznie wspierane będzie solidnymi funduszami (przygotował dr Tomasz Zaremba, Collegium Medium, Bydgoszcz, Instytut Curie, Paryż, członek Komitetu organizacyjnego Zjazdu BACR).

**W dniach 16 i 17 czerwca 2010 r. w Heidelbergu odbył się 3<sup>rd</sup> Polish-Ger-**

**man Cancer Workshop** (Fot. 10), w ramach cyklicznych spotkań naukowych współorganizowanych przez Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) w Heidelbergu oraz Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Poprzednie spotkania odbyły się 19 czerwca 2008 r. w Heidelbergu (połączony z 3<sup>rd</sup> General Meeting of Alumni DKFZ) i 20 listopada 2009 r. w Gliwicach (połączony z 13<sup>th</sup> Gliwice Scientific Meeting). Tematyka dotychczasowych spotkań dotyczyła *Cancer Cell Biology* (1<sup>st</sup> Workshop), *Molecular Epidemiology of Cancer* oraz *Functional Genomics in Cancer Research* (2<sup>nd</sup> Workshop), *Tumor Cell Biology* oraz *Radiobiology, Radiooncology and Radiotherapy Physics* (3<sup>rd</sup> Workshop). W ramach trzech dotychczasowych spotkań odbyło się ponad 70 wykładów, które przedstawiali m.in. P. Bannasch, P. Boukamp, A. Forsti, U. Hamann, K. Hemminki, T. Hofman, J. Hoheisel, P. Huber, S. Wiemann, O. Wiestler (ze strony niemieckiej) oraz M. Chorąży, E. Grzybowska, B. Jarząb, J. Kupryjańczyk, B. Maciejewski, J. Rzeszowska, J. Siedlecki, R. Suwiński, K. Szyfter, P. Widłak, K. Galwas-Kliber, A. Grządziel, J. Rzeszowska-Wolny, K. Składowski, R. Suwiński, D. Ściegłińska, R. Tarnawski, J. Wydmański (ze strony polskiej), a łącznie uczestniczyło w nich blisko 300 osób. Następne spotkanie z cyklu Polish-German Cancer Workshop odbędzie się w Gliwicach, 18 listopada 2011 r., w połączeniu z 15<sup>th</sup> Gliwice Scientific Meeting. Proponowana tematyka to *Functional Cell Imaging* oraz *Genomics and Proteomics in Discovery and Validation of Cancer Markers*. Współorganizatorzy, Centrum Onkologii i DKFZ, zgodnie uznali, że konferencje z cyklu Polish-German Cancer Workshop mają szansę i powinny stać się miejscem spotkań i wymiany informacji między badaczami z szerokiej grupy polskich i niemieckich instytucji naukowo-badawczych. Organizatorzy już teraz zapraszają do udziału w następnych spotkaniach z tego cyklu (na podstawie



Fot. 10. Polskie uczestnicy Konferencji Polish-German Cancer Workshop.



Fot. 11. Wstęgę przecinają profesorowie Barbara Jarząb i Janusz Siedlecki.

relacji prof. Piotra Widłaka oraz Biuletynu Informacyjnego Centrum Onkologii, lipiec-sierpień 2010).

W dniu 23 czerwca 2010 r. **uroczyście otwarto Laboratorium Genomiki Funkcjonalnej** wyposażone w sekwenator genomowy zakupiony ze środków projektu Śląska BIOFARMA; otwarcie było połączone z seminariami prezentującymi możliwości urzędnika firmy Illumina. Wstęgi przecinali prof. Barbara Jarząb (kierownik Laboratorium) i prof. Janusz Siedlecki, przewodniczący Rady Naukowej Centrum Onkologii (Fot. 11).

Profesor Joanna Polańska zaprasza na kurs „**Metody statystyczne opracowania wyników badań medycznych**”. Kurs przeznaczony jest dla lekarzy realizujących własne prace badawcze i chcących doskonalić stosowane przez siebie narzędzia statystyczne. Uczestnik kursu po jego ukończeniu będzie posiadał rozeznanie w zakresie istniejącego oprogramowania narzędziowego i umiejętność doboru metod statystycznych właściwych do rozpatrywanego problemu. Powinien także samodzielnie przeprowadzić analizę i ocenę uzyskanych wyników. Kurs organizowany jest przez Polsko-Japońską Wyższą Szkołę Technik Komputerowych, Wydział w Bytomiu, w IV kwartale br. Zajęcia obejmują 30 godzin lekcyjnych (12 godzin wykładów i 18 ćwiczeń). Więcej informacji i rejestracja: Małgorzata Bujak, tel: 32 3871662 (na podstawie Informatora Instytutu Onkologii w Gliwicach).

**Portal MamSM.pl** jest pierwszym w Polsce i na świecie serwisem, który zawiera **symptomy objawów stwardnienia rozsianego**. Minął właśnie rok od jego uruchomienia. W sieci pojawiła się także angielskojęzyczna wersja portalu, która odnotowała już ponad 211000 odwiedzin. Symulacja pozwalająca poznać stwardnienie rozsiane zdobywa coraz większą popularność i szerzy wiedzę o tej chorobie wśród internautów w Polsce i na świecie.

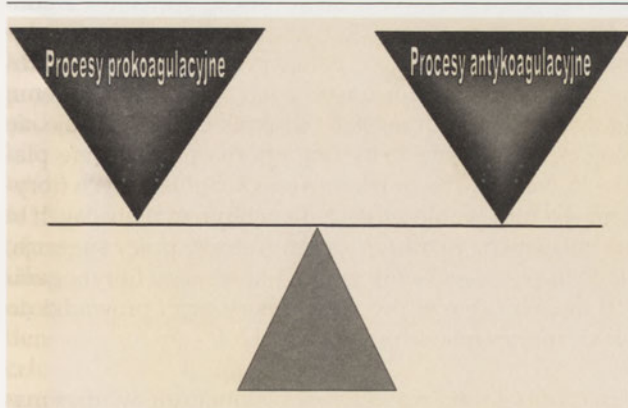
**pod redakcją Teresy Wesołowskiej**

## STRESZCZENIE

Prawidłowa hemostaza jest stanem dynamicznej równowagi pomiędzy procesami pro- i antykoagulacyjnymi, który zależy od oddziaływań ściany naczynia krwionośnego, płytek krwi oraz czynników krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Śródbłonek naczynia odgrywa istotną rolę w aktywacji płytek krwi, krzepnięciu krwi i fibrynolizie, a także ma wpływ na skurcz i rozkurcz naczynia. Do zaburzonej funkcji śródbłonka obserwowanej w chorobach układu krążenia dochodzi pod wpływem reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA), przede wszystkim nadtlenoazotynu, który powstaje w szybkiej reakcji tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym. RFT i RFA powodują zmiany w strukturze i funkcji wielu cząsteczek uczestniczących w hemostazie. Utlenieniu ulegają przede wszystkim białka i lipidy komórek śródbłonka, płytek krwi oraz osocza. Zmiany oksydacyjne w białkach komórkowych, spowodowane przez reaktywne formy tlenu i azotu, w tym przez nadtlenoazotyn obejmują: nitrowanie reszt aminokwasów aromatycznych, utlenianie grup tiolowych i przekształcanie niektórych reszt aminokwasowych w pochodne karbonylowe. Oksydacyjne modyfikacje białek płytek krwi mogą powodować zmianę ich struktury i funkcji hemostatycznych, tj. aktywacji. Nadtlenoazotyn również powoduje utlenienie i nitrowanie fibrynogenu – kluczowego białka w procesie krzepnięcia krwi oraz plazminogenu – głównego białka fibrynolizy hamując ich funkcje hemostatyczne. Zmiany patofizjologiczne naczynia wywołane przez nadtlenoazotyn są spowodowane uszkodzeniem glikokaliksłu i komórek śródbłonka, zahamowaniem syntezy prostacykliny i tlenu azotu w śródbłonku. Oksydacyjne/nitracyjne modyfikacje poszczególnych komponentów hemostazy zaobserwowano w wielu schorzeniach układu krążenia.

## WPROWADZENIE

Hemostaza jest jednym z wielu znanych systemów zapewniających stałe warunki wewnętrznego środowiska organizmu człowieka, tj. homeostazy. Według powszechnie akceptowanej definicji hemostaza to zespół mechanizmów zapobiegających wypływowi krwi z naczyń krwionośnych (zarówno w warunkach prawidłowych, jak i w przypadkach ich uszkodzeń), a także zapewniających jej płynność i przepływ w układzie krwionośnym. W złożonym procesie hemostazy uczestniczą: ściana naczyń krwionośnych (głównie *intima*), płytki krwi, układ krzepnięcia (fibrynogen, czynniki i inhibitory krzepnięcia), układ fibrynolizy (plazminogen, aktywatory i inhibitory fibrynolizy) oraz układ fagocytarny. Prawidłową (fizjologiczną) hemostazę obrazuje się jako stan dynamicznej równowagi pomiędzy procesami pro- i antykoagulacyjnymi (Ryc. 1). Procesy prokoagulacyjne obejmują wszystkie mechanizmy prowadzące do tworzenia czopu hemostatycznego, którego funkcją jest hamowanie krwawienia, natomiast procesy antykoagulacyjne, poprzez mechanizmy hamujące tworzenie i ograniczające nadmierny wzrost czopu hemostatycznego zapewniają zachowanie płynności krwi w łożysku naczyniowym. Zachwianie równowagi między procesami pro- i antykoagulacyjnymi prowadzi do krwawień lub zakrzepów. Zakrzepem (skrzepiną) określamy czop hemostatyczny, który rozwinął się w naczyniu krwionośnym w sposób niedostatecznie kontrolowany lub w niewłaściwym miejscu.



Rycina 1. Prawidłowa hemostaza jako stan dynamicznej równowagi pomiędzy procesami pro- i antykoagulacyjnymi.

Paweł Nowak<sup>✉</sup>

Beata Ols

Barbara Wachowicz

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

<sup>✉</sup>Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel./faks: (42) 635 44 84, e-mail: pnowak@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 24 lutego 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 21 marca 2010 r.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu i azotu, nadtlenoazotyn, stres oksydacyjny, hemostaza, płytki krwi

Wykaz skrótów: NOS – syntaza tlenu azotu; RFA – reaktywne formy azotu; RFT – reaktywne formy tlenu; PGI<sub>2</sub> – prostacyklina; TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>; t-PA – aktywator plazminogenu typu tkankowego; u-PA – aktywator plazminogenu typu urokinazowego; MMPs – metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej

W stanach patologicznych związanych z ostrym lub przewlekłym zapaleniem (np. zespół rozsianego krzep-

nięcia śródnaczyniowego, ostra niewydolność oddechowa, choroba niedokrwienna serca, miażdżycowe niedokrwienie kończyn dolnych, cukrzyca typu 2), niedotlenieniem i następującą po tym reperfuzyją tkanek, a także w chorobach nowotworowych, częstym zjawiskiem są powikłania zakrzepowo-zatorowe, stanowiące główną przyczynę zgonów [1,2]. Dokładny mechanizm pojawiającej się zakrzepicy u osób chorych nie jest w pełni poznany. Jedną z przyczyn zachwiania subtelnej równowagi pomiędzy procesami pro- i przeciwzakrzepowymi może być stres oksydacyjny towarzyszący tym chorobom. W wielu pracach wykazano, że powstające w stresie oksydacyjnym reaktywne formy tlenu i azotu (RFT i RFA) modyfikują funkcję wszystkich elementów układu hemostazy, tj. płytek krwi, komórek śródbłónka naczyń krwionośnych, osoczowych białek układu krzepnięcia i fibrynolizy [3-12].

### NADTLENOAZOTYN A UKŁAD KRZEPNIĘCIA KRWI I FIBRYNOLIZY

Jednym z głównych czynników stresu oksydacyjnego powstających w układzie krążenia jest nadtlendioazotyn. Do tworzenia nadtlendioazotynu dochodzi w wyniku szybkiej reakcji pomiędzy anionorodnikiem ponadtlenkowym ( $O_2^{\cdot-}$ ) a tlenkiem azotu ( $NO^*$ ), *in vivo* głównie w pobliżu komórek generujących jednocześnie duże ilości tych rodników (komórki śródbłónka, aktywowane makrofagi/monocyty, neutrofile) [3,13]. Czas półtrwania nadtlendioazotynu w warunkach biologicznych jest rzędu kilku milisekund, wystarczająco jednak długi do jego przemieszczania się na odległość 5-20  $\mu m$  poprzez struktury komórkowe. W białkach może indukować nitrowanie reszt tyrozynowych, a także tworzenie dityrozyny i grup karbonylowych, co z reguły prowadzi do zmian w ich funkcji biologicznej [14]. W warunkach fizjologicznych ważną reakcją nadtlendioazotynu jest reakcja z dwutlenkiem węgla (ze względu na wysokie stężenie  $CO_2$  zarówno w osoczu, jak i cytoplazmie komórek). Prowadzi ona do wytworzenia nietrwałego adduktu – nitrozonadtlenowęglanu ( $O=N-OOCO_2$ ), który łatwo ulega rozpadowi do rodników  $CO_2^{\cdot-}$  i  $NO_2^*$  [15]. W wyniku ich działania dochodzi do zwiększonego powstawania rodnika tyrozynowego, który na skutek reakcji z  $NO_2^*$  jest przekształcany do 3-nitrotyrozyny lub ulega dimeryzacji do dityrozyny. Wielu autorów uważa, że obecność znitrowanych białek w organizmie jest skutkiem działania głównie nadtlendioazotynu, choć do powstawania 3-nitrotyrozyny może dochodzić również w innych reakcjach [16].

W osoczu osób zdrowych zawartość 3-nitrotyrozyny w białkach jest stosunkowo niska (<0,1 nmol/mg białka), ale znacząco wzrasta np. u palaczy czy w przebiegu wielu chorób związanych z ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym (posocznica, zespół ostrej niewydolności oddechowej, choroba niedokrwienna serca, chroniczna niewydolność nerek, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, nowotwory płuc) [16]. Stwierdzono, że spośród białek osocza w warunkach *in vivo* nitrowaniu ulegają między innymi fibrynogen i plazminogen, dwa podstawowe białka uczestniczące w procesie koagulacji i fibrynolizy [9]. Ponadto w cząsteczce fibrynogenu warunkach *in vivo* dochodzi również do tworzenia grup karbonylowych, co może świadczyć o dużej podatności tego białka na stres oksydacyjny [17].

Fibrynogen odgrywa główną rolę w układzie hemostazy. Uczestniczy w procesie agregacji płytek krwi (jako białko postmowe przyłączające się do integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) oraz tworzy nierozpuszczalną sieć włóknika stanowiącą zasadniczy zrąb czopu hemostatycznego. Fibrynogen jest heteroheksamerem stabilizowanym wiązaniami disiarczkowymi, złożonym z dwóch zestawów trzech nieidentycznych łańcuchów  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ . Częsteczka fibrynogenu ma wydłużony kształt i składa się z pięciu domen. Centralnej domeny E połączonej z dwoma terminalnymi domenami D poprzez odcinki spiralnie skręconych  $\alpha$ -helis trzech łańcuchów polipeptydowych oraz dwóch domen  $\alpha C$  stanowiących C-koniec łańcuchów  $A\alpha$  [18]. Ekspozycja fibrynogenu na działanie nadtlendioazotynu w warunkach *in vitro* powoduje powstawanie 3-nitrotyrozyny i wzrost poziomu grup karbonylowych w łańcuchach  $A\alpha$  i  $B\beta$  oraz tworzenie dityrozyny mostkującej domeny  $\alpha C$  [12]. Zmiany strukturalne w cząsteczce fibrynogenu wywołane przez nadtlendioazotyn osłabiają oddziaływanie fibrynogenu z płytkami krwi, zaburzają proces polimeryzacji oraz strukturę tworzonego przez trombinę włóknika, a także są przyczyną mniejszej wrażliwości tego białka na proteolityczne działanie plazminy [5,6,12]. Obecność zmiataczy nadtlendioazotynu – kwasu moczowego lub (-)-epikatechiny, chroni cząsteczkę fibrynogenu przed tworzeniem dityrozyny i 3-nitrotyrozyny i przywraca w pełni właściwości polimeryzacyjne tego białka. Szczególnie interesujące wydają się być wyniki badań z użyciem (-)-epikatechiny jako antyoksydanta. Związek ten znany jest bowiem jako czynnik chroniący białka przed nitrującym, ale nie przed oksydacyjnym działaniem nadtlendioazotynu. Ochrona zdolności polimeryzacyjnych fibrynogenu przez ten związek może oznaczać, że modyfikacje reszt tyrozynowych w fibrynogenie przez nadtlendioazotyn są główną przyczyną obserwowanych funkcjonalnych zaburzeń tego białka [12].

Fibrynogen jest białkiem ostrej fazy. Jego synteza i stężenie w osoczu może wzrosnąć 2-3 krotnie w odpowiedzi na stan zapalny. Badania epidemiologiczne wykazały, że podwyższony poziom fibrynogenu we krwi zwiększa ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, zawału serca i niedokrwiennego udaru mózgu. Sugeruje się, że w stanach zapalnych, gdy generowanie reaktywnych form tlenu i azotu gwałtownie wzrasta, fibrynogen staje się głównym obiektem ich ataku, dzięki czemu chroni inne białka i lipidy osocza przed utlenianiem [19]. Wyniki niedawno opublikowanych badań wskazują, że podwyższony poziom znitrowanej formy fibrynogenu w osoczu pacjentów z chorobą niedokrwienną serca jest czynnikiem ryzyka wystąpienia zakrzepicy. Szybkość polimeryzacji zarówno osocza pacjentów, jak i wyizolowanego z ich osocza fibrynogenu, ulega zwiększeniu, a powstały włóknik charakteryzuje się patologiczną, sztywną strukturą, oporną na działanie plazminy. Przyczyną zmian właściwości koagulacyjnych fibrynogenu jest nitrowanie jednej z dwóch tyrozyn obecnych w C-końcu łańcucha  $B\beta$  fibrynogenu. Autorzy pracy sugerują, że już jedna cząsteczka tak zmodyfikowanego fibrynogenu na 200 innych zaburza proces polimeryzacji i prowadzi do patologicznej architektury włóknika [20].

Układ fibrynolityczny odgrywa istotną rolę w utrzymaniu hemostazy nie tylko bezpośrednio poprzez rozpuszczanie skrzepliny, ale jest również zaangażowany pośrednio,

poprzez aktywację metaloproteaz w wiele innych procesów: w przebudowę tkanek, angiogenezę i gojenie ran. Uczestniczy również w procesach patologicznych, m.in. w patogenezie niedokrwienia mięśnia sercowego, powstawaniu tętniaków, progresji zmian nowotworowych i miażdżycy. Układ fibrynolizy składa się z czterech elementów: plazminogenu, aktywatorów plazminogenu: tkankowego i urokinazowego (tPA i uPA) przekształcających plazminogen w aktywny enzym – plazminę, inhibitorów aktywatora plazminogenu (PAI-1, PAI-2) oraz inhibitorów aktywnej plazminy, m.in.  $\alpha_2$ -antyplazminy ( $\alpha_2$ -AP). Hamowanie aktywności fibrynolitycznej zachodzić może na drodze hamowania aktywacji plazminogenu do plazminy, głównie przy udziale PAI-1 lub poprzez obniżenie enzymatycznej aktywności plazminy, w obecności  $\alpha_2$ -AP. Kluczowym białkiem fibrynolizy jest plazminogen – proenzym, który w wyniku proteolizy wiązania Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub> jest przekształcany do plazminy, dwułańcuchowej proteazy serynowej, której łańcuch ciężki zawiera 5 domen kringlowych, a w łańcuchu lekkim której znajduje się centrum katalityczne enzymu. Regulacja fibrynolizy zachodzi przy udziale aktywatorów oraz inhibitorów plazminogenu, które mogą hamować etap aktywacji plazminogenu lub samą plazminę. Stężenie aktywatorów w osoczu jest niższe aniżeli głównego inhibitora PAI-1, który posiada zdolność hamowania tPA.

Nadtlenoazotyn może wpływać na białka związane z fibrynolizą w bardzo szerokim zakresie. W warunkach *in vitro* ONOO<sup>-</sup> hamuje zarówno proces aktywacji plazminogenu do plazminy, jak i aktywność amidolityczną i proteolityczną samej plazminy. Spadkowi aktywności generowanej plazminy towarzyszy wzrost nitrowania reszt tyrozynowych w cząsteczce plazminogenu [10,11]. Wykazano także wysoką podatność plazminogenu na działanie nadtlenoazotynu w osoczu [7]. Na podstawie obserwowanego hamującego wpływu nadtlenoazotynu na aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), Nielsen i wsp. [8] sugerują istnienie związku między nitrowaniem reszt tyrozyny na skutek działania ONOO<sup>-</sup>, a obniżeniem aktywności t-PA.

Potencjalnym celem dla działania nadtlenoazotynu mogą być również współdziałające z układem fibrynolitycznym metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*). Wykorzystanie izolowanych serc szczurów jako modelu stanu niedokrwienia i reperfuzy umożliwiło wykazanie, że uszkodzenia komórek serca indukowane nadtlenoazotynem zachodzą przy udziale metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-2. Wprowadzenie ONOO<sup>-</sup> do krążenia wieńcowego powoduje wzrost uwalniania i aktywności MMP-2 [21]. Ponadto wykazano, że ONOO<sup>-</sup> hamuje także tkankowy inhibitor metaloproteazy 1 (TIMP-1, ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*), który jest inhibitorem zależnej od plazminy MMP-1 [22]. Nadtlenoazotyn może modyfikować strukturę i funkcje białek nie tylko poprzez tworzenie nitrotyrozyny. Okamoto i wsp. [23] zaobserwowali indukowaną nadtlenoazotynem aktywację proMMPs zależną od glutationu. Nadtlenoazotyn silnie aktywuje oczyszczone metaloproteazy człowieka: MMP-1, MMP-8 i MMP-9 w obecności glutationu. Rolę w aktywacji metaloproteaz w tym układzie przypisuje się S-nitrozoglutationowi (GSNO<sub>2</sub>) powstającemu w reakcji zredukowanej formy glutationu (GSH) z nadtlenoazo-

tynem. Zarówno syntetyczny GSNO<sub>2</sub>, jak i generowany w reakcji z ONOO<sup>-</sup>, powodują S-glutationylację syntetycznego peptydu PCRGVPD, który jest sekwencją zachowanego w ewolucji fragmentu domeny w MMPs odpowiedzialnej za autohamowanie, co wskazuje na możliwość modyfikacji aktywności metaloproteaz na skutek działania ONOO<sup>-</sup>.

## STRES OKSYDACYJNY A PŁYTKI KRWI

W przebiegu prawidłowej hemostazy istotną rolę odgrywają też płytki krwi. Uczestniczą w hemostazie pierwotnej polegającej na tworzeniu płytkowego czopu hemostatycznego oraz biorą udział w tzw. hemostazie wtórnej, uczestnicząc w aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia krwi prowadzącej do wytwarzania trombin. Płytki krwi biorą także udział w innych procesach fizjologicznych i patologicznych, m.in. w stanach zapalnych, zmianach miażdżycowych ściany naczyń, metastazie komórek nowotworowych czy gojeniu ran.

Płytki krwi są najmniejszymi, beźądrzastymi elementami morfotycznymi krwi (średnica 2-4  $\mu$ m). Powstają z megakariocytów w szpiku kostnym i częściowo w płucach. Proliferację i różnicowanie komórek prekursorowych szeregu płytkotwórczego oraz dojrzewanie megakariocytów aż do wytworzenia płytek krwi regulują cytokiny (interleukina 3 i 11), a przede wszystkim trombopoetyna. Czas życia nie uczestniczących w procesie hemostazy płytek krwi w krążeniu wynosi od 8-12 dni; ulegają one fagocytozie (głównie w śledzionie). Płytką krwi jest otoczona błoną plazmatyczną, w której zlokalizowane są liczne receptory, sprzężone z enzymatycznymi systemami przekazywania informacji.

Aby płytki krwi mogły pełnić swe funkcje hemostatyczne, muszą ulec aktywacji. Aktywację płytek krwi indukują liczne i różnorodne pod względem budowy związki (agoniści) poprzez przyłączenie do specyficznych receptorów obecnych na powierzchni płytek krwi i najczęściej sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G. Agonistami wchodzącymi w oddziaływanie z takimi receptorami są m.in.: trombina, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), ADP, adrenalina, płytkowy czynnik aktywujący (PAF; ang. *platelet activating factor*) i wazopresyna. Trombina ma trzy różne receptory: dwa typu PAR (ang. *proteolytically activated receptor*) i glikoproteinę GPIb w kompleksie (GPIb/IX/V), natomiast ADP rozpoznawany jest przez płytkę za pomocą trzech purynoergicznych receptorów: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>ac</sub> i P2X<sub>1</sub> [24]. Rozmiar aktywacji płytek krwi zależy od rodzaju działającego agonisty.

W procesie aktywacji płytek dochodzi do zmiany kształtu z dyskoidalnego na sferyczny, a następnie do wytwarzania filopodiów i lamellipodiów, których tworzenie jest uwarunkowane reorganizacją cytoszkieletu płytek możliwą dzięki wzrostowi wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i metabolizmowi fosfatydyloinozytoli. Aktywacja płytek krwi prowadzi do wydzielania związków zmagazynowanych w licznych specyficznych ziarnistościach płytek. Agregacja płytek krwi następuje w wyniku przekazywania sygnałów typu „inside out” i prowadzi do aktywacji i zmiany konformacji bardzo licznych receptorów integrynowych  $\alpha_{IIb}\beta_3$  na powierzchni płytek umożliwiając przyłączenie do nich dimerów fibrynogeny i tworzenia agregatów płytkowych. Ponadto, aktywacji płytek

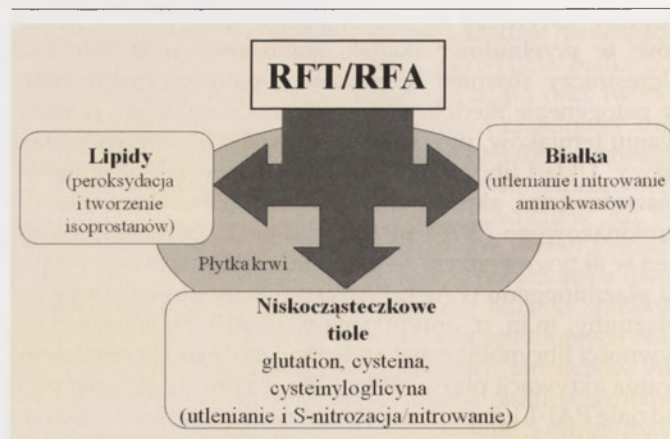
krwi towarzyszy odszczepienie od powierzchni płytek mikrocząstek, które obdarzone są właściwościami prokoagulantyjnymi oraz ekspozycja ujemnie naładowanych fosfolipidów – fosfatydyloseryny, co umożliwia płytkom krwi udział w procesie krzepnięcia krwi. Dochodzi również do ekspozycji na powierzchni płytek krwi selektywnej P pochodzącej z błon ziarnistości alfa oraz białka CD40L.

Podczas aktywacji płytek krwi dochodzi do inicjowania dwóch wzajemnie ze sobą powiązanych kaskad przekazywania sygnału. Pierwsza inicjowana jest przez hydrolizę fosfolipidów błony zachodzącą pod wpływem fosfolipazy C (PLC). Większość agonistów aktywuje izoformę  $\beta$  PLC. W wyniku działania PLC powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: diacyloglicerol (DAG) i inozytolotrisfosforan ( $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ) aktywujący białkową kinazę C – kluczowy enzym w aktywacji płytek. Z przemianą fosfolipidów płytkowych związana jest też przemiana arachidonianu i synteza eikozanoidów z wytworzeniem tromboksanu  $\text{A}_2$  potęgującego aktywację. Drugą kaskadą reakcji przekazywania sygnału w pobudzonych płytkach jest inicjowana przez przyłączenie niereceptorowych kinaz tyrozynowych do specyficznych receptorów białek adhezyjnych prowadząc do aktywacji kinaz tyrozynowych [25].

## REAKTYWNE FORMY TLENU I AZOTU W PŁYTKACH KRWI

Reaktywne formy tlenu czy azotu w płytkach krwi powstają w toku ich fizjologicznego metabolizmu: z udziałem oksydaz błonowych, syntazy  $\text{NO}^*$ , przemiany kwasu arachidonowego, metabolizmu fosfatydyloinozytoli i cyklu glutationowego [27-33]. Płytki krwi mogą także wytwarzać dodatkowe ilości RFT/RFA w stanach patologicznych (m.in. w stanach zapalnych) i pod wpływem różnorodnych egzogennych czynników: składników diety, jonów metali ciężkich, leków i w czasie wysiłku fizycznego. Przy zmniejszeniu skuteczności układów antyoksydacyjnych, nadmiar RFT czy RFA wywołuje stres oksydacyjny, prowadząc do zmian funkcji hemostatycznych płytek krwi. Różne tarcze działania RFT i RFA w płytkach krwi przedstawiono na rycinie 2.

Jednym z ważniejszych enzymów zaangażowanych w wytwarzanie RFT w różnych komórkach, w tym w płytkach krwi jest przypuszczalnie oksydaza  $\text{NAD(P)H}$  (EC 1.6.2.4), katalizująca powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w wyniku transferu elektronów z  $\text{NADPH}$  na tlen cząsteczkowy. Jednak do tej pory, nie udało się wyizolować oksydazy  $\text{NAD(P)H}$  z płytek krwi, i wyniki badań dotyczące udziału oksydazy w wytwarzaniu anionorodnika ponadtlenkowego są często kontrowersyjne. Badania Salvemini i wsp. [34] wykazały, że zastosowanie difenylenodjoniny, niespecyficznego inhibitora oksydazy  $\text{NAD(P)H}$  powoduje zahamowanie agregacji płytek krwi stymulowanej trombiną, ADP czy kolagenem. Finazzi-Agro i wsp. [35] natomiast stwierdzili, że w płytkach krwi obecna jest oksydaza  $\text{NAD(P)H}$  z  $\text{NADPH}$  jako kofaktorem. Marcus i wsp. [26] stosując metodę kolorymetryczną opierającą się na redukcji cytochromu c stwierdzili, że płytki krwi wytwarzają  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Późniejsze badania [36] wykazały, że aktywacja płytek krwi jest powiązana z wytwarzaniem  $\text{O}_2^{\cdot-}$  podczas metabolizmu arachidonianu na drodze zależnej od 12-lipoksygenazy (EC 1.13.11.12) i cyklooksygenazy (EC 1.14.99.1) oraz przemiany glutationu [36].



Rycina 2. Tarcze działania RFT i RFA w płytkach krwi.

Źródłem rodnika hydroksylowego z kolei może być przemiana prostaglandyn [37]. W płytkach krwi powstaje też nadtlenek wodoru, co wykazano metodą fluorescencji przy użyciu m.in. 2,7-dichlorodihydrofluoresceiny.  $\text{H}_2\text{O}_2$  powstający w stymulowanych trombiną płytkach krwi jest przekształcany do bardzo reaktywnego rodnika  $\cdot\text{OH}$ , który może spełniać rolę wtórnego przekaźnika informacji i indukować sygnał do wytwarzania agregatów płytkowych [38]. Signorello i wsp. [39] stwierdzili, że kwas arachidonowy jako wtórny przekaźnik moduluje aktywność niektórych płytkowych enzymów uczestniczących w wytwarzaniu RFT czy RFA, m. in. arachidonian może aktywować oksydazę  $\text{NAD(P)H}$ , a tym samym tworzenie anionorodnika ponadtlenkowego oraz może też hamować aktywność syntazy tlenu azotu.

RFT czy RFA w stężeniu fizjologicznym mogą odgrywać ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu płytek krwi regulując proces ich aktywacji. Aktywacja płytek krwi indukowana kolagenem (w przeciwieństwie do ADP) jest powiązana z wytwarzaniem nadtlenku wodoru, funkcjonującego jako wtórny przekaźnik, który stymuluje metabolizm kwasu arachidonowego i aktywuje fosfolipazę C [40,41]. Mechanizm aktywacji fosfolipazy C przez  $\text{H}_2\text{O}_2$  nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony.  $\text{H}_2\text{O}_2$  odgrywa też istotną rolę w aktywacji kinaz tyrozynowych, dzięki czemu pośrednio może wpływać na aktywność fosfolipazy C, gdyż katalaza hamuje uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błony płytkowej, a tym samym syntezę eikozanoidów czy przemianę fosfoinozytoli. Wykazano także, że aktywacja płytek indukowana wysokim stężeniem kolagenu jest hamowana w obecności różnych antyoksydantów (m.in. witaminy E), co wskazuje, że  $\text{H}_2\text{O}_2$  i inne reaktywne formy tlenu mogą uczestniczyć w aktywacji płytek krwi wywołanej kolagenem [40-42]. Istnieją również doniesienia, że RFT czy RFA powstają w płytkach krwi aktywowanych trombiną [28,43].

W płytkach krwi bezpośrednio pod wpływem wolnych rodników kwas arachidonowy wbudowany estrowo do fosfolipidów błony komórkowej może ulegać utlenieniu. W wyniku tego nieenzymatycznego utleniania mogą powstawać liczne izoprostany – izomery prostaglandyn, które powodują m.in. wzrost adhezji płytek krwi.

RFT są także silnymi aktywatorami kinazy JNK, hamując jej inhibitory, w tym m.in. S-transferazę glutationową czy

fosfatazę JNK. Fosfataza SHP-1 przeciwdziała aktywności oksydazy NADPH poprzez hamowanie kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej i białka Rac1, ponieważ ostatnim etapem aktywacji oksydazy NADPH jest przyłączenie się do utworzonego kompleksu zaktywowanego białka Rac1 (w kaskadzie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, zależnej od kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej), która bezpośrednio aktywuje oksydazę NADPH do wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego. Działanie fosfatazy SHP-1 stanowi zatem system obronny przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem anionorodnika nadadtlenkowego.

NO<sup>•</sup> powstaje w cytosolu płytek krwi w ilościach ~100 fmol NO<sup>•</sup>/(mg białka płytek\*min), tzn. ~1 pg NO<sup>•</sup>/(mg białka płytek\*min). Szybkość powstawania NO<sup>•</sup> wynosi ok. 4-7 pmol/(min\*10<sup>8</sup> płytek) w niepobudzonych płytkach krwi i wzrasta do ok. 11-21 pmol/(min\*10<sup>8</sup> płytek) po aktywowaniu kolagenem [30,44,45]. Płytki krwi posiadają dwie izoforny syntazy NO<sup>•</sup> (NOS; ang. *nitric oxide synthase*; EC 1.14.13.39): konstytutywną i indukowalną, pochodzącą z megakariocytów – macierzystych komórek płytek krwi. Konstytutywna jest zależna od jonów Ca<sup>2+</sup> i NAD(P)H. Pobudzenie Meg-01 przez cytokiny IL-1 β i TNF-α prowadzi do ekspresji indukowalnej formy, Ca<sup>2+</sup> niezależnej. Ta aktywność wzrasta po dodaniu NAD(P)H i tetrahydrobiopteryny jako kofaktora. Uwalnianie NO<sup>•</sup> przez płytki krwi przypuszczalnie pełni rolę w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego ochrony przed ich dalszą aktywacją [46]. Sugeruje się, że w płytkach krwi obecny jest mRNA dla konstytutywnej syntazy tlenu azotu (eNOS) [47].

Tlenek azotu jako wolny rodnik posiadający jeden elektron niesparowany, reaguje z białkami, zwłaszcza zawierającymi centra żelazowo-siarkowe, jony metali przejściowych lub grupy hemowe, w tym z cyklazą guanylanową [4,48]. Tlenek azotu w płytkach krwi bierze udział w przekazywaniu sygnałów i aktywacji płytek dzięki zdolności do wiązania i aktywacji rozpuszczalnej w cytosolu cyklazy guanylanowej (ang. *soluble guanylate cyclase*; EC 4.6.1.1). NO<sup>•</sup> aktywując płytkową cyklazę guanylanową powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP. Ten wtórny przekaźnik stymuluje białkową kinazę G (zależną od cGMP) [47,49], przy udziale której dochodzi do fosforylacji reszty seryny w pozycji 239 w białku VASP (ang. *vasodilator – stimulated phosphoprotein*) oraz fosforylacji receptora dla TXA<sub>2</sub>. Fosforylacja białka VASP jest skorelowana z hamowaniem uwalniania jonów wapnia do cytosolu. Tlenek azotu obniżając stężenie jonów wapnia prowadzi do zahamowania różnych etapów aktywacji płytek krwi, m.in. tworzenia agregatów płytkowych czy adhezji płytek do kolagenu. Dokładny mechanizm odpowiedzialny za hamujące działanie NO<sup>•</sup> w płytkach krwi nie jest całkowicie jasny. Najnowsze dane sugerują, że NO<sup>•</sup> może hamować funkcje płytek krwi poprzez oddziaływanie z grupami tiolowymi w centrum aktywnym białkowej izomerazy disulfidowej (PDI, ang. *protein disulfide isomerase*; EC 5.3.4.1). Tworzenie S-nitrozotioli w miejscu aktywnym PDI może prowadzić do inaktywacji izomerazy i – w konsekwencji – wpływa na modulowanie funkcji hemostatycznych płytek krwi. Z kolei powstawanie S-nitrozotioli w integrynie α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> niezbędnej do tworzenia agregatów płytkowych może hamować reakcje wymiany tiol/disulfid zachodzące w tym receptorze [50].

Tlenek azotu może również reagować z anionorodnikiem nadadtlenkowym w płytkach krwi tworząc nadadtlenoazotyn. Płytki krwi generuje bardzo małe ilości nadadtlenoazotynu z uwagi na niskie stężenie endogennego anionorodnika nadadtlenkowego i tlenu azotu [30,51]. Wpływ ONOO<sup>-</sup> powstającego w układzie krążenia na właściwości biologiczne płytek krwi nie jest w pełni poznany, a nieliczne doniesienia są często kontrowersyjne [4,6,33,52-54]. Egzogenny ONOO<sup>-</sup>, w zależności od stężenia, może zarówno aktywować, jak i hamować właściwości hemostatyczne płytek krwi [4,52]. Stwierdzono, że w warunkach *in vitro* ONOO<sup>-</sup> aktywuje płytki krwi, ale obecność osocza całkowicie znosi ten efekt [4,52-54]. W układzie modelowym *in vitro* ONOO<sup>-</sup> może też hamować różne etapy aktywacji płytek krwi, m.in.: adhezję płytek do kolagenu i fibrynogenu [53], agregację [6] i sekrecję nukleotydów adeninowych i białek [54].

Tarczą działania ONOO<sup>-</sup> w płytkach krwi są lipidy i białka, w tym grupy tiolowe białek oraz tiole niskocząsteczkowe. Nadadtlenoazotyn obniża poziom zredukowanych form glutationu, cysteiny i cysteinyloglicyny [55]. Obniżenie stężenia tioli, w tym glutationu może być niekorzystnym zjawiskiem, gdyż glutation jest głównym antyoksydantem chroniącym komórki przed stresem oksydacyjnym. Glutation reguluje metabolizm kwasu arachidonowego, który towarzyszy aktywacji płytek krwi. Egzogenny GSH może podnosić wydajność reakcji syntezy NO<sup>•</sup> katalizowanej przez syntazę tlenu azotu. ONOO<sup>-</sup> nie tylko powoduje utlenianie płytkowych tioli, ale także może powodować nitrozację czy nitrowanie. ONOO<sup>-</sup> (w wysokich dawkach) indukuje tworzenie S-nitrozoglutationu (GSNO) i S-nitroglutationu (GSNO<sub>2</sub>), które mogą być odpowiedzialne za antypłytkowe właściwości ONOO<sup>-</sup> – hamowanie różnych etapów aktywacji płytek krwi [4]. Powstająca pod wpływem ONOO<sup>-</sup> S-nitrozocysteina hamuje poprzez mechanizm niezależny od cGMP agregację płytek krwi indukowaną kolagenem i kwasem arachidonowym [56].

Ekspozycja płytek krwi na działanie nadadtlenoazotynu, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* powoduje nitrowanie reszt tyrozynowych wielu białek [57-60], a także ich karbonylację [61]. Naseem i wsp. [62] zaobserwowali, że wysokie stężenia ONOO<sup>-</sup> (150 μM) powodują nitrowanie białek błony płytkowej, natomiast niższe stężenia indukują tworzenie 3-nitrotyrozyny w białkach cytosolowych. Inni badacze zidentyfikowali jeszcze inne białka płytkowe ulegające nitrowaniu, m.in. kinazę MAP, białkową kinazę Lyn, paksylinę, białko VASP, α-aktynę czy cyklooksygenazę [58,59,63,64]. Nie wyklucza się także, że nitrowanie reszt tyrozynowych w białkach płytkowych może hamować fosforylację a tym samym hamować przekazywanie informacji [65].

Poprzez pomiar różnych markerów peroksydacji lipidów, w tym pomiar stężenia izoprostanów, czy związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym wykazano, że nadadtlenoazotyn w płytkach krwi jest czynnikiem odpowiedzialnym za peroksydację lipidów [55] prowadzącą do zmian struktury błony płytkowej, w tym dostępności różnorodnych receptorów błonowych i upośledzenia aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia na powierzchni płytek. ONOO<sup>-</sup> powoduje też nitrowanie lipidów płytkowych, a

powstający kwas nitrolinolenowy hamuje tworzenie agregatów płytkowych wywołane trombiną, a niezbędne do tworzenia prawidłowego czopu hemostatycznego [66].

Należy podkreślić, że modyfikacje białek, a w szczególności ich nitrowanie może mieć istotne znaczenie nie tylko w zmianie funkcji czy struktury białek, ale także mieć wpływ na zmienione właściwości hemostatyczne płytek krwi narażonych na stres oksydacyjny [67].

Wynikiem stresu oksydacyjnego może być nawet wejście płytek na drogę apoptozy. Po przechowywaniu płytek krwi, jak i po aktywacji płytki krwi wchodzi na drogę apoptozy, głównie na szlaku wewnętrznym. W płytkach krwi wykazano obecność licznych, typowych biochemicznych znaczników apoptozy, w tym markerów szlaku zewnętrznego i wewnętrznego (mitochondrialnego) apoptozy oraz „wykonawców” tego procesu. Stwierdzono obecność „ligandów śmierci” (TRAIL – ligand z rodziny TNF indukujący apoptozę), „receptorów śmierci” (TNFR1, DR3, DR4, DR5 i DcR2 (receptor pułapka)), białek adaptorowych (TRADD i RIP), białek rodziny Bcl-2 (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-2, Bcl-X<sub>l</sub>, Bfl-1, Mcl-1), kaspaz (2, 3, 6, 8 i 9), kalpain i wykazano zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów, ekspozycję fosfatydyloseryny i tworzenie mikropęcherzyków. Na obecnym poziomie wiedzy można przypuszczać, że przebieg procesu apoptozy w płytkach krwi na szlaku zewnętrznym czy wewnętrznym w znacznym stopniu zależy od rodzaju czy siły induktora apoptozy. Dokładne mechanizmy apoptozy w płytkach krwi zostały omówione przez Wachowicz i wsp. [68]. Nadtlenoazotyn w układzie modelowym *in vitro* powoduje wzrost ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni płytek krwi, tworzenie mikropęcherzyków, depolaryzację błony mitochondrialnej oraz aktywację kaspazy-3, co świadczy o indukowaniu przez ONOO<sup>-</sup> zdarzeń apoptotycznych w płytkach krwi [69]. Mechanizm procesu apoptozy wywołany przez ONOO<sup>-</sup> jest częściowo zależny od nitrowania białek płytkowych, ponieważ zastosowanie epikatechiny jako czynnika redukującego proces nitrowania [70] obniża także poziom apoptotycznych marke-

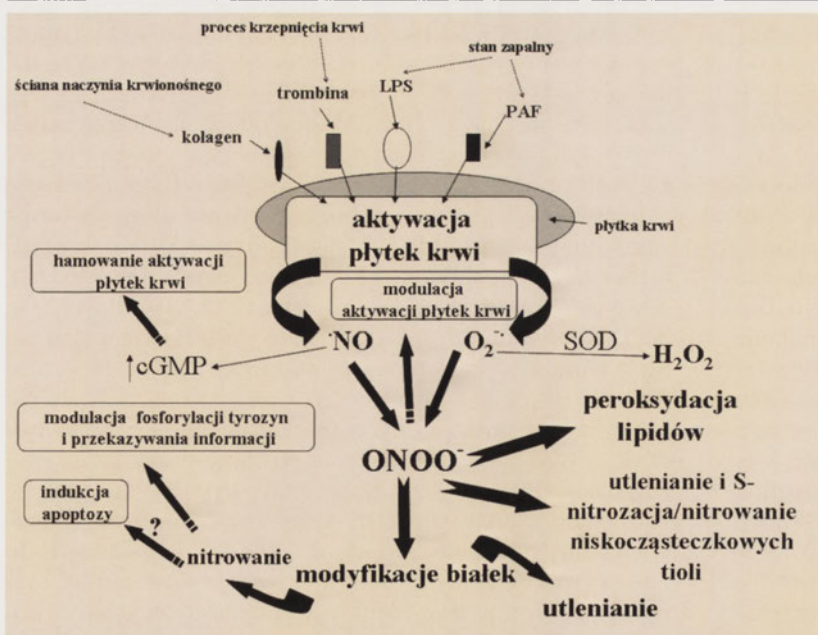
rów w płytkach krwi traktowanych ONOO<sup>-</sup> [69]. Rolę RFT i RFA, w tym nadtlenoazotynu w procesie aktywacji i apoptozy płytek krwi przedstawiono na rycinie 3.

### ODDZIAŁYWANIE PŁYTEK KRWI Z KOMÓRKAMI ŚRÓDBŁONKA

W procesie hemostazy uczestniczy głównie błona wewnętrzna ściany naczynia krwionośnego (*intima*) składająca się z pojedynczej warstwy komórek śródbłonna oraz trombogennej warstwy podśródbłonkowej. Powierzchnia komórek śródbłonna skierowana do światła naczynia pokryta jest glikokaliksem w skład którego wchodzi glikozaminoglikany (GAG) o właściwościach antykoagulacyjnych. Komórki śródbłonna syntetyzują składniki glikokaliksu, jak i składniki błony podstawnej, takie jak kolagen, elastyna, fibronektyna, witronektyna czy laminina. Są również miejscem syntezy tlenu azotu [71], enzymów proteolitycznych degradujących tkankę łączną (kolagen, elastynę) oraz enzymów degradujących glikozaminoglikany. W śródbłonku zachodzi synteza czynnika von Willebranda (vW) magazynowanego w ciałkach Weibel-Palade'a oraz licznych czynników uwalnianych do krwiobiegu i uczestniczących w procesie hemostazy: aktywatorów plazminogenu (tPA, uPA), inhibitorów plazminogenu (PAI), białka S oraz czynników mitogenicznych (PDGF, FGF, EDGF). Ze śródbłonna do krwiobiegu są uwalniane związki mające wpływ na aktywację płytek krwi, na potencjał przeciwzakrzepowy oraz na skurcz i rozkurcz naczynia krwionośnego. Te związki regulujące przebieg hemostazy określa się mianem trombo regulatorów. Do najważniejszych trombo regulatorów syntetyzowanych w komórkach śródbłonna należą: prostacyklina – PGI<sub>2</sub>, tlenek azotu oraz ektonukleotydy. PGI<sub>2</sub> powstaje z arachidonianu i wykazuje przeciwstawne działanie do płytkowego TXA<sub>2</sub> – powoduje rozkurcz naczynia i ma działanie hamujące agregację płytek. Tlenek azotu jest wytwarzany przy udziale syntazy NO<sup>•</sup> (eNOS) i działa synergistycznie z PGI<sub>2</sub>. Ektonukleotydy (CD39) z zachowanymi w ewolucji regionami apyrazy są zlokalizowane w błonie komórek śródbłonna. Hydrolizują ATP i ADP pochodzące z uszkodzonych komórek

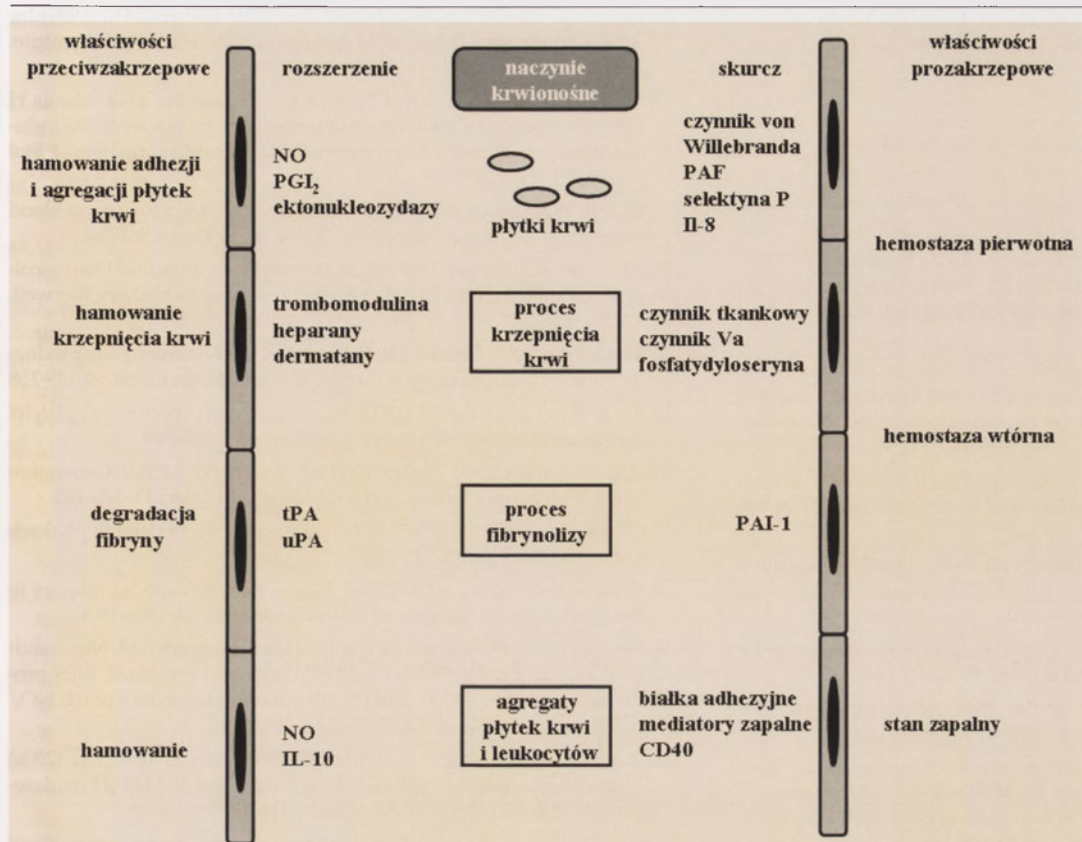
czy też z osmoofilnych ziarnistości płytkowych i uwalniane w procesie sekrecji z pobudzonych płytek krwi. Powstający AMP przy udziale 5'-nukleotydyazy jest metabolizowany do adenyzy wykazującej działanie antypłytkowe (hamowanie agregacji) i rozkurczowe. W śródbłonku ma miejsce też synteza angiotensyny II, izoprostanów oraz endoteliny (ET-1), peptydu zbudowanego z 21 reszt aminokwasowych powodującego skurcz naczynia i wzrost ciśnienia krwi. W komórkach mięśni gładkich naczynia są obecne receptory dla endoteliny [72-74].

Przeciwzakrzepowe właściwości komórek śródbłonna zależą od obecności na ich powierzchni GAG (głównie siarczanu heparanu) czy też trombomoduliny, która łącząc się z trombiną inicjuje antykoagulacyjne działanie białka C. Z komórek śródbłonna uwalniane są czynniki wpływające na układ fibrynolizy, tj. aktywatory plazminogenu (tPA, uPA). Pobudzone komórki śródbłonna uwalniają również metaloproteazy, które degradują białka macierzy i eksponują



Rycina 3. Rola RFT i RFA w procesie aktywacji i apoptozy płytek krwi.





Rycina 4. Udział płytek krwi i komórek śródbłonnka w hemostazie.

receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPAR).

Sporocynkowe płytki krwi nie przylegają do komórek śródbłonnka wyściełających naczynie krwionośne. Jednak uszkodzenie ciągłości warstwy śródbłonnka powoduje odsłonięcie warstwy podśródbłonnej i białek adhezyjnych (kolagen, fibronektyna, laminina, witronektyna), do których przylegają płytki. Adhezja płytek do śródbłonnka może mieć także miejsce po ich uprzedniej aktywacji lub po uszkodzeniu komórek śródbłonnka bez naruszenia ciągłości warstwy. Niepobudzone komórki śródbłonnka zapobiegają adhezji płytek przez syntezę NO<sup>\*</sup> i prostacykliny. Adhezja płytek do śródbłonnka powoduje również aktywację płytek i wydzielanie związków zmagazynowanych w ziarnistościach. Pobudzone płytki uwalniają do środowiska czynniki wpływające na hemostazę oraz liczne mediatory zapalne [73,74].

W adhezji płytek do śródbłonnka uczestniczą: płytkowy kompleks GPIb/IX/V łączący się z PSGL-1 (ang. *P-selectin glycoprotein ligand 1*) i z selektyną P i E, śródbłonna i płytkowa integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wiążąca integrynę  $\alpha_v\beta_3$  i białko adhezyjne ICAM-1 (międzykomórkowe białko adhezyjne 1) śródbłonnka za pośrednictwem fibrynogenu, fibronektyny czy czynnika von Willebranda, oraz obecna na pobudzonych płytkach krwi selektyna P z receptorem PSGL-1. Adhezja odwracalna tych komórek zachodzi przy udziale selektyn (selektyna P na pobudzonych płytkach i selektyna P i E na śródbłonnku) oraz PSGL-1 [73,74]. Udział płytek krwi i komórek śródbłonnka w hemostazie przedstawia rycina 4.

Zmiany warunków przepływu krwi, co ma miejsce przy nadciśnieniu tętniczym czy przewężeniu naczynia, prowadzą do ekspozycji białek adhezyjnych w komórkach śródbłonnka: VCAM-1 (białko adhezyjne naczynia), ICAM-1, selektyny P i E oraz aktywacji czynnika transkrypcji (NF- $\kappa$ B) pobudzającego syntezę wielu białek, w tym prozapalnych.

Powstający w komórkach śródbłonnka NO<sup>\*</sup> jest najważniejszym fizjologicznym czynnikiem rozkurczającym naczynia krwionośne, a jego ciągle wytwarzanie z argininy decyduje o utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi i chroni płytki krwi przed aktywacją niezbędną do utworzenia czopu hemostatycznego. Za-

pobiega on agregacji płytek krwi stymulując cyklazę guanylanową. Dysfunkcja śródbłonnka może być spowodowana lokalnym powstawaniem RFT/RFA. Stwierdzono, że utlenianie tetrahydrobiopteryny, krytycznego kofaktora NOS przesuwając równowagę w kierunku syntezy anionorodnika nadadtlenkowego. Powstawanie anionorodnika nadadtlenkowego z kolei obniża biodostępność wolnego NO<sup>\*</sup>, prowadząc do powstania silnie utleniającego i nitrującego związku – nadtlenoazotynu. Ogranicza też syntezę prostacykliny, gdyż bezpośrednio hamuje syntazę PGI<sub>2</sub> nitrując resztę tyrozyny (w pozycji 430) w centrum aktywnym. Hamuje też syntezę PGH<sub>2</sub>. Ma to istotny wpływ na dysfunkcję śródbłonnka, prowadząc do zmian miażdżycowych i stanu zapalnego [75].

Modyfikacjom wywołanym działaniem nadtlenoazotynu ulegają liczne białka uczestniczące w przebiegu hemostazy, w tym białka obecne w komórkach śródbłonnka: aktywna przez nitrowanie reszty tyrozyny i utlenianie reszty cysteiny, a profilina poprzez nitrowanie reszt tyrozyny. Hamowana jest również syntaza NO<sup>\*</sup> (eNOS). Nadtlenoazotyn ogranicza wytwarzanie NO<sup>\*</sup> poprzez inaktywację eNOS utleniając jej centrum cynkowe. Ponadto, nadtlenoazotyn nie tylko inaktywuje syntazę prostacykliny (nitrując resztę tyrozyny w pozycji 430), ale powoduje rozpad glikokaliksu komórek śródbłonnka zmniejszając jego właściwości przeciwzakrzepowe, zmienia właściwości białek adhezyjnych glikokaliksu, zwiększa adhezję neutrofilów i wywołuje apoptozę komórek śródbłonnka i mięśni gładkich naczynia, głównie na skutek uszkodzenia mitochondrialnego DNA i aktywacji kaspaz. Śródbłonek stanowi główne źródło RFT/

RFA uszkadzających białka osocza, w tym białka uczestniczące w krzepnięciu krwi i fibrynolizie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Levi M, van der Poll T (2005) Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 15: 254-259
2. Esmon CT (2005) The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 131: 417-430
3. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624
4. Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6702-6706
5. Lupidi G, Angeletti M, Eleuteri AM, Tacconi L, Coletta M, Fioretti E (1999) Peroxynitrite-mediated oxidation of fibrinogen inhibits clot formation. *FEBS Lett* 462: 236-240
6. Nowak P, Wachowicz B (2002) Peroxynitrite-mediated modification of fibrinogen affects platelet aggregation and adhesion. *Platelets* 13: 293-299
7. Gugliucci A (2003) Human plasminogen is highly susceptible to peroxynitrite inactivation. *Clin Chem Lab Med* 41: 1064-1068
8. Nielsen VG, Crow JP, Zhou F, Parks DA (2004) Peroxynitrite inactivates tissue plasminogen activator. *Anesth Analg* 98: 1312-1317
9. Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bennett JS, Murciano JC, Muzykantov V, Penn MS, Hazen SL, Weisel JW, Ischiropoulos H (2004) Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279: 8820-8826
10. Hathuc C, Hermo R, Schulze J, Gugliucci A (2006) Nitration of human plasminogen by RAW 264.7 macrophages reduces streptokinase-induced plasmin activity. *Clin Chem Lab Med* 44: 213-219
11. Nowak P, Kolodziejczyk J, Wachowicz B (2004). Peroxynitrite and fibrinolytic system: the effect of peroxynitrite on plasmin activity. *Mol Cell Biochem* 267: 141-146
12. Nowak P, Zbikowska HM, Ponczek M, Kolodziejczyk J, Wachowicz B (2007) Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences. *Thromb Res* 121: 163-174
13. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298: 446-451
14. Bartosz G (1996) Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol* 43: 645-659
15. Gow A, Duran D, Thom SR, Ischiropoulos H (1996) Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 333: 42-48
16. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424
17. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Fortes C, Constantinescu V, Ischiropoulos H, Ohshima H (2001) Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* 61: 778-784
18. Doolittle RF (2004) Determining the crystal structure of fibrinogen. *J Thromb Haemost* 2: 683-689
19. Olinescu RM, Kummerow FA (2001) Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 12: 162-169
20. Parastatidis I, Thomson L, Burke A, Chernysh I, Nagaswami C, Visser J, Stamer S, Liebler DC, Koliakos G, Heijnen HF, Fitzgerald GA, Weisel JW, Ischiropoulos H (2008) Fibrinogen beta-chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor. *J Biol Chem* 283: 33846-33853
21. Wainwright CL (2004) Matrix metalloproteinases, oxidative stress and the acute response to acute myocardial ischaemia and reperfusion. *Curr Opin Pharmacol* 4: 132-138
22. Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG (1996) Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett* 381: 21-24
23. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet, Maeda H (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 276: 29596-29602
24. Olas B, Wachowicz B (1998) Modulation of cisplatin toxicity in blood platelets by glutathione depletion. *Anti-Cancer Drugs* 9: 473-478
25. Rynningen A, Holmsen H (1999) In Platelet Physiology and Pharmacology. (Gundu H, Rao R, red) Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1-22
26. Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, Ullmann HL (1977) Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 59: 149-158
27. Forde RC, Fitzgerald DJ (1997) Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 95: 787-789
28. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A (2002) Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 13: 175-182
29. Olas B, Wachowicz B (2003) Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi. *Post Biol Kom* 2: 325-337
30. Krotz F, Sohn HY, Pohl U (2004) Reactive oxygen species, players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1988-1996
31. Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U (2005). Platelet NAD(P)H oxidase-generated ROS production regulates  $\alpha IIb\beta 3$  integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood* 106: 2757-2760
32. Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, Gambaryan S, Walter U (2006) Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS. *Blood Cell Mol Dis* 36: 166-170
33. Olas B, Wachowicz B (2007) Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets* 23: 1-11
34. Salvemini D, Botting R (1993) Modulation of platelet function by free radicals and free radicals scavengers. *Trends Pharmacol Sci* 14: 36-42
35. Finazzi-Agro A, Menichelli A, Persiani M, Biancini G, Del Principe D (1982) Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 718: 21-25
36. Jahn B, Hansch GM (1990) Oxygen radical generation in human platelets: dependence of 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93: 73-79
37. Maresca M, Colao C, Leoncini G (1992) Generation of hydrogen peroxide in resting and activated platelets. *Cell Biochem Funct* 10: 79-82
38. Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Practico D, Violi F (1997) Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 22: 999-1006
39. Signorello MG, Segantin A, Leoncini G (2009) The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. *Biochim Biophys Acta* 1791: 1084-1092
40. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Corpo ML, Di Giulio S, Finazzi-Agro AF (1985) Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Lett* 1: 142-149
41. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F (1998) Hydrogen peroxide is involved in collagen - induced platelet activation. *Blood* 91: 484-490
42. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Giulio S, Giordani M, Savini I, Finazzi Agro AF (1991) Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin. *Thromb Res* 62: 365-371
43. Olas B, Wachowicz B, Nowak P (2009) Oxidative/nitrative modification of blood platelet proteins induced by thrombin *in vitro*. *Thromb Res* 123: 758-762
44. Mehta JL, Chen LY, Kone CB, Mehta P, Turner P (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125: 87-96
45. Zhou Q, Hellerman GR, Solomonson LP (1995) Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 77: 87-96

46. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5193-5197
47. D'Atri LP, Malver E, Romaniuk MA, Pozner RG, Negrotto S, Schatner M (2009) Nitric oxide: news from stem cells to platelets. *Curr Med Chem* 16: 417-429
48. Radomski MW, Zakar T, Salas E (1996) Nitric oxide in platelets. *Meth Enzymol* 269: 88-107
49. Walter U, Gambaryan S (2009) cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb Exp Pharmacol* 191: 533-548
50. Karolczak K, Olas B (2009) Mechanism action of homocysteine and its thiolactone in haemostasis system. *Physiol Res* 58: 1-11
51. Lufitano M, Balazy M (2003) Interactions of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. *Biochem Pharmacol* 65: 515-523
52. Mondoro TH, Shafer BC, Vostal JG (1997) Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Radic Biol Med* 22: 1055-1063
53. Nowak P, Wachowicz B (2001) Studies on pig blood platelet responses to peroxynitrite action. *Platelets* 12: 376-381
54. Nowak P, Wachowicz B (2001) The effects of peroxynitrite on pig platelet lipid peroxidation and the secretory process induced by thrombin. *Cytobios* 106: 179-187
55. Nowak P, Olas B, Bald E, Glowacki R, Wachowicz B (2003) Peroxynitrite-induced changes of thiol groups in human blood platelets. *Platelets* 14: 375-379
56. Tsiskas D, Ikic M, Tewes KS, Raida M, Frolich JC (1999) Inhibition of platelet aggregation by S-nitroso-cysteine via cGMP independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> synthesis in human blood platelets. *FEBS Lett* 442: 162-166
57. Bruckdorfer KR (2001) The nitration of proteins in platelets. *Life Sci* 324: 611-615
58. Sabetkar M, Low SY, Naseem KM, Bruckdorfer KR (2002) The nitration of proteins in platelets: significance in platelet function. *Free Radic Biol Med* 33: 728-736
59. Olas B, Nowak P, Kołodziejczyk J, Wachowicz B (2004) The effects of antioxidants on peroxynitrite-induced changes in platelet proteins. *Thromb Res* 113: 399-406
60. Cardoso MH, Morganti RP, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E, Marcondes S (2010) The role of superoxide anion in the inhibitory effect of SIN-1 in thrombin-activated human platelet adhesion. *Eur J Pharmacol* 627: 229-234
61. Olas B, Nowak P, Ponczek M, Wachowicz B (2006) Natural phenolic compound – resveratrol may reduce carbonylation of proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. *General Physiol Biophys* 25: 215-222
62. Naseem KM, Low SY, Sabetkar M, Bradley NJ, Khan J, Jacobs M, Bruckdorfer KR (2000) The nitration of platelet cytosolic proteins during agonist-induced activation of platelets. *FEBS Lett* 473: 119-122
63. Boulos C, Jiang H, Balazy M (2000) Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 222-229
64. Marcondes S, Cardoso MHM, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E (2006) Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for  $\alpha$ -actinin nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3434-3439
65. Ischiropoulos H, Gow A (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology* 208: 299-303
66. Coles B, Bloodworth A, Eiserich JP, Lewis MJ, McLoughlin RM, Giddings JC, Lewis MJ, Haslam RJ, Freedman BA, O'Donnell VB (2002) Nitrooleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J Biol Chem* 277: 5832-5840
67. Low SY, Sabetkar M, Bruckdorfer KR, Naseem KM (2002) The role of protein nitration in the inhibition of platelet activation by peroxynitrite. *FEBS Lett* 511: 59-64
68. Wachowicz B, Olas B, Rywaniak J (2006) Markery apoptozy w płytkach krwi. *Post Biol Kom* 33: 603-620
69. Wachowicz B, Rywaniak JZ, Nowak P (2008) Apoptotic markers in human blood platelets treated with peroxynitrite. *Platelets* 19: 624-635
70. Schroeder P, Zhang H, Klotz LO, Kalyanaraman B, Sies H (2001) (-)-Epicatechin inhibits nitration and dimerization of tyrosine in hydrophilic as well as hydrophobic environments. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 1334-1338
71. Furchgott RF, Zawadzki JF (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
72. Wnuczko K, Szczepański M (2007) Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol Merkuriusz Lek* 23: 60-65
73. Kralisz U (2008) Oddziaływania płytek krwi z komórkami śródbłonna w stanach zapalnych. Cz. I, Receptory adhezyjne płytek krwi, komórki śródbłonna i mikropecherzyków w hemostazie i stanach zapalnych. *Post Biol Kom* 35: 45-60
74. Kralisz U (2008) Oddziaływania płytek krwi z komórkami śródbłonna w stanach zapalnych. Cz. II, Substancje uwalniane z płytek krwi – szlaki regulujące przewodzenie sygnału w komórkach śródbłonna w stanach zapalnych. *Post Biol Kom* 35: 61-78
75. Zou MH, Leist M, Ullrich U (1999) Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol* 154: 1359-1365

## Oxidative stress in haemostasis

Paweł Nowak<sup>✉</sup>, Beata Olas, Barbara Wachowicz

Department of General Biochemistry, Institute of Biochemistry, University of Łódź, 12/16 Banacha St., 90-237 Łódź, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: pnowak@biol.uni.lodz.pl

**Key words:** reactive oxygen and nitrogen species, peroxynitrite, oxidative stress, haemostasis, blood platelets

### ABSTRACT

The normal hemostatic mechanisms consist of a balance between hemorrhage and thrombosis that is achieved through the interaction of the blood vessels, blood platelets, the coagulation and fibrinolytic factors. The vascular endothelium sustains the balance between prevention and stimulation of platelet activation, thrombogenesis and fibrinolysis and between vasoconstriction and vasodilatation. Endothelial dysfunction associated with different cardiovascular diseases is related to the local formation of reactive oxygen/nitrogen species, mainly peroxynitrite that is produced in a rapid reaction between nitric oxide and superoxide anion. Reactive oxygen/nitrogen species induce changes in the structure and function in hemostatic elements. Proteins and lipids are major initial targets in endothelial cells, blood platelets and plasma. Reaction of reactive oxygen species and nitrogen species, including peroxynitrite, with cellular proteins can lead to nitration of aromatic amino acid residues, oxidation of thiol groups and conversion of some amino acid residues into carbonyl derivative. Oxidative/nitrative modifications of platelet proteins may induce changes of their signaling and haemostatic function (activation). Peroxynitrite also causes oxidation and nitration of fibrinogen – a key protein in coagulation cascade and plasminogen (the main protein of fibrinolysis process) changing their hemostatic functions. Oxidative/nitrative modifications of different components of haemostasis system have been observed in several cardiovascular diseases.

# Stres oksydacyjny w chorobach neurodegeneracyjnych – potencjalne właściwości antyoksydacyjne katecholamin

Katarzyna Jodko-Piórecka

Grzegorz Litwinienko✉

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego,  
Warszawa

✉Wydział Chemii Uniwersytetu  
Warszawskiego, ul. Pasteura 1, 02-093  
Warszawa; tel.: (22) 822 02 11 (w. 333), e-mail:  
litwin@chem.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 6 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 25 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** choroby neurodegeneracyjne, stres oksydacyjny, katecholaminy, antyoksydanty, dopamina

**Wykaz skrótów:** ALS (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) – stwardnienie zanikowe boczne; APP (ang. *Amyloid Precursor Protein*) – białko prekursorowe amyloidu; COMT (ang. *Catechol-O-Methyl Transferase*) – metylotransferaza katecholowa; CuZn SOD – cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa; L-DOPA – 3,4-dihydroksyfenyloalanina; EOAD (ang. *Early-Onset Alzheimer Disease*) – wczesna postać choroby Alzheimer; MAO (ang. *Monoamine Oxidase*) – oksydaza mono-aminowa; MAP – białko związane z mikrotubulami (ang. *Microtubule Associated Protein*); RFT – reaktywne formy tlenu

**Podziękowania:** Autorzy pragną podziękować Pani dr hab. Marii A. Ciemerych-Litwinienko za cenną dyskusję i uwagi dotyczące niniejszej pracy. Artykuł powstał w ramach projektu badawczego MPD/2008/1/styp6, realizowanego w ramach programu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (program współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego).

## STRESZCZENIE

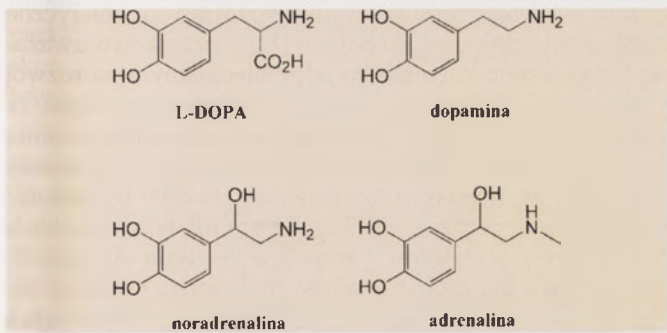
Choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimer, Parkinsona i stwardnienie zanikowe boczne, charakteryzują się postępującym zanikiem komórek nerwowych, któremu towarzyszy agregacja nieprawidłowo sfałdowanych białek (odpowiednio – peptydu A $\beta$ ,  $\alpha$ -synukleiny i cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej). Białka te mogą wiązać jony metali przejściowych, ułatwiając im wchodzenie w cykl reakcji redoks prowadzące do nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu. Powstały stres oksydacyjny może prowadzić do uszkodzenia, a nawet śmierci neuronów oraz do lokalnego spadku stężenia neuroprzekazników katecholaminowych. Rezultaty badań *in vitro* wskazują, że oprócz pełnienia kluczowej roli w przekazywaniu sygnałów nerwowych, katecholaminy posiadają również aktywność antyoksydacyjną. W niniejszym opracowaniu omówiono właściwości antyoksydacyjne neuroprzekazników katecholaminowych – dopaminy (i jej prekursora L-DOPA), adrenaliny i noradrenaliny. Przytoczono wyniki doświadczeń świadczące o antyoksydacyjnym potencjale tych związków. Prawdopodobnie, katecholaminy mogą bezpośrednio neutralizować wolne rodniki, ale dokładny mechanizm ich działania nie został dotąd opisany.

## WPROWADZENIE

W 2006 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaprezentowała raport zatytułowany *Neurological disorders: public health challenges*, który informował o rosnącej częstości występowania chorób neurologicznych. Według raportu, przeszło miliard osób jest obecnie dotkniętych schorzeniami tego typu. Wpływ chorób neurologicznych na stan zdrowia społeczeństwa był przez lata ignorowany. Wynikało to między innymi z metodyki badań epidemiologicznych, które koncentrowały się głównie na wskaźniku śmiertelności – w przypadku chorób neurologicznych jest on stosunkowo niewielki i wynosi mniej niż 1% (choroby te są bezpośrednią przyczyną około 6,8 mln zgonów rocznie) [1]. Schorzenia neurologiczne są przeważnie postępującymi chorobami przewlekłymi, które nie poddają się leczeniu farmakologicznemu. Ich konsekwencją jest dramatyczne pogorszenie się warunków życia chorych i ich rodzin, które nie było uwzględniane we wcześniejszych badaniach epidemiologicznych. We wspomnianym raporcie wpływ chorób neurologicznych na stan zdrowia społeczeństwa oszacowano za pomocą współczynnika DALYs (ang. *Disability-Adjusted Life Years*) – parametr ten charakteryzuje lata pełnosprawności utracone w wyniku choroby [1]. Stwierdzono, że choroby neurologiczne wywierają większy wpływ na społeczeństwo niż choroby nowotworowe. Ponadto, według danych zawartych w raporcie, w ciągu najbliższych 25 lat liczba osób cierpiących na choroby neurologiczne może zwiększyć się nawet o 12%, dlatego niezbędne jest zintensyfikowanie badań prowadzących do zrozumienia zjawisk leżących u podłoża tej grupy schorzeń [1].

Choroby neurologiczne są efektem zaburzeń w funkcjonowaniu osrodkowego (mózg, rdzeń kręgowy) i obwodowego układu nerwowego (nerwy obwodowe, połączenia nerwowo-mięśniowe). Schorzenia neurologiczne, których objawy są konsekwencją postępującej utraty komórek nerwowych, klasyfikujemy jako choroby neurodegeneracyjne. Często (choć niesłusznie) postrzegane są one jako problem tylko i wyłącznie „wieku podeszłego”. Najczęściej występujące schorzenie neurodegeneracyjne, choroba Alzheimer (obecnie około 35 milionów chorych), rzeczywiście dotyka przede wszystkim osób starszych – 98% przypadków rejestruje się u pacjentów powyżej 65 roku życia [1,2]. Jednak symptomy innych chorób neurodegeneracyjnych obserwuje się u znacznie młodszych pacjentów – choroba Huntingtona (6 milionów chorych) dotyka już osoby 30-letnie, podczas gdy choroba Krabbe (o częstości 1:100 000 urodzeń) jest śmiertelnym schorzeniem wieku dziecięcego.

<sup>1</sup>Zgodnie z klasyfikacją WHO wyodrębniono następujące okresy: 60-75 lat – wiek podeszły; 75-90 lat – wiek starczy; powyżej 90 lat – wiek sędziwy.



Rycina 1. Struktura chemiczna katecholamin, które pełnią rolę neuroprzekazników w układzie nerwowym (dopamina, adrenaliny i noradrenaliny) oraz prekursora dopaminy – L-DOPA.

W niniejszym opracowaniu omówiona zostanie etiologia trzech schorzeń neurodegeneracyjnych – choroby Alzheimer, Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). Szczególna uwaga zostanie poświęcona roli stresu oksydacyjnego w powstawaniu wyżej wymienionych chorób oraz możliwościom obniżenia jego poziomu za pomocą neuroprzekazników katecholaminowych, takich jak dopamina i jej prekursor, 3,4-dihydroksyfenyloalanina (L-DOPA), oraz adrenalina i noradrenalina (Ryc. 1). Katecholaminy mają strukturę pierścienia benzenowego z dwoma grupami hydroksylowymi położonymi względem siebie w pozycji *orto* (ugrupowanie katecholu) i bocznym łańcuchem etylowym zakończonym grupą aminową. Zaliczamy je więc do polifenoli (związków posiadających więcej niż jedną grupę hydroksylową przy pierścieniu benzenowym). Wiele związków z grupy polifenoli wykazuje właściwości antyoksydacyjne [3]. W niniejszym opracowaniu przytoczone zostaną wyniki doświadczeń świadczące o antyoksydacyjnej aktywności neuroprzekazników katecholaminowych.

#### AGREGACJA NIEPRAWIDŁOWO SFAŁDOWANYCH BIAŁEK JAKO PRZYCZYNA NEURODEGENERACJI

Choroby neurodegeneracyjne charakteryzują się postępującym zanikiem komórek nerwowych w określonych obszarach układu nerwowego. Jak dotąd nie został jednoznacznie określony mechanizm, według którego następuje śmierć komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych, choć wyniki wielu doświadczeń wskazują na apoptozę [4]. Śmierć neuronów prowadzi do przerwania przekazywania sygnału w synapsach i do powstania zakłóceń w funkcjonowaniu układu nerwowego [5,6]. Selektywnej degeneracji komórek nerwowych towarzyszy pojawienie się zmian patologicznych, będących wynikiem agregacji niewłaściwie sfałdowanych białek. W prawidłowo funkcjonującej komórce, proces fałdowania białek skutkuje stabilną strukturą przestrzenną polipeptydu, który uzyskuje w ten sposób pełną aktywność biologiczną. Fałdowanie białek może zachodzić spontanicznie lub przy udziale białek opiekuńczych, do których zaliczamy białka szoku cieplnego [7].

Nieprawidłowo sfałdowane białka mogą oddziaływać w sposób niepożądany ze składnikami komórki lub uczestniczyć w procesach niespecyficznej agregacji, z utworzeniem bezpostaciowych skupisk polipeptydów lub włókien odkła-

danych w tkance w postaci amyloidu. Złogi białkowe mogą powstawać w wyniku agregacji białek o pełnej długości łańcucha (np.  $\alpha$ -synukleiny w neuronach osób z chorobą Parkinsona [8] lub dysmutazy ponadtlenkowej w neuronach pacjentów dotkniętych ALS [9]), krótkich peptydów o określonej funkcji biologicznej jak np. będącej hormonem amyliny, lub fragmentów białek powstających na drodze specyficznej proteolizy (np. peptydu A $\beta$  odkładanego w neuronach osób cierpiących na chorobę Alzheimer [10]). Złogi białkowe mogą być efektem agregacji białek o prawidłowej lub zmienionej, w wyniku mutacji, sekwencji aminokwasowej. Mutacje te prowadzą do rozwoju rodzinnych postaci chorób neurodegeneracyjnych [7].

Pojawienie się niewłaściwie sfałdowanego białka powinno uruchomić mechanizmy obronne komórki – ekspresję genów białek szoku cieplnego lub włączenie szlaku ubikwitynozależnej proteolizy źle sfałdowanych białek. Białka szoku cieplnego należą do najstarszych ewolucyjnie systemów obronnych komórki. Zapobiegają agregacji nieprawidłowo sfałdowanych białek poprzez ich wiązanie i izolowanie od innych polipeptydów. Z kolei przyłączenie cząsteczek ubikwityny do nieprawidłowo sfałdowanego białka kieruje je do degradacji w proteasomie. Wydaje się, że zakłócenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem a degradacją nieprawidłowo sfałdowanych białek powoduje wzrost ich stężenia i agregację prowadzącą do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimer, Parkinsona i ALS [7].

#### POWSTAWANIE ZŁOGÓW BIAŁKOWYCH W CHOROBIE ALZHEIMERA

W przebiegu choroby Alzheimer następuje znaczne obniżenie sprawności umysłowej, w tym zakłócenie wyższych funkcji kory mózgowej takich jak: pamięć, orientacja, zdolność pojmowania i uczenia się oraz umiejętności językowe. W zaawansowanym stadium choroby zaburzeniom psychicznym towarzyszy zniechęcenie fizyczne. Bezpośrednią przyczyną zgonu jest najczęściej zapalenie płuc, zakażenie dróg moczowych lub posocznica [1,2].

W tkance nerwowej pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimer obserwuje się dwa typy zmian patologicznych: wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne oraz położone na zewnątrz neuronów płytki starcze. Obecność tych zmian patologicznych stwierdza się przede wszystkim w rejonach mózgu odpowiedzialnych za pamięć, uczenie się i emocje, czyli w korze śródwęchowej, hipokampie, przodomózgowiu i jądrze migdałowatym. W efekcie neurodegeneracji następuje zmniejszanie masy płatów skroniowych i czołowych. Szczególnie wrażliwe na degenerację są neurony cholinergiczne i glutaminergiczne (wykorzystujące jako neuroprzekazniki odpowiednio: acetylocholinę i glutaminian), choć obserwuje się również śmierć innych typów komórek nerwowych [5].

Sploty neurofibrylarne to nierozpuszczalne złogi białka *tau* oraz jego hiperfosforylowanej formy P-*tau* i tubuliny [11,12]. Występujące niemal wyłącznie w komórkach nerwowych białko *tau* należy do rodziny związanych z mikrotubulami i stabilizujących je białek określanymi jako MAPs

(ang. *Microtubule-Associated Proteins*). W chorobie Alzheimera następuje zwiększenie liczby reszt fosforanowych związanych z białkiem *tau*. Hiperfosforylowane białko *tau*, tak zwane *P-tau*, wykazuje silne powinowactwo do normalnie występującej formy *tau*, tworząc wraz z nią nierozpuszczalne agregaty; oddziałuje również z białkami MAP1 i MAP2. Oddziaływanie białka *P-tau* z białkami z rodziny MAPs (*tau*, MAP1 i MAP2) może prowadzić do stopniowego uwalniania tych białek z kompleksów z tubuliną (wchodzącą w skład mikrotubul), co powoduje postępujący rozkład tych struktur, obserwowany w chorobie Alzheimera [11]. W efekcie uszkodzenia mikrotubul zakłócony zostaje transport aksonalny, co powoduje stopniowe obumieranie neuronu. Towarzyszy temu utrata plastyczności synaps i zmiana kształtu komórek nerwowych [12].

Płytki starcze to zewnątrzkomórkowe złogi amyloidowe zbudowane głównie z peptydu A $\beta$ , który powstaje w procesie proteolizy prekursorowego białka  $\beta$ -amyloidu (APP, ang. *Amyloid Precursor Protein*). APP jest integralnym białkiem błonowym, które prawdopodobnie wpływa na funkcjonowanie komórek nerwowych poprzez regulowanie wzrostu aksonów, plastyczności synaps i adhezji komórkowej [5]. Białko APP jest produkowane w postaci wielu izoform o długości od 695 do 770 reszt aminokwasowych. Składa się z długiego fragmentu N-końcowego, eksponowanego na zewnątrz komórki, domeny transbłonowej, w której częściowo zawarta jest sekwencja peptydu A $\beta$ , i krótszego, cytoplazmatycznego odcinka C-końcowego. Następujące po sobie trawienia białka APP przez dwa enzymy proteolityczne –  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazę, uwalniają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej domenę sAPP $\beta$  i peptyd A $\beta$  (mający długość od 38 do 42 reszt aminokwasowych) zaś do cytoplazmy domenę AICD (ang. *APP Intracellular Domain*) [5].

W neuronach osób dotkniętych chorobą Alzheimera obserwuje się wzrost wytwarzania formy 42-aminokwasowej peptydu A $\beta$  (tzw. A $\beta$ 1-42), która ma większą skłonność do agregacji i jest jako pierwsza odkładana w postaci złogów amyloidowych [13,14]. Na kluczową rolę peptydu A $\beta$  w rozwoju choroby Alzheimera wskazuje analiza genetycznych uwarunkowań choroby. Wykazano, że mutacje prowadzące do rozwoju wczesnej postaci choroby Alzheimera (EOAD, ang. *Early-Onset Alzheimer Disease*)<sup>2</sup> występują w obrębie genu kodującego białko APP (wewnątrz lub w pobliżu fragmentu kodującego peptyd A $\beta$ ) lub w genach kodujących białka biorące udział w proteolizie APP (preseniliny-1 i preseniliny-2, które wchodzi w skład kompleksu enzymatycznego  $\gamma$ -sekreazy). Mutacje te prowadzą do zwiększonego wytwarzania peptydu A $\beta$  lub wzrostu stosunku stężeń A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40, co wpływa na przyspieszenie agregacji peptydu [13,14]. EOAD może być również efektem duplikacji genu kodującego APP [14,15]. Ponieważ jest on zlokalizowany na chromosomie 21, powstawanie złogów amyloidowych stwierdza się u osób z zespołem Downa, czyli trisomią tego chromosomu [14]. Należy podkreślić, że peptyd A $\beta$  występuje naturalnie w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym osób zdrowych, nie wywołując neurode-

generacji. Wydaje się więc, że dopiero formy oligomeryczne i agregaty peptydu są szkodliwe [14]. Początkowo uważano, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój choroby Alzheimera są włókna amyloidowe, wchodzące w skład płytek starczych. Doprowadziło to do sformułowania tzw. hipotezy amyloidowej rozwoju choroby [16]. Okazało się jednak, że stopień zaawansowania choroby lepiej koreluje ze stężeniem rozpuszczalnych form A $\beta$ , w tym krótkich oligomerów – dimerów i trimerów peptydu A $\beta$  [15,16]. Niewątpliwą przyczyną choroby Alzheimera jest więc zakłócenie równowagi między wytwarzaniem a degradacją i usuwaniem z mózgu peptydu A $\beta$ .

## ETIOLOGIA CHOROBY PARKINSONA

Choroba Parkinsona jest drugim po chorobie Alzheimera najbardziej rozpowszechnionym schorzeniem neurodegeneracyjnym, które dotyka około 1% populacji powyżej 60 roku życia. Kliniczne objawy tej choroby obejmują spowolnienie i niezborność ruchów (bradykinezę), utrudnioną inicjację ruchu (akinezę), spoczynkowe drżenie mięśni oraz niestabilność postawy [17,18].

Na poziomie komórkowym, choroba Parkinsona charakteryzuje się postępującą degeneracją neuronów dopaminergicznych (syntezujących dopaminę). Dopamina jest neuroprzekaznikiem katecholoaminowym, który pośredniczy w przekazywaniu impulsu nerwowego między komórkami poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami w błonie neuronów (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>). W zależności od miejsca wytwarzania w układzie nerwowym, dopamina bierze udział w kontrolowaniu funkcji motorycznych i inicjacji ruchu (układ pozapiramidowy), procesach emocjonalnych (układ limbiczny) oraz stymulowaniu uwalniania hormonów (podwzgórze). Efektywne przekazywanie sygnałów nerwowych wymaga precyzyjnej regulacji stężenia dopaminy, której nadmiar w przestrzeni synaptycznej jest rozkładany do biologicznie nieaktywnego kwasu homowanilinowego w dwuetapowym procesie katalizowanym przez oksydazę monoaminową (MAO, ang. *Monoamine Oxidase*) i metylotransferazę katecholową (COMT, ang. *Catechol-O-Methyl Transferase*) [19].

Najbardziej typowym objawem choroby Parkinsona jest obniżona koordynacja ruchów oraz pojawienie się ruchów mimowolnych, w tym drżenia. Jest to spowodowane postępującym uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych, zlokalizowanych w części zbitej istoty czarnej (łac. *substantia nigra*) śródmózgowia. Charakterystyczny zespół objawów klinicznych pojawia się, gdy degeneracja istoty czarnej (a tym samym obniżenie zawartości dopaminy) osiągnie około 60% [18].

Komórki nerwowe istoty czarnej gromadzą w swoim wnętrzu ciemny barwnik – neuromelaninę, będącą polimerem składającym się z produktów utleniania dopaminy. W złogach neuromelaniny zgromadzone są duże ilości jonów metali przejściowych, przede wszystkim żelaza [17,18]. Uszkodzeniu neuronów dopaminergicznych towarzyszy pojawienie się zewnątrzkomórkowych złogów białkowych, ciał inkluzyjnych Lewy'ego, składających się m. in. z włókien nieprawidłowo sfałdowanej  $\alpha$ -synukleiny oraz

<sup>2</sup>Pierwsze symptomy EOAD pojawiają się u pacjentów jeszcze przed ukończeniem 65 roku życia. Ta postać choroby dotyka zaledwie 2% chorych. W większości przypadków jej przyczyną są zmiany o podłożu genetycznym.

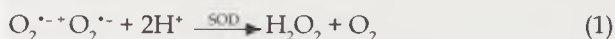
cząstek ubikwityny [8] i parkiny, która jest jednym z elementów ligazy ubikwitynowej [20]. Obecność ubikwityny i parkiny w ciałach Lewy'ego może świadczyć o obniżeniu skuteczności szlaku ubikwitynozależnej proteolizy niewłaściwie sfaldowanych białek, w tym  $\alpha$ -synukleiny.

Kluczową rolę w powstawaniu choroby Parkinsona odgrywa  $\alpha$ -synukleina, która w zdrowych komórkach reguluje równowagę między dopaminą zlokalizowaną w pęcherzykach synaptycznych i dopaminą obecną w cytoplazmie. W prawidłowo funkcjonującym neuronie około 75% dopaminy powinno znajdować się w pęcherzykach. W konsekwencji agregacji  $\alpha$ -synukleiny rośnie stężenie dopaminy w cytoplazmie. Zarówno autooksydacja dopaminy, jak i jej oddziaływanie z jonami metali przejściowych może prowadzić do stresu oksydacyjnego w komórkach nerwowych, obserwowanego w przebiegu choroby Parkinsona [17,18].

#### AGREGACJA DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ W STWARDNIENIU ZANIKOWYM BOCZNYM

Degenerację komórek nerwowych skorelowaną z obecnością złogów nieprawidłowo sfaldowanej cytoplazmatycznej dysmutazy nadtlenkowej (CuZnSOD) stwierdza się w przebiegu stwardnienia zanikowego bocznego. Schorzenie to, znane też jako choroba Lou Gehriga, charakteryzuje się postępującą degeneracją obwodowych i ośrodkowych neuronów motorycznych (rogów przednich rdzenia kręgowego, jąder nerwów czaszkowych rdzenia przedłużonego oraz neuronów drogi piramidowej). Degeneracja neuronów motorycznych prowadzi do zaniku kolejnych partii mięśni, mimowolnych drżeń i objawów spastycznych. W końcowym stadium choroba powoduje całkowity paraliż i śmierć, przeważnie na skutek zatrzymania pracy mięśni oddechowych [21].

Postępujące uszkodzenie komórek nerwowych jest skorelowane z wewnątrzkomórkową akumulacją źle sfaldowanej CuZnSOD. Jest to białko enzymatyczne, które katalizuje reakcję dysproporcjonowania anionorodnika nadtlenkowego (będącego reaktywną formą tlenu) według równania [9,22]:



Nieprawidłowe fałdowanie i agregacja CuZnSOD obniża stężenie aktywnej formy tego enzymu w cytoplazmie, co powoduje osłabienie możliwości obronnych organizmu w walce ze stresem oksydacyjnym [9]. Wykryto około 100 różnych mutacji zlokalizowanych w genie białka CuZnSOD, prowadzących do rozwoju rodzinnych postaci ALS (stanowiących około 20% wszystkich przypadków tej choroby). Mutacje te są przyczyną zaburzeń w kontrolowaniu poziomu stresu oksydacyjnego przez komórkę nerwową, mogą również prowadzić do powstania form białka o właściwościach prooksydacyjnych [23].

#### ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO W PRZEBIEGU CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Spośród omówionych powyżej chorób jedynie w ALS występuje wyraźny związek między etiologią choroby i

dysregulacją białek zaangażowanych w obniżenie poziomu stresu oksydacyjnego (CuZnSOD). Wskazuje to na bezpośredni wpływ stresu oksydacyjnego na progresję ALS. Stres oksydacyjny polega na niekontrolowanym wzroście stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) i zainicjowaniu kaskady niespecyficznych reakcji rodnikowych z biocząsteczkami obecnymi w komórce. W reakcjach tych uczestniczą lipidy i białka błonowe, białka enzymatyczne, węglowodany oraz kwasy nukleinowe. Zmiany w strukturze i aktywności tych biocząsteczek mogą prowadzić do zakłóceń w funkcjonowaniu komórki, a nawet jej śmierci [24], dlatego już na poziomie molekularnym następuje neutralizowanie RFT, wychwytywanie rodnikowych produktów pośrednich generowanych w procesach utleniania oraz naprawa uszkodzeń będących skutkiem stresu oksydacyjnego [25].

Reaktywne formy tlenu mogą być rozkładane na drodze reakcji enzymatycznych. Możliwa jest też ich neutralizacja przez małowcząsteczkowe antyoksydanty, czyli związki, które powodują zahamowanie procesu utleniania nawet wtedy, gdy ich stężenie jest niskie w porównaniu ze stężeniem substancji utlenianej. Antyoksydanty mogą reagować z czynnikami inicjującymi proces utleniania (w ten sposób działają antyoksydanty prewentywne) lub mogą wychwytywać i neutralizować pośrednie produkty oksydacji (antyoksydanty interwentywne) [25]. Wszystkie substancje przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu współdziałają ze sobą tworząc łańcuch układów redukująco-utleniających i brak nawet jednego ze związków o właściwościach antyoksydacyjnych może być przyczyną zaburzenia homeostazy organizmu. Należy jednak odróżnić pierwotne przyczyny stresu oksydacyjnego od stresu wywołanego brakiem działania (lub wyczerpaniem się) antyoksydanta. W przebiegu ALS następuje zmniejszenie ilości aktywnej formy enzymu antyoksydacyjnego (CuZnSOD), co jest wtórną przyczyną stresu oksydacyjnego, obserwowanego w tej chorobie [21,23]. Wydaje się więc, że agregacja CuZnSOD nie jest jedynym czynnikiem prowadzącym do zwiększenia poziomu stresu oksydacyjnego towarzyszącego ALS.

W przebiegu innych schorzeń neurodegeneracyjnych też stwierdza się znaczny wzrost poziomu stresu oksydacyjnego [26]. Świadczy o tym między innymi podwyższone stężenie końcowych produktów utleniania lipidów (dialdehydu malonowego i 4-hydroksy-2-nonenalu) w tkance nerwowej pobranej od pacjentów cierpiących zarówno na ALS jak również na chorobę Alzheimera lub chorobę Parkinsona [26]. Wzrostowi poziomu stresu oksydacyjnego w dwóch ostatnich chorobach nie towarzyszy jednak inaktywacja enzymów odpowiedzialnych za neutralizowanie reaktywnych form tlenu. W neuronach pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera, w odpowiedzi na rosnące stężenie RFT, obserwuje się wręcz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych [26]. Słuszne wydaje się w tej sytuacji poszukiwanie pierwotnej przyczyny tłumaczącej wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w omawianych schorzeniach neurodegeneracyjnych, czyli zarówno w ALS jak i w chorobie Alzheimera i Parkinsona.

#### PRZYCZYNY WZROSTU POZIOMU STRESU OKSYDACYJNEGO W OBSZARACH NEURODEGENERACJI

Tkanka nerwowa jest szczególnie narażona na uszkodzenia będące efektem stresu oksydacyjnego. Pośrednio wyni-

ka to z olbrzymiego zapotrzebowania układu nerwowego na tlen. Mózg, który stanowi zaledwie 2% masy ciała dorosłego człowieka, zużywa około 20% tlenu pobranego przez organizm [27]. Intensywny metabolizm tlenowy skutkuje zwiększoną produkcją RFT powstających jako produkty uboczne oddychania komórkowego<sup>3</sup> [28]. Błony komórkowe neuronów są szczególnie bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, co czyni je wyjątkowo podatnymi na oksydację. Dodatkowo, tkanka nerwowa w ośrodkowym układzie nerwowym wykazuje słabe właściwości regeneracyjne, co utrudnia jej odbudowę i prawidłowe funkcjonowanie po uszkodzeniach wywołanych przez RFT [26]. Mimo nieustannej ekspozycji na stres oksydacyjny, tkanka nerwowa nie wykształciła skutecznych mechanizmów minimalizowania jego skutków, w układzie nerwowym nie stwierdza się bowiem podwyższonego stężenia naturalnych antyoksydantów, które mogłyby kompensować wysoki poziom RFT [27].

Kluczowych informacji na temat przyczyn podwyższonego stresu oksydacyjnego w tkance nerwowej pacjentów dotkniętych przez omawiane choroby neurodegeneracyjne (chorobę Alzheimera, Parkinsona i ALS) dostarczyła dokładna analiza złożeń białkowych obecnych w tkance nerwowej chorych. U pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera zaobserwowano podwyższone stężenie jonów miedzi, żelaza i cynku w chorobowo zmienionych obszarach mózgu [29]. Stwierdzono również zwiększone stężenie jonów żelaza w części zbitą istoty czarnej u pacjentów dotkniętych chorobą Parkinsona [30].

Jony miedzi i żelaza mogą szybko zmieniać stopień utlenienia ( $\text{Cu}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ ). Procesy te są pożądane w przypadku działania grup prostetycznych w licznych enzymach, jednak poza enzymami mogą być przyczyną wytwarzania reaktywnych rodników hydroksylowych na drodze reakcji Fentona:



Utloniony jon metalu może być regenerowany w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym:



Istnienie dwóch sprzężonych reakcji, w których jony metali są utleniane a następnie redukowane (regenerowane), umożliwia zachodzenie reakcji Fentona nawet w obecności bardzo niskich stężeń jonów metali [24].

Ze względu na wysoki potencjał utleniania ( $E_{\text{OH}^{\cdot}/\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}} = 2,31\text{V}$  [31]), powstający rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywnym rodnikiem obecnym w komórkach. Ponadto, substratem reakcji Fentona jest nadtlenek wodoru, cząsteczka stosunkowo mało reaktywna, ale zdolna do przenikania przez błony komórkowe na drodze dyfuzji oraz w efekcie transportu przez kanały w błonie utworzone przez

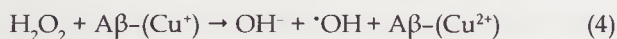
<sup>3</sup>W efekcie „wycieku mitochondrialnego”, czyli uwalniania z łańcucha oddechowego nie w pełni zredukowanych cząsteczek tlenu, każdego dnia do cytoplazmy dostaje się około  $2 \times 10^{10}$  reaktywnych form tlenu, w tym: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i nadtlenek wodoru (przybliżone obliczenia dla pojedynczej komórki sznurzej) [28]

akwaporyny [32]. Charakter związków biorących udział w reakcji Fentona, a więc duża reaktywność rodnika hydroksylowego oraz zdolność nadtlenu wodoru do swobodnego rozprzestrzeniania się w organizmie powodują, że reakcja ta jest uważana za główną przyczynę stresu oksydacyjnego obserwowanego w układach biologicznych [24].

### ODDZIAŁYWANIE BIAŁEK Z JONAMI METALI ZWIĘKSZA WYTWARZANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU

Szczególnie intensywny przebieg reakcji Fentona w obszarach mózgu objętych neurodegeneracją jest prawdopodobnie efektem niespecyficznego wiązania jonów metali przejściowych przez nieprawidłowo sfałdowane białka (peptyd A $\beta$  w chorobie Alzheimera,  $\alpha$ -synukleinę w chorobie Parkinsona i CuZnSOD w ALS) [26]. Zidentyfikowanie domen odpowiedzialnych za wiązanie i aktywację jonów metali może pomóc w znalezieniu źródła cytotoksyczności wymienionych białek. Postuluje się istnienie dwóch typów miejsc wiązania jonów metali, pierwszy typ nazywany jest osłoniętym miejscem wiązania a drugi miejscem wiązania o mniejszym powinowactwie. W zdrowej tkance, następuje wiązanie jonów metali w miejscach osłoniętych białka, co zmniejsza prawdopodobieństwo reakcji tych jonów z nadtlenkiem wodoru według mechanizmu Fentona. Wzrost stężenia jonów metali w obszarach objętych neurodegeneracją powoduje wiązanie tych jonów również przez fragmenty białka stanowiące miejsca wiązania o mniejszym powinowactwie. Wiązanie jonów metali w tych miejscach czyni te jony podatnymi na oddziaływanie z tlenem cząsteczkowym (z utworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego lub nadtlenu wodoru) oraz na udział w reakcji Fentona [26].

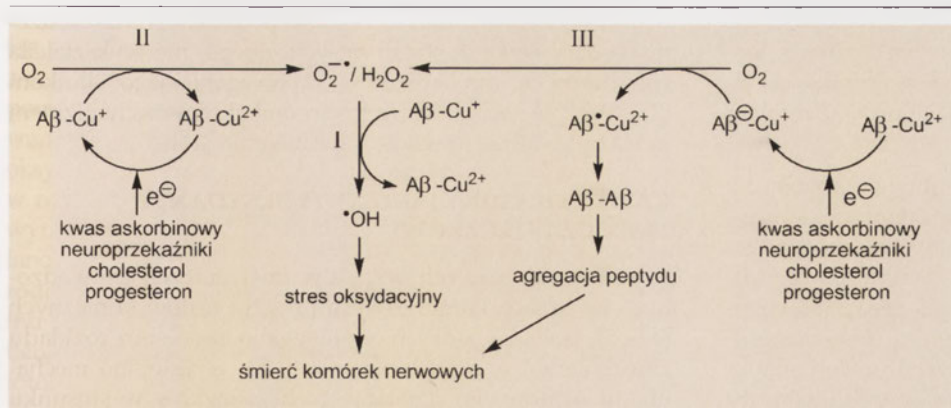
Wykazano, że zarówno w skład peptydu A $\beta$  jak i białka APP wchodzi domeny wiążące jony miedzi  $\text{Cu}^{2+}$ . Wiązanie jonu metalu przez peptyd ułatwia redukcję tego jonu [29,33]. Donorem elektronów są związki organiczne takie jak: kwas askorbinowy, cholesterol czy progesteron. W komórkach nerwowych rolę tę mogą pełnić także neuroprzekazniki takie jak dopamina, L-DOPA, adrenalina, noradrenalina i serotonina [34]. Kompleksy jonów miedzi  $\text{Cu}^+$  z peptydem A $\beta$  mogą reagować z nadtlenkiem wodoru w reakcji Fentona (reakcja I na rycinie 2):



Rodnik hydroksylowy może też powstawać wskutek oddziaływania kationów żelaza z peptydem A $\beta$  [29]. Jon  $\text{Cu}^+$  związany z peptydem A $\beta$  może również redukować tlen cząsteczkowy do anionu ponadtlenkowego  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (reakcja II na rycinie 2) [26].

Rezultaty badań spektroskopowych struktury kompleksu peptydu A $\beta$  z jonami miedzi wskazują, że za wiązanie jonów miedzi przez peptyd A $\beta$  odpowiadają reszty aminokwasowe Tyr<sup>10</sup>, His<sup>6</sup>, His<sup>13</sup> i His<sup>14</sup> [35]. Wydaje się również, że występujące na C-końcu peptydu silnie hydrofobowe reszty aminokwasowe Ile<sup>41</sup> i Ala<sup>42</sup> powodują zwiększone powinowactwo A $\beta$ 1-42 do jonów miedzi, ponieważ ułatwiają one peptydowi przyjęcie optymalnej konformacji dla wiązania jonów tego metalu. W efekcie, forma 42-amino-





Rycina 2. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w efekcie oddziaływania jonów miedzi z peptydem  $A\beta$ . I. Wytwarzane rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona z udziałem kompleksów  $A\beta-Cu^+$ ; II. Redukcja tlenu cząsteczkowego do anionorodnika nadatlentkowego  $O_2^{\bullet -}$  w obecności  $A\beta-Cu^+$ ; III. Dwuelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do nadtlentku wodoru z wytworzeniem rodnika peptydu  $A\beta$  (kompleks  $A\beta^{\bullet -}-Cu^{2+}$ ). Stres oksydacyjny będący skutkiem nadmiernego wytwarzania RFT przez jony miedzi związane z peptydem  $A\beta$  może prowadzić do śmierci komórek w tkance nerwowej pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera. Jony metali mogą być również związane przez  $\alpha$ -synukleinę w chorobie Parkinsona i  $CuZnSOD$  w ALS. Rycinę wykonano w oparciu o [26,34,35].

kwasowa peptydu  $A\beta$  wykazuje większą cytotoxycyzość niż  $A\beta 1-40$  [36].

Kompleks  $A\beta-(Cu^{2+})$  może pośrodkniczy w przekazywaniu elektronów z czynnika redukującego (np. wymienionych powyżej związków organicznych) przekształcając cząsteczkę tlenu do nadtlentku wodoru (reakcja III na rycinie 2) [26,35]. Reakcja zachodzi w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, ale powstały nadtlentek wodoru może dyfundować przez błonę komórkową do wnętrza komórki [32]. Zgodnie z zaproponowanym przez Barnhama i Haeffnera mechanizmem, elektron ze związku organicznego (kwasu askorbinowego) jest przenoszony za pośrednictwem reszty tyrozynowej peptydu  $A\beta$  ( $Tyr^{10}$ ) kolejno na  $Cu^{2+}$  i cząsteczkę tlenu, co prowadzi do utworzenia anionorodnika nadatlentkowego. Następnie, w efekcie jednoczesnego przeniesienia protonu z  $H_3O^+$  i atomu wodoru z tyrozyny w pozycji 10 na anionorodnik nadatlentkowy, powstają  $H_2O_2$ ,  $H_2O$  i rodnik tyrozylowy [35]. Reakcja między dwoma rodnikami tyrozylowymi może prowadzić do utworzenia dimeru peptydu  $A\beta$ , połączonego wiązaniem kowalencyjnym. Wiązanie to jest odporne na proteolizę i może stabilizować formy oligomeryczne peptydu, jak również złoży amyloidowe, obecne w tkance nerwowej pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera [37].

Podobnie jak peptyd  $A\beta$ , cząsteczka  $\alpha$ -synukleiny posiada miejsca wiązania jonów metali o niskim powinowactwie. Jony metali związane przez cząsteczkę  $\alpha$ -synukleiny intensywnie uczestniczą w reakcji Fentona, a w obecności jonów miedzi i żelaza obserwuje się zwiększoną agregację tego białka. Ponieważ  $\alpha$ -synukleina wpływa na proces gromadzenia dopaminy w pęcherzykach transportujących, inaktywacja tego białka na drodze agregacji może prowadzić do wzrostu stężenia dopaminy w cytoplazmie [26]. Równoczesny wzrost stężenia jonów metali i dopaminy w neuronach istoty czarnej, charakterystyczny dla choroby Parkinsona, prowadzi do intensywnego tworzenia kompleksów tego neuroprzekaźnika i jonów metali. Dopamina związana z jodem metalu przejściowego ma właściwości prooksydacyjne. Przeniesienie elektronu z dopaminy na jon

metaluminium umożliwia jego regenerację, niezbędną do zajścia kolejnego cyklu reakcji Fentona [26].

Podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, którego przyczyną jest wiązanie jonów metali przez nieprawidłowo sfałdowaną dysmutazę nadatlentkową stwierdzono również w przebiegu stwardnienia zanikowego bocznego [38]. Mutacje w genie  $CuZnSOD$  prowadzące do rozwoju rodzinnej postaci ALS mogą powodować wiązanie jonów miedzi w miejscach pierwotnie przeznaczonych do wiązania jonów cynku [26]. Wydaje się, że białka, których nieprawidłowe fałdowanie leży u podłoża chorób neurodegeneracyjnych (peptyd  $A\beta$ ,  $\alpha$ -synukleina i  $CuZnSOD$ ) mogą niespecyficznie wiązać jony metali

i w ten sposób zwiększać intensywność reakcji Fentona, jak również katalizować redukcję tlenu do anionorodnika nadatlentkowego lub nadtlentku wodoru. W efekcie następuje wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w tkance nerwowej, który może prowadzić do uszkodzenia a nawet śmierci neuronów (Ryc. 2) [26].

#### OCHRONNY POTENCJAŁ NEUROPRZEKAŹNIKÓW KATECHOLAMINOWYCH

Konsekwencją śmierci komórek nerwowych w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych jest lokalny spadek stężenia neuroprzekaźników katecholaminowych, które są normalnie uwalniane w synapsach. Prowadzi to do dramatycznego obniżenia efektywności przekazywania impulsów nerwowych. Zmniejszenie stężenia katecholamin może również skutkować przyspieszeniem procesów neurodegeneracyjnych. Wyniki doświadczeń mających na celu określenie wpływu neuroprzekaźników katecholaminowych na różne typy komórek nerwowych, wskazują na antyoksydacyjne działanie tych związków. Wykazano, że noradrenalina, dopamina i jej prekursor – L-DOPA (w stężeniach  $< 10 \mu M$ ), zwiększają przeżywalność hodowanych *in vitro* neuronów dopaminergicznych, które wyizolowano ze śródmózgowia szczura. Wymienione neuroprzekaźniki zmniejszają stężenie RFT w tych komórkach nerwowych [39]. Zaobserwowano, że podobny efekt można osiągnąć stosując kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromanolo-2-karboksylowy (Trolox, rozpuszczalny w wodzie analog  $\alpha$ -tokoferolu), którego działanie polega przede wszystkim na zapobieganiu peroksydacji lipidów. Prawdopodobnie, katecholaminy również zapobiegają utlenianiu lipidów wchodzących w skład błon komórkowych neuronów [39]. Tezę tę potwierdzają wyniki doświadczeń, w których stwierdzono hamowanie procesu utleniania kwasu linolowego w obecności dopaminy i noradrenaliny [40]. Wykazano również, że noradrenalina i dopamina oraz kwas homowanilinowy i kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (produkty katabolizmu dopaminy katalizowanego przez MAO i COMT) obniżają poziom stresu oksydacyjnego w homogenacie uzyskanym

z mózgow szczeni [41]. Zatem aktywność antyoksydacyjna neuroprzekazników katecholaminowych ujawnia się zarówno w prostych układach modelowych (peroksydacja kwasu linolowego) jak i w doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych [39,41].

Neuroprzekazniki katecholaminowe mogą zapobiegać śmierci komórek nerwowych na drodze apoptozy. Wykazano, że wzrost przeżywalności neuronów śródmózgowia w obecności katecholamin (w stężeniu niższym niż 10  $\mu\text{M}$ ) może wynikać z zahamowania aktywności proapoptotycznej kaspazy-8 [39]. Potwierdzają to wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Iacovitti i współpracowników [42] z użyciem neuronów prądkowia myszy traktowanych niskimi stężeniami dopaminy, L-DOPA, adrenaliny lub noradrenaliny (5–20  $\mu\text{M}$  w przypadku dopaminy i 10  $\mu\text{M}$  dla pozostałych neuroprzekazników). Gęstość kultur neuronów prądkowia (które nie zawierają komórek glejowych), hodowanych w nieobecności katecholamin, systematycznie maleje. Prawdopodobnie komórki te obumierają na drodze apoptozy, o czym świadczy obecność skondensowanego i pofragmentowanego DNA. W obecności katecholamin proces ten jest zahamowany [42].

Wstępne wyniki testów klinicznych sugerują, że zwiększenie poziomu katecholamin w mózgu poprzez zahamowanie procesów ich degradacji może opóźnić rozwój chorób neurodegeneracyjnych. Terapeutyczny efekt zaobserwowano u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera [43–45] lub chorobę Parkinsona [46], którzy otrzymywali L-deprenyl (inaczej selegilinę), selektywny inhibitor MAO. Podawanie L-deprenylu powoduje wzrost stężenia neuroprzekazników katecholaminowych w tkance nerwowej. W efekcie terapii L-deprenylem u osób cierpiących na chorobę Alzheimera zaobserwowano zmniejszenie zaburzeń procesów poznawczych [44], opóźnienie momentu, w którym pojawiają się problemy z wykonywaniem codziennych czynności oraz wzrost przeżywalności chorych [43,45]. Z kolei u pacjentów dotkniętych chorobą Parkinsona odroczone zostaje moment, w którym niezbędne jest podanie L-DOPA [46]. L-DOPA jest prekursorem dopaminy, który w przeciwieństwie do dopaminy może być wchłaniany z krwi do mózgu (czyli przechodzi przez barierę krew-mózg). Doustne podawanie L-DOPA jest najpopularniejszą terapią choroby Parkinsona, stosowaną od końca lat 60. Substancja ta jest podawana wraz z karbidopą (zapobiegającą rozkładowi L-DOPA w tkankach obwodowych) w leczeniu symptomatycznym zaawansowanej choroby Parkinsona, która charakteryzuje się dramatycznym obniżeniem poziomu dopaminy w tkance nerwowej. Ze względu na liczne objawy uboczne towarzyszące długotrwałej terapii z zastosowaniem L-DOPA (w tym dramatyczne pogorszenie się sprawności motorycznej pacjentów), celowe jest jak najdłuższe odroczenie momentu, w którym niezbędne jest podanie tej substancji [46].

Wyniki cytowanych powyżej badań wskazują na ochronne (prawdopodobnie antyoksydacyjne) właściwości katecholamin. Zgodnie z hipotezą Liu i Mori katecholaminy i produkty ich degradacji obecne w tkance nerwowej mogą nawet stanowić wewnętrzny system ochronny mózgu przeciwko stresowi oksydacyjnemu [41]. Jak już wspomniano wcześniej,

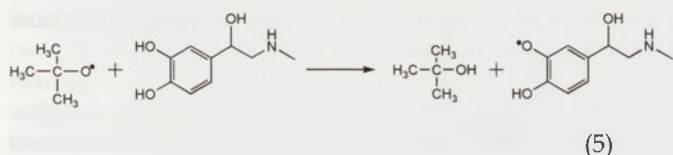
tkanka nerwowa, mimo szczególnej podatności na uszkodzenia będące efektem stresu oksydacyjnego, nie wykształciła specyficznych mechanizmów zapobiegania jego skutkom [27]. Wydaje się jednak, że takim unikalnym mechanizmem może być właśnie obecność katecholamin [41].

## KATECHOLAMINY JAKO ANTYOKSYDANTY MAŁOCZĄSTECZKOWE

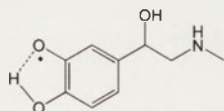
Mimo obiecujących wyników doświadczeń prowadzonych na liniach komórkowych [39,42] i testów klinicznych [43–45], podczas których zapobiegano procesom rozkładu katecholamin w tkance nerwowej, nie wyjaśniono mechanizmu ochronnego działania tych związków w stosunku do komórek nerwowych. Prawdopodobnie działają one jak małowcząsteczkowe antyoksydanty interwentywne, bezpośrednio reagujące z wolnymi rodnikami. Weryfikacja doniesień o neutralizowaniu wolnych rodników przez katecholaminy wymaga jednak przeprowadzenia doświadczeń wykorzystujących układy modelowe, takie jak np. homogeniczne lub heterogeniczne roztwory (w tym emulsje lipidowe, będące najprostszym modelem błony komórkowej). Badania takie umożliwią monitorowanie kinetyki reakcji katecholamin z rodnikami i potwierdzą bezpośrednie oddziaływanie między tymi indywidualnymi chemicznymi. Z tej perspektywy, niezwykle interesujące są wyniki opublikowane w 2001 roku przez Sofica i współpracowników [47], którzy zbadali oddziaływanie między neuroprzekaznikami katecholaminowymi (dopaminą, L-DOPA, adrenaliną i noradrenaliną) oraz rodnikami nadtlenkowymi i hydroksyloowymi. Doświadczenia, w których wykorzystano te dwa rodzaje rodników są szczególnie istotne dla zrozumienia procesów zachodzących w komórkach nerwowych.

Rodniki nadtlenkowe ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) powstają w efekcie reakcji łańcuchowych, w których biorą udział cząsteczki lipidów – biomolekuł szczególnie podatnych na utlenianie pod wpływem RFT [50]. Mechanizm rodnikowej peroksydacji został już opisany w jednym z artykułów zawartych w tym zeszycie *Postępów Biochemii* [48]. Ze względu na dużą podatność lipidów na utlenianie, obecność końcowych produktów ich utleniania jest dogodnym markerem stresu oksydacyjnego. Postępowi chorób neurodegeneracyjnych towarzyszy wzrost stężenia produktów utleniania lipidów w tkance nerwowej pacjentów [26]. Niekontrolowane utlenianie lipidów błonowych może prowadzić do uszkodzenia integralności błon komórkowych i, ostatecznie, do śmierci komórki. Ochronne działanie katecholamin w stosunku do neuronów może polegać przede wszystkim na neutralizowaniu rodników hydroksylowych i nadtlenkowych, co jest zgodne z przewidywaniami Troadeca i współpracowników [39]. Tezę tę potwierdziły wyniki doświadczeń Sofica i wsp. dowodzące, że katecholaminy są bardziej efektywne w uniemożliwianiu rodników  $\text{LOO}^{\bullet}$  niż glutation i Trolox. Natomiast w reakcji z rodnikami hydroksyloowymi katecholaminy wykazują większą aktywność niż glutation, ale mniejszą niż Trolox. Sofic i współpracownicy zwrócili również uwagę na prooksydacyjne działanie katecholamin w obecności  $\text{Cu}^{2+}$  (ale bez nadtlenu wodoru). Prawdopodobnie katecholaminy wiążą jony  $\text{Cu}^{2+}$  tworząc kompleksy bardzo podatne na reakcje utleniania i redukcji [47]. W tej samej pracy monitorowano przebieg reakcji katecholamin z rodnikami  $^{\bullet}\text{OH}$  i  $\text{LOO}^{\bullet}$  pośrednio, w oparciu o zanik intensywno-

ności fluorescencji  $\beta$ -fikoerytryny. Taka metoda pomiaru nie jest jednak dowodem na bezpośrednią reakcję katecholamin z neutralizowanymi rodnikami. Więcej informacji dostarczają pomiary spadku stężenia modelowego rodnika wychwytywanego przez związek o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych, lub pojawianie się sygnału od powstającego w reakcji rodnika antyoksydanta. Szczególnie interesujące są wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Cosa i Sciano, w których monitorowano stopniowy przyrost stężenia rodnika semichinonu powstającego w efekcie oderwania atomu wodoru od katecholaminy [49]. W badaniach użyto nadtlenu di-*tert*-butylu ( $t\text{-BuO}_2$ ), który poddawany był laserowej fotolizie do rodników *t*-butoksylowych ( $t\text{-BuO}^\bullet$ ). Wykazano, że rodniki te mogą być bezpośrednio neutralizowane przez adrenalinę ( $\text{Adr-OH}$ ) w wyniku oderwania atomu wodoru z utworzeniem rodnika semichinonu ( $\text{Adr-O}^\bullet$ ):



W przedstawionej reakcji atom wodoru jest odrywany od grupy hydroksylowej w cząsteczce katecholaminy, co jest zgodne z wnioskami wynikającymi z doświadczeń przeprowadzonych przez Sofica [47] oraz z przewidywaniami termodynamicznymi [50,51]. Dla antyoksydacyjnych właściwości katecholamin kluczowe znaczenie ma ugrupowanie katecholowe (zawierające dwie wolne grupy hydroksylowe położone w pozycji *orto*- w pierścieniu benzenowym). Zablokowanie nawet jednej grupy hydroksylowej (poprzez metylowanie) powoduje znaczny spadek aktywności antyoksydacyjnej [47]. Wniosek ten jest zgodny z wynikami testów prowadzonych przez Troadeca i współpracowników na liniach komórkowych: silne działanie antyoksydacyjne wykazują tylko te związki, które zawierają ugrupowanie katecholowe [39]. Prekursory i metabolity katecholamin nie posiadające dwóch wolnych grup hydroksylowych przy pierścieniu benzenowym nie wykazują takich właściwości. Ugrupowanie katecholowe jest kluczowe dla antyoksydacyjnego działania katecholamin, ponieważ trwałość rodnika fenoksyloвого będącego pochodną katecholu jest większa niż rodnika powstałego w efekcie oderwania atomu wodoru od fenolu, który zawiera pojedynczą grupę hydroksylową. Rodnik fenoksyloowy powstały z katecholu jest bowiem stabilizowany przez wiązanie wodorowe utworzone pomiędzy tlenem (posiadającym jeden niesparowany elektron) i wodorem z drugiej grupy hydroksylowej [51,52]. Poniżej przedstawiono strukturę rodnika fenoksyloвого powstałego z cząsteczki adrenaliny ( $\text{Adr-O}^\bullet$ ):



#### MECHANIZM NEUTRALIZACJI WOLNYCH RODNIKÓW PRZEZ KATECHOLAMINY

Katecholaminy, z racji posiadania grup hydroksylowych połączonych z pierścieniem benzenowym, zaliczane są do

fenoli. Wiele związków fenolowych (np.  $\alpha$ -tokoferol chroniący błony komórkowe przed utlenianiem lub zawarta w przyprawie *curry* kurkumina) wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne. Związki te, nazywane antyoksydantami fenolowymi, neutralizują wolne rodniki poprzez przekazanie im atomu wodoru, który jest odrywany od reszty hydroksylowej (fenolowej).

Przeniesienie atomu wodoru z antyoksydanta fenolowego ( $\text{PhOH}$ ) na cząsteczkę neutralizowanego rodnika może zachodzić co najmniej według trzech różnych mechanizmów: HAT, PCET [53] i SPLET [54-56], które zostały opisane bardziej szczegółowo w artykule Kowalewskiej i Litwinienko, zawartym w tym numerze *Postępów Biochemii* [48].

Zazwyczaj kinetyka reakcji antyoksydanta fenolowego z rodnikiem jest wypadkowym efektem mechanizmów HAT i SPLET. O tym, który mechanizm będzie kinetycznie bardziej istotny (czyli będzie dominował) decydują warunki reakcji takie jak polarność i odczyn środowiska, rodzaj rodników i ich elektrofilowość, oraz kwasowość grupy fenolowej antyoksydanta. Podstawową różnicą między mechanizmami HAT i SPLET jest znaczna różnica w ich szybkościach. W rozpuszczalnikach polarnych takich jak etanol, metanol czy acetonitryl i w wysokich wartościach pH stwierdza się przewagę szybkiego mechanizmu SPLET. W zależności od kwasowości środowiska, antyoksydanty fenolowe takie jak  $\alpha$ -tokoferol, kurkumina, czy niektóre flawonoidy (w tym kwercetyna) reagują według mieszanego mechanizmu, HAT i SPLET [3,54-56].

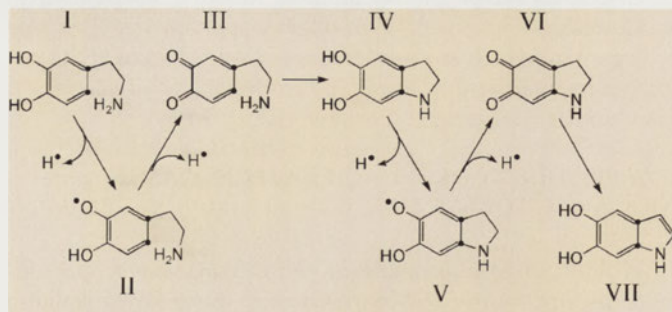
Dotychczas nie został określony mechanizm, według którego następuje przekazanie atomu wodoru lub elektronu z neuroprzekaźnika katecholaminowego na cząsteczkę neutralizowanego rodnika. Kawashima i współpracownicy badając aktywność antyoksydacyjną katecholamin w acetonitrylu założyli, że reakcja przebiega tylko według mechanizmu HAT [57]. Autorzy nie wzięli jednak pod uwagę obecności anionów fenolanowych ( $\text{PhO}^-$ ) w układzie reakcyjnym, więc przedstawione w ich pracy wyniki są niewystarczające do wyciągnięcia wniosków na temat mechanizmu reakcji. Wyniki doświadczeń w układach homogenicznych powinny być bardzo ostrożnie interpretowane, gdyż nie odzwierciedlają specyfiki procesów zachodzących w wielofazowych układach naturalnych, w których procesom oksydacji w pierwszej kolejności ulegają lipidy wchodzące w skład błon komórkowych. Procesy rodnikowe zachodzące na granicy faz pomiędzy błoną lipidową a otaczającą ją środowiskiem hydrofilowym odgrywają najważniejszą rolę w organizmie i ich zrozumienie może być kluczowe dla poznania mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy ALS.

#### CZY PRODUKTY OKSYDACJI KATECHOLAMIN MOGĄ BYĆ TOKSYCZNE?

Wykazano, że katecholaminy neutralizują takie wolne rodniki, jak np. rodnik *tert*-butoksylovy, stosunkowo stabilny rodnik galwinoksylovy i bardzo reaktywny rodnik kumyloperoksylovy (kumyloperoksylovy). Procesy te zachodzą w wyniku przeniesienia na te rodniki elektronu lub atomu wodoru, oderwanego od cząsteczki katecholaminy [49,57].

Równocześnie, powstają rodniki fenoksyłowe, zwane w tym przypadku rodnikami semichinonowymi (np. semichinon adrenaliny  $\text{Adr-O}^{\bullet}$ , zob. równanie 5). Rodniki te mogą następnie ulegać reakcji dysproporcjonowania, prowadzącej do regeneracji katecholaminy i utworzenia cząsteczki chinonu [49]. Obecność semichinonów i chinonów została stwierdzona w tkance nerwowej, a ich powstawanie może być jednym z etapów oksydacyjnego metabolizmu neuroprzekazników katecholaminowych, którego przebieg jest wspólny dla wszystkich związków z tej grupy [49]. Proces ten zostanie omówiony na przykładzie utleniania dopaminy (Ryc. 3). W pierwszym etapie utleniania atom wodoru jest odrywany od ugrupowania katecholowego dopaminy (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diolu, struktura I na rycinie 3), co prowadzi do utworzenia rodnika aminosemichinonu (struktura II), z którego, w wyniku dalszego utleniania powstaje aminochinon (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-dion, struktura III) ulegający przegrupowaniu (cyklizacji) do leukoaminochromu (5,6-dihydroksyindolu, struktura IV). Oderwanie kolejnego atomu wodoru od leukoaminochromu prowadzi do powstania semichinonu leukoaminochromu (struktura V), który może ulec dalszemu utlenieniu do aminochromu (struktura VI) lub reakcji dysproporcjonowania z udziałem innego rodnika semichinonowego. Przegrupowanie związku VI prowadzi do powstania cząsteczki aminoleutyiny (2,3-dihydro-5,6-dihydroksyindolu, VII) [49,58].

Dwie spośród cząsteczek obecnych w szlaku utleniania katecholamin, leukoaminochrom i aminoleutyina, zasługują na szczególną uwagę ze względu na pewne podobieństwo ich struktury do struktury  $\alpha$ -tokoferolu (Ryc. 4).  $\alpha$ -tokoferol zawdzięcza swój silny potencjał antyoksydacyjny relatywnie dużej trwałości powstającego rodnika tokoferoksyłowego. Trwałość tego rodnika wynika ze sprzężenia orbitalu elektronowego z atomu tlenu pierścienia heterocyklicznego z niesparowanym elektronem powstałym w efekcie oderwania atomu wodoru z grupy fenolowej [59]. Leukoaminochrom i aminoleutyina także posiadają w cząsteczce pierścień heterocykliczny z azotem (mającym, podobnie jak tlen, wolną parę elektronów). Azot w pierścieniu heterocyklicznym leukoaminochromu i aminoleutyiny oraz tlen w pierścieniu  $\alpha$ -tokoferolu są położone w taki sam sposób w stosunku do aktywnej grupy fenolowej tych cząsteczek (położenie para). Taka struktura sugeruje, że omawiane pochodne dopaminy mogą wykazywać silną aktywność antyoksydacyjną, zbliżoną do aktywności  $\alpha$ -tokoferolu. Właściwości antyoksydacyjne aminoleutyiny zostały potwierdzone przez wyniki

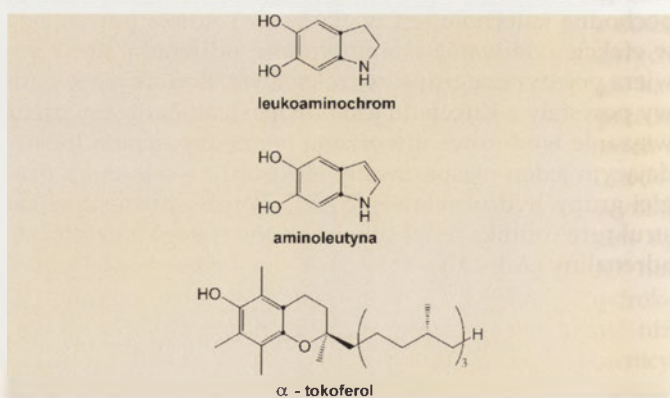


Rycina 3. Utlenianie dopaminy. I. dopamina (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diol); II. aminosemichinon; III. aminochinon (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-dion); IV. leukoaminochrom (5,6-dihydroksyindol); V. semichinon leukoaminochromu; VI. aminochrom; VII. aminoleutyina (2,3-dihydro-5,6-dihydroksyindol) [49,58].

doświadczeń z użyciem rodników t-butoksyłowych, które są neutralizowane przez aminoleutyinę znacznie szybciej niż przez adrenalinę [49].

Polimeryzacja aminoleutyiny powstałej w procesie utleniania dopaminy prowadzi do utworzenia złożeń neuromelaniny, nadającej charakterystyczne, ciemne zabarwienie neuronom wchodzącym w skład istoty czarnej śródmózgowia [58]. Komórki zawierające neuromelaninę są szczególnie podatne na degenerację w przebiegu choroby Parkinsona [60]. Substancja ta w obecności niskich stężeń jonów metali, takich jak  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , wykazuje właściwości antyoksydacyjne, jednak wraz ze wzrostem stężenia jonów tych metali staje się prooksydantem. Prawdopodobnie, złoże neuromelaniny mogą niespecyficznie wiązać jony metali przejściowych zwiększając szybkość reakcji Fentona. Wzrost stężenia jonów metali powoduje również ich wiązanie przez cząsteczki dopaminy, co z kolei przyspiesza utlenianie tego neuroprzekaznika i odkładanie wtórnych produktów jego oksydacji (chinonów i semichinonów) w tkance nerwowej [26].

Wydaje się, że gromadzenie produktów utleniania katecholamin w komórkach nerwowych może być przyczyną śmierci tych komórek, zachodzącej w obecności wysokich stężeń katecholamin. I tak, w obecności L-DOPA w stężeniu wyższym niż 100  $\mu\text{M}$ , następuje spadek gęstości hodowli szczurzych komórek śródmózgowia, przy czym obumierają przede wszystkim neurony dopaminergiczne [61,62]. Na szczególną szkodliwość rodników semichinonowych wskazują doświadczenia, w których wykazano, że rodniki te (powstałe w procesach utleniania dopaminy, L-DOPA, adrenaliny i noradrenaliny) mogą powodować utlenianie kwasu askorbinowego i glutationu, jak również indukować peroksydację lipidów i oksydacyjne uszkodzenia DNA. Zmniejszenie puli antyoksydantów komórkowych zwiększa podatność układu nerwowego na uszkodzenia będące efektem stresu oksydacyjnego, co przyczynia się do postępu neurodegeneracji [63]. Również chinony, powstające w procesie utleniania semichinonów, mogą przyczynić się do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego w tkance nerwowej. Prawdopodobnie, chinony oddziałują z jonotropowymi receptorami glutaminianu, nazwanymi receptorami NMDA, które są obecne w błonach komórkowych neuronów. Receptory te mogą być aktywowane poprzez przyłączenie cząsteczki glu-



Rycina 4. Struktura chemiczna leukoaminochromu, aminoleutyiny i  $\alpha$ -tokoferolu. Wszystkie te cząsteczki zawierają w pierścieniu heterocyklicznym atom z wolną parą elektronową (azot lub tlen). Sprzężenie tego orbitalu elektronowego z niesparowanym elektronem powstałym w efekcie oderwania atomu wodoru z grupy fenolowej może zwiększać trwałość powstającego rodnika fenoksyłowego [49,59].

taminianu lub kwasu N-metylo-D-asparaginowego, NMDA. Receptory NMDA są powiązane z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów wapnia, sodu i potasu. W efekcie nadmiernego pobudzenia tych receptorów następuje napływ jonów wapnia do wnętrza komórki. W stanie spoczynkowym, stężenie jonów wapnia w cytoplazmie jest około 10000 razy mniejsze niż w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zwiększone stężenie wapnia w komórce prowadzi do aktywacji różnych grup enzymów, w tym proteaz, lipaz i endonukleaz, które uszkadzają białczące [62]. Z uszkodzonych neuronów może wydostawać się glutaminian powodujący dalsze pobudzenie receptorów NMDA.

Katabolizm katecholamin zachodzący pod wpływem enzymów MAO i COMT również może prowadzić do wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego w komórce. W procesie deaminacji katecholamin katalizowanej przez MAO jako produkt uboczny wydzielany jest nadtlenek wodoru, który może być źródłem reaktywnych form tlenu w reakcji Fentona. Obecność nadtlenu wodoru przyspiesza również utlenianie katecholamin do toksycznych rodników semichinonowych, katalizowane przez peroksydazy obecne w komórkach nerwowych (Ryc. 5) [63]. Wydaje się, że katecholaminy mogą indukować śmierć komórki nerwowych na drodze apoptozy. Wskazują na to wyniki doświadczeń przeprowadzonych na komórkach nerwiaka płodowego (neuroblastomy, linia Neuro-2A), traktowanych L-DOPA lub dopaminą w stężeniu wyższym niż 100  $\mu\text{M}$ . W komórkach tych stwierdzono podwyższoną aktywność proapoptotycznej kaspazy-3 [64].

Wyniki doświadczeń na liniach komórek nerwowych, które poddano działaniu wysokich stężeń katecholamin, świadczą o toksycznym działaniu tych substancji [61,62,64]. Szkodliwe działanie wysokich stężeń katecholamin zostało zaobserwowane w badaniach *in vivo*, które przeprowadzono na szczurach. Wykazano, że krótko po podaniu tym zwierzętom L-DOPA wzrasta stężenie reaktywnych rodników hydroksylowych w istocie czarnej śródmózgowia. Efekt ten nie jest hamowany przez podanie L-deprenylu, więc prawdopodobnie jest skutkiem utleniania L-DOPA do semichinonów i chinonów a nie jej rozkładu z udziałem MAO [65]. Wyniki powyższych doświadczeń są spójne z niepokojącymi doniesieniami na temat skutków długotrwałej terapii L-DOPA, która jest stosowana w leczeniu zaawansowanej choroby Parkinsona. Sto-

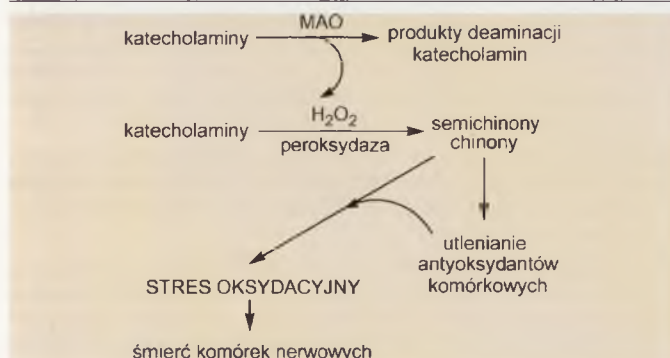
sowanie L-DOPA prowadzi początkowo do poprawy stanu zdrowia pacjentów. Niestety, kilkuletnia terapia prowadzi do nagłego pogorszenia się stanu zdrowia chorych, pojawiają się problemy z poruszaniem, a przede wszystkim dyskineza, czyli mimowolne chaotyczne ruchy obejmujące kończyny lub całe ciało [66,67]. Zaprezentowane doniesienia o szkodliwym działaniu wysokich stężeń katecholamin wskazują na konieczność poznania źródeł toksyczności tych substancji i znalezienia metod minimalizowania szkodliwych efektów ich działania.

## PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA KATECHOLAMIN W TERAPII CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Degeneracja komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych skutkuje lokalnym obniżeniem stężenia neuroprzekaźników katecholaminowych, które może prowadzić do zaburzeń w przekazywaniu sygnałów nerwowych. Spadek stężenia katecholamin może również wpływać na przyspieszenie procesów neurodegeneracyjnych, ze względu na potencjalne właściwości antyoksydacyjne tych związków. Jednak mimo obiecujących wyników doświadczeń *in vitro* [39,42] i testów klinicznych [43-45], podawanie L-DOPA w zaawansowanym stadium choroby Parkinsona jest obecnie jedyną stosowaną terapią choroby neurodegeneracyjnej, która polega na bezpośrednim podawaniu pacjentom katecholaminy. Niestety, długotrwała terapia z zastosowaniem L-DOPA powoduje dramatyczne pogorszenie się stanu pacjentów, prawdopodobnie w wyniku akumulacji toksycznych produktów utleniania katecholamin (chinonów i semichinonów) w tkance nerwowej [66,67]. Toksyczne działanie wysokich stężeń katecholamin zaobserwowano w doświadczeniach z wykorzystaniem linii komórek nerwowych [62,62,64] i w badaniach *in vivo* na zwierzętach [65]. Wydaje się więc, że skuteczna terapia z użyciem katecholamin będzie możliwa dopiero wtedy, gdy zostaną dobrane substancje regenerujące te związki (czyli redukujące rodniki semichinonowe do katecholamin). Efekt taki można uzyskać podając katecholaminy równocześnie z innymi antyoksydantami, które będą neutralizować rodniki semichinonowe poprzez przekazywanie im elektronu lub atomu wodoru.

Propozycję stosowania złożonych układów antyoksydantów w leczeniu choroby Parkinsona przedstawił Prasad i współpracownicy [68]. Zasugerowali oni równoczesne podawanie L-deprenylu, L-DOPA i mieszanki innych antyoksydantów w wysokich stężeniach (m. in. kwasu askorbinowego,  $\alpha$ -tokoferolu i  $\beta$ -karotenu). Stosowane antyoksydanty powinny być tak dobrane, aby neutralizować różne typy wolnych rodników, zarówno obecne w lipidowym wnętrzu błon komórkowych jak i w cytoplazmie i przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Autorzy opracowania niestety nie ustosunkowują się do bezpośredniego oddziaływania antyoksydantów z produktami utleniania katecholamin (chinonami i semichinonami) i do możliwości potencjalnej regeneracji neuroprzekaźników katecholaminowych przez te antyoksydanty.

Dotychczas, próbowano łączyć terapię L-deprenylem (która powoduje zwiększenie stężenia neuroprzekaźników katecholaminowych w tkance nerwowej) z podawaniem  $\alpha$ -tokoferolu pacjentom dotkniętym chorobą Alzheimera. Niestety, równoczesne podawanie L-deprenylu i



**Rycina 5.** Stres oksydacyjny jako efekt utleniania katecholamin i ich rozkładu (deaminacji) pod wpływem MAO. Nadtlenek wodoru, wydzielany w procesie deaminacji katecholamin przyspiesza utlenianie tych związków do toksycznych semichinonów i chinonów. Rdniki semichinonowe są źródłem stresu oksydacyjnego – indukują peroksydację lipidów i oksydacyjne uszkodzenia DNA. Zmniejszają również pulę dostępnych antyoksydantów w układzie nerwowym (zmodyfikowano wg [63]).

$\alpha$ -tokoferolu nie spowodowało silniejszych efektów terapeutycznych niż terapia, w której oddzielnie stosowano każdy z tych związków. We wszystkich przypadkach obserwowano wyraźne opóźnienie momentu, w którym pojawiają się problemy z wykonywaniem codziennych czynności oraz dłuższą przeżywalność pacjentów. Możliwe, że katecholaminy (których stężenie w tkance nerwowej rośnie w efekcie terapii L-deprenylem) i  $\alpha$ -tokoferol zapobiegają progresji choroby według podobnego lub tego samego mechanizmu i nawet stosowane oddzielnie zapewniają optymalną skuteczność na danym etapie rozwoju choroby [43].

## PIŚMIENNICTWO

1. Le Galès-Camus C (2006) Neurological disorders: public health challenges. World Health Organization, Genewa (www.who.int)
2. Prince M, Jackson J (2009) World Alzheimer Report. Alzheimer's Disease International (www.alz.co.uk)
3. Musialik M, Kuzmicz R, Pawlowski TS, Litwinienko G (2009) Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem* 74: 2699-2709
4. Bredesen DE (1995) Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851
5. Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639
6. Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278: 412-419
7. Massimo S, Dobson CM (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 81: 678-699
8. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997)  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840
9. Valentine JS, Hart PJ (2003) Misfolded Cu, Zn SOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3617-3622
10. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890
11. Alonso ADC, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 298-303
12. Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol* 113: 501-511
13. Cohen FE, Kelly JW (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426: 905-909
14. Walsh DM, Selkoe DJ (2007)  $A\beta$  oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* 101: 1172-1184
15. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nature Reviews* 8: 101-112
16. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356
17. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909
18. Chinta SJ, Andersen JK (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1362-1367
19. Ganong WF (2007) Przewodnictwo synaptyczne i przez złącza międkomórkowe. W: *Fizjologia* (red. J. Lewin-Kowalik), PZWL, Warszawa, str. 84-119
20. Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson Disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 160: 1655-1667
21. Shaw PJ, Barber SC (2010) Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biol Med* 48: 629-641
22. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B (1993) Mutations in Cu, Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
23. Liochev SI, Fridovich I (2003) Mutant Cu, Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: Evaluation of oxidative hypotheses. *Free Radic Biol Med* 34: 1383-1389
24. Bartosz G (2008) *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
25. Burton GW, Ingold KU (1989) Mechanisms of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants, W: Miquel J (red) *CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC Press, Boca Raton, str. 29-43
26. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Rev Disc* 3: 205-214
27. Reiter RJ (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9: 526-533
28. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922
29. White AR, Bush AI (2006) The metallobiology of Alzheimer's Disease: from bench to clinic. *Curr Med Literat: Neurology* 22: 89-97
30. Fahn S, Cohen G (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32: 804-812
31. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4<sup>th</sup> Edition, Oxford University Press, Oxford
32. Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerling JK, Jahn TP (2007) Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *J Biol Chem* 282: 1183-1192
33. Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Ruppert T, Masters CL, Beyreuther K (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 271: 1406-1409
34. Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC, Bush AI (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic  $H_2O_2$ . *J Biol Chem* 277: 40302-40308
35. Barnham KJ, Haeflner F, Ciccotosto GD, Curtain CC, Tew D, Mavros C, Beyreuther K, Carrington D, Masters CL, Cherny RA, Cappai R, Bush AI (2004) Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid. *FASEB J* 18: 1427-1429
36. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JDA, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999) Cu(II) potentiation of Alzheimer  $A\beta$  neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem* 274: 37111-37116
37. Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI (2004) Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid- $\beta$ . *Biochemistry* 43: 560-568
38. Liu H, Zhu H, Eggers DK, Nersissian AM, Faull KF, Goto JJ, Ai J, Sanders-Loehr J, Gralla EB, Valentine JS (2000) Copper(2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. *Biochemistry* 39: 8125-8132
39. Troade JD, Marien M, Darios F, Hartmann A, Ruberg M, Colpaert F, Michel PP (2001) Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochem* 79: 200-210

40. Yen GC, Hsieh CL (1997) Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1646-1649
41. Liu J, Mori A (1993) Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against oxidant- and free radical-induced damage. *Arch Biochem Biophys* 302: 118-127
42. Iacovitti L, Stull ND, Mishizen A (1999) Neurotransmitters, KCl and antioxidants rescue striatal neurons from apoptotic cell death in culture. *Brain Res* 816: 276-285
43. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New Eng J Med* 336: 1216-1222
44. Piccinin GL, Finali G, Piccirilli M (1990) Neuropsychological effects of L-deprenyl in Alzheimer's type dementia. *Clin Neuropharmacol* 13: 147-163
45. Mangoni A, Grassi MP, Frattola L, Piolti R, Bassi S, Motta A, Marcone A, Smirne S (1991) Effects of a MAO-B inhibitor in the treatment of Alzheimer disease. *Eur Neurol* 31: 100-107
46. The Parkinson Study Group (1993) Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *New Eng J Med* 328: 176-183
47. Sofic E, Denisova N, Youdim K, Vattrenjak-Velagic, V, De Filippo C, Mehmedagic A, Causevic A, Cao G, Joseph JA, Prior RL (2001) Antioxidant and pro-oxidant capacity of catecholamines and related compounds. Effects of hydrogen peroxide on glutathione and sphingomyelinase activity in pheochromocytoma PC12 cells: potential relevance to age-related diseases. *J Neural Transm* 108: 541-557
48. Kowalewska E, Litwinienko G (2010) Fenolowe antyoksydanty interwentywne – aktywność i mechanizmy działania. *Postepy Biochem* 56: 274-283
49. Cosa G, Scaiano JC (2008) Reactivity of adrenaline toward alkoxy radicals and carbonyl triplet states. *Org Biomol Chem* 6: 4609-4614
50. Litwinienko G, Ingold KU (2007) Oxidation of dopamine by peroxy radicals – a commentary on the site of radical attack. *Free Radical Biol Med* 42: 730
51. Wright JS, Johnson ER, DiLabio G (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 123: 1173-1183
52. Litwinienko G, Mulder P (2009) Comment on „temperature and solvent effects on radical scavenging ability of phenols”. *J Phys Chem A* 113: 14014-14016
53. Hynes JT, Klinman JP, Limbach HH, Schowen RL (2007) *Hydrogen Transfer Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim
54. Litwinienko G, Ingold KU (2007) Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc Chem Res* 40: 222-230
55. Litwinienko G, Ingold KU (2003) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in alcohols. *J Org Chem* 68: 3433-3438
56. Litwinienko G, Ingold KU (2005) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in Sequential Proton Loss Electron Transfer chemistry. *J Org Chem* 70: 8982-8990.
57. Kawashima T, Ohkubo K, Fukuzumi S (2010) Radical scavenging reactivity of catecholamine neurotransmitters and the inhibition effect for DNA cleavage. *J Phys Chem B* 114: 675-680
58. Smythies J, Galzigna L (1998) The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta* 1380: 159-162
59. Burton GW, Le Page Y, Gabe EJ, Ingold KU (1980) Antioxidant activity of vitamin E and related phenols. Importance of stereoelectronic factors. *J Am Chem Soc* 102: 7791-7792
60. Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-348
61. Mytilineou C, Han SK, Cohen G (1994) Toxic and protective effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem* 61: 1470-1478
62. Lieb K, Andrae J, Reiser I, Pilgrim C (1995) Neurotoxicity of dopamine and protective effects of the NMDA Receptor antagonist AP-5 differ between male and female dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 134: 222-229
63. Siraki AG, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters. *Toxicology* 177: 81-90
64. Pedrosa R, Soares-da-Silva P (2002) Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *Br J Pharmacol* 137: 1305-1313
65. Spencer ST, Parker WD Jr., Bennett JP Jr. (1994) L-DOPA increases nigral production of hydroxyl radicals *in vivo*: potential L-DOPA toxicity? *NeuroReport* 5: 1009-1011
66. Marsden CD, Parkes JD (1977) Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 345-349
67. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW (2000) The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* 55: S13-S20
68. Prasad KN, Cole WC, Kumar B (1999) Multiple Antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's Disease. *J Am Coll Nutr* 18: 413-423

## Oxidative stress in the neurodegenerative diseases – potential antioxidant activity of catecholamines

Katarzyna Jodko, Grzegorz Litwinienko 

Faculty of Chemistry, University of Warsaw, 1 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: litwin@chem.uw.edu.pl

**Key words:** Neurodegenerative diseases, oxidative stress, catecholamines, antioxidants, dopamine

### ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis), are characterized by the deposition of misfolded proteins (A $\beta$ -peptide,  $\alpha$ -synuclein and Cu, Zn superoxide dismutase, respectively). Oxidative stress is accompanied by the diminished level of catecholamines in neuronal tissue. Beside their role in transduction of nervous stimuli, catecholamines might act as antioxidants. Herein, we focused on the antioxidant activity of catecholamine neurotransmitters – dopamine (and its precursor L-DOPA), adrenaline and noradrenaline. There is an increasing evidence that catecholamines might act as scavengers of free radicals and experimental data indicate the antioxidant potency of catecholamines. However, the exact mechanism of this action is not defined.

# Stres oksydacyjny jako uniwersalna przyczyna starzenia się – od somatycznych komórek człowieka do jednokomórkowych drożdży i prokariotycznych komórek bakterii

Krzysztof Książek

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Patofizjologii, Poznań

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Patofizjologii, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854 65 79, faks: (61) 854 65 74, e-mail: kksiazek@ump.edu.pl

Artykuł otrzymano 3 lutego 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 6 lutego 2010 r.

**Słowa kluczowe:** antyoksydanty, cukrzyca, reaktywne formy tlenu, starzenie komórkowe, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA

**Wykaz skrótów:** 8-OH-dG – 8-hydroksydeoksyguanozyna; GSH – zredukowany glutation; PBN – *N-tert*-butylo- $\alpha$ -fenylnitron; PDs – podwojenia populacji; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; ERCs – pozachromosomalne kolisty rDNA

## STRESZCZENIE

Stres oksydacyjny jest jedną z najważniejszych przyczyn procesu starzenia się, rozpatrywanego zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu. Istnieją dowody na to, że czynnik ten stanowi także wspólny element łączący starzenie się komórek i całych organizmów wyższych z podobnym procesem zachodzącym w eukariotycznych i prokariotycznych organizmach jednokomórkowych. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat roli stresu oksydacyjnego w starzeniu się ludzkich komórek somatycznych oraz organizmu człowieka jako całości, jak również przedstawienie tego problemu na modelach jednokomórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterii *Caulobacter crescentus* i *Escherichia coli*.

## WPROWADZENIE

W dobie postępującego wzrostu średniej i przewidywalnej długości życia mieszkańców krajów uprzemysłowionych (w tym także i Polski), szczególnego znaczenia nabrały badania molekularnych podstaw procesu starzenia się. Badania te prowadzone są na wielu płaszczyznach organizacji ustroju, tj. na szczeblu całego organizmu, poszczególnych narządów i tkanek, jak również komórek określonych typów. W powszechnej opinii, najatrakcyjniejszym obiektem badawczym są właśnie modele komórkowe, które umożliwiają wgląd w istotę starzenia się z punktu widzenia współczesnej, a więc zaawansowanej biochemii, biologii molekularnej i genetyki. Dodatkowym atutem tych badań jest duża różnorodność dostępnych komórek somatycznych (wynikająca między innymi z ich niejednorodnego pochodzenia embrionalnego), co pozwala na wyodrębnienie komórkowo-specyficznych różnic w przyczynowości, mechanice i tempie przebiegu tego zjawiska. Jako niezwykle pomocne narzędzie badawcze służą także komórki organizmów niższych, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, które pozwalają prześledzić filogenetyczną mozaikowość (rozumianą jako sumę podobieństw i różnic) określonych zjawisk związanych z fenomenem starzenia się.

## WYCZERPANIE ZDOLNOŚCI PODZIAŁOWYCH JAKO MIARA STARZENIA SIĘ KOMÓREK CZŁOWIEKA

Badania starzenia się z wykorzystaniem modeli komórkowych trwają nieprzerwanie już od blisko pięćdziesięciu lat. Punktem wyjścia do rozważań nad starzeniem się komórek stała się obserwacja, że prawidłowe komórki somatyczne człowieka mogą podzielić się w warunkach hodowlanych tylko ściśle ograniczoną liczbę razy [1]. Ta graniczna liczba podziałów jest cechą charakterystyczną poszczególnych typów komórek, a wpływ na nią ma ich topograficzna lokalizacja oraz pochodzenie embrionalne. Spośród wszystkich rodzajów komórek człowieka, najpopularniejszym obiektem badawczym są fibroblasty, których relatywnie wysoka aktywność proliferacyjna pozwala na obserwację stopniowego spadku tempa wzrostu hodowli, wchodzenia komórek w fazę starzenia się i towarzyszącej temu charakterystycznej degeneracji [2]. Dzisiaj wiadomo już także, że wyczerpywanie możliwości podziałowych jest zjawiskiem dużo bardziej uniwersalnym i nie kończy się na komórkach organizmów wyższych. Podobne zjawisko zaobserwowano u eukariotycznych, asymetrycznie dzielących się pączkujących drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (odzwierciedleniem tego jest skończona liczba pączków, które mogą odłączyć się od komórki „matki”) [3], jak również u prokariotycznych szczepów bakterii *Escherichia coli* (czemu odpowiada obniżenie możliwości podziałowych tych komórek, które dziedziczą składniki tzw. „starego bieguna” komórki matki) [4].

Poszukiwania mechanizmu leżącego u podłoża zapaści proliferacyjnej komórek człowieka zaowocowały wyodrębnieniem dwóch podstawowych szlaków starzenia się: starzenia replikacyjnego, związanego ze zmianami w budowie i dłu-



gości telomerów oraz starzenia przedwczesnego, przebiegającego bez widocznych zmian w telomerach [5]. Pierwszy z wymienionych mechanizmów, charakteryzujący komórki o wysokim potencjale proliferacyjnym (np. fibroblasty, które starzeją się po 40–100 podwojeniach populacji; PDs), inicjowany jest przez postępującą utratę telomerowych powtórzeń TTAGGG i towarzyszące temu procesowi otwieranie pętlowej struktury telomerów (ang. *uncapping*). Uważa się, że zjawisko to może być wynikiem tzw. „problemu końca replikacji” (ang. *end-replication problem*), tj. niezdolności polimerazy DNA do pełnej syntezy nici potomnej na matrycy macierzystej nici opóźnionej [6]. W rezultacie, skrócone i „otwarte” telomery odczytywane są przez komórki jako sekwencje noszące znamiona rozległych uszkodzeń DNA, których odzwierciedleniem jest m.in. obecność tzw. ognisk uszkodzonego DNA, tj. obszarów bogatych w ufosforylowaną postać histonu H2A.X ( $\gamma$ -H2A.X) oraz białek 53BP1 i MRE11 [7]. Pojawienie się w DNA dużej liczby ognisk uszkodzeń zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń mających na celu trwale wyprowadzenie komórki z cyklu podziałowego. Na tym etapie, efektorami starzenia się są białka p53 i p21, które w zsynchronizowany sposób, za pośrednictwem kinazy ATM, blokują cykl mitotyczny komórek przed przejściem przez nie punktu restrykcyjnego G<sub>1</sub>/S [8].

Zdecydowanie odmienna jest specyfika starzenia się komórek nabłonkowych i mezotelialnych. Komórki te cechują się relatywnie niewielkimi możliwościami podziałowymi (~10–30 PDs) i starzeją się bez zmian długości i budowy telomerowego DNA [9,10]. Jako przyczynę ich przedwczesnego zatrzymania wzrostu uważa się szczególnie wrażliwość na niefizjologiczne warunki panujące w hodowli *in vitro*, do których zaliczyć można wzrost na powierzchniach plastikowych (zamiast na elementach macierzy), brak heterogennych oddziaływań z innymi typami komórek, nieadekwatny do rzeczywistych potrzeb skład środowiska hodowlanego (czynniki wzrostu, hormony, mikroelementy), czy sukcesywne poddawanie komórek proteolitycznemu działaniu trypsyny (w trakcie pasażowania hodowli) [11]. Stres, którego doświadczają komórki po przeniesieniu z organizmu do środowiska *in vitro* wiąże się z pojawieniem rozległych uszkodzeń DNA, zlokalizowanych w niespecyficznych, pozatelomerowych obszarach genomu. Głównym mediatorem odpowiedzialnym za zatrzymanie progresji cyklu komórkowego jest w tych komórkach białko p16 [12].

Wyodrębnienie dwóch różniących się od siebie mechanizmów starzenia się komórek człowieka stało się przesłanką do postawienia tezy mówiącej, że rzeczywista natura tego procesu oprócz swej zaprogramowanej składowej (związanej ze stałym, utrwalonym ewolucyjnie dla danej grupy komórek potencjałem proliferacyjnym) zawierać może także silny element stochastyczny, związany z działaniem na komórkę określonych stresorów. W tym kontekście, na plan pierwszy wysunął się stres oksydacyjny, którego komórki doświadczają zarówno wskutek przewlekłej ekspozycji na wysokie, atmosferyczne ciśnienie parcjalne tlenu w hodowli *in vitro* (w miejsce kilkuprocentowej prężności charakteryzującej tkanki), jak również w wyniku narastającej w miarę starzenia się produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) przez mitochondria [11,13].

## STRES OKSYDACYJNY JAKO INDUKTOR STARZENIA SIĘ

### EGZOGENNY (ŚRODOWISKOWY) STRES OKSYDACYJNY

Stres oksydacyjny oznacza dysproporcję pomiędzy tempem wytwarzania RFT a ich neutralizacji przez systemy antyoksydacyjne. W badaniach przeprowadzonych na ludzkich komórkach mezotelialnych wykazano, że komórki te są bardzo wrażliwe na środowiskowy stres oksydacyjny, spowodowany hiperoksją, której ulegają bezpośrednio po wyizolowaniu ich z tkanki. Skutkiem tej ekspozycji jest pojawienie się w pierwotnych hodowlach znaczącego odsetka komórek noszących fenotypowe oznaki starzenia się, takie jak: zwiększenie rozmiarów, obecność  $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem, gromadzenie 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OH-dG) oraz podwyższona produkcja białka p16 [14]. Co istotne, wczesna protekcja komórek za pomocą zmiatacza wolnych rodników, pułapki spinowej *N-tert*-butylo- $\alpha$ -fenylnitronu (PBN) okazała się skutecznie chronić hodowlę przed przedwczesnym pojawieniem się w niej komórek starych. Efektu takiego nie uzyskano natomiast wówczas, gdy zróżnicowane strategie antyoksydacyjne (PBN, obniżenie ciśnienia tlenu z 21% do 3%, dodawanie procysteiny - prekursora zredukowanego glutationu; GSH) zastosowano na dalszych etapach hodowli *in vitro*. Dane te sugerują, że niekorzystny wpływ środowiskowego stresu oksydacyjnego może chronologicznie wyprzedzać skutki działania endogennych RFT, a w kontekście ograniczenia możliwości podziałowych komórek, może być nawet czynnikiem o kluczowym znaczeniu [14].

Przyspieszone starzenie się komórek rosnących w obecności wysokiej prężności tlenu nie jest jedynym dowodem na egzogenne uwarunkowanie zmian zachodzących w komórkach starych. Jak pokazały badania przeprowadzone m.in. na fibroblastach, fenotypowe oznaki starzenia się można wywołać w krótkim czasie także w komórkach młodych, poprzez poddanie ich działaniu wysokich dawek nadtlenu wodoru [15] lub poprzez podwyższenie ciśnienia parcjalnego tlenu do 40% [16]. Co warto podkreślić, wszystkie morfologiczne i czynnościowe cechy starzenia się, które można zaobserwować w komórkach ekspozycyjnych na środowiskowy stres oksydacyjny są niemal identyczne z tymi, które występują w komórkach starzejących się wskutek przebycia określonej liczby podziałów [7].

### ENDOGENNY STRES OKSYDACYJNY

Wprawdzie przyczyn powstawania RFT w komórce jest wiele, za najważniejszą uznaje się mitochondrialne procesy utleniania komórkowego. W trakcie tych przemian około 0,1–4% tlenu nie ulega pełnej redukcji do cząsteczki wody, czego skutkiem jest ich „wyciek” z mitochondriów w postaci form wolnorodnikowych [17]. W związku z powyższym, wewnątrzpochodny stres oksydacyjny w komórkach starych jest przede wszystkim wynikiem zmian zachodzących w mitochondriach, do których zalicza się między innymi wzrost aktywności enzymów uczestniczących w transporcie elektronów, tj. dehydrogenazy NADH i oksydazy cytochromu c [18]. Oprócz tego, w mitochondriach komórek starych można zaobserwować zjawisko tzw. wstecznej odpowiedzi

sygnałowej (ang. *retrograde signaling response*), które stanowi ich reakcję na postępujące zmniejszanie się potencjału błony wewnętrznej, a tym samym obniżoną zdolność do generowania ATP. Aby przeciwstawić się tym zmianom dochodzi do nasilonej biogenezy nowych mitochondriów, czego efektem jest dalszy wzrost produkcji RFT [13].

Od pewnego czasu sugeruje się, że RFT mogą być zaangażowane w proces skracania się telomerów, a wywierany przez nie wpływ może być nawet silniejszy niż efekt zależny od problemu końca replikacji [19]. Jak wykazano w przypadku fibroblastów płucnych, hodowanych w obecności 40% prężności tlenu, przedwczesnemu starzeniu się komórek (zachodzącemu po zaledwie kilku podziałach) towarzyszy przyspieszone tempo skracania się telomerów, które wzrasta od wartości około 90 par zasad na podział w warunkach normalnej prężności tlenu, do wartości 500 par zasad na podział w warunkach hiperoksjii. W wyniku przyspieszenia procesu destrukcji telomerowego DNA, zatrzymanie podziałów mitotycznych w obu grupach komórek następuje po osiągnięciu podobnej średniej długości telomerów [16]. Za główną przyczynę szczególnej wrażliwości telomerowego DNA na działanie stresu oksydacyjnego uważa się niską wydajność układów naprawczych w tym obszarze genomu, co powoduje gromadzenie się tam różnego typu uszkodzeń, szczególnie jednoniciowych pęknięć DNA. Kumulujące się uszkodzenia stanowią fizyczną przeszkodę dla działania polimeraz, w wyniku czego dochodzi do przerw w procesie replikacji i przedwczesnego zakończenia syntezy nici potomnej. Efektem tego jest skrócenie telomeru na dużo większą skalę niż wynikałoby to z samego problemu końca replikacji [19,20].

Czynnikiem o niebagatelnym znaczeniu dla tempa starzenia się komórek w warunkach stresu oksydacyjnego jest również odpowiednia aktywność mechanizmów antyoksydacyjnych. Dowodów na to dostarczyły m.in. badania z zastosowaniem egzogennych antyoksydantów i zmiataczy RFT, w obecności których tempo skracania się telomerów w komórkach ulega spowolnieniu, czemu towarzyszy wyraźny wzrost potencjału proliferacyjnego

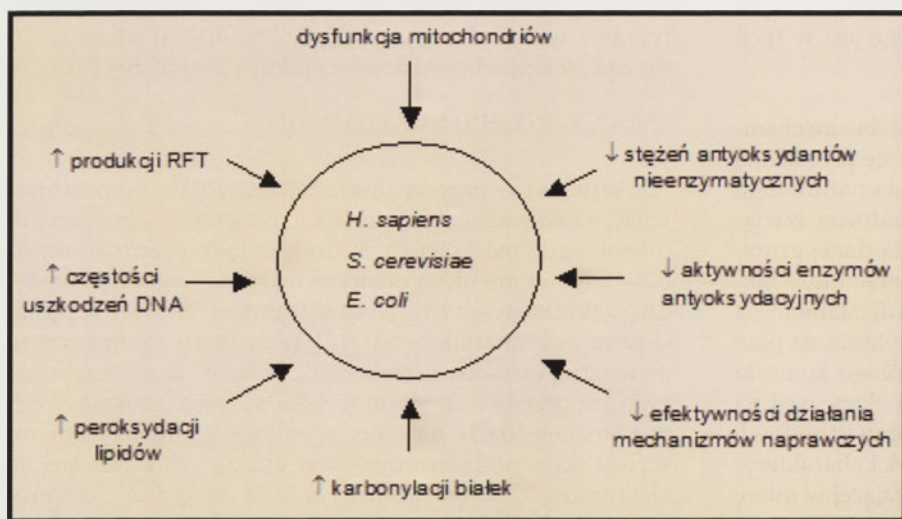
[20]. W różnicach w sprawności endogennych systemów antyoksydacyjnych doszukuje się także wyjaśnienia różnic w potencjale podziałowym określonych typów komórek. Jak wykazały badania porównawcze dwóch pierwotnych populacji komórek mezotelium otrzewnowego, wyższa aktywność proliferacyjna komórek LP-9 (pochodzących z płynu puchlinowego) w porównaniu z komórkami HOMCs (pochodzącymi z sieci większej) koreluje z wysoką aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz wysokim stężeniem GSH w tych pierwszych [21]. Z kolei, doświadczenia na fibroblastach dowiodły, że komórki pochodzenia skórno (szczep BJ), przewyższające swym potencjałem podziałowym fibroblasty płucne (szczep MRC-5), charakteryzują się także wyższą aktywnością pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD) [22,23]. Oprócz neutralizacji RFT produkowanych w komórkach, właściwa aktywność systemów antyoksydacyjnych odgrywa także duże znaczenie dla odpowiedniej ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym pochodzenia środowiskowego [21] (Ryc. 1).

## STRES OKSYDACYJNY W MODELACH STARZENIA SIĘ ORGANIZMÓW NIŻSZYCH

### DROŹDŻE PIEKARNICZE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Choć wydawać by się mogło, że zjawisko wyczerpywania się potencjału podziałowego komórek wskutek procesów zachodzących w ich wnętrzu, utożsamiane obecnie z procesem starzenia się, zostało opisane po raz pierwszy w oparciu o badania fibroblastów płucnych człowieka [1], w rzeczywistości dokonano tego wcześniej na modelu drożdży piekarskich *S. cerevisiae*. Wówczas to, Mortimer i Johnston zasugerowali, że długość życia tego jednokomórkowego eukarionta może być determinowana liczbą komórek potomnych (tzw. pączków), które mogą być wytworzone przez komórkę matkę. Badacze ci poddali pod dyskusję fakt, że ograniczone możliwości podziałowe drożdży mogą być pochodną nagromadzenia się schitynizowanych blizn podziałowych, które ograniczają pole powierzchni komórki dostępnej do powstawania kolejnych pączków [24]. Pomimo, iż teoria ta została w późniejszych latach odrzucona [25], a gromadzenie się blizn zostało zinterpretowane jako jeden ze skutków starzenia się komórki, drożdże piekarskie dołączyły do ścisłej czołówki organizmów modelowych wykorzystywanych w badaniach procesu starzenia się.

Ważną cechą *S. cerevisiae* jest ich dwoista natura w odniesieniu do zjawisk związanych z regulacją wzrostu i starzenia się. Z jednej strony bowiem, komórki drożdży wykazują szereg podobieństw z komórkami organizmów wyższych (w tym człowieka), a z drugiej, posiadają zestaw specyficznych właściwości, wynikających choćby z tego, że pojedyncza komórka jest zarazem pełnowartościowym organizmem. W optymalnych warunkach wzrostu, wynikających w głównej



Rycina 1. Najważniejsze wykładniki stresu oksydacyjnego, biorące udział w procesie starzenia się komórek człowieka, drożdży *S. cerevisiae* i bakterii *E. coli*.

mierze z dostępności składników odżywczych w pożywe hodowlanej, zdolność reprodukcyjna *S. cerevisiae* waha się od 10–50 podziałów, przy czym wartość ta jest cechą charakterystyczną danego szczepu [3]. Istotne jest jednak to, że w trakcie asymetrycznego podziału komórki drożdży, niezależnie od liczby przebytych rund podziałowych przez komórkę matkę, replikacyjny czas życia nowopowstałego pączka ulega wyzerowaniu (tzw. zjawisko resetu replikacyjnego), co umożliwia mu odbycie pełnej liczby przypisanych danemu szczepowi podziałów [26].

Drożdże starzeją się w sposób niezależny od telomerów, czego główną przyczyną jest aktywność telomerazy, odbudowującej ubytki w telomerowym DNA [27]. Co ciekawe, komórki, u których proces skracania się telomerów wywołano sztucznie, poprzez mutację genu *tTLC1*, kodującego jedną ze składowych telomerazy, charakteryzują się zwiększonymi możliwościami podziałowymi w porównaniu ze szczepem dzikim [28]. Uważa się, że jedną z przyczyn tego zjawiska może być działanie obecnego w obrębie telomerów białka Sir3p, które w odpowiedzi na uszkodzenia telomerów jest uwalniane, a następnie przyłącza się preferencyjnie do miejsc noszących znamiona uszkodzeń i uczestniczy w ich naprawie [29].

Według obecnego stanu wiedzy, wyczerpanie zdolności drożdżowej komórki matki do produkowania nowych pączków może być związana z gromadzeniem się w niej określonego czynnika związanego ze starzeniem (tzw. *senescence factor*), który nie jest przekazywany do komórek potomnych lub, jak sądzą niektórzy, jest przekazywany i szybko unieczynniony w tych komórkach [30]. Jako głównego kandydata do pełnienia tej funkcji wymienia się pozachromosomalne cząsteczki kolistego rDNA (ERCs), które gromadzą się w komórkach starych, a ich wprowadzenie do komórek młodych wywołuje w nich oznaki przyspieszonego starzenia się [31]. Jak wykazano, szereg substancji o charakterze utleniaczy ma zdolność indukowania wewnątrzchromosomalnej rekombinacji DNA, uznawanej za podstawę tworzenia ERCs, co wskazuje na przyczynowy związek między stresem oksydacyjnym a starzeniem się *S. cerevisiae* [32].

Szczegółowe badania roli stresu oksydacyjnego w starzeniu się drożdży pokazały, że związek między tymi procesami jest bardzo silny. Stwierdzono m.in., że stare komórki matki, w odróżnieniu od komórek młodych, cechują się wysokim poziomem RFT pochodzenia mitochondrialnego. Cząsteczki te mogą stanowić bezpośrednią przyczynę nasilenia zmian apoptotycznych w komórkach, co stanowi jeden z wykładników ostatecznego wyczerpania ich zdolności do podziału [33]. Pewne zmiany dają się także zaobserwować w strukturze mitochondriów, które wskutek działania RFT stają się silnie pofragmentowane. Jak wykazano, delecja genu *DNM1*, odpowiedzialnego za ochronę komórek przed sygnałami proapoptotycznymi, okazała się zwiększać oporność komórek na działanie RFT oraz wydłużać ich życie. Analogiczny efekt zaobserwowano w przypadku szczepu noszącego mutację genu *MDM30*, odpowiedzialnego za prawidłowe działanie mitochondriów w komórkach dzielących się [34]. Interesujących danych dostarczyły

także badania mutantów cechujących się niewydolnymi mechanizmami naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Prace te dowiodły istnienia zjawiska „błędnego koła”, polegającego na stymulowaniu generowania endogennych RFT przez gromadzące się w komórkach, nienaprawione oksydacyjne uszkodzenia DNA [35]. Interesująca w tym kontekście wydaje się także sugestia, zgodnie z którą, unieczynnienie mitochondriów, będących głównym źródłem RFT w komórce, mogłoby wpłynąć na poprawę zdolności podziałowych drożdży [36]. Teza ta nie znalazła jednak poparcia w badaniach doświadczalnych, które pokazały, że długość życia mutantów z unieczynnionymi mitochondriami, prawdopodobnie ze względu na energetyczne wymagania enzymów antyoksydacyjnych, jest znacząco ograniczona [37].

Cechą starych komórek *S. cerevisiae* jest nagromadzenie się produktów oksydacyjnych modyfikacji makrocząsteczek, w tym DNA (8-OH-dG) i białek (wzrost stężenia grup karbonylowych) [38,39]. Co ciekawe, gromadzenie części tych uszkodzeń można znacząco zmniejszyć poprzez poddanie komórek restrykcji kalorycznej, wywołanej zmniejszeniem stężenia glukozy w pożywe z 2% do 0,5%. Procedura ta pozwala ponadto utrzymać na stałym poziomie stężenie jonów żelaza, kluczowych kofaktorów reakcji wolnorodnikowych, których stężenie w komórkach rosnących w standardowych warunkach wzrasta nawet pięciokrotnie. Niebagatelnym efektem stosowania restrykcji kalorycznej jest także wydłużenie tzw. chronologicznej długości życia komórek, czyli czasu przeżycia drożdży pozostawionych w fazie stacjonarnej (odpowiednika komórek postmitotycznych u organizmów wyższych) [39]. Jako przyczynę korzystnego wpływu restrykcji kalorycznej uważa się przesunięcie metabolizmu komórek z procesów fermentacji w stronę procesów fosforylacji oksydacyjnej [40]. Taka zmiana powoduje zwiększenie tempa transportu elektronów i wzrost stosunku  $NAD^+/NADH$ , czego efektem jest aktywacja genu deacetylazy histonowej *SIR2* (jej kompetywnym inhibitorem jest  $NADH$ ), uczestniczącej w wyciszaniu chromatyny jądrowej i procesach napraw [41,42]. Jak zasugerowano jednak niedawno, efekt restrykcji kalorycznej u drożdży *S. cerevisiae* może być niezależny od działania *SIR2* i może wynikać z aktywacji innych dróg sygnałowych, np. szlaku TOR [43]. Warto podkreślić, że komórki rosnące w warunkach obniżonego stężenia glukozy wytwarzają zdecydowanie mniej RFT w przeliczeniu na ilość wykorzystanego tlenu, co może sugerować, iż przynajmniej część efektów restrykcji jest związana z ograniczeniem stresu oksydacyjnego w komórkach [44].

Ważnym aspektem w kontrolowaniu poziomu stresu oksydacyjnego u drożdży jest aktywność systemów antyoksydacyjnych. W badaniach wykonanych na szczepach *S. cerevisiae* pozostających w fazie stacjonarnej zaobserwowano, iż komórki stare cechują się obniżonym stężeniem GSH oraz obniżoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD oraz reduktazy i peroksydazy glutationowej [38,45]. Zgodne z tymi obserwacjami są wyniki badań na mutantach pozbawionych  $Cu,ZnSOD$  oraz  $MnSOD$ , które cechowały się mniejszą żywotnością w porównaniu ze szczepem dzikim [46].

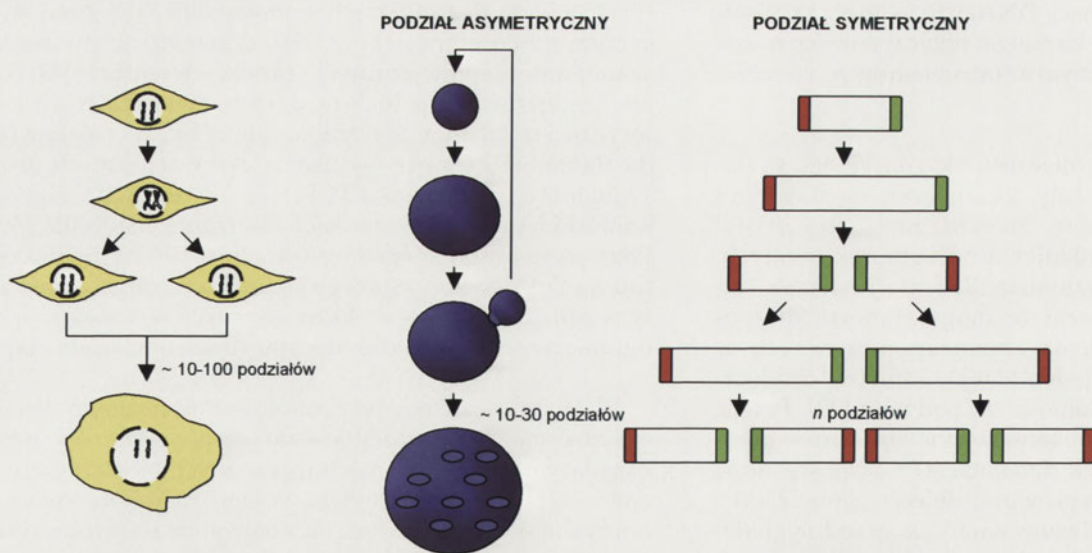
Jeszcze do niedawna sądzono, że bakterie, będące przedstawicielami *Prokaryota*, nie podlegają procesowi starzenia się. Tłumaczono to morfologicznie symetrycznym charakterem podziału komórki bakteryjnej, którego efektem jest wytworzenie dwóch identycznych, i młodych zarazem, komórek potomnych. Zgodnie z tą regułą, bakterie można by uznać za organizmy nieśmiertelne, pod warunkiem zapewnienia im optymalnych warunków wzrostu (substancje odżywcze, czynniki wzrostowe, temperatura, pH, zasolenie). Jako swego rodzaju wyjątek traktowane były bakterie *Caulobacter crescentus*, cechujące się wyraźnie asymetryczną cytokinezą i dimorficznym cyklem podziałowym. U bakterii tych, w wyniku podziału komórki matki, powstaje ruchliwa, zaopatrzona w wić komórka potomna (ang. *swarmer cell*) oraz druga, statyczna komórka posiadająca charakterystyczną wypustkę o strukturze kanalikowej (ang. *stalked cell*). Podział chromosomu, i w następstwie całej komórki, następuje jednak tylko w tej drugiej formie potomnej, w którą różnicuje się także w czasie dojrzewania komórka ruchliwa. W związku z tym, nowe pokolenia bakterii powstają wyłącznie z komórek posiadających wypustkę, przy czym czas potrzebny komórce matce na wytworzenie kolejnych generacji wzrasta z każdym podziałem, co jest utożsamiane z jej postępującym starzeniem się [47].

Przełomowe w swej wymowie stały się badania Stewarta i wsp. [4], którzy analizując cykl życiowy bakterii *E. coli* zaobserwowali, że choć morfologicznie podział komórki wydaje się być symetryczny, to pod względem czynnościowym można dostrzec znaczne zróżnicowanie komórek potomnych. Stwierdzono wówczas, że jedna z nowopowstałych komórek, dziedzicząca elementy tzw. „starego bieguna” komórki matki dzieli się wolniej, wytwarza mniej pokoleń potomnych oraz wykazuje większe ryzyko śmierci od

swego odpowiednika, którego koniec syntetyzowany jest *de novo* w trakcie podziału [4] (Ryc. 2).

Dowodów na ewolucyjną celowość wyodrębnienia się asymetrycznego, związanego ze starzeniem się i śmiercią, podziału komórki bakteryjnej dostarczyły prace porównujące oba typy podziału (symetryczny i asymetryczny) za pomocą modeli matematycznych. Wykazały one, że skutkiem podziału asymetrycznego (nie tylko morfologicznie, lecz też czynnościowo) jest niższa liczebność powstającej populacji, przy czym tempo jej wzrostu jest wyższe niż w przypadku podziału symetrycznego. Dane te mogą wskazywać, że starzenie się części komórek bakteryjnych wskutek asymetrii podziału może stanowić przystosowanie populacji do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiska, np. w warunkach wysokiego współzawodnictwa o substancje odżywcze [48]. Także wskutek zadziałania subletalnych dawek egzogennych stresorów, przetrwanie populacji bakterii może być uwarunkowane asymetryczną segregacją potencjalnych uszkodzeń makrocząsteczek tylko do jednej z komórek potomnych [49].

Pomimo ustalenia, że specyfika podziałów *E. coli* doprowadza do starzenia się komórek, mechanizm tego zjawiska pozostaje nadal niejasny. Dominującym wątkiem badawczym są próby identyfikacji cząsteczek, które dziedziczone są w trakcie podziału tylko w linii pochodzącej ze „starego bieguna” komórki matki. Uważa się, że należeć do nich mogą elementy ściany komórkowej, uszkodzone i/lub toksyczne fragmenty macierzystego DNA lub zmodyfikowane oksydacyjnie białka [4,50]. Szczególnie ta ostatnia możliwość stanowi atrakcyjny punkt wyjścia do rozważań nad rolą stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się *E. coli*. Przemawia za tym także fakt gromadzenia się w starzejących komórkach dzięki szczepu agregatów zmodyfikowanych oksydacyjnie białek, których produkcja ulega zahamowaniu w mutantach o podwyższonej aktywności systemów antyoksydacyjnych [51].



Rycina 2. Charakterystyka podziałów komórkowych prowadzących do starzenia się w komórkach człowieka, *S. cerevisiae* (podział asymetryczny) i *E. coli* (podział symetryczny). Symetria podziału komórki *E. coli* odnosi się do morfologii komórek potomnych. Pod względem dziedziczenia określonych struktur i związanych z tym możliwości funkcjonalnych komórek potomnych, podział ten można określić jako czynnościowo asymetryczny (patrz tekst pracy). Elementy komórki bakterii (podział symetryczny) wyszczególnione kolorem czerwonym i zielonym oznaczają, odpowiednio, struktury starego i nowego bieguna komórki, dziedziczone przez komórki potomne podczas podziału komórki *E. coli*.

W komórkach organizmów eukariotycznych, głównym źródłem RFT są mitochondrialne procesy redukcji tlenu cząsteczkowego katalizowane przez enzymy łańcucha oddechowego [17]. Choć bakterie nie posiadają mitochondriów, dane doświadczalne wskazują, że w komórkach *E. coli* blisko 90% RFT powstaje dzięki aktywności zlokalizowanych w błonie wewnętrznej enzymów łańcucha oddechowego, a ich produkcja jest pro-

porcjonalna do liczby jednostek łańcucha oddechowego w komórce [52]. Szczegółowe badania wykazały, że podstawową przyczyną powstawania RFT u *E. coli* są reakcje autoutleniania trzech dehydrogenaz: NADH, bursztynianowej i D-mleczanowej [53]. Co ciekawe, skala produkcji RFT w komórkach *E. coli* wydaje się być porównywalna do tej, obserwowanej w komórkach ssaków [52]. Bakterie te wykształciły także odpowiednie systemy neutralizujące RFT, z których najważniejsze to MnSOD (kodowana przez *sodA*), FeSOD (kodowana przez *sodB*) oraz katalazy HPI i HPII (kodowane przez *katG* i *katE*) [54]. Dowodem wpływu RFT, pochodnych metabolizmu tlenowego, na wzrost *E. coli* była obserwacja, że długość życia dzikiego szczepu utrzymywanego w warunkach beztlenowych jest znacząco wyższa w porównaniu z komórkami rosnącymi w warunkach tlenowych [55]. Z drugiej strony, tempo starzenia się komórek nabrało przyspieszenia wskutek pozbawienia ich tetrafosforanu guanozyny (pp-Gpp), będącego jednym z alarmonów związanych z odpowiedzią komórki bakteryjnej na działanie różnego rodzaju stresorów [56].

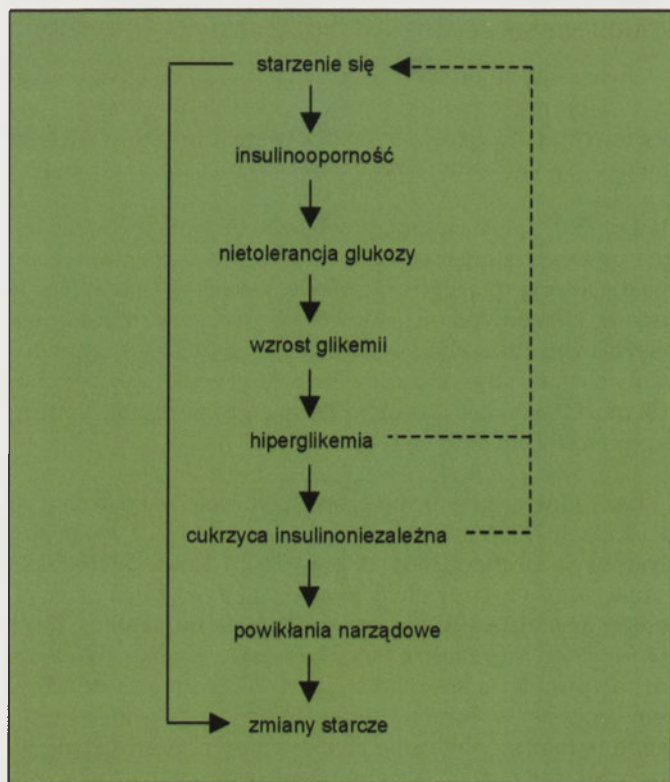
Duży wkład w ocenę roli oksydacyjnych uszkodzeń białek w starzeniu się bakterii *E. coli* mają badania prowadzone na komórkach w fazie stacjonarnej, uzyskanej przez usunięcie ze środowiska kluczowych substancji odżywczych. Wskutek utrzymywania komórek w takich warunkach, zachodzą w nich zmiany degeneracyjne (określane jako starzenie uwarunkowane; ang. *conditional senescence*), których efektem jest skrócenie czasu życia komórek (mierzonego ich zdolnością reprodukcyjną po przeniesieniu do środowiska optymalnego), utrata integralności struktur komórkowych oraz śmierć [49]. Doświadczenia z wykorzystaniem fazy stacjonarnej pokazały, że w komórkach ulegających uwarunkowanemu starzeniu się można zaobserwować wzrost zawartości zmodyfikowanych oksydacyjnie białek. Sytuacja ta wydaje się o tyle paradoksalna, iż jednym z efektów pozostawiania komórek w fazie stacjonarnej jest także silna indukcja enzymów antyoksydacyjnych, w tym obu form SOD i katalazy. Co więcej, w komórkach pozbawionych naturalnej ochrony antyoksydacyjnej, poziom grup karbonylowych jest wielokrotnie wyższy, a wymieranie mutantów znacząco przyspieszone [55]. W związku z tymi rozbieżnościami powstaje pytanie o rzeczywisty udział RFT i enzymów antyoksydacyjnych w gromadzeniu się zmodyfikowanych białek w procesie starzenia się *E. coli*. Wyjaśnienia tej pozornej niespójności dostarczyły doświadczenia z wykorzystaniem komórek traktowanych streptomycyną, czego efektem jest wzrost częstości błędów w procesie translacji białek oraz nagromadzenie grup karbonylowych, bez jednoczesnego wzrostu generowania RFT, czy dysfunkcji enzymów antyoksydacyjnych [57]. Wyniki tych badań sugerują, że rzeczywistą przyczyną gromadzenia się w komórkach zmodyfikowanych oksydacyjnie białek jest zwiększona produkcja polipeptydów o nieprawidłowej strukturze, cechujących się nasiloną podatnością na działanie czynników utleniających [56]. Trzeba jednak nadmienić, że oksydacyjne modyfikacje białek spowodowane błędami w translacji są bardziej efektem starzenia się *E. coli* niż jego przyczyną, czego dowodzi brak różnic w długości życia między szczepem dzikim a mutantami posiadającymi allel *rpsL141*, usprawniający funkcję rybosomów i znoszący ryzyko błędnej translacji [58].

## STRES OKSYDACYJNY JAKO ELEMENT ŁĄCZĄCY STARZENIE SIĘ KOMÓREK I ORGANIZMU JAKO CAŁOŚCI

Uważa się, że proces starzenia się komórek obserwowany *in vitro* może być jednym z wykładników starzenia się organizmu jako całości *in vivo*. Związku takiego dowodzi między innymi odwrotna zależność między potencjałem podziałowym komórek a kalendarzowym wiekiem ich dawcy [59]. Także badania stresu oksydacyjnego związane z procesem starzenia się komórek są zbieżne z powszechnie uznawaną rolą tego czynnika w kontekście starzenia się ustroju. Jako dowód na to można przytoczyć wzrost stopnia oksydacyjnych modyfikacji DNA (np. 8-OH-dG) obserwowany u osób starszych. Zaawansowany wiek dawcy komórek może także decydować o tempie gromadzenia się tego typu uszkodzeń [60].

Jako główną przyczynę gromadzenia się oksydacyjnych uszkodzeń DNA wraz z wiekiem uważa się postępującą dysfunkcję mechanizmów naprawczych. Przykładem takiej sytuacji może być zależny od wieku spadek wydajności systemów wycinających błędnie wstawione nukleotydy (ang. *nucleotide excision repair*), który łączy się przyczynowo z obniżoną produkcją specyficznych białek biorących udział w tym procesie. W tkance nerwowej starych gryzoni odnotowano natomiast obniżenie efektywności naprawy podwójnych pęknięć nici DNA za pomocą niehomologicznego scalania końców DNA (ang. *non-homologous end-joining*), związane z niewydolnością polimerazy  $\beta$  oraz ligazy DNA. W badaniach przeprowadzonych na nicieniach *Caenorhabditis elegans* oszacowano, że zależny od starzenia się organizmu spadek zdolności naprawczych DNA może sięgać nawet 30–50% [61].

Wpływ stresu oksydacyjnego na proces starzenia się organizmu można także rozpatrywać z punktu widzenia określonych patologii. Jedną z chorób przebiegających w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego i wpływających zarazem na długość życia pacjenta jest cukrzyca. Szacuje się, że przewidywana długość życia chorych z cukrzycą typu 2 (90% pacjentów cierpi na tę odmianę choroby) skraca się o około 5–10 lat. Główną przyczyną stresu oksydacyjnego u chorych na cukrzycę są metaboliczne torry przemian podwyższonego stężenia glukozy, która podlegając m.in. procesom autooksydacji, glikacji i szlaku poliowego staje się silnym źródłem RFT [62]. Warto jednak zauważyć, że o ile wpływ procesu starzenia się na rozwój cukrzycy typu 2, związany ze zmianami wstecznymi w trzustce i rozwojem insulinooporności tkanek obwodowych, jest powszechnie znany, o tyle zależność biegnąca w przeciwnym kierunku, tj. wpływ cukrzycy na tempo starzenia się nie jest do końca poznany. Istnieje przypuszczenie, że wzrastające wraz z wiekiem stężenie glukozy (tempo tego wzrostu szacowane jest na około 1–2 mg/dl na dekadę przy pomiarze na czczo) może być jedną z wiodących przyczyn dysfunkcji wielonarządowej u osób starszych. Odzwierciedleniem związku między hiperglikemią, cukrzycą i procesem starzenia się, stanowiącego podstawę tzw. „glukozowej teorii starzenia się” jest podobieństwo zaburzeń narządowych (np. zaćma, artropatia, miażdżyca) występujących u osób cierpiących na cukrzycę oraz osób w wieku podeszłym [63] (Ryc. 3).



Rycina 3. Związek między procesem starzenia się, hiperglikemią i rozwojem cukrzycy insulinozależnej. Strzałki ciągłe oznaczają wpływ procesu starzenia się na rozwój cukrzycy i jej powikłań narządowych, natomiast strzałki przerywane - wpływ upośledzonej gospodarki glukozowej na proces starzenia się.

Zgodnie z obserwacjami poczynionymi w skali całego organizmu są także wyniki badań wpływu podwyższonego stężenia glukozy (imitującego warunki hiperglikemiczne) na proces starzenia się komórek *in vitro*. Antyproliferacyjne działanie podwyższonego stężenia glukozy wykazano m.in. na fibroblastach [64], komórkach śródbłonna naczyń [65] i komórkach mezotelialnych [66]. Stwierdzono także, że fibroblasty wyizolowane od chorych na cukrzycę charakteryzują się niższą liczbą osiągniętych podziałów, jak również przyspieszonym tempem rozwoju fenotypowych oznak starzenia się [64]. Doświadczenia przeprowadzone na modelu komórek mezotelialnych pokazały natomiast, że tempo starzenia się komórek poddawanych działaniu glukozy można ograniczyć poprzez zastosowanie substancji o charakterze antyoksydantów, co potwierdza udział RFT w promującym starzenie się wpływie glukozy [67]. Wykazano ponadto, że wysokie stężenie glukozy może upośledzać metabolizm mitochondriów, czego efektem jest spadek potencjału błony wewnętrznej oraz wzrost biogenezy tych organelli. Co istotne jednak, zaobserwowano także istnienie dodatniej zależności między ilością wytwarzanych przez mitochondria RFT a masą mitochondriów, co oznacza, że produkcja RFT w przeliczeniu na jednostkę masy mitochondrialnej w komórkach rosnących w obecności podwyższonego i prawidłowego stężenia glukozy jest bardzo podobna. Wynik ten nasuwa przypuszczenie, że główną przyczyną zwiększonego wytwarzania RFT w komórkach ekspozowanych na podwyższone stężenie glukozy jest nie tyle wzrost ich uwalniania z mitochondriów *per se*, co raczej wzmożona biogeneza tych organelli [66].

## PODSUMOWANIE

Rolę stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się można rozpatrywać zarówno na poziomie pojedynczych komórek, jak i całych organizmów. Co więcej, zbieżność tych dwóch zjawisk, zbadaną dogłębnie w odniesieniu do komórek i/lub organizmów wyższych, można także uchwycić w organizmach eukariotycznych o budowie jednokomórkowej oraz prokariotycznych komórkach bakteryjnych. Daje to podstawę do postawienia tezy, że zarówno stres oksydacyjny, jak i proces starzenia się są zjawiskami o charakterze uniwersalnym, które w sposób trwały zostały zachowane w ewolucji na różnych szczeblach organizacji drzewa filogenetycznego. Jeśli jest tak rzeczywiście, to szczególnie duże oczekiwania można pokładać w badaniach modelowych organizmów jednokomórkowych, których relatywnie niedługi czas życia oraz wysoka homogenność populacji (będąca przeciwieństwem naturalnej heterozygotyczności organizmów wyższych) stanowi szansę modelowania związków przyczynowo-skutkowych łączących te dwa procesy, co powinno pomóc w zdefiniowaniu strategii (być może opierających się na nowoczesnych metodach inżynierii genetycznej) pozwalających na skuteczną walkę zarówno z fenotypowymi oznakami starzenia, jak i chorobami związanymi z tym procesem.

## PIŚMIENNICTWO

- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
- Norwood TH, Pendergrass WR (1992) The cultured diploid fibroblast as a model for the study of cellular aging. *Crit Rev Oral Biol Med* 3: 353-370
- Powell CD, Van Zandycke SM, Quain DE, Smart KA (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology* 146: 1023-1034
- Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 3: e45
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729-740
- Campisi J (1997) The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33: 703-709
- von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP (2005) Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 126: 111-117
- Itahana K, Dimri G, Campisi J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268: 2784-2791
- Kang MK, Guo W, Park NH (1998) Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ* 9: 85-95
- Ksiazek K, Passos JF, Olijslagers S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2007) Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 707-711
- Sherr CJ, DePinho RA (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102: 407-410
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passos C, Shay JW, Wright WE (2001) Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15: 398-403
- Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TB, von ZT (2007) Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5: e110

14. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A, Witowski J (2008) Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med* 45: 460-467
15. Frippiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O (2002) Signal transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 33: 1334-1346
16. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 220: 186-193
17. Richter C (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 241: 1-5
18. Allen RG, Tresini M, Keogh BP, Doggett DL, Cristofalo VJ (1999) Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol* 180: 114-122
19. von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339-344
20. von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28: 64-74
21. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Olijslagers S, Jorres A, von Zglinicki T, Witowski J (2009) Vulnerability to oxidative stress and different patterns of senescence in human peritoneal mesothelial cell strains. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R374-R382
22. Lorenz M, Saretzki G, Sitte N, Metzkow S, von Zglinicki T (2001) BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radic Biol Med* 31: 824-831
23. Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G (2003) Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278: 6824-6830
24. Mortimer RK, Johnston JR (1959) Life span of individual yeast cells. *Nature* 183: 1751-1752
25. Muller I (1985) Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51: 1-10
26. Austriaco NR Jr. (1996) Review: to bud until death: the genetics of aging in the yeast, *Saccharomyces*. *Yeast* 12: 623-630
27. Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310: 154-157
28. Austriaco NR, Jr., Guarente LP (1997) Changes of telomere length cause reciprocal changes in the lifespan of mother cells in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9768-9772
29. Mills KD, Sinclair DA, Guarente L (1999) MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97: 609-620
30. Egilmez NK, Jazwinski SM (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171: 37-42
31. Sinclair DA, Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles — a cause of aging in yeast. *Cell* 91: 1033-1042
32. Brennan RJ, Swoboda BE, Schiestl RH (1994) Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Mutat Res* 308: 159-167
33. Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kohlwein S, Dawes I, Frohlich KU, Breitenbach M (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 39: 1166-1173
34. Palermo V, Falcone C, Mazzoni C (2007) Apoptosis and aging in mitochondrial morphology mutants of *S. cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* 52: 479-483
35. Salmon TB, Evert BA, Song B, Doetsch PW (2004) Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 32: 3712-3723
36. Guidot DM, McCord JM, Wright RM, Repine JE (1993) Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo*. *J Biol Chem* 268: 26699-26703
37. Kirchman PA, Kim S, Lai CY, Jazwinski SM (1999) Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152: 179-190
38. Grzelak A, Macierzynska E, Bartosz G (2006) Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Gerontol* 41: 813-818
39. Reverter-Branch, Cabisco E, Tamarit J, Ros J (2004) Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction. *J Biol Chem* 279: 31983-31989
40. Lin SJ, Kaerberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344-348
41. Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18: 12-16
42. Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD (2000) A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6658-6663
43. Smith DL, Jr., Li C, Matecic M, Maqani N, Bryk M, Smith JS (2009) Calorie restriction effects on silencing and recombination at the yeast rDNA. *Aging Cell* 8: 633-642
44. Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ (2004) Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 49883-49888
45. Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 28: 659-664
46. Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. *J Biol Chem* 271: 12275-12280
47. Ackermann M, Stearns SC, Jenal U (2003) Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* 300: 1920
48. Watve M, Parab S, Jogdand P, Keni S (2006) Aging may be a conditional strategic choice and not an inevitable outcome for bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14831-14835
49. Fredriksson A, Nystrom T (2006) Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 9: 612-618
50. Nystrom T (2007) A bacterial kind of aging. *PLoS Genet* 3: e224
51. Maisonneuve E, Ezraty B, Dukan S (2008) Protein aggregates: an aging factor involved in cell death. *J Bacteriol* 190: 6070-6075
52. Gonzalez-Flecha B, Demple B (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 13681-13687
53. Imlay JA, Fridovich I (1991) Superoxide production by respiring membranes of *Escherichia coli*. *Free Radic Res Commun* 12-13: 59-66
54. Farr SB, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55: 561-585
55. Dukan S, Nystrom T (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 274: 26027-26032
56. Nystrom T (2003) Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol Microbiol* 48: 17-23
57. Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nystrom T (2000) Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5746-5749
58. Ballesteros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nystrom T (2001) Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J* 20: 5280-5289
59. Ksiazek K, Winckiewicz M, Staniszewski R, Breborowicz A, Witowski J (2007) Correlation between the donor age and the proliferative life-

- span of human peritoneal mesothelial cells *in vitro*: is TGF-beta1 a link? *Exp Gerontol* 42: 840-843
60. Ksiazek K, Piatek K, Witowski J (2008) Impaired response to oxidative stress in senescent cells may lead to accumulation of DNA damage in mesothelial cells from aged donors. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 335-339
61. Chen JH, Hales CN, Ozanne SE (2007) DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* 35: 7417-7428
62. Ksiazek K, Wisniewska J (2001) The role of glucose and reactive oxygen species in the development of vascular complications of diabetes mellitus. *Przegl Lek* 58: 915-918
63. Ksiazek K, Witowski J (2008) Impaired insulin signaling and human ageing. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62: 263-271
64. Blazer S, Khankin E, Segev Y, Ofir R, Yalon-Hacohen M, Kra-Oz Z, Gottfried Y, Larisch S, Skorecki KL (2002) High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 93-101
65. McGinn S, Poronnik P, King M, Gallery ED, Pollock CA (2003) High glucose and endothelial cell growth: novel effects independent of autocrine TGF-beta 1 and hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1374-C1386
66. Ksiazek K, Passos JF, Olijslagers S, von Zglinicki T (2008) Mitochondrial dysfunction is a possible cause of accelerated senescence of mesothelial cells exposed to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 793-799
67. Ksiazek K, Breborowicz A, Jorres A, Witowski J (2007) Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 42: 636-641

## Oxidative stress as an universal cause of aging – from human somatic cells to the unicellular yeast and bacteria

Krzysztof Książek

Poznań University of Medical Sciences, Department of Pathophysiology, 6 Święcickiego St., 60-781 Poznań, Poland

✉ e-mail: kksiazek@ump.edu.pl

**Key words:** antioxidants, diabetes, DNA damage, reactive oxygen species, cellular senescence, oxidative stress

### ABSTRACT

Oxidative stress is one of the major causes of aging considered at both the cellular and organismal levels. There is evidence that this agent may also constitute a common element connecting the aging of cells of higher organisms with a similar process occurring in eukaryotic and prokaryotic unicellulars. The aim of this paper was to present the current state of knowledge on the role of oxidative stress in aging of human somatic cells, human as a whole as well as the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria *Caulobacter crescentus*, and *Escherichia coli*.



# Białkowe fosfatazy tyrozynowe – endogenne markery stresu oksydacyjnego

## STRESZCZENIE

Odwracalna fosforylacja białek strukturalnych i regulatorowych jest ważnym mechanizmem kontroli w komórkach eukariotycznych. Białkowe fosfatazy tyrozynowe regulują ścieżki transdukcji sygnału, które kontrolują liczne funkcje komórek, m.in. proliferację, różnicowanie i wzrost. Zaburzenia w ekspresji kodujących je genów mogą przyczynić się do powstawania m.in. nowotworów oraz chorób neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych. Enzymy te posiadają w centrum katalitycznym charakterystyczną sekwencję reszt aminokwasowych, wewnątrz której znajduje się wrażliwa na utlenienie reszta cysteiny, warunkująca aktywność enzymu jedynie w stanie zredukowanym. Odwracalne utlenienie katalitycznej reszty cysteiny jest głównym mechanizmem regulacji ich aktywności enzymatycznej. Właściwość ta sprawia, że białkowe fosfatazy tyrozynowe mogą być uważane za bardzo czułe markery stresu oksydacyjnego. Wielokrotnie wykazano, że aktywność białkowych fosfataz tyrozynowych może być zahamowana przez powstałe w warunkach stresu oksydacyjnego reaktywne formy tlenu.

## WPROWADZENIE

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się roli stresu oksydacyjnego w patogenezie szeregu groźnych chorób. Stres oksydacyjny kojarzony jest z różnymi procesami patofizjologicznymi, m.in. powstawaniem nowotworów, chorobami układu krążenia, chorobami nerek, czy zmianami zwyrodnieniowymi związanymi z wiekiem [1]. Istnieje wiele danych na temat znaczenia stresu oksydacyjnego w rozwoju m.in. choroby Alzheimera oraz innych chorób neurodegeneracyjnych [2], jak również w dnie moczanowej, zapaleniu trzustki, miażdżycy [3] a także w procesie starzenia się organizmu [4].

Zjawisko stresu oksydacyjnego występuje, gdy dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy wytwarzaniem prooksydantów a ich usuwaniem przez ustrojowe systemy antyoksydacyjne, na korzyść tych pierwszych. Jest to związane ze wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu, do których zalicza się wolne rodniki, nadtlenki, tlen singletowy, przekraczającym zdolności kompensacyjne komórek i organizmu, prowadzącym do uszkodzenia struktur i upośledzenia funkcji komórek [5].

## ODWRACALNA FOSFORYLACJA

Precyzyjna regulacja aktywności metabolicznej komórki realizuje się poprzez kontrolę ekspresji genów oraz konformacji ich białkowych produktów. Jednym z kluczowych mechanizmów wpływających na strukturę i funkcję enzymów, uczestniczących w przekazywaniu sygnału w komórkach organizmów eukariotycznych, jest odwracalna fosforylacja białkowych domen regulatorowych. Uniwersalny charakter odwracalnej fosforylacji wynika m.in. z wysokiej gęstości ładunku elektrycznego w przyłączanej grupie fosforanowej, a co za tym idzie możliwości tworzenia stabilizujących wiązań wodorowych z otaczającymi ją resztami aminokwasowymi. Mechanizm ten pełni istotną rolę w przekazywaniu sygnału wewnątrz komórki oraz sygnalizacji międzykomórkowej. Stan ufosforylowania białek definiuje właściwości, w tym aktywność katalityczną enzymów. Modyfikacja stanu fosforylacji białka może zachodzić spontanicznie lub w wyniku działania specyficznych enzymów, kinazy i fosfataz białkowych. Kinazy białkowe biorą udział w reakcji przyłączenia grupy fosforanowej do niektórych reszt aminokwasowych z wykorzystaniem energii, podczas gdy fosfatazy białkowe hydrolitycznie usuwają grupę fosforanową [6].

Kinazy białkowe przenoszą grupę fosforanową z adenozyntrifosforanu (ATP) na specyficzne białka, najczęściej na resztę seryny, treoniny lub tyrozyny. Kowalencyjne przyłączenie grupy fosforanowej zmienia konformację białka i tym samym jego zdolność do oddziaływania z ligandem. Fosfatazy usuwają grupy fosforanowe, przywracając białko do poprzedniej nieufosforylowanej postaci. Tym samym cykl fosforylacji/defosforylacji może być traktowany jako molekularny włącznik lub wyłącznik (Ryc. 1). Regulacja aktywności białka zachodzi na drodze allosterycznej

Alicja Kuban-Jankowska

Magdalena Górka

Adam Dębicki

Urszula Popowska

Narcyz Knap

Michał Woźniak

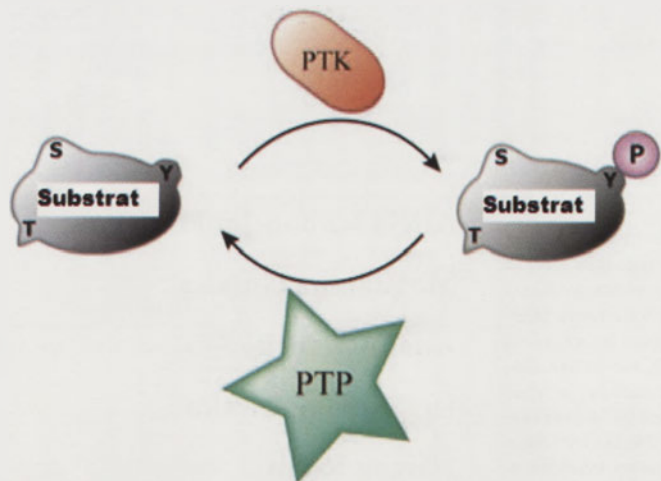
Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

☒Katedra i Zakład Chemii Medycznej GUMed, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk; tel.: (58) 349 14 50, e-mail: alicjakuban@gumed.edu.pl

Artykuł otrzymano 20 kwietnia 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 29 maja 2010 r.

**Słowa kluczowe:** białkowe fosfatazy tyrozynowe, odwracalna fosforylacja, katalityczna reszta cysteiny, stres oksydacyjny

**Podziękowanie:** Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu badawczego Nr N401 029537 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wzrostu.



Rycina 1. Mechanizm fosforylacji i defosforylacji reszt tyrozynowych białek. Odwracalna fosforylacja reszt tyrozynowych białek zachodzi na podstawie przeciwnego działania białkowych kinaz (PTKs, ang. *protein tyrosine kinases*) i fosfataz tyrozynowych (PTPs, ang. *protein tyrosine phosphatases*) (na podstawie [14]).

zmiany konformacji, bezpośrednio wpływającej na aktywność katalityczną lub powinowactwo względem ligandu [7].

Fosforylacja reszt tyrozynowych białek odgrywa ważną rolę w procesach regulacyjnych zwłaszcza dotyczących proliferacji i różnicowania komórek, a w konsekwencji tkanek i narządów. Ma istotne znaczenie w przekazywaniu sygnałów w komórkach, może wpływać na kształt i ruchliwość komórek, przebieg procesów metabolicznych lub transport cząsteczek. Poziom fosforylacji reszt tyrozyny kontrolowany przez działające przeciwnie białkowe kinazy i fosfatazy tyrozynowe, zależy od aktywności obu tych grup enzymów [8].

## ZNACZENIE I FUNKCJE BIAŁKOWYCH FOSFATAZ TYROZYNOWYCH

W genomie człowieka można znaleźć 90 genów kodujących białkowe kinazy tyrozynowe i 107 genów kodujących białkowe fosfatazy tyrozynowe (które stanowią 3% genomu kodującego białka). Spośród 90 białkowych kinaz tyrozynowych, 85 jest katalitycznie aktywnych, natomiast wśród 107 białkowych fosfataz tyrozynowych, 81 posiada zdolność defosforylacji. Liczba aktywnych katalitycznie kinaz i fosfataz tyrozynowych jest więc porównywalna, co sugeruje podobny poziom złożoności w obrębie tych dwóch rodzin [9]; dodatkowym generatorem różnorodności obu grup enzymów są alternatywne promotory, proces alternatywnego składania mRNA i modyfikacje potranslacyjne [10].

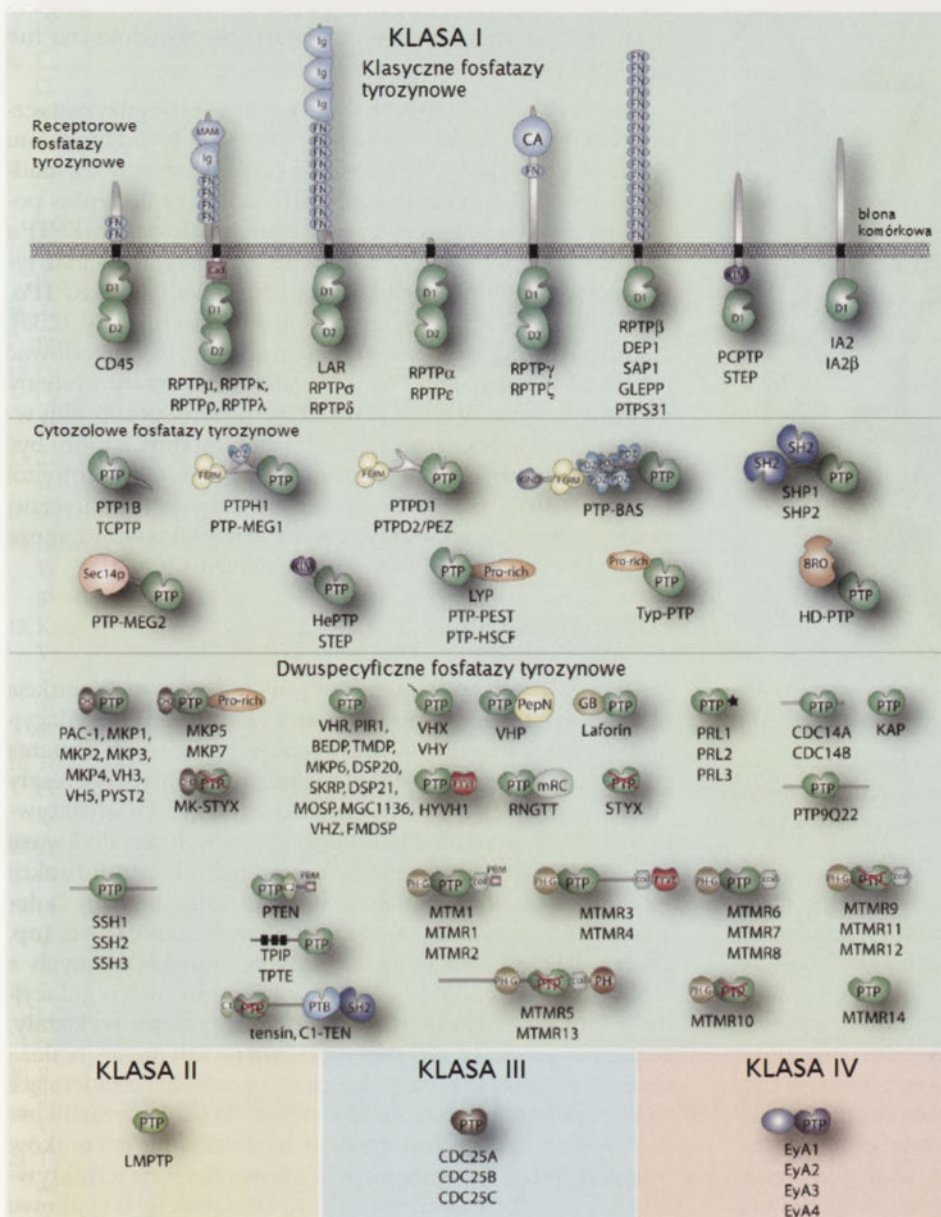
Wydaje się, że w przeciwieństwie do kinaz białkowych, relatywnie mniej miejsca w piśmiennictwie poświęcono fosfatazom białkowym (PTPs, ang. *protein tyrosine phosphatases*) [11]. Mechanizmy regulacji białkowych fosfataz tyrozynowych, będących modulatorami sygnalizacji komórkowej, a tym samym rozlicznych funkcji komórek są wciąż nie do końca poznane i stanowią przedmiot dociekań naukowych w dziedzinie biologii i biochemii komórki. Nieprawidłowe działanie tych fosfataz jest bowiem kojarzone z licznymi patologiami, w tym z procesami nowotworzenia [12]. Fosfatazy te mają też związek z patogenezą chorób metabo-

licznych i wirusowych [13]. Białkowe fosfatazy tyrozynowe są ważne dla prawidłowego funkcjonowania systemu odpornościowego, a zmiany ekspresji kodujących je genów mogą być jedną z przyczyn powstawania niektórych nowotworów, takich jak szpiczak mnogi, chłoniak czy glejak [14] oraz chorób autoimmunologicznych np. ciężki złożony niedobór immunologiczny (SCID) lub stwardnienie rozsiane (SM) [15,16]. Mutacje w genach kodujących białkowe fosfatazy tyrozynowe prowadzą także do rozwoju zespołu Noonana – genetycznie uwarunkowanego zespołu wad wrodzonych czy młodzieńczej białaczki szpikowej [17].

## KLASYFIKACJA BIAŁKOWYCH FOSFATAZ TYROZYNOWYCH

Fosfatazy białkowe w zależności od specyficzności względem substratu można zaklasyfikować do trzech grup: fosfataz serynowo-treoninowych, fosfataz tyrozynowych oraz fosfataz specyficznych dla reszt tyrozyny oraz seryny/treoniny [18] (Ryc. 2). W zależności od struktury pierwszorzędowej domeny katalitycznej, wyróżnia się cztery klasy białkowych fosfataz tyrozynowych. Klasa I, do której należy największa liczba fosfataz tyrozynowych, zawiera 38 klasycznych fosfataz tyrozynowych (ściśle tyrozynowo-specyficznych) oraz 61 fosfataz dwuspecyficznych. Klasę II w genomie człowieka reprezentuje tylko jeden gen kodujący stosunkowo niewielką (18 kDa) tyrozynowo-specyficzną fosfatazę LMWPTP. Trzy fosfatazy tyrozynowo-treoninowe, pełniące rolę regulatorów cyklu komórkowego człowieka, tworzą klasę III [9]. Klasa IV obejmuje zaledwie cztery fosfatazy tyrozynowe lub serynowo-tyrozynowe, różniące się od fosfataz innych klas obecnością katalitycznie aktywnej reszty kwasu asparaginowego. Enzymy należące do klas I-III charakteryzują się tym, że zawierają w centrum aktywnym katalityczną resztę cysteiny. Dalsza część tego opracowania dotyczyć będzie właśnie tej grupy białkowych fosfataz tyrozynowych [19].

Klasyczne fosfatazy tyrozynowe, należące do klasy I, można podzielić na fosfatazy błonowe (zwane także receptorowymi, ang. *receptor protein tyrosine phosphatases*, RPTPs) oraz na rozpuszczalne fosfatazy cytosolowe (zwane inaczej niereceptorowymi lub cytoplazmatycznymi, ang. *nonreceptor protein tyrosine phosphatases*, nrPTPs). Receptorowe fosfatazy tyrozynowe najczęściej składają się z dwóch cytoplazmatycznych domen fosfatazowych, z których jedna, bliższa błonie komórkowej, (D1) odpowiada głównie za aktywność katalityczną. Natomiast domena dystalna (D2) pełni zasadniczo rolę regulatorową [11]. Brak aktywności katalitycznej w domenie D2 wynika z mutacji dotyczącej jedynie dwóch reszt aminokwasowych, które z kolei są zachowane w ewolucji w katalitycznej aktywnej domenie D1 [20]. Strukturalna integralność domeny D2 jest jednak ważna dla aktywności, specyficzności i stabilności fosfatazy jako całości oraz odgrywa ważną rolę w oddziaływaniach białko-białko [10]. Cytosolowe fosfatazy tyrozynowe składają się z pojedynczej zachowanej w ewolucji domeny fosfatazowej połączonej ze zmienną sekwencją reszt aminokwasowych, regulującą aktywność i wewnątrzkomórkowy transport enzymu [21]. Receptorowe fosfatazy tyrozynowe znajdują się przeważnie w błonie komórkowej, podczas gdy niereceptorowe fosfatazy tyrozynowe zlokalizowane są w różnych przedziałach komórkowych, m.in. w cytoplazmie, błonie komórkowej i siateczce śródplazmatycznej [22].



Rycina 2. Podział białkowych fosfataz tyrozynowych na klasy oraz schematycznie przedstawiona budowa każdej z fosfataz. Na rycinie przedstawione są domeny: D1-katalityczna, D2-regulatorowa (na podstawie [9]).

Domena katalityczna klasycznych białkowych fosfataz tyrozynowych zawiera około 280 reszt aminokwasowych i posiada kilka krótkich motywów sekwencji, w szczególności charakterystyczną pętlę wiążącą fosforany, znajdującą się wewnątrz centrum aktywnego. Motyw ten charakteryzuje się sekwencją HCX<sub>5</sub>R, zawierającą zachowane w ewolucji reszty cysteiny i argininy. Katalityczna reszta cysteiny (w formie zredukowanej) funkcjonuje jako akceptor reszty fosforanowej i warunkuje aktywność enzymatyczną. Wszystkie enzymy należące do rodziny PTP (z wyjątkiem klasy IV) wykazują ten sam dwustopniowy mechanizm katalityczny. W pierwszym etapie następuje nukleofilowy atak atomu siarki pochodzącego z katalitycznej reszty cysteiny na resztę fosfotyrozynową substratu. Wywołuje to powstanie przejściowej formy – reszty fosfocysteiny, która w następnym etapie jest hydrolizowana przy udziale reszt glutaminy i kwasu asparaginowego, co ostatecznie pro-

wadzi do uwolnienia grupy fosforanowej [23]. Mutacja powodująca zmianę reszty cysteiny znajdującej się w miejscu aktywnym na resztę innego aminokwasu wywołuje całkowitą utratę zdolności katalitycznej enzymu [24].

Struktura krystaliczna jednej z fosfataz tyrozynowych PTP1B (Ryc. 3) pokazuje, że katalityczna reszta cysteiny (nukleofil w procesie katalizy) oraz zaangażowana w wiązanie fosforanu reszta argininy są zlokalizowane w niewielkiej odległości i tworzą motyw podobny do kołyski, pozwalający na utrzymanie grupy fosforanowej substratu w miejscu umożliwiającym atak nukleofilowy. Wiązanie wodorowe pomiędzy grupą hydroksylową reszty seryny (w przypadku fosfatazy PTP1B Ser222) a atomem siarki reszty cysteiny dodatkowo stabilizuje konformację centrum aktywnego wokół reszty cysteiny wiążącej substrat [25]. Znaczącym elementem struktury centrum katalitycznego jest także pętla rozpoznająca resztę fosfotyrozynową substratu, zawierająca zachowany w ewolucji motyw KNRY (w przypadku PTP1B reszty aminokwasowe 43-46). Pętla ta determinuje głębokość szczeliny centrum aktywnego oraz oddziałuje poprzez resztę tyrozyny (Tyr46) z pierścieniem aromatycznym reszty fosfotyrozyny substratu [26].

### INAKTYWACJA BIAŁKOWYCH FOSFATAZ TYROZYNOWYCH POPRZEC UTLENIE NIE KATALITYCZNEJ RESZTY CYSTEINY

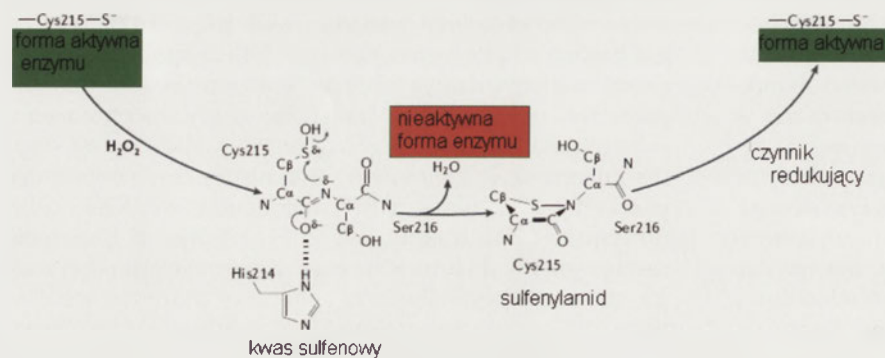
W centrum aktywnym białkowych fosfataz tyrozynowych reszta katalitycznej cysteiny występuje w postaci anionu tiolanowego i ze względu na swoje mikrootoczenie posiada niskie  $pK_a$  (~5,4), przez co jest bardzo wrażliwa na utlenienie. Utlenienie katalitycznej reszty cysteiny hamuje zdolność enzymu do defosforylacji substratu, polegającej na transferze grupy fosforanowej z substratu na katalityczną resztę cysteiny. Zależnie od stopnia utlenienia, reszta cysteiny w centrum aktywnym może przekształcić się w resztę kwasu sulfenowego (SOH), sulfonowego (SO<sub>2</sub>H) lub sulfonowego (SO<sub>3</sub>H) (Ryc. 4). Utlenienie reszty cysteiny do formy kwasu sulfenowego jest odwracalne, albowiem powstały kwas sulfenowy może być zredukowany w komórce przez tioredoksynę lub glutation. Odpowiednio wysoki potencjał oksydacyjny środowiska może spowodować konwersję reszty cysteiny do nieodwracalnej formy kwasu sulfinowego lub sulfonowego [27]. Okazuje się jednak, że sulfiredoksyna może redukować resztę kwa-



Rycina 3. Struktura krystaliczna fosfatazy PTP1B. Charakterystyczny dla fosfataz tyrozynowych motyw przyjmuje konformację podobną do kołyski i tworzy podstawę centrum aktywnego (na podstawie [25]).

su sulfinowego peroksyredoksyny Tsa1 w obecności jonów magnezu i ATP [28]. Peroksyredoksyna, podobnie jak fosfatazy tyrozynowe, zawiera w centrum katalitycznym aktywną redoksoowo resztę cysteiny [29].

Odwracalne utlenienie reszty katalitycznej cysteiny jest charakterystycznym mechanizmem regulacji białkowych fosfataz tyrozynowych. Powrót formy utlenionej do aktywnej formy zredukowanej możliwy jest dzięki konwersji kwasu sulfinowego do przejściowej struktury sulfenylamidu. Bliskie położenie reszt histydyny i cysteiny w tej strukturze powoduje polaryzację wiązania amidowego, umożliwiając atak nukleofilowy atomu azotu reszty serynowej na atom siarki reszty cysteiny w kwasie sulfinowym. Prowadzi to do kondensacji i utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomami siarki i azotu. Sulfenylamid może być następnie zredukowany do aktywnej formy anionu tiolanowego [30]. Utworzenie sulfenylamidu powoduje zmiany konformacyjne w centrum katalitycznym enzymu, co chroni katalityczną resztę cysteiny przed nieodwracalnym utlenieniem do kwasu sulfinowego i sulfonowego oraz



Rycina 4. Mechanizm utleniania i redukcji reszty katalitycznej cysteiny oraz powstanie przejściowej formy sulfenylamidu (na podstawie [10]).

ułatwia reaktywację enzymu poprzez działanie biologicznych czynników redukujących takich jak tioredoksyna lub glutation [31].

Wyniki wielu badań wykazały, że aktywność enzymatyczna białkowych fosfataz tyrozynowych zależy od poziomu stresu oksydacyjnego. Ustalono, że czynniki stresowe tj. nadtlenek wodoru, promieniowanie UV, a także szok cieplny powodują inaktywację receptorowej białkowej fosfatazy RPTPa [19]. Stwierdzono inaktywację wielu białkowych fosfataz tyrozynowych, m.in. PTP1B, CD45, LAR, PTEN, TC45, RPTPa, SHP-1, SHP-2, DEP-1 przez nadtlenek wodoru [11,30,32,33]. Nadtlenek wodoru jest czynnikiem mogącym powodować odwracalne utlenienie reszty katalitycznej reszty cysteiny do kwasu sulfinowego, a utracona w ten sposób aktywność enzymatyczna w warunkach laboratoryjnych może być przywrócona dzięki reduktorom tioli, takim jak ditiotreititol [34,35]. Jednakowoż długotrwała ekspozycja katalitycznej reszty cysteiny na wysokie stężenie nadtlenu wodoru, może prowadzić do jej nieodwracalnego utlenienia [21,24].

## PODSUMOWANIE

Wyniki wielu badań naukowych sugerują, że produkcja reaktywnych form tlenu związana ze stresem oksydacyjnym, może powodować inaktywację białkowych fosfataz tyrozynowych, a odwracalne utlenienie katalitycznej reszty cysteiny uznano za główny mechanizm regulacji ich aktywności [32]. Odwracalne utlenienie grupy tiolowej do kwasu sulfinowego jest uniwersalnym systemem kontroli funkcji biologicznych wielu białek. Białka zawierające grupy tiolowe odgrywają ważną rolę w sygnalizacji komórkowej (np. H-Ras, PTP1B), wiązaniu czynników transkrypcyjnych z DNA (np. Nrf-2, NF- $\kappa$ B) i wielu innych procesach regulacyjnych [36]. Już wczesne badania nad enzymami wykazały, że niemal połowa z nich jest wrażliwa na utlenienie. Należą do nich fosfatazy, kinazy, kaspazy i proteazy, zawierające resztę cysteiny w centrum aktywnym. Wysoka wrażliwość białkowych fosfataz tyrozynowych na działanie czynników utleniających, a także stosunkowo łatwa detekcja ich aktywności, pozwala wykorzystać je w charakterze wyjątkowo czułych biosensorów poziomu stresu oksydacyjnego.

## PIŚMIENNICTWO

- Griendling KK, Fitzgerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury. Basic mechanism and *in vivo* monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916
- Wehr H (2006) Stres oksydacyjny i choroby nerodegeneracyjne. *Czynniki Ryzyka* 1: 3-8
- Sokołowska M, Włodek L (2001) Dobre i złe strony tlenu azotu. *Folia Cardiol* 8: 467-477
- Sun X, Majumder P, Shioya H, Wu F, Kumar S, Weichselbaum R, Kharbanda S, Kufe D (2000) Activation of the cytoplasmic c- Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275: 17237-17240
- Krejsa CM, Schieven GL (1998) Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Env Health Persp* 106: 1179-1184
- Obuchowski M (2005) Serynowo-treoninowe fosfatazy białkowe w *Bacillus subtilis*. *Postepy Biochem* 51: 95-104

7. Johnson LN, Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 101: 2209-2242
8. Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, Ramponi G (1998) The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 273: 32554-32560
9. Alonso A, Sasin J, Bottini I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711
10. Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Mol Cell Biol* 26: 833-846
11. den Hertog J, Groen A, van der Wijk T (2005) Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Arch Biochem Biophys* 434: 11-15
12. Dawes R, Petrova S, Liu Z, Wraith D, Beverley PCL, Tchilian EZ (2006) Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol* 176: 3417-3425
13. Zhang Z (1998) Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 1-52
14. Navis AC, van den Eijnden M, Schepens JTG, van Huijsduijnen RH, Wesseling P, Hendriks WJAJ (2010) Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. *Acta Neuropathol* 119: 157-175
15. Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LJ, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML (2000) Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 6: 343-345
16. Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PCL (2001) A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* 166: 1308-1313
17. Zheng H, Alter S, Qu C (2009) SHP-2 tyrosine phosphatase in human diseases. *Int J Clin Exp Med* 2: 17-25
18. Hendriks WJ, Elson A, Harroch S, Stoker AW (2008) Protein tyrosine phosphatases: functional inferences from mouse models and human diseases. *FEBS J* 275: 816-830
19. Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, Hedge RS (2003) Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* 426: 295-298
20. Blanchetot C, Tertoolen LGJ, den Hertog J (2002) Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$  by oxidative stress. *EMBO J* 21: 493-503
21. Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45 and LAR by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 369: 197-207
22. Stoker AW (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* 185: 19-33
23. Tabernero L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlaczek E (2008) Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J* 275: 867-882
24. Barrett DM, Black SM, Todor H, Schmidt-Ulrich RK, Dawson KS, Mikkelsen RB (2005) Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. *J Biol Chem* 280: 14453-14461
25. van Montfort RLM, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H (2003) Oxidation state of active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423: 773-777
26. Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, Jansen PG, Andersen HS, Tonks NK, Moller NP (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* 21: 7117-7136
27. Chiarugi P, Cirri P (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28: 509-514
28. Biteau B, Labarre J, Toledano MB (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425: 980-984
29. Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG (2003) Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. *J Biol Chem* 278: 47361-47364
30. Persson C, Sjoblom T, Groen A, Kappert K, Engstrom U, Hellman U, Heldin CH, den Hertog J, Ostman A (2004) Preferential oxidation of second phosphatase domain of receptor-like PTP- $\alpha$  revealed by an antibody against oxidized protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1886-1891
31. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, Barford D (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase PTP1B involves a sulfenylamide intermediate. *Nature* 423: 769-773
32. Meng TC, Buckley DA, Galic S, Tiganis T, Tonks NK (2004) Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J Biol Chem* 279: 37716-37725
33. Juarez JC, Manula M, Burnett ME, Betancourt O, Boivin B, Shaw DE, Tonks NK, Mazar AP, Donate F (2008) Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7147-7152
34. Goldstein BJ, Kalyanar M, Wu X (2005) Redox paradox: Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 54: 311-321
35. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273: 15366-15372
36. Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-C868

## Protein tyrosine phosphatases – endogenous markers of oxidative stress

Alicja Kuban-Jankowska<sup>✉</sup>, Magdalena Górska, Adam Dębicki, Urszula Popowska, Narcyz Knap, Michał Woźniak

Department of Medical Chemistry, Medical University of Gdansk, ul. Debinki 1, 80-211 Gdansk, Poland

<sup>✉</sup>e-mail: alicjakuban@gumed.edu.pl

**Key words:** protein tyrosine phosphatases, reversible phosphorylation, catalytic cysteine, oxidative stress

### ABSTRACT

The reversible phosphorylation of structural and regulatory proteins in eucaryotic cells is one of the most important regulatory mechanisms. Protein tyrosine phosphatases (PTP) regulate a wide range of signal transduction pathways that control many cellular processes such as cell proliferation, differentiation and growth. Disorder in PTP gene expression is implicated in the development of cancer, autoimmune and neurodegenerative diseases. The active sites of these enzymes are characterized by the consensus sequence containing cysteine which is essential for enzyme activity and highly susceptible to oxidation. Reversible oxidation of the catalytic cysteine is becoming recognized as a general mechanism for regulation of PTP enzymatic activity. These findings suggest that protein tyrosine phosphatases may be considered as very sensitive markers of oxidative stress. Many studies have demonstrated that the production of reactive oxygen species during oxidative stress can inactivate protein tyrosine phosphatases.

# Fenolowe antyoksydanty interwencyjne – aktywność i mechanizmy działania

Ewelina Kowalewska

Grzegorz Litwinienko

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 822 02 11 (wew. 333), e-mail: litwin@chem.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 6 marca 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 27 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** wolne rodniki, peroksydacja lipidów, antyoksydanty interwencyjne, aktywność antyoksydacyjna, fenole

**Wykaz skrótów:** BDE (ang. *Bond Dissociation Enthalpy*) – entalpia dysocjacji wiązania; ET-PT (*Electron Transfer – Proton Transfer*) – przeniesienie protonu poprzedzone przeniesieniem elektronu; HAT (ang. *Hydrogen Atom Transfer*) – przeniesienie atomu wodoru; KSE (ang. *Kinetic Solvent Effect*) – Kinetyczny Efekt Rozpuszczalnikowy; LDL (ang. *Low-Density Lipoprotein*) – lipoproteiny o małej gęstości; PCET (*Proton-Coupled Electron Transfer*) – transfer elektronu sprzężony z przeniesieniem protonu; SPLET (*Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*) – przeniesienie elektronu poprzedzone deprotonacją grupy hydroksylowej; TMP (ang. *Tocopherol-Mediated Peroxidation*) – peroksydacja mediowana przez tokoferol

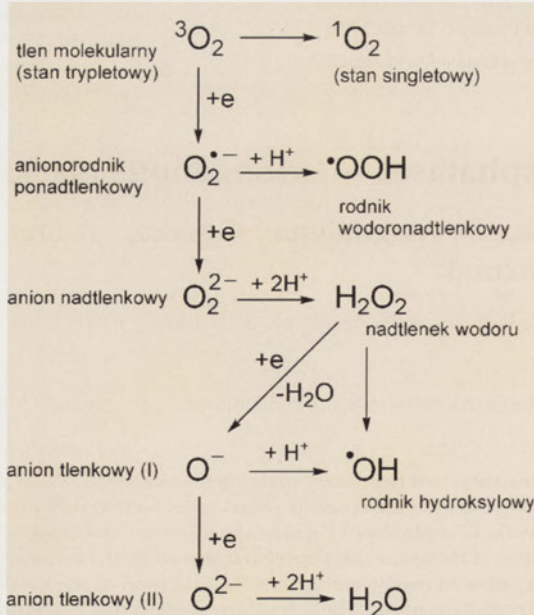
**Podziękowanie:** Praca finansowana przez MNiSW ze środków na naukę w latach 2010-2011 jako projekt badawczy N N507 452937.

## STRESZCZENIE

Rodniki wytwarzane podczas stresu oksydacyjnego reagują z lipidami błon komórkowych inicjując peroksydację – proces, w którym łańcuch kinetyczny jest przekazywany za pośrednictwem lipidowych rodników nadtlenkowych. W wyniku zaawansowanej peroksydacji błony biologiczne nie są zdolne do pełnienia funkcji ochronnych i tracą integralność. Antyoksydanty fenolowe stanowią system efektywnej ochrony błon, jednak ich skuteczność zależy od szeregu parametrów, do których należą: stechiometria reakcji z wolnymi rodnikami, rodzaj i kinetyka reakcji następczych jakim ulega rodnik fenoksylowy, polarność mikrośrodowiska, lokalizacja, stężenie i mobilność cząsteczek antyoksydanta. Na efektywność działania antyoksydantów ma wpływ także Kinetyczny Efekt Rozpuszczalnikowy oraz możliwe oddziaływania z innymi antyoksydantami. W pracy omówiono główne mechanizmy reakcji fenoli z wolnymi rodnikami: jednoetapowe przeniesienie atomu wodoru (HAT), proces uzgodnionego przeniesienia elektronu i protonu (PCET) oraz dwa mechanizmy, w których elektron i proton przenoszone są w osobnych etapach.

## WPROWADZENIE – AUTOOKSYDACJA LIPIDÓW

Autooksydacja lipidów polega na powolnym utlenianiu substancji organicznych z udziałem molekularnego tlenu w stanie podstawowym (trypletowym,  $^3\text{O}_2$ ) w niskich bądź umiarkowanych temperaturach [1]. W wysokich temperaturach ta rodnikowa reakcja przebiega bardzo gwałtownie z wydzielaniem znacznych ilości energii w postaci światła i ciepła i nazywana jest spalaniem. Pierwsze prace badawcze nad mechanizmem autooksydacji zostały podjęte w latach czterdziestych. XX wieku ze względu na znaczenie przemysłowe tego procesu, a szczególnie jego wpływ na właściwości i trwałość kauczuku, wosków i tłuszczów [2,3], dopiero w latach siedemdziesiątych powiązano autooksydację z niekorzystnymi procesami przebiegającymi w układach biologicznych. Jednocześnie znacznie poszerzyła się wiedza o roli rodników i prekursorów rodnikowych. W ostatnich 15 latach dwukrotnie Nagrodę Nobla z medycyny i fizjologii otrzymali badacze procesów o przebiegu rodnikowym (Furchgott, Ignarro i Murrad w 1998 roku, oraz Bremer, Horowitz i Sullo w 2002 roku), a odkrycia dotyczące rodnikowych mechanizmów znanych dotychczas procesów są przyjmowane z zainteresowaniem i żywo dyskutowane [4-7]



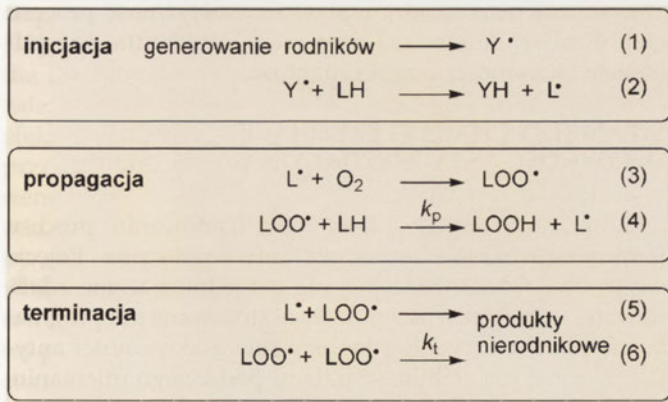
Rycina 1. Przykłady reaktywnych form tlenu powstających w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego.

Różnym procesom zachodzącym w organizmach żywych towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) (Ryc. 1) [8]. Nadmierny wzrost ilości RFT jest istotnym zaburzeniem równowagi oksydacyjno-redukcyjnej i jest nazywany stresem oksydacyjnym. Zjawisko to może prowadzić do zainicjowania autooksydacji. Ponieważ produktami autooksydacji są nadtlenki (ang. *peroxides*), często autooksydacja nazywana jest peroksydacją, jednak peroksydacja jest teminem szerszym, obejmującym powstawanie nadtlenków również w sposób nierodnikowy. W tej pracy peroksydacja oznacza

autooksydację lipidów. Peroksydacja jest przyczyną licznych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, tkanek, a nawet całego organizmu. Opisano udział peroksydacji m.in. w procesach modyfikacji struktury DNA, uszkodzenia białek, błon biologicznych, lipoprotein o małej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*) [9] oraz w kancerogenezie [10,11]. Stres oksydacyjny powiązany z procesem biologicznego starzenia się organizmu [12-16], a także z chorobami takimi jak: miażdżycą [17], choroby układu krążenia [18] oraz choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona [19], Alzheimer [20]). Peroksydacja prowadzi do powstawania nadtlenu i wodoronadtlenków będących pod względem struktury, polarności i trwałości cząsteczkami różnymi od związków wyjściowych (nieutlenionych), co przyczynia się do utraty pierwotnej funkcji biocząsteczek. Z drugiej strony, nadtlenuki i wodoronadtlenki są produktami relatywnie nietrwałymi, w obecności kationów metali przejściowych ulegającymi rozpadowi do form rodnikowych, powodując intensyfikację stresu oksydacyjnego. Obydwa aspekty są istotne biologicznie, dlatego mechanizm peroksydacji jest przedmiotem ciągłych badań [8].

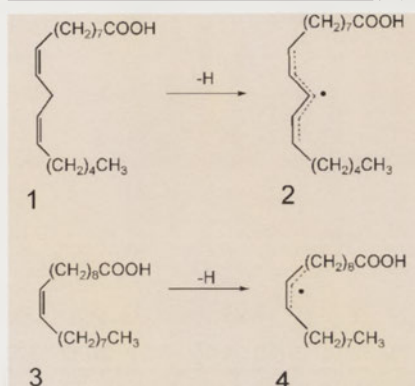
## MECHANIZM PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Peroksydacja lipidów to łańcuchowy proces o przebiegu wolnorodnikowym, zatem można w nim wyodrębnić trzy charakterystyczne etapy: inicjację, propagację i terminację (Ryc. 2) [21]. W etapie inicjacji z lipidu, LH, powstaje rodnik lipidowy L<sup>•</sup> w wyniku homolitycznego rozpadu wiązania L-H lub w wyniku oderwania atomu wodoru od L-H przez rodnik inicjujący, Y<sup>•</sup>. W rzeczywistości, łańcuch reakcji rodnikowych może być inicjowany przez światło, promieniowanie jonizujące, ciepło, wodoronadtlenki i kationy metali przejściowych. Pierwotne pochodzenie rodników Y<sup>•</sup> w układach nieożywionych jest ciągle dyskutowane, natomiast w organizmach źródłem rodników są m. in. procesy redukcji tlenu cząsteczkowego przedstawione na rycinie 1. Autooksydację w błonach komórkowych i lipoproteinach mogą inicjować enzymy, uwalniając anionrodnik ponadtlenkowy O<sub>2</sub><sup>-•</sup> będący w równowadze ze swoją protonowaną formą, rodnikiem wodoronadtlenkowym (pK<sub>a</sub> = 4,8): O<sub>2</sub><sup>-•</sup> + H<sup>+</sup> ⇌ <sup>•</sup>OOH [8]. Z kolei przykładem nieenzymatycznej reakcji inicjującej jest rozpad nadtlenu wodoru oraz rozkład nadtlenu i wodoronadtlenków. W warunkach laboratoryjnych wolne rodniki nadtlenukowe (peroksydowe) w prosty i powtarzalny sposób generuje się z molekularnych prekursorów – inicjatorów.



Rycina 2. Kinetyczne etapy autooksydacji.

Coraz częściej używane w testach *in vitro* są azozwiązki [22], np. chlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidu) (AAPH), chlorowodorek 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propanu] (AIPH) czy 2,2'-azobis(2,4-dimetylowaleronitryl) (AMVN), ze względu na odtwarzalne wartości szybkości inicjacji (R). Powstały rodnik L<sup>•</sup> reaguje bardzo szybko z tlenem cząsteczkowym z wytworzeniem rodnika nadtlenukowego LOO<sup>•</sup>. Reakcja ta jest w kontrolowana dyfuzyjnie (k<sub>3</sub> ~ 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>). Następujące po niej oderwanie atomu wodoru od cząsteczki LH przez rodnik nadtlenukowy zachodzi znacznie wolniej i jest krokiem limitującym szybkość propagacji



Rycina 3. Struktury rodników: pentadienylowego (2) i allilowego (4) oraz ich prekursorów, odpowiednio: kwasu linolowego (1) i oleinowego (3).

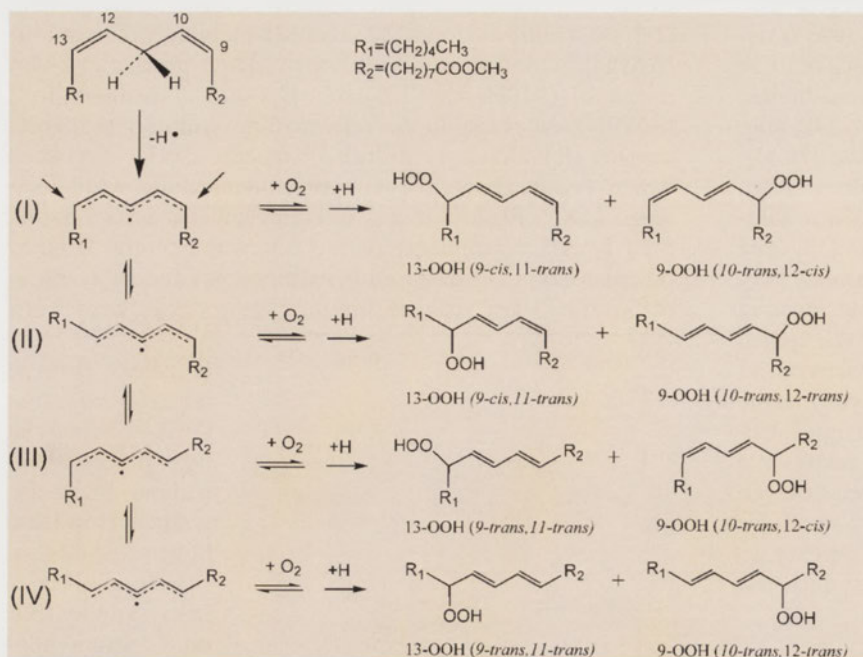
(k<sub>p</sub> zależy głównie od siły wiązania C-H). Kinetyka tego procesu była badana przez Ingolda i Howarda, którzy ustalili, że cząsteczki LH tworzące stabilny rodnik L<sup>•</sup> łatwiej ulegają autooksydacji [23]. Peroksydacja kwasu *cis,cis*-9,12-oktadekadienowego;

kwas 18:2) i jego estrów przebiega szybciej (k<sub>p</sub> = 31 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [23]) niż kwasu oleinowego (kwas 9-oktadekanoowy; kwas 18:1) i jego estrów (k<sub>p</sub> = 0,9 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [23]), ponieważ w wyniku oderwania atomu wodoru z bis-allilowej grupy metylenowej, CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH- (zaznaczona pochyłą czcionką) wytwarzany jest względnie stabilny rodnik pentadienylowy, o wiele trwalszy niż rodnik allilowy, powstający po oderwaniu atomu wodoru z którejkolwiek pozycji allilowej: -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>- podczas peroksydacji kwasu 18:1 (Ryc. 3).

Na rycinie 4 przedstawiono zaproponowany przez Portera mechanizm autooksydacji linolanu metylu. Głównymi produktami tego procesu są wodoronadtlenki utworzone przez addycję tlenu w pozycjach C-9 lub C-13 do rodnika pentadienylowego. Izomeria geometryczna produktów (*trans,cis* lub *trans,trans*) zależy od tego czy reakcja jest kontrolowana kinetycznie czy termodynamicznie [24]. Reakcje rodników nadtlenukowych z innymi biocząsteczkami (białkami, węglowodanami, steroidami) oraz powstawanie całej gamy produktów pośrednich i końcowych opisał ostatnio Denisov [1] a także Spitteller w dwóch obszernych pracach przeglądowych [9,26].

## INHIBITORY AUTOOKSYDACJI

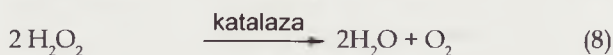
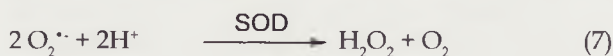
Niewielkie ilości reaktywnych form tlenu i azotu są w organizmie niezbędne m.in. w walce z czynnikami chorobotwórczymi, a także w procesie przekazywania sygnałów [4]. Są one generowane w sposób kontrolowany w takich komórkach jak na przykład makrofagi, pneumocyty, osteoblasty czy komórki śródbłonna. Wzrost stężenia RFT jest zjawiskiem szkodliwym i jest kinetycznie regulowany przy pomocy antyoksydantów (przeciwutleniaczy). Nazwa ta obejmuje różnorodne związki chemiczne, których wspólną



**Rycina 4.** Mechanizm autooksydacji linolanu metylu (wg Portera [24]) tłumaczący powstawanie sprzężonych dienów oraz *trans*-izomerów. Po oderwaniu atomu wodoru od węgla C-11 rodnik ulega izomeryzacji do struktur I-IV. Przyłączenie cząsteczki tlenu do każdego z tych izomerów prowadzi do otrzymania rodników peroksydacyjnych, które mogą ponownie ulec rozpadowi z wydzieleniem tlenu, lub mogą oderwać atom wodoru, tworząc mieszaninę względnie stabilnych 9- i 13-wodoronadtlenków zawierających skoniugowane (sprzężone) wiązania podwójne. Otrzymane związki wykazują absorpcję w 234 nm (dla lipidów trienowych maksimum absorpcji wynosi 262 nm) [25].

cechą jest hamowanie utleniania innych substancji, przy ich stosunkowo małym stężeniu (w porównaniu z substancją utlenianą) [8]. Należy w tym miejscu wspomnieć, że definicja antyoksydanta nie jest jednoznacznie ustalona. Począwszy od najstarszej i najbardziej ogólnej, w której antyoksydant to „substancja przeciwdziałająca utlenianiu i hamująca procesy wyzwalane przez tlen i nadtlaki”, poprzez definicję przemysłową: „naturalna lub syntetyczna substancja obecna lub wprowadzona do produktu w celu przeciwdziałania lub opóźnienia jego oksydacyjnej degradacji”, aż po definicję biochemiczno-medyczną, wg której antyoksydant to cząsteczka (w tym biocząsteczka/enzym) zdolna do przeciwdziałania skutkom utleniania z komórkach i tkankach. Antyoksydanty można podzielić w oparciu o sposób działania na dwie klasy: antyoksydanty prewencyjne (ang. *preventive*) i interwencyjne (ang. *chain-breaking*).

Antyoksydanty prewencyjne powodują zmniejszenie szybkości inicjowania poprzez eliminację źródeł wolnych rodników. Do klasy tej zaliczane są związki reagujące z anionrodnikiem ponadtlakowym, wodoronadtlenkami (w tym H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), neutralizujące tlen singletowy, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, oraz chelatory kationów metali. Przykładem mogą być enzymy: dysmutaza ponadtlakowa (SOD), katalazy, peroksydaza glutationowa (GPx) oraz peroksyredoksyny.

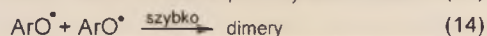
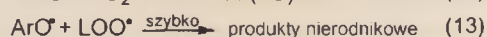
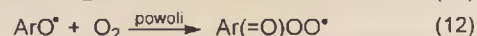
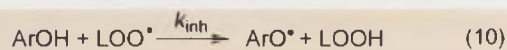


Działanie chelatorów metali przejściowych (np. miedzi czy żelaza), zapobiega peroksydacji poprzez tworzenie związków koordynacyjnych z tymi metalami. Chelatorami są białka: transferyna, ferrytyna, albumina, ceruloplazmina, a także flawonoidy [27]. Mechanizm ten odgrywa główną rolę w hamowaniu pęknięcia nici DNA [28].

Antyoksydanty interwencyjne przerywają peroksydację na etapie propagacji (reakcja 4 na rycinie 2). Przedstawicielami tej klasy są związki z grupy fenoli, amin aromatycznych, tiofenoli, tioli, niektórych węglowodorów (np. terpinowych) [29]. Ze względu na różnicowanie strukturalne, a co za tym idzie, różne powinowactwo do fazy wodnej i lipidowej, antyoksydanty interwencyjne mogą być zlokalizowane w różnych obszarach komórki.

Reakcje, jakim ulega interwencywny antyoksydant fenolowy przedstawione są na rycinie 5. Większość antyoksydantów interwencyjnych neutralizuje rodniki nadtlakowe LOO<sup>•</sup> poprzez transfer atomu wodoru (reakcja 10), tworząc stabilizowany

rezonansowo rodnik, który nie jest w stanie oderwać atom wodoru od kolejnej cząsteczki lipidu (reakcja 11) i nie reaguje z molekularnym tlenem (reakcja 12), natomiast szybko rekombinuje z innymi rodnikami (reakcje 13-14):



**Rycina 5.** Reakcja antyoksydanta fenolowego (ArOH, gdzie Ar oznacza pierścień aromatyczny) z rodnikami nadtlakowymi oraz schematycznie przedstawione reakcje następcze jakim ulega rodnik fenoksydowy, ArO<sup>•</sup>.

Reakcje następcze, jakim ulega rodnik powstały z antyoksydanta mają istotny wpływ na efektywność procesu neutralizacji rodników i są bezpośrednio związane z zagadnieniem aktywności antyoksydantów.

#### PARAMETRY CHARAKTERYZUJĄCE AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNĄ

Skuteczność antyoksydantów w hamowaniu procesu peroksydacji określa aktywność antyoksydacyjna. Pojęcie aktywności antyoksydacyjnej nie jest jednoznacznie zdefiniowane – w większości publikacji stosowane jest pragmatyczne podejście, według którego miarą aktywności antyoksydacyjnej jest stabilność układu poddanego utlenianiu, jeśli w układzie tym znajduje się badany związek o poten-



cialnym działaniu antyoksydacyjnym. Tak zdefiniowana aktywność zależy od szeregu parametrów takich jak [30]:

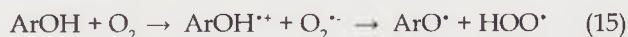
- reaktywność molekuł antyoksydanta względem rodników  $\text{LOO}^\bullet$ ,
- stechiometria procesu inhibicji peroksydacji,
- reakcje następcze, jakim ulega rodnik  $\text{ArO}^\bullet$ ,
- lokalizacja antyoksydanta,
- stężenie i mobilność antyoksydanta w danym mikrośrodowisku,
- oddziaływanie z innymi antyoksydantami,
- wchłanianie, transport, retencja, metabolizm i aspekty toksykologiczne.

Różnorodność czynników mających wpływ na aktywność antyoksydacyjną substancji sugeruje ścisły związek z danym układem eksperymentalnym, co znacząco utrudnia porównywanie aktywności antyoksydantów. Przedstawione powyżej parametry zostaną po kolei omówione.

#### REAKTYWNOŚĆ WZGLĘDEM WOLNYCH RODNIKÓW

Reaktywność względem rodnika  $\text{LOO}^\bullet$  może być ilościowo wyrażona za pomocą stałej szybkości reakcji przerywania łańcucha peroksydacji,  $k_{\text{inh}}$ . Niewielkie stężenia  $\text{ArOH}$  są w stanie znacząco hamować autooksydację tylko wówczas, jeśli stała szybkości reakcji 10 jest wielokrotnie większa od stałej szybkości reakcji 4 ( $k_{\text{inh}} \gg k_p$ ) [31]. Dla  $\alpha$ -tokoferolu, uznawanego za najbardziej aktywny naturalny antyoksydant fenolowy, wartość  $k_{\text{inh}}$  reakcji z rodnikami nadtlennymi (w środowisku niepolarnym) wynosi  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [31], co w porównaniu z parametrem  $k_p = 31 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  dla linoleanu metylu, doskonale tłumaczy zdolność tokoferolu do przerywania łańcucha propagacji. Znajomość stałych  $k_{\text{inh}}$  dla różnych antyoksydantów interwencyjnych pozwala na dokonanie wstępnej ilościowej oceny efektywności tych antyoksydantów, jeśli wartości  $k_{\text{inh}}$  mierzone były w tych samych warunkach. Z drugiej strony, efektywność działania antyoksydacyjnego jest wielkością względną i zależy od podatności substratu L-H na utlenianie, tzn. nawet mało reaktywny antyoksydant (o niskiej stałej  $k_{\text{inh}}$ ) może skutecznie hamować autooksydację substratu niezbyt podatnego na utlenianie (mała wartość  $k_p$ ).

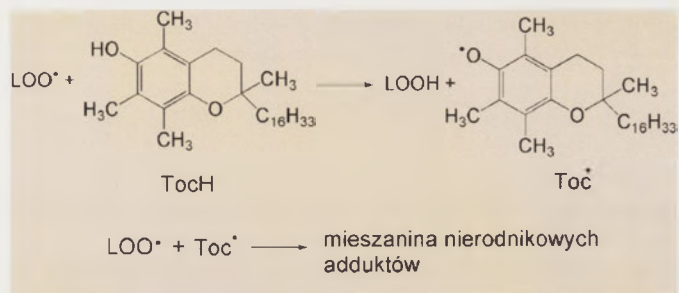
Reaktywność  $\text{ArOH}$  wobec rodnika  $\text{LOO}^\bullet$  można wstępnie ocenić wyznaczając entalpię dysocjacji wiązania O-H (ang. *Bond Dissociation Enthalpy*,  $\text{BDE}_{\text{O-H}}$ ), od której w dużym stopniu zależy wartość stałej  $k_{\text{inh}}$  (w roztworach apolarnych) [32]. Parametr  $k_{\text{inh}}$  jest odwrotnie proporcjonalny do  $\text{BDE}_{\text{O-H}}$  dla dużej liczby różnych pochodnych fenolowych, jednak zależność ta jest bardziej skomplikowana, ze względu na efekty steryczne i rozpuszczalnikowe, a także możliwość przebiegu reakcji według mechanizmu innego niż przeniesienie atomu wodoru. Ogólną zasadą jest, że podstawniki oddające elektrony do pierścienia aromatycznego (np. grupy alkilowe, alkoksyłowe) powodują obniżenie wartości  $\text{BDE}_{\text{O-H}}$ , jednak znacznemu obniżeniu siły wiązania O-H towarzyszy inne niekorzystne zjawisko, obniżenie wartości potencjału jonizacji, IP, cząsteczki aromatycznej (jest to energia potrzebna do oderwania elektronu od atomu bądź cząsteczki). Niski potencjał jonizacji prowadzi do przeniesienia elektronu z antyoksydanta na cząsteczkę tlenu:



i reakcja ta, będąc źródłem rodników nadtlennych, może inicjować nowe łańcuchy kinetyczne propagacji.

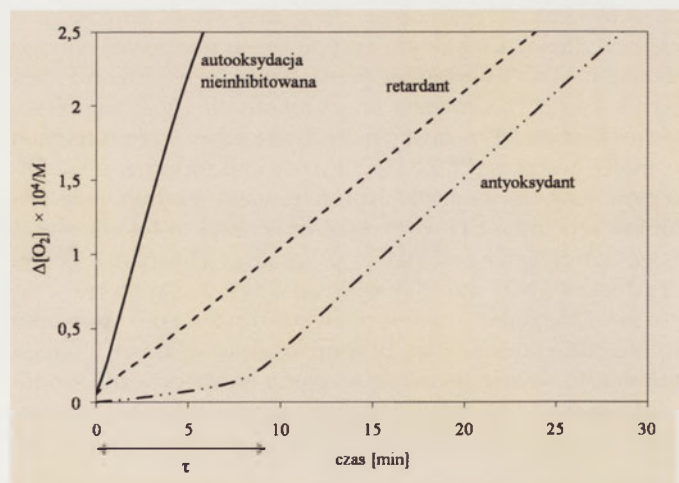
#### STECHEIOMETRIA REAKCJI Z RODNIKAMI NADTLENKOWYMI

Innym parametrem opisującym dany związek o działaniu antyutleniającym jest współczynnik stechiometryczny  $n$ , oznaczający liczbę rodników nadtlennych neutralizowanych przez jedną molekułę inhibitora. Współczynnik ten może przyjmować różne wartości (im wyższe, tym lepiej). Najbardziej aktywny naturalny antyoksydant fenolowy,  $\alpha$ -tokoferol, reaguje z dwoma rodnikami ( $n = 2$ , Ryc. 6) [33], lecz współczynnik  $n$  może być większy dla polifenoli takich jak katechole i flawonoidy.



Rycina 6. Reakcja  $\alpha$ -tokoferolu z rodnikami nadtlennymi.

Parametrem bezpośrednio powiązany ze współczynnikiem stechiometrycznym jest czas indukcji  $\tau$ . Jest to czas jaki upływa od momentu zapoczątkowania (zainicjowania) reakcji, gdy utlenianie substratu zachodzi bardzo powoli, do wyczerpania się antyoksydanta, gdy następuje spontaniczny wzrost szybkości utleniania (Ryc. 7). Czas indukcji można wyznaczyć monitorując postęp peroksydacji bezpośrednio, mierzając ubytek tlenu w trakcie utleniania substratu w obecności antyoksydanta w układzie zamkniętym (Ryc. 7) lub pośrednio, np. mierzając zawartość nadtlenników, bądź na podstawie pomiarów powstawania wtórnych produktów



Rycina 7. Typowe profile kinetyczne przedstawiające ubytek tlenu w układzie w trakcie utleniania substratu bez inhibitora, w obecności retardanta bądź antyoksydanta.

utleniania i rozpadu. Czas indukcji może być wykorzystany do obliczenia współczynnika stechiometrycznego z następującej zależności:

$$n = \frac{R_i \times \tau}{[\text{ArOH}]_0}$$

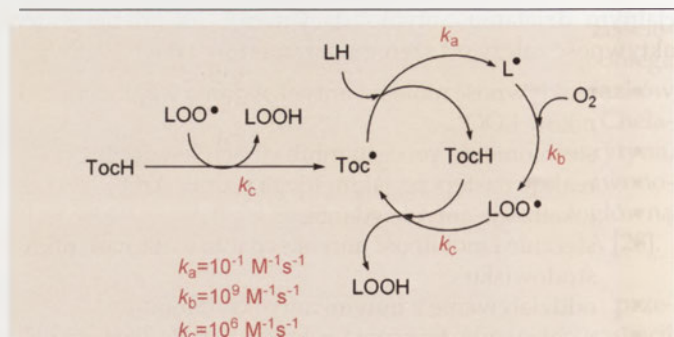
gdzie  $[\text{ArOH}]_0$  jest początkowym stężeniem inhibitora [34].

Istnieje wiele związków organicznych, których dodatek zmniejsza szybkość autooksydacji w danym układzie pomiarowym, ale tylko dla efektywnych inhibitorów ( $k_{\text{inh}} \gg k_p$ ) obniżenie szybkości jest na tyle znaczne, aby stwierdzić istnienie wyraźnego czasu indukcji. Substancje mniej aktywne, które nie powodują powstawania okresu indukcji, są nazywane retardantami i charakteryzują się małymi wartościami  $k_{\text{inh}}$  w porównaniu z  $k_p$ , czyli są jedynie słabymi inhibitorami autooksydacji i nie powinny być zaliczane do grupy antyoksydantów interwencyjnych.

#### REAKCJE NASTĘPCZE RODNIKÓW FENOKSYLOWYCH

Dalsze losy powstałego w reakcji 10 rodnika  $\text{ArO}^{\bullet}$  mają bezpośredni wpływ na aktywność antyoksydacyjną. Decydują one m.in. o wartości współczynnika stechiometrycznego  $n$ . Jeśli rodniki  $\text{ArO}^{\bullet}$  ulegają wygaszeniu głównie w reakcji z  $\text{LOO}^{\bullet}$  (reakcja 13), wtedy  $n$  wynosi 2 lub jest bliskie 2. Jeśli natomiast dominuje symetryczna rekombinacja rodników fenoksylowych (reakcja 14) wartość współczynnika zbliżona będzie do jedności. Warto zauważyć, iż produkty reakcji 14 mogą również wykazywać działanie przeciwutleniające, co spowodowane jest możliwością powolnej tautomerizacji ketonowych form dimerów  $\text{ArO}^{\bullet}$ , prowadzącej do powstania fenoli [35].

Rzadziej spotykaną reakcją jest udział rodników aryloksyloowych w propagacji łańcucha peroksydacji, co przedstawiają równania reakcji 11 i 12. Rodniki powstałe m.in. z hydrochinonów, katecholi, aminofenoli i diamin aromatycznych mogą reagować z tlenem cząsteczkowym także z wytworzeniem rodników  $\text{HOO}^{\bullet}$ . Wraz ze wzrostem szybkości tych niekorzystnych reakcji maleje wartość współczynnika stechiometrycznego oraz aktywność antyoksydacyjna związku. Ciekawym przypadkiem prooksydacyjnego działania  $\text{ArO}^{\bullet}$ , opisanym przez Bowry'ego i Ingolda, jest peroksydacja mediowana przez tokoferol (TMP, ang. *Tocopherol-Mediated Peroxidation*), zachodząca w lipoproteinach o małej gęstości (LDL) [36]. Każdy mikropęcherzyk LDL o promieniu Stokesa ok. 10 nm zawiera średnio 1450 bis-allylowych grup  $\text{CH}_2$  oraz 6-12 cząsteczek  $\alpha$ -tokoferolu, a więc teoretycznie jest nawet przesadnie chroniony (jedna cząsteczka TocH może chronić od 8 tys. aż do 68 tys. cząsteczek LH). Jednak zaobserwowano, iż szybkość utleniania lipidu nie zmniejsza się proporcjonalnie do ilości użytego tokoferolu. Dzieje się tak ze względu na specyficzne środowisko reakcji. LDL nie jest homogeniczna, a dyfuzja lipofilowych związków pomiędzy drobinami jest bardzo powolna. Mechanizm TMP przedstawiono na rycinie 8. Gdy w wyniku reakcji 10 powstanie rodnik  $\text{Toc}^{\bullet}$ , to jest bardzo prawdopodobne, że uwięziony w LDL nie napotka innego rodnika zdolnego do rekombinacji i będzie przez cały czas w kon-



Rycina 8. Mechanizm peroksydacji mediowanej przez tokoferol.

takcie z lipidem, zatem zwiększy się prawdopodobieństwo oderwania atomu wodoru od lipidu (stała szybkości  $k_a$  na rycinie 8), co jest przyczyną zainicjowania nowego łańcucha peroksydacji.

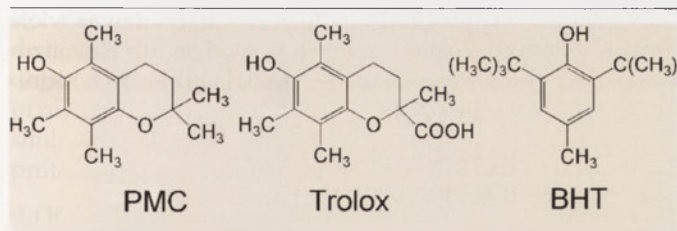
Podsumowując powyższe informacje, dobry interwencyjny antyoksydant fenolowy powinien wykazywać się następującymi cechami [37]:

- stała szybkości reakcji przeniesienia atomu wodoru jest znacznie większa od stałej szybkości propagacji łańcucha ( $k_{\text{inh}} \gg k_p$ ),
- rodnik fenoksyloowy ulega wygaszeniu w reakcji 13, natomiast nie reaguje z tlenem cząsteczkowym (reakcja 12) ani z substratem LH (reakcja 11), gdyż przyczyniałoby się to do propagacji łańcucha wg Ryciny 8,
- cząsteczki antyoksydanta  $\text{ArOH}$  nie powinny reagować z tlenem molekularnym,
- entalpia dysocjacji wiązania fenolowej grupy hydroksylowej,  $\text{BDE}_{\text{O-H}^{\bullet}}$  powinna być jak najniższa,
- potencjał jonizacyjny antyoksydanta powinien być na tyle wysoki, aby zapobiec przeniesieniu elektronu na cząsteczkę tlenu i ponownemu inicjowaniu peroksydacji przez antyoksydant (reakcja 15).

#### LOKALIZACJA, STĘŻENIE I MOBILNOŚĆ ANTYOKSYDANTA

Znajomość parametrów  $n$ ,  $k_{\text{inh}}$ ,  $k_p$ ,  $\text{BDE}_{\text{O-H}^{\bullet}}$  oraz potencjału jonizacji nie wystarczy do przewidywania efektywności antyoksydanta, ponieważ żaden z tych parametrów nie uwzględnia czynnika, jakim jest jego dostępność. Pomiar kinetyki autooksydacji przeprowadzone w roztworach homogenicznych (najczęściej w rozpuszczalnikach niepolarnych) prowadzić mogą do otrzymania rezultatów nieprzekładalnych na warunki panujące w układach biologicznych.

Bardziej wiarygodne wyniki można uzyskać testując związki w układach przypominających rzeczywiste środowisko działania antyoksydantów tj. w micelach lub dwuwarstwach lipidowych. Barclay [38] oraz Niki i Noguchi [39] zwrócili szczególną uwagę na lokalizację i mobilność antyoksydanta w układach biologicznych. Przykładem różnego zachowania antyoksydantów w zależności od lokalizacji jest opisany przez Niki i Noguchi [39] eksperyment polegający na pomiarze szybkości zużywania poszczególnych antyoksydantów w mieszaninie zawierającej tokoferol (TocH), 2,2,5,7,8-pentametylo-6-chromanol (PMC), kwas

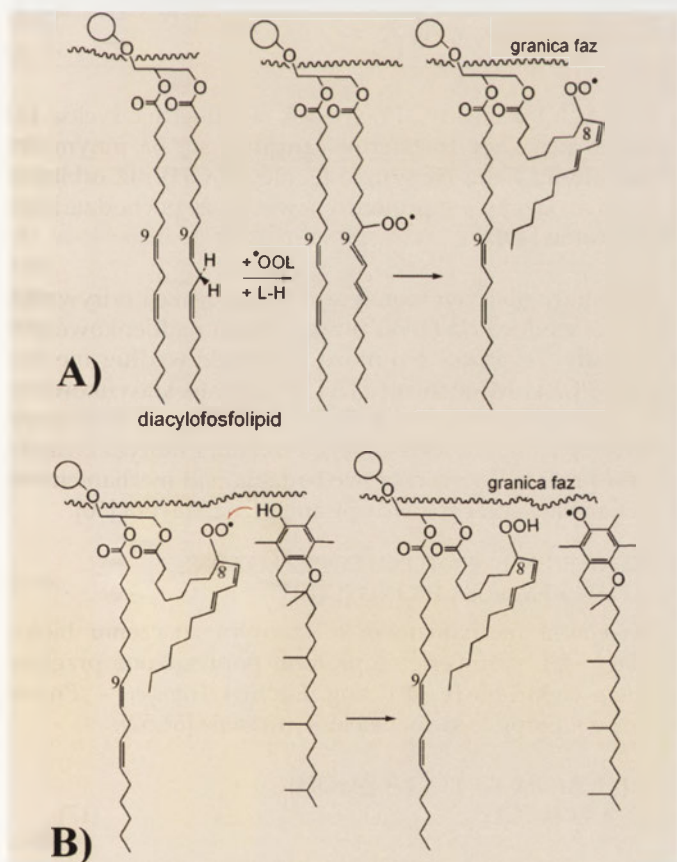


Rycina 9. Struktury antyoksydantów: PMC, Troloxu oraz BHT.

6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromanylo-2-karboksylowy (Trolox), i 2,6-di-*tert*-butylo-6-metylofenol (BHT) (Ryc. 9).

W homogenicznym roztworze metanowym tokoferol i jego pochodne (PMC, Trolox) wykazują tę samą reaktywność względem rodników nadtlenkowych, a najmniej aktywny BHT zużywany jest znacznie wolniej. W roztworach heterogenicznych zachowanie jest odmienne. W liposomach dimirystylofosfatydylocholino pochodne tokoferolu różnicują swoją reaktywność: najszybciej reaguje z rodnikami Trolox, potem PMC, znacznie wolniej TocH (BHT jest zużywany najwolniej). W liposomach fosfatydylocholino sojowej, zawierającej nienasycone kwasy tłuszczowe, aktywności TocH i BHT są równe. Zjawisko to zinterpretowano jako efekt różnej dostępności i mobilności antyoksydantów.

W mikroheterogenicznym środowisku łańcuchy lipidów mono- lub polienowych narażone są na atak wolnych rodników znajdujących się w hydrofobowym rdzeniu błony.



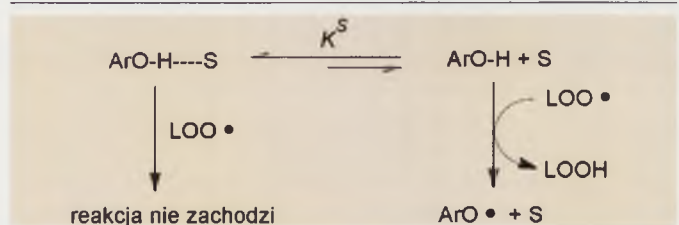
Rycina 10. Hipoteza wpływającego na powierzchnię rodnika nadtlenkowego (ang. *Floating Peroxyl Radical*) [38]. Dla uproszczenia zilustrowano tylko powstawanie rodnika nadtlenkowego w pozycji 8, bez zmiany izomerii geometrycznej sprzężonych wiązań podwójnych.

Cząsteczki  $\alpha$ -tokoferolu położone są równolegle do łańcuchów lipidowych, a grupa OH w pierścieniu chromanolu jest skierowana do fazy polarnej (wodnej). Z chwilą powstania rodnika nadtlenkowego, część łańcucha lipidu staje się bardziej polarna niż reszta dwuwarstwy i migruje w stronę granicy faz, gdzie styka się z polarną powierzchnią wody. W pobliżu granicy faz rodnik może być zneutralizowany w wyniku reakcji z grupą hydroksylową  $\alpha$ -tokoferolu. Proces ten został zaproponowany jako hipoteza wpływającego na powierzchnię rodnika nadtlenkowego (ang. *Floating Peroxyl Radical Hypothesis*) i przedstawiony jest na rycinie 10.

Zgodnie z tą hipotezą, dla wielu antyoksydantów wykazujących się wysoką reaktywnością wobec wolnych rodników (m.in.  $\alpha$ -tokoferolu), wewnątrz hydrofobowego rdzenia dwuwarstwy odnotowano wyraźny spadek aktywności antyoksydacyjnej. Zaobserwowano również zmniejszenie stałej szybkości terminacji  $2k_t$ , co tłumaczone jest istnieniem stabilizującego wiązania wodorowego między rodnikiem nadtlenkowym a cząsteczkami wody. Dodatkowo niekorzystny wpływ na aktywność tokoferolu ma ograniczona mobilność cząsteczki, co spowodowane jest długim łańcuchem fitylowym, uwięzionym w hydrofobowej części dwuwarstwy lipidowej.

### KINETYCZNY EFEKT ROZPUSZCZALNIKOWY

W początkowym okresie badań nad substancjami o działaniu przeciwutleniającym szybkości reakcji antyoksydantów z rodnikami nadtlenkowymi  $LOO\cdot$ , badane były jedynie w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Gdy zmieniło środowisko na polarne [40,41], a więc bardziej przypominające środowisko wnętrza komórek, zauważono, iż reakcja 10 zachodzi znacznie wolniej, a stałe szybkości inhibicji autooksydacji w danym rozpuszczalniku,  $k^s$ , są skorelowane z polarnością rozpuszczalnika. Efekt ten przypisano blokowaniu fenolowych grup OH, aktywnych w procesie inhibicji, przez polarne cząsteczki rozpuszczalnika (S) tworzące z nimi wiązanie wodorowe ( $ArOH\cdots S$ ) opisywane stałą równowagi  $K^s$  i nazwano Kinetycznym Efektem Rozpuszczalnikowym (KSE, ang. *Kinetic Solvent Effect*, Ryc. 11).



Rycina 11. Mechanizm Kinetycznego Efektu Rozpuszczalnikowego. Symbolem S oznaczono cząsteczkę rozpuszczalnika, symbol  $K^s$  oznacza stałą równowagi reakcji dysocjacji wiązania wodorowego  $ArOH\cdots S$ .

Wielkość KSE została wyrażona ilościowo przez Snelgrove'a i wsp. [42] w postaci empirycznego równania opisującego wzajemną zależność stałych szybkości przeniesienia atomu wodoru z fenolu  $ArOH$  do rodnika w rozpuszczalniku polarnym (stała  $k^s$ ) i rozpuszczalniku nie będącym akceptorem wiązania wodorowego (stała  $k^0$ ):

$$\log k^s \approx \log k^0 - 8.3\alpha_2^H \beta_2^H \quad (16)$$

gdzie  $\alpha_2^H$  jest parametrem charakteryzującym zdolność ArOH do bycia donorem wiązania wodorowego, a  $\beta_2^H$  jest parametrem charakteryzującym zdolność rozpuszczalnika do akceptowania wiązania wodorowego. Obydwa parametry mogą przyjmować wartości od 0 do 1. Stałe szybkości inhibicji peroksydacji wyliczone przy pomocy powyższego równania są zbliżone do wartości otrzymanych eksperymentalnie, jeśli reakcja 10 (Ryc. 5) zachodzi według mechanizmu jednoetapowego przeniesienia atomu wodoru.

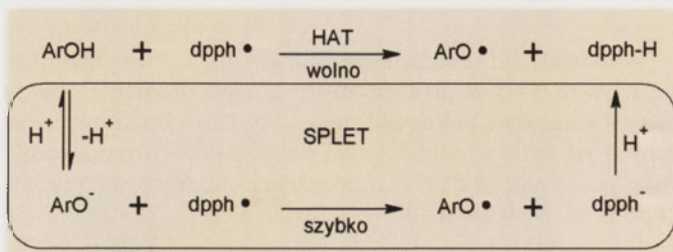
## MECHANIZMY REAKCJI ANTYOKSYDANTÓW Z RODNIKAMI

Przez długi czas uważano mechanizm HAT za jedyny, według którego działają antyoksydanty fenolowe. Jednak rozwój metod badawczych wraz ze zwiększeniem różnorodności badanych układów doprowadził w ostatnich latach do istotnego poszerzenia wiedzy na temat zarówno procesu HAT, jak i innych mechanizmów opisujących reakcje rodnikowe. W wielu przypadkach mechanizm tych reakcji jest o wiele bardziej złożony, zależny od rodzaju reagentów i środowiska reakcji, a szybkość reakcji antyoksydanta z rodnikami może być wypadkowym efektem działania różnych mechanizmów. Spośród wielu opisanych ostatnio w literaturze mechanizmów [29,32] na szczególną uwagę zasługują: SPLET, PCET i ET-PT.

### PRZENIESIENIE ELEKTRONU POPRZEDZONE DEPROTONACJĄ GRUPY OH (SPLET)

W trakcie badań nad mechanizmem przeniesienia atomu wodoru zaobserwowano znaczne odchylenia od KSE dla rozpuszczalników takich jak alkohole, acetonitryl, tetrahydrofuran (THF) i dimetylosulfotlenek (DMSO). Wartości stałych szybkości reakcji antyoksydantów fenolowych z modelowym rodnikiem 1,1-difenyl-2-pikrylohydrozylowym (dpph $\cdot$ ) były dużo większe niż przewidywane na podstawie równania 16, a czasem nawet większe od stałych szybkości w rozpuszczalnikach niepolarnych [43,44]. Zaproponowano nowy mechanizm, według którego najpierw antyoksydant fenolowy dysocjuje tworząc anion fenolanowy, z którego następuje szybkie przeniesienie elektronu do rodnika dpph $\cdot$  [44]. Mechanizm ten nazwano transferem elektronu poprzedzonym deprotonacją grupy OH (SPLET, ang. *Sequential Proton-Loss Electron-Transfer*, Ryc. 12) [45,46].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że całkowity mechanizm reakcji antyoksydanta fenolowego z rodnikami jest kombinacją mechanizmów HAT oraz SPLET, ze wzrastającym udziałem tego drugiego w miarę wzrostu polarności rozpuszczalnika. Mechanizm ten może

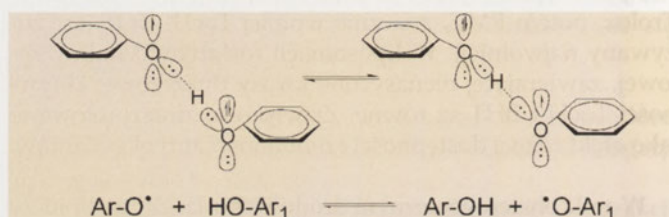


Rycina 12. Porównanie mechanizmów: przeniesienia atomu wodoru i transferu elektronu poprzedzone deprotonacją grupy OH [44].

mieć znaczenie w procesach biologicznych, ponieważ wiele antyoksydantów rozpuszczalnych w wodzie lub zlokalizowanych na granicy faz może brać udział w reakcjach rodnikowych jako aniony [47,48].

### TRANSFER ELEKTRONU SPRZĘŻONY Z PRZENIESIENIEM PROTONU (PCET)

Często w opisie reakcji antyoksydantów fenolowych z rodnikami używa się terminu PCET (ang. *Proton-Coupled Electron Transfer*), który wnika głębiej w istotę procesu przeniesienia atomu wodoru z fenolu do rodnika (równanie reakcji 10) niż prosty mechanizm HAT. W mechanizmie PCET przeniesienie protonu i elektronu jest rozpatrywane osobno, ale nadal jest to proces jednoetapowy (dlatego mówi się o sprzężonym bądź uzgodnionym transferze obu indywidualów, a terminy „sprzężony” i „uzgodniony” oznaczają brak etapu przejściowego). Ideą sprzężenia jest jednoczesne przeniesienie protonu i elektronu, które mogą pochodzić



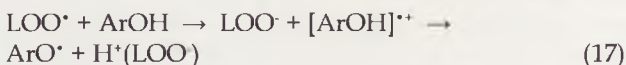
Rycina 13. Mechanizm sprzężonego przeniesienia protonu i elektronu (PCET). Przeniesienie protonu odbywa się wzdłuż osi wiązania wodorowego, podczas gdy transfer elektronu zachodzi między podwójnie obsadzonym orbitalem atomowym 2p tlenu w molekule fenolu Ar<sub>1</sub>OH a pojedynczo zajętym orbitalem 2p tlenu rodnika fenoksylogowego ArO $\cdot$ .

z „różnych lokalizacji”. Przypadek taki ilustruje rycina 13: elektron ulegający transferowi znajduje się na innym orbitalu atomu tlenu (w grupie fenolowej OH) niż orbital z którym związany jest proton, a nawet może pochodzić z innego atomu [49].

Rezultaty obliczeń teoretycznych dla reakcji odrywania atomów wodoru od fenoli przez rodniki nadtlenkowe potwierdziły, że proces ten może zachodzić według mechanizmu PCET. Mechanizm HAT jest często klasyfikowany jako szczególny przypadek PCET, w którym przenoszony elektron pochodzi z tego samego orbitalu, z którym związany jest proton. Dotychczasowe badania nad mechanizmem PCET zostały szczegółowo opisane przez Mayera [50].

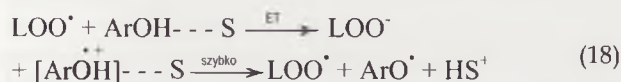
### PRZENIESIENIE PROTONU POPRZEDZONE TRANSFEREM ELEKTRONU (ET-PT)

Kolejnym mechanizmem o istotnym znaczeniu biologicznym jest przeniesienie protonu poprzedzone przeniesieniem elektronu (ET-PT, ang. *Electron Transfer – Proton Transfer*). Etapy te są rozdzielone w czasie [51,52]:



Szczególnie podatne na ten dwuetapowy proces z utworzeniem karbokationu są fenole lub aminy zawierające w pierścieniu aromatycznym podstawniki silnie elektrodonorowe – potencjał jonizacji takiej cząsteczki powinien

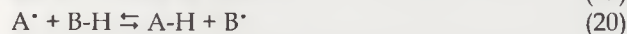
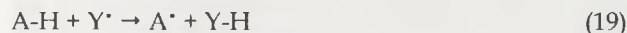
być jak najniższy. Proton i elektron mogą przemieścić się do różnych akceptorów [47]. Taka sytuacja ma miejsce, gdy cząsteczka fenolu jest silnie związana z rozpuszczalnikiem: przeniesienie elektronu do rodnika prowadzi do powstania silnie kwasowego kationorodnika, który bardzo szybko deprotonuje:



Mechanizm ET-PT jest coraz częściej rozważany w reakcjach z udziałem flawonoidów, amin a także w reakcjach enzymatycznego utleniania/redukcji.

#### ODDZIAŁYWANIE Z INNYMI ANTYOKSYDANTAMI

Mieszanki dwóch lub większej ilości antyoksydantów często wykazują znacznie wyższą aktywność antyoksydacyjną, niż wynika to z prostego sumowania parametrów opisujących poszczególne składniki mieszaniny. Wyjaśnienie zjawiska synergizmu zaproponowali po raz pierwszy Mahoney i DaRooge [53] opisując niespodziewaną aktywność mieszaniny 4-metoksyfenolu i 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenolu (BHT). Idea efektywnego współdziałania antyoksydantów polega na regenerowaniu cząsteczki antyoksydanta bardziej aktywnego (A-H), który reaguje szybciej z rodnikami, przez ko-antyoksydant (B-H), cząsteczkę zdolną do oddania elektronu lub atomu wodoru z odtworzeniem pierwotnej cząsteczki A-H:



Antyoksydant A-H reaguje z rodnikiem Y<sup>•</sup> szybciej niż zrobiłby to antyoksydant B-H, co jest spowodowane niską wartością BDE, odpowiednią lokalizacją i brakiem przeszkód sterycznych. Natomiast względnie stabilny rodnik A<sup>•</sup> wchodzi w równowagę reakcję z ko-antyoksydantem, który znajduje się w nadmiarze np. na granicy faz, i który może oddefundować, przesuwając równowagę reakcji (20) w prawo.

W układach biologicznych zjawisko synergizmu antyoksydacyjnego odgrywa ważną rolę. Wnętrze komórek jest chronione przez zespół antyoksydantów lipofilowych (tokoferole, β-karoten, ubichinon, witamina K) oraz rozpusz-

czalnych w wodzie (kwas askorbinowy, kwas moczowy, glutation). Pojawienie się w komórce stresu oksydacyjnego uruchamia całą kaskadę mechanizmów ochronnych i naprawczych, w których poszczególne związki współdziałają ze sobą w ściśle określony sposób. Mechanizm tego współdziałania nadal nie został w pełni wyjaśniony i jest przedmiotem ciągłych badań [54-56].

Wśród wielu przypadków synergizmu antyoksydacyjnego najbardziej znanym i szeroko opisywanym [39,57-60] jest oddziaływanie lipofilowego α-tokoferolu z rozpuszczonym w fazie wodnej kwasem askorbinowym (witamina C), który samodzielnie nie wykazuje znaczącego działania jako antyoksydant interwentywny (choć w potocznym rozumieniu jest on uważany za antyoksydant). *In vitro* zaobserwowano (a) wydłużenie czasu indukcji dla mieszaniny obu związków, znacznie większe niż wynikałoby to ze zsumowania indywidualnych czasów indukcji, (b) zużycie najpierw zasobów kwasu askorbinowego, a dopiero potem α-tokoferolu. Wspomagające działanie witaminy C zostało przypisane redukcji rodnika tokoferoksylogo do tokoferolu przez hydrofilowy askorbinian, co przedstawiono na rycinie 14.

Regeneracja α-tokoferolu przez kwas askorbinowy jest konkurencyjna do innych reakcji następczych, jakim może ulegać rodnik aryloksylowy. Co prawda, stała szybkości reakcji rekombinacji (Ryc. 5, reakcja 13) jest o co najmniej dwa rzędy wielkości większa od stałej szybkości redukcji rodnika tokoferoksylogo przez askorbinian [61], jednak inne czynniki, tj. wysokie stężenie askorbinianu oraz lokalizacja poszczególnych reakcji i oddziaływań, faworyzują regenerację. Dalsze utlenianie rodnika askorbylowego prowadzi do otrzymania dehydroaskorbinianu. W tkankach obydwie formy, rodnik askorbylowy i dehydroaskorbinian, są enzymatycznie redukowane do askorbinianu a czynnikiem redukującym jest glutation (GSH) lub dinukleotydy nikotynoamidoadeninowe (NADH i NADPH) [8].

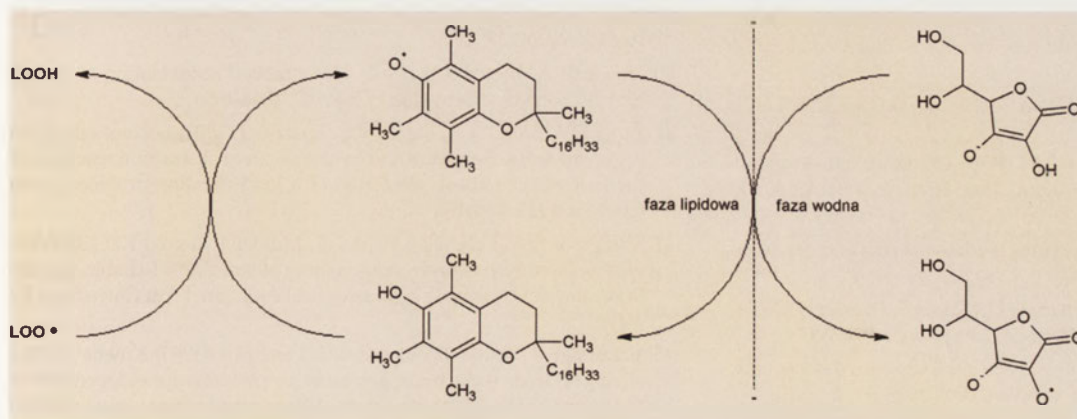
Innym mechanizmem wspomagającym działanie α-tokoferolu może być jego redukcja do anionu fenolano-wego (mechanizm transferu elektronu):



Proces ten został opisany dla polihydroksyfenoli jako rozpuszczalnych w wodzie koantyoksydantów [62].

#### METODY BADANIA AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ

Problem z jednoznacznością definicją antyoksydanta oraz definicją aktywności antyoksydacyjnej prowadzi do szeregu różnic w metodologii badania aktywności antyoksydantów,



Rycina 14. Mechanizm oddziaływania α-tokoferolu z kwasem askorbinowym.

a także różnic w interpretacji danych eksperymentalnych i porównywalności otrzymanych wyników. Różnice te są widoczne nawet dla antyoksydantów uważanych za standardowe, takie jak np. tokoferole, a aktywność antyoksydacyjna takich substancji jak kwas askorbinowy lub kwas moczowy mierzona różnymi metodami jest diametralnie odmienna. Przykładami najpopularniejszych metod są pomiary TAC (ang. *Total Antioxidant Capacity*), ORAC (ang. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (ang. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), TOSC (ang. *Total Oxidant Scavenging Capacity*), FRAP (ang. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (ang. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*), TAR (ang. *Total Antioxidant Reactivity*). Przegląd metod pomiarów aktywności antyoksydacyjnej wykracza poza ramy tego opracowania. W ostatnim czasie ukazał się szereg prac przeglądowych, na szczególną uwagę zasługują krytyczne opracowania Bartosza [63], Priora i wsp. [64,65], Laguerre'a i wsp. [66]. W literaturze dostępnej w języku polskim warto zapoznać się z pracą zbiorową *Przeciwwutleniacze w żywności* pod red. W. Grajka [67].

## PIŚMIENNICTWO

- Denisov ET, Afanas'ev IB (2005) Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology, Taylor & Francis, Boca Raton
- Bolland JL (1949) Kinetics of olefin oxidation. *Q Rev Chem Soc* 3: 1-21
- Bateman LQ (1954) Olefin oxidation. *Q Rev Chem Soc* 8: 147-167
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol* 55: 373-399
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 7897-7810
- Stubbe J, Van Der Donk WA (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* 98: 705-762
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) Free Radicals in Biology and Medicine, wydanie 4-te, Oxford University Press, Oxford
- Spiteller G (1998) Linoleic acid peroxidation - the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - and its relationship to chronic diseases. *Chem Phys Lipids* 95: 105-162
- Breimer LH (2006) Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 3: 188-197
- Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381
- Sohal RS (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 33: 37-44
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002) Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 33: 575-586
- Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91: 7-11
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 29-38
- Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: 26-38
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G (2000) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502: 139-144
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30: 277-290
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progr Lipid Res* 46: 244-282
- Howard JA, Ingold KU (1967) Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. V. The hydroperoxy radical in chain propagation and termination. *Can J Chem* 45: 793-802
- Porter NA (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc Chem Res* 19: 262-268
- Kamal-Eldin A, Pokorny J (2005) Analysis of Lipid Oxidation, AOCS Press, Champaign, Illinois
- Spiteller G (2006) Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med* 41: 362-387
- Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208
- Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Cantoni O (1998) Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med* 25: 196-200
- Foti MC, Amorati R (2009) Non-phenolic radical trapping antioxidants. *J Pharm Pharmacol* 61: 1435-1448
- Niki E, Noguchi N (2002) Effects of antioxidants against atherosclerosis. *Mol Cell Biochem* 234/235: 19-25
- Burton GW, Ingold KU (1986) Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res* 19: 194-201
- Foti MC (2007) Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol* 59: 1673-1685
- Kamal-Eldin A, Appelqvist L (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701
- Mahoney LR (1969) Antioxidants. *Angew Chem Int Engl* 8: 547-555
- Weiner SA, Mahoney LR (1972) A mechanistic study of the termination reactions of 2,4,6-trialkylphenoxy radicals. *J Am Chem Soc* 94: 5029-5033
- Bowry VW, Ingold KU (1999) The unexpected role of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein. *Acc Chem Res* 32: 27-34
- Korth HG (2007) Carbon Radicals of low reactivity against oxygen: Radically different antioxidants. *Angew Chem Int Ed* 46: 5274-5276
- Barclay LRC (1993) Model biomembranes: Quantitative studies of peroxidation, antioxidant action, partitioning, and oxidative stress. *Can J Chem* 71: 1-16
- Niki E, Noguchi N (2004) Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res* 37: 45-51
- Howard JA, Ingold KU (1964) The inhibited autoxidation of styrene: Part IV. Solvent effects. *Can J Chem* 42: 1044-1056
- Avila DV, Brown CE, Ingold KU, Luszyk J (1993) Solvent effects on the competitive  $\beta$ -scission and hydrogen atom abstraction reactions of the cumyloxy radical. resolution of a long-standing problem. *J Am Chem Soc* 115: 466-470
- Snelgrove DW, Luszyk J, Banks JT, Mulder P, Ingold KU (2001) Kinetic solvent effects on hydrogen-atom abstractions: Reliable, quantitative predictions via a single empirical equation. *J Am Chem Soc* 123: 469-477
- Valgimigli L, Banks JT, Ingold KU, Luszyk J (1995) Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting radical. Two extreme tests using vitamin E and Phenol. *J Am Chem Soc* 117: 9966-9971

44. Litwinienko G, Ingold KU (2003) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 1. The reaction of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) in alcohols. *J Org Chem* 68: 3433-3438
45. Litwinienko G, Ingold KU (2004) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of Sequential Proton Loss Electron Transfer. *J Org Chem* 69: 5888-5896
46. Foti MC, Daquino C, Geraci C (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the dpph<sup>•</sup> radical in alcoholic solutions. *J Org Chem* 69: 2309-2314
47. Litwinienko G, Ingold KU (2007) Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals. *Acc Chem Res* 40: 222-230
48. Musialik M, Kuzmicz R, Pawlowski TS, Litwinienko G (2009) Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *J Org Chem* 74: 2699-2709
49. Mayer JM, Hrovat DA, Thomas JL, Borden WT (2002) Proton-Coupled Electron Transfer versus Hydrogen Atom Transfer in benzyl/toluene, methoxyl/methanol, and phenoxy/phenol self-exchange reactions. *J Am Chem Soc* 124: 11142-11147
50. Mayer JM (2004) Proton-Coupled Electron Transfer: A reaction chemist's view. *Annu Rev Phys Chem* 55: 363-390
51. Neta P, Huie RE, Maruthamuthu P, Steenken S (1989) Solvent effects in the reactions of peroxy radicals with organic reductants. Evidence for Proton-Transfer-Mediated Electron Transfer. *J Phys Chem* 93: 7654-7659
52. Alfassi ZB, Huie RE, Neta P (1993) Solvent effects on the rate constants for reaction of trichloromethylperoxy radicals with organic reductants. *J Phys Chem* 97: 7253-7257
53. Mahoney LR, DaRooge MA (1967) Inhibition of free-radical reactions. Synergistic effect of 2,6-di-tert-butylphenols on hydrocarbon oxidation retarded by 4-methoxyphenol. *J Am Chem Soc* 89: 5619-5629
54. Milde J, Elstner EF, Grassmann J (2007) Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. *Mol Nutr Food Res* 51: 956-961
55. Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O (2007) Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radic Biol Med* 43: 933-946
56. de Jonge CRHI (1983) Synergism of antioxidants. *Pure Appl Chem* 55: 1637-1650
57. Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738
58. Golumbic C, Mattill HA (1941) Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbic acid in association with tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J Am Chem Soc* 63: 1279-1280
59. Niki E (1987) Interaction of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol. *Ann N Y Acad Sci* 498: 186-199
60. Doba T, Burton GW, Ingold KU (1985) Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 835: 298-303
61. Barclay LRC, Locke SJ, MacNeil JM (1985) Autoxidation in micelles. Synergism of vitamin C with lipid-soluble vitamin E and water-soluble Trolox. *Can J Chem* 63: 366-374
62. Jovanovic SV, Hara Y, Steenken S, Simic MG (1995) Antioxidant potential of gallic catechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study. *J Am Chem Soc* 117: 9881-9888
63. Bartosz G (2003) Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem* 37: 220-293
64. Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302
65. Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856
66. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidant to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progr Lipid Res* 46: 244-282
67. Grajek W (2007) *Przeciwutleniacze w żywności – aspekty technologiczne, molekularne i analityczne*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa

## Phenolic chain-breaking antioxidants – their activity and mechanisms of action

Ewelina Kowalewska, Grzegorz Litwinienko 

Faculty of Chemistry, University of Warsaw, 1 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

e-mail: litwin@chem.uw.edu.pl

**Key words:** free radicals, lipid peroxidation, chain-breaking antioxidants, antioxidant activity, phenols

### ABSTRACT

This tutorial review is focused on some mechanistic aspects of peroxidation process and chemistry of phenolic chain-breaking antioxidants. Lipids are susceptible to oxidative degradation caused by radicals and during autoxidation (peroxidation) the chain reaction is mediated by peroxy radicals leading to damage of integrity and the protective and organizational properties of biomembranes. Phenolic antioxidants provide active system of defence against lipid peroxidation, however, the effectiveness of their antioxidant action depends on several important parameters. Stoichiometry of the reaction with free radicals, fate of a phenoxyl radical, polarity of the microenvironment, localization of antioxidant molecules, their concentration and mobility, kinetic solvent effects, and interactions with other co-antioxidants are considered. Principal mechanisms of reaction between phenols and free radicals (Hydrogen Atom Transfer, Proton Coupled Electron Transfer and two mechanisms based on separate electron transfer and proton transfer steps) are described.

# Znaczenie pro-utleniających właściwości flawonoidów w indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne

Małgorzata Muzolf-Panek<sup>1</sup>

Bożena Tyrakowska<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Katedra Zarządzania Jakością Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań  
<sup>2</sup>Katedra Instrumentalnych Metod Oceny Jakości, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Poznań

<sup>✉</sup>Katedra Instrumentalnych Metod Oceny Jakości, Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu; 61-875 Poznań, ul. Niepodległości 10, tel.: (61) 856 93 83, faks: (61) 854 39 93, e-mail: bożena.tyrakowska@ue.poznan.pl

Artykuł otrzymano 4 marca 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 9 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** chinony, enzymy detoksykacyjne, EpRE, flawonoidy, właściwości pro-utleniające

**Wykaz skrótów:** EpRE (ang. *Electrophile-Responsive Element*) – element kontrolujący ekspresję genów kodujących enzymy detoksykacyjne; Keap1 (ang. *Kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology-associating protein 1*) – białko represorowe, Nrf2 (ang. *Nuclear erythroid 2-related factor*) – czynnik jądrowy, NQO1 – oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon 1

## STRESZCZENIE

Flawonoidy są jednym z głównych składników codziennej diety człowieka. W ostatnich kilkudziesięciu latach obserwuje się rosnące zainteresowanie tą grupą związków, ze względu na ich korzystny wpływ na organizm. Pro-zdrowotne właściwości flawonoidów przypisuje się głównie ich aktywności przeciwutleniającej. Jednakże coraz częściej pojawiają się wyniki badań wskazujące, że właściwości pro-utleniające flawonoidów, uznawane dotychczas za niekorzystne dla organizmu, mogą prowadzić do korzystnych, pro-zdrowotnych efektów, poprzez indukcję ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne. W niniejszym artykule przedstawiono stan najnowszej wiedzy na temat indukcji ekspresji genu kodującego ważny enzym detoksykacyjny – oksydoreduktazę NAD(P)H:chinon 1 przez flawonoidy (flawonole, flawony i flawan-3-ole). Zaprezentowano również wyniki badań potwierdzające rolę właściwości pro-utleniających flawonoidów w mechanizmie tej indukcji.

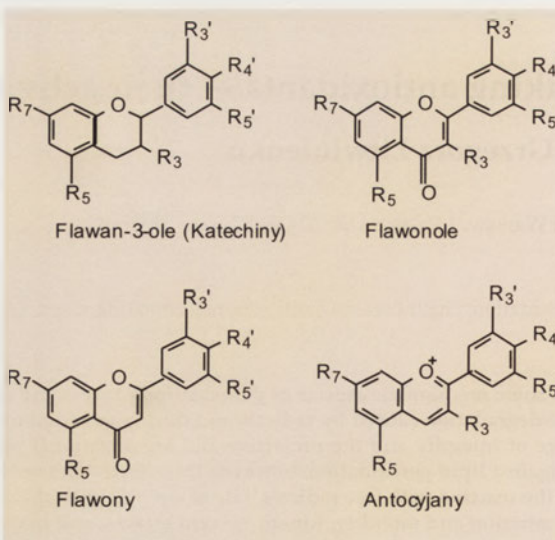
## WPROWADZENIE

Flawonoidy są najliczniejszą grupą związków polifenolowych. Charakterystyczną cechą ich struktury jest szkielet difenylopropanoidowy (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) [1]. W obrębie tej grupy wyróżnia się kilka klas związków różniących się stopniem utlenienia pierścienia γ-piranowego m. in. flawony, flawonole, flawan-3-ole (katechiny), antocyjany (Ryc. 1). Ze względu na rozpowszechnienie w świecie roślin flawonoidy stanowią ważny składnik codziennej diety człowieka. Obecnie szacuje się, że ilość spożywanego flawonoidów wynosi średnio 189,7 mg dziennie, z czego aż 83,5% stanowią flawan-3-ole (katechiny), flawanony 7,6%, flawonole 6,8%, a antocyjany 1,6% [2]. Bogatym źródłem flawonoidów są owoce i warzywa, a także czekolada, wino i herbata [3,4].

Znamienną cechą flawonoidów jest ich wysoka aktywność przeciwutleniająca [1]. Korzystne działanie flawonoidów w mechanizmie obronnym organizmu przeciwko tzw. chorobom cywilizacyjnym o podłożu wolnorodnikowym (jak np. choroba niedokrwienna serca, nowotwory, choroby neurodegeneracyjne) przypisuje się głównie ich właściwościom przeciwutleniającym. Jednakże, związki te mogą, w zależności od stężenia oraz warunków środowiska (obecności jonów metali przejściowych, tlenu cząsteczkowego i enzymów) wykazywać działanie pro-utleniające. Właściwości pro-utleniające związków polifenolowych uważano dotychczas za niekorzystne dla organizmu człowieka, ponieważ powstające w reakcjach utleniania polifenoli silnie elektrofilowe chinony oraz reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać makrocząsteczki komórek, co stanowi istotny

element w powstawaniu i rozwoju wielu chorób tzw. cywilizacyjnych.

Badania ostatnich kilkunastu lat dostarczają jednak coraz więcej dowodów na pozytywną rolę pro-utleniających właściwości flawonoidów. Dzięki właściwościom pro-utleniającym flawonoidy mogą wpływać na wiele procesów zachodzących w komórce poprzez regulację czynników transkrypcyjnych, szlaków sygnalizujących a także regulację cyklu komórkowego i apopto-



Rycina 1. Wzory strukturalne różnych klas flawonoidów.

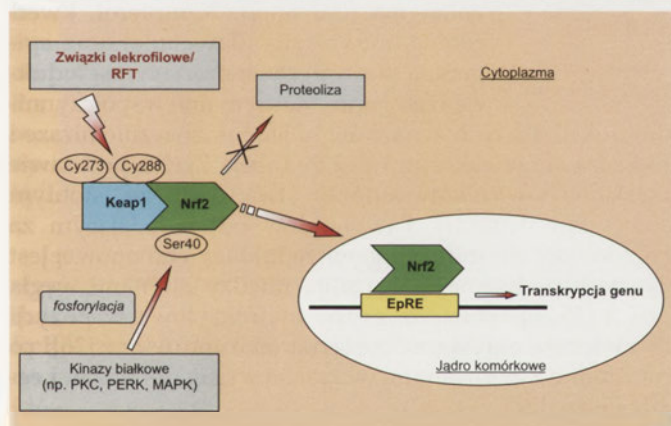


zy [5-7]. Stres oksydacyjny indukowany przez flawonoidy, uznawany dotychczas za objaw lub przyczynę występowania stanów patologicznych w organizmie, może również aktywować geny kodujące enzymy II fazy biotransformacji (enzymy detoksykacyjne) [8,9].

W niniejszym artykule omówiono wyniki najnowszych badań dotyczące indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne takie jak np. oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon 1 przez flawonoidy ze szczególnym uwzględnieniem znaczącej roli właściwości pro-utleniających flawonoidów w mechanizmie tej indukcji.

## MECHANIZM EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY DETOKSYKACYJNE

Indukcja ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne zachodzi za pośrednictwem elementu kontrolującego EpRE (ang. *Electrophile-Responsive Element*), znanego wcześniej jako ARE (ang. *Antioxidant-Responsive Element*), który znajduje się w regionach promotorowych genów kodujących enzymy detoksykacyjne [10]. Ponadto w regulacji ekspresji tych genów biorą udział dwa czynniki białkowe: czynnik transkrypcyjny Nrf2, wiążący się z EpRE oraz białko represorowe Keap1 (Ryc. 2) [11-13].



Rycina 2. Mechanizm ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne za pośrednictwem elementu kontrolującego EpRE. Pozostałe oznaczenia na rycinie: Ser40 – reszta seryny 40, Cy273 i Cy288 – reszty cysteiny 273 i 288, Keap1 – białko represorowe, PKC – kinaza białkowa C, PERK – kinaza białkowa siateczki śródplazmatycznej, MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami.

Kluczowym regulatorem ekspresji genów jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *Nuclear erythroid 2-related factor*), który reguluje ekspresję ponad 200 genów kodujących enzymy II fazy biotransformacji, katalizujące reakcje sprzężania chroniące organizm przed działaniem toksycznych metabolitów oraz reaktywnych form tlenu. Do enzymów tych zaliczane są między innymi: oksigenaza hemowa, S-transferaza glutationowa, katalaza, dehydrogenaza aldehydowa, dehydrogenaza leukotrienu B4, reduktaza tioredoksyny i oksydoreduktaza NAD(P)H:chinon 1 [11,12,14-16]. W neutralnych warunkach aktywność Nrf2 jest blokowana przez białko represorowe Keap1 (ang. *Kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology-associating protein 1*) bogate w reszty cysteiny, które tworzy w cytoplazmie kompleks z czynnikiem Nrf2 (Ryc. 2). Kompleks białkowy

jest odpowiedzialny za utrzymanie Nrf2 w cytoplazmie na stałym poziomie, a nadmiar Nrf2 jest kierowany do ubikwityno-zależnej proteolizy. Decydującym etapem aktywacji ekspresji genów zawierających EpRE jest uwolnienie Nrf2 z kompleksu z Keap1, które może nastąpić między innymi na skutek bezpośredniej reakcji elektrofilowego induktora z białkiem Keap1 powodując powstanie mostka disiarczkowego w Keap1 (Cy273-Cy288). Pod wpływem reakcji induktora (cząsteczki elektrofilowe lub reaktywne formy tlenu) z białkiem represorowym (Keap1), zmianie ulega konformacja Keap1 i czynnik Nrf2 zostaje uwolniony z kompleksu, przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z elementem EpRE promotora, w wyniku czego następuje transkrypcja genu kodującego dany enzym. Uwolnienie Nrf2 z kompleksu Keap1-Nrf2 może nastąpić również na skutek fosforylacji czynnika Nrf2 (Ser40) przez specyficzne kinazy biorące udział w przekazywaniu sygnału w komórce (Ryc. 2).

## FLAWONOIDY JAKO INDUKTORY EKSPRESJI GENÓW

Do związków, które pełnią rolę induktorów genów kodujących enzymy detoksykacyjne należy wiele substancji naturalnie występujących w diecie człowieka. Zalicza się do nich np. indolo-3-karbinol, iberynę czy izotiocyjaniany [16-18].

Najnowsze wyniki badań wskazują na istotną rolę flawonoidów jako induktorów ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne [19-24]. W Tabeli 1 przedstawiono maksymalne wartości współczynników indukcji ekspresji genu oksydoreduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) w komórkach EpRE-LUX (komórki wątrobowe myszy Hepa-1c1c7, do których wprowadzono gen reporterowy, kodujący lucyferazę, zawierający w regionie promotorowym element EpRE genu NQO1 człowieka) wyznaczone dla różnych klas flawonoidów. Wyniki zawarte w Tabeli 1 wskazują, że spośród badanych flawonoidów najlepszymi induktorami ekspresji genu kodującego NQO1, wyrażony jako współczynnik indukcji, wykazują kwercetyna, mirycetyna, moryna i fisetyna (Tabela 1). Maksymalne wartości współczynników indukcji tych związków zawierają się między 8,0 a 10,0. Autorzy badań stwierdzili, że wysoka aktywność flawonoli jako induktorów zależy w dużym stopniu od obecności w cząsteczkach tych związków grupy hydroksylowej w pozycji C3. Wniosek ten wysunięto na podstawie porównania poziomu indukcji flawonoli (np. kwercetyny) z poziomem indukcji flawonów (np. luteoliny), które nie posiadają w swej strukturze ugrupowania C3-OH.

Spośród flawonów najbardziej skutecznym induktorem ekspresji genu NQO1 za pośrednictwem EpRE jest luteolina, której współczynnik indukcji wynosi 3,0 [21]. Pozostałe flawony charakteryzują się niższymi współczynnikami indukcji (Tabela 1). Lee-Hilz i współpracownicy [21] wykazali, że zablokowanie grupy hydroksylowej w pozycji C7, w wyniku jej metylacji, znacznie zwiększa aktywność flawonów jako induktorów. Pochodna metylowa apigeniny charakteryzuje się współczynnikiem indukcji 5,0 a metylowa pochodna chryzyny współczynnikiem 4,4 [21]. Maksymalne poziomy indukcji wyznaczone dla flawonoli i flawonów,

**Tabela 1.** Maksymalne wartości współczynników indukcji ekspresji genu oksydoreduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1) wyznaczone dla flawonoidów w komórkach EpRE-LUX (komórki wątrobowe myszy Hepa-1c1c7, do których wprowadzono gen reporterowy, kodujący lucyferazę, zawierający w regionie promotorem element EpRE genu NQO1 człowieka) [21,22]. Współczynnik indukcji definiuje się jako zdolność związku do indukowania ekspresji genu lucyferazy w odniesieniu do próbki kontrolnej [10].

Flawonoid	Miejsce podstawienia grupy OH	Reszta kwasu galusowego	Współczynnik indukcji
<b>flawonole [21]:</b>			
kwercetyna	R3, R5, R7, R3', R4'	-	10,0
mirycetyna	R3, R5, R7, R3', R4', R5'	-	9,0
moryna	R3, R5, R7, R2', R4'	-	8,4
fisetyna	R3, R7, R3', R4'	-	8,0
kampferol	R3, R5, R7, R4'	-	7,1
resokampferol	R3, R7, R4'	-	6,5
galangina	R3, R5, R7	-	4,0
<b>flawony [21]:</b>			
luteolina	R5, R7, R3', R4'	-	3,0
bajkaleina	R5, R6, R7	-	2,5
chryzyna	R5, R7	-	2,1
apigenina	R5, R6, R4'	-	2,0
<b>flawan-3-ole (katechiny) [22]:</b>			
galusan epigalokatechiny	R5, R7, R3', R4', R5'	R3	5,0
galusan galokatechiny	R5, R7, R3', R4', R5'	R3	4,2
epigalokatechyna	R3, R5, R7, R3', R4', R5'	-	3,8
galokatechyna	R3, R5, R7, R3', R4', R5'	-	3,2
galusan epikatechiny	R5, R7, R3', R4'	R3	1,1
epikatechyna	R5, R7, R3', R4'	-	1,0

przedstawione w Tabeli 1, obserwowano w zakresie stężeń 10-20  $\mu\text{M}$ .

Ekspresję genów zawierających w regionach promotorowych element EpRE aktywują transkrypcyjnie także niektóre katechiny [22,24]. Muzolf-Panek i wsp. [22] wykazali, że największą skuteczność wśród katechin jako induktora ekspresji genu kodującego enzym NQO1 wykazuje galusan epigalokatechiny (Tabela 1). Dobrymi induktorami ekspresji genu kodującego NQO1 są, poza galusanem epigalokatechiny, również epigalokatechyna, galokatechyna i galusan galokatechiny. Maksymalne wartości współczynników indukcji tych związków, wyznaczone w zakresie stężeń 100-200  $\mu\text{M}$ , zawierają się w przedziale 3,2-5,0 (Tabela 1). Galusan epikatechiny oraz epikatechyna i jej izomer katechyna nie aktywują ekspresji genu kodującego NQO1. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że zdolność do indukcji wykazują jedynie katechiny posiadające ugrupowanie piragalolowe w cząsteczce [22]. Odmiennie wyniki badań uzyskali Chen i wsp. [24], którzy stwierdzili, że najsilniejszymi induktorami ekspresji genu reporterowego EpRE-lucyferaza w grupie badanych katechin są galusan epigalokatechiny oraz galusan epikatechiny. Epigalokatechyna oraz epikatechyna charakteryzują się ponad czterokrotnie niższymi współczynnikami indukcji w porównaniu do ich galusanów. Katechyna natomiast nie indukuje ekspresji genów zawierających w regionach promotorowych element EpRE. Ponieważ najwyższy poziom indukcji ekspresji genu reporterowego EpRE-lucyferaza wykazują jedynie katechiny zawierające resztę kwasu galusowego, Chen i wsp. [24] wysunęli wniosek, że zdolność katechin do indukcji jest wynikiem obecności reszty kwasu

galusowego w ich cząsteczkach. Wyniki badań Muzolf-Panek i wsp. [22] nie potwierdziły tego wniosku, ponieważ galusan epikatechiny nie indukuje ekspresji genu NQO1.

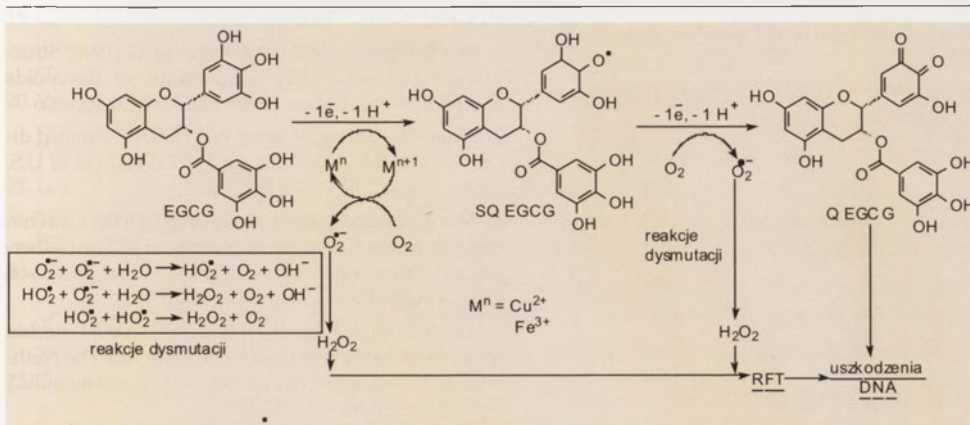
Indukcję ekspresji genu kodującego reduktazę chinonową przez flawonoidy w komórkach Hepa-1c1c7 badali Yang i Liu [25]. Wyniki tych badań przedstawiono w Tabeli 2. Autorzy wykazali, że spośród badanych flawonoidów, najlepszym induktorem ekspresji genu reduktazy chinonowej jest kwercetyna (flawonol) z maksymalnym współczynnikiem indukcji 3,5 (dla stężenia 30  $\mu\text{M}$ ). Dobrym induktorem jest również genisteina (izoflawon), której maksymalny współczynnik indukcji wynosi 2,8 (dla stężenia 50  $\mu\text{M}$ ). Pozostałe flawonoidy: delfinidyna, malwidyna (antocyjany), katechiny i rutyna (flawonol) wykazują słabą indukcję ekspresji genu kodującego reduktazę chinonową. Uda i współpracownicy [26] wykazali, że w zakresie stężeń 0-100  $\mu\text{M}$  najbardziej aktywnym flawonoidem jest galangina (flawonol). Kampferol, kwercetyna, mirycetyna (flawonole) oraz apigenina (flawon) również aktywują indukcję tego genu. Maksymalne współczynni-

ki indukcji dla tych związków są jednak znacznie niższe i mieszczą się w zakresie 1,6-2,8 (Tabela 2). Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że istotnym elementem struktury flawonoidów odpowiadającym za ich zdolność do indukcji genu reduktazy chinonowej jest obecność podwójnego wiązania między atomami węgla C2-C3 [25,26]. Ponadto, grupa hydroksylowa w pozycji C3 zwiększa aktywność związku jako induktora [26], co jest zgodne z cytowanymi wcześniej wynikami badań Lee-Hilz i wsp. [21].

#### ROLA WŁAŚCIWOŚCI PRO-UTLENIAJĄCYCH FLAWONOIDÓW W INDUKCJI EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH ENZYMY DETOKSYKACYJNE

Wyniki badań wskazują, że flawonoidy indukują ekspresję genów kodujących enzymy detoksykacyjne za pośrednictwem EpRE. Związki te nie mają jednak charakteru elektrofilowego, który jest kluczowy dla mechanizmu indukcji (Ryc. 2). Znane są raczej jako antyoksydanty zdolne do oddawania elektronu. Charakter elektrofilowy, konieczny do aktywacji transkrypcyjnej genu zawierającego w regionie promotorowym sekwencję EpRE, posiadają natomiast metabolity flawonoidów o strukturze chinonów, które powstają na skutek utleniania (chemicznego lub enzymatycznego) tych związków.

Powstawanie chinonów flawonoidów jest dobrze udokumentowane w literaturze [22,27-33]. Utlenianie flawonoidów z utworzeniem chinonów może zachodzić bądź w obecności jonów metali przejściowych, bądź w obecności enzymów utleniających takich jak peroksydaza lub tyrozy-naza, niezależnie od obecności jonów metali przejściowych.



Rycina 3. Reakcja utleniania flawonoidów na przykładzie galusanu epigalokatechiny (EGCG). Oznaczenia: SQ EGCG – semichinon galusanu epigalokatechiny, Q EGCG – chinon galusanu epigalokatechiny, RFT – reaktywne formy tlenu.

Powstawanie chinonów flawonoidów jest wynikiem 2-elektronowej reakcji utleniania flawonoidów przebiegającej w jednym lub dwóch etapach (Ryc. 3). Produktami pośrednimi reakcji utleniania flawonoidów do chinonów są rodniki fenoksyłowe. Formy chinonowe są wysoce toksyczne, co wynika z ich dużej reaktywności. Ze względu na silnie elektrofilowy charakter, chinony mogą wiązać się kowalentnie z makrocząsteczkami komórek, powodując zmiany ich struktury i funkcji, co w konsekwencji prowadzi do powstawania i rozwoju wielu chorób degeneracyjnych. Ponadto, zarówno rodniki fenoksyłowe jak i chinony mogą uczestniczyć w cyklu redoks, generując duże ilości reaktywnych form tlenu takich jak np. nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy (Ryc. 3).

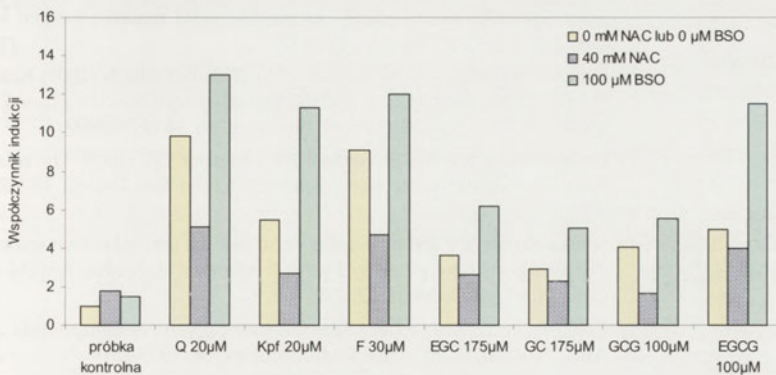
Istotną rolę chinonów flawonoidów, powstających w wyniku ich działania pro-utleniającego, w mechanizmie indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 za pośrednictwem EpRE potwierdzono różnymi drogami [21,22]. Udowodniono przy zastosowaniu metody *in vitro* (utlenianie flawonoidów w obecności tyrozynazy i glutationu, ang. *glutathione-trapping method*), że flawonoidy charakteryzujące się wyso-

z modulowanym poziomem wewnątrzkomórkowego glutationu.

Zarówno Lee-Hilz i wsp. [21] jak i Muzolf-Panek i wsp. [22] stwierdzili, że ekspresja genu NQO1 za pośrednictwem EpRE jest osłabiona w komórkach EpRE-LUX z podwyższonym poziomem wewnątrzkomórkowego glutationu i podwyższona w komórkach z obniżonym poziomem glutationu (Ryc. 4). Im wyższy poziom wewnątrzkomórkowego glutationu, tym większa ilość związków elektrofilowych (chinonów) ulega sprzężeniu z glutationem i tym niższy poziom indukcji. Zmniejszenie poziomu glutationu powoduje zachwianie homeostazy i sprawia, że komórki stają się bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny czyli obserwuje się wyższy poziom indukcji. Zatem zaobserwowane zmiany wartości współczynników indukcji flawonoidów, takich jak kwercetyna, kampferol, fisetyna, epigalokatechyna, galokatechyna, galusan epigalokatechiny i galusan galokatechiny, w komórkach EpRE-LUX z obniżonym lub podwyższonym poziomem glutationu wskazują na istotną rolę chinonów tych flawonoidów, powstających w wyniku ich działania pro-utleniającego, w mechanizmie tej induk-

cji (Ryc. 4). Autorzy wyjaśnili, że utworzone w wyniku utleniania flawonoidów chinony lub reaktywne formy tlenu powstające w cyklu redoks, oddziałują z grupami tiolowymi białka represorowego Keap1, w wyniku czego następuje uwolnienie Nrf2 z kompleksu Keap1-Nrf2. Białko Nrf2 przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie łączy się z elementem EpRE genu kodującego NQO1 i włącza transkrypcyjnie jego ekspresję [21,22].

Dodatkowym potwierdzeniem istotnej roli właściwości pro-utleniających flawonoidów w mechanizmie indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne, takie jak NQO1, są stwierdzone zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi łatwość utleniania flawonoidów a wyznaczonymi doświadczalnie dla tych związków współczynnikami indukcji. Lee-Hilz i wsp. [21] podobnie jak wcześniej Zoete i wsp. [35] wykazali, że war-



Rycina 4. Poziom indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 przez flawonoidy oraz próbkę kontrolną (0,5% DMSO) w komórkach EpRE-LUX z niezmiennym (0 mM NAC lub 0 µM BSO), podwyższonym (40 mM NAC) lub obniżonym (100 µM BSO) poziomem glutationu [21,22]. Badane flawonoidy oznaczono następującymi skrótami: Q – kwercetyna, Kpf – kampferol, F – fisetyna, EGC – epigalokatechyna, GC – galokatechyna, GCG – galusan galokatechiny i EGCG – galusan epigalokatechiny. Pozostałe oznaczenia na rycinie: NAC – N-acetylo-L-cysteina, BSO – DL-butionino-[S,R]-sulfoksymina.

**Tabela 2.** Maksymalne wartości współczynników indukcji ekspresji genu reduktazy chinonowej wyznaczone dla flawonoidów w komórkach Hepa-1c1c7 [25,26].

Flawonoid	Miejsce podstawienia grupy OH	Współczynnik indukcji	Piśmiennictwo
<b>flawonole:</b>			
kwercetyna	R3, R5, R7, R3', R4'	3,5	[25]
		2,1	[26]
galangina	R3, R5, R7	3,6	[26]
kampferol	R3, R5, R7, R4'	2,8	[26]
mirycetyna	R3, R5, R7, R3', R4', R5'	1,6	[26]
<b>izoflawon:</b>			
genisteina	R5, R7, R4'	2,8	[25]
<b>flawon:</b>			
apigenina	R5, R6, R4'	1,6	[26]

tości parametru  $E_{\text{HOMO}}$  21 flawonoidów, odzwierciedlające łatwość oddawania elektronu przez cząsteczkę, korelują z wartościami współczynników indukcji wyznaczonymi dla tych związków. Z kolei Muzolf-Panek i wsp. [22] stwierdzili, że katechiny będące dobrymi induktorami ekspresji genu NQO1 charakteryzują się jednocześnie niskimi wartościami potencjału utleniania – parametru odzwierciedlającego łatwość oddawania elektronu przez cząsteczkę, jak i niskimi wartościami różnicy ciepła tworzenia chinonu – parametru wyrażającego energię potrzebną do utworzenia chinonu katechiny. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że zdolność flawonoidów do indukcji ekspresji genu kodującego NQO1 wynika z łatwości utleniania tych związków, czyli ich zdolności do tworzenia chinonów, będącej wynikiem działania pro-utleniającego związków.

## PODSUMOWANIE

Właściwości pro-utleniające flawonoidów, a więc ich zdolność do tworzenia wysoce reaktywnych chinonów uznawano dotychczas za niekorzystne dla organizmu. Jednakże, w ostatnich latach ujawniono, że powstające w wyniku utleniania związków polifenolowych silnie elektrofilowe chinony mogą wykazywać pozytywny wpływ na organizm człowieka poprzez aktywację ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne.

Z punktu widzenia ochronnego działania składników żywności na organizm człowieka potencjalna zdolność flawonoidów do indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne zasługuje na szczególną uwagę. Selektywna indukcja ekspresji tych genów przez flawonoidy występujące w żywności może stanowić skuteczną ochronę komórek organizmu przed toksycznym działaniem ksenobiotyków i reaktywnych form tlenu. Indukcja enzymów detoksykacyjnych przez flawonoidy może być wykorzystana jako strategia zapobiegania nowotworom oraz innym schorzeniom jak choroby neurodegeneracyjne i układu krążenia [16]. Podsumowując flawonoidy mogą wykazywać efekt pro-zdrowotny nie tylko jako przeciwutleniacze ale również jako pro-utleniacze indukując ekspresję genów kodujących enzymy detoksykacyjne.

## PIŚMIENNICTWO

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956
- Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137: 1244-1252
- Arts IC, van de Putte B, Hollman PC (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem* 48: 1746-1751
- Arts IC, van de Putte B, Hollman PC (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem* 48: 1752-1757
- Chen C, Shen G, Hebbler V, Hu R, Owuor ED, Kong A-NT (2003) Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 24: 1369-1378
- Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS (2005a) Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antiox Redox Signal* 7: 1704-1714
- Yamamoto T, Hs S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G (2003) Green tea polyphenols causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 230-236
- Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys* 476: 107-112
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Biol Med* 36: 838-849
- Boerboom AMJE, Vermeulen M, van der Woude H, Bremer BI, Le-e-Hilz YY, Kampmand E, van Bladeren PJ, Rietjens IMCM, Aarts JMMJG (2006) Newly constructed stable reporter cell lines for mechanistic studies on electrophile-responsive element-mediated gene expression reveal a role for flavonoid planarity. *Biochem Pharmacol* 72: 217-226
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw DW, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11908-11913
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208-1213
- Kobayashi M, Yamamoto M (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46: 113-140
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw DW, Wakabayashi N (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 44: 6889-6899
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw DW, Kensler TW (2005) The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol* 18: 1779-1791
- Krajka-Kuźniak V (2007) Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig Med Dośw* 61: 627-638
- Chen C, Kong AN (2004) Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med* 36: 1505-1516
- Śmiechowska A, Bartoszek A, Namieśnik J (2008) Przeciwrakowe właściwości glukozylanów zawartych w kapuście (*Brassica oleracea* var. *capitata*) oraz produktów ich rozpadu. *Postępy Hig Med Dośw* 62: 125-140

19. Chou F-P, Chu Y-C, Hsu J-D, Chiang H-C, Wang C-J (2000) Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem Pharmacol* 60: 643-650
20. Yang S-P, Wilson K, Kawa A, Raner GM (2006) Effects of green tea extracts on gene expression in HepG2 and Cal-27 cells. *Food Chem Toxicol* 44: 1075-1081
21. Lee-Hilz YY, Boerboom AM, Westphal AH, Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM (2006) Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol* 19: 1499-1505
22. Muzolf-Panek M, Gliszczyńska-Swigło A, de Haan L, Aarts JMMJG, Szymusiak H, Vervoort JM, Tyrakowska B, Rietjens IMCM (2008) Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol* 21: 2352-2360
23. Ogborne RM, Rushworth SA, O'Connell MA (2008) Epigallocatechin activates heme oxygenase-1 expression *via* protein kinase C $\delta$  and Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 584-588
24. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong A-N (2000) Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival. *Arch Pharm Res* 23: 605-621
25. Yang J, Liu RH (2009) Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by grape extracts and selected phytochemicals. *Food Chem* 114: 898-904
26. Uda Y, Price KR, Williamson G, Rhodes MJC (1997) Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by flavonoids. *Cancer Lett* 120: 213-216
27. Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IMCM (2000) Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. *Arch Biochem Biophys* 378: 224-233
28. Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van der Woude H, van Zanden J, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM (2002) Identification of *o*-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular *in vitro* system. *FEBS Lett* 520: 30-34
29. Awad HM, Boersma G, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM (2002) The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chem Res Toxicol* 15: 343-351
30. Boersma MG, Vervoort J, Szymusiak H, Lemańska K, Tyrakowska B, Cenas N, Segura-Aguilar J, Rietjens IMCM (2000) Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem Res Toxicol* 13: 185-191
31. Boots AW, Balk JM, Bast A, Haenen GRMM (2005) The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spread oxidized quercetin-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 93-929
32. Galati G, Moridiani MY, Chan T, O'Brien PJ (2001) Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin *versus* luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med* 30: 370-382
33. Galati G, Sabzervari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91-104
34. Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee M-J, Stark RE, Ho C-T, Yang CS (2005) Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice. *Chem Res Toxicol* 18: 1762-1769
35. Zoete V, Rougee M, Dinkova-Kostova AT, Talalay P, Bensasson RV (2004) Redox ranking of inducers of a cancer-protective enzyme *via* the energy of their highest occupied molecular orbital. *Free Radic Biol Med* 36: 1418-1423

## Role of pro-oxidant properties of flavonoids in the induction of detoxifying enzymes gene expression

Małgorzata Muzolf-Panek<sup>1</sup>, Bożena Tyrakowska<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Quality Management, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznan University of Life Science, 31 Wojska Polskiego St., 60-624 Poznan, Poland

<sup>2</sup>Chair of Instrumental Analysis, Faculty of Commodity Science, Poznan University of Economics, 10 Niepodległości St., 61-875 Poznan, Poland


✉ e-mail: bozena.tyrakowska@ue.poznan.pl

**Key words:** quinone, detoxifying enzyme, EpRE, flavonoids, pro-oxidant properties

### ABSTRACT

Flavonoids are one of the most important components of human daily diet. In recent years flavonoids have become the subject of extensive investigations mostly due to their health-promoting properties. Beneficial health effects of flavonoids are mainly ascribed to their antioxidant activity. However, there is increasing evidence of the positive role of pro-oxidant properties of flavonoids, considered previously as highly unfavorable, through the induction of detoxifying enzymes gene expression. The article discusses recent reports on the EpRE-mediated induction of NQO1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase) gene expression by the flavonoids (flavonols, flavones and flavan-3-oles) and the role of pro-oxidant properties of the flavonoids in the mechanism of this induction.

# Udział melanocytów w ochronie przed stresem fotooksydacyjnym

Krystyna Stępień 

Katedra Analizy Instrumentalnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Sosnowiec

Katedra Analizy Instrumentalnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec; tel.: (32) 364 10 50, e-mail: kstepien@sum.edu.pl

Artykuł otrzymano 12 czerwca 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 16 czerwca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** melanocyty, melanina, melanogeneza, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu,  $\alpha$ -melanotropina

**Wykaz skrótów:** 6-4 PP – fotoprodukty (6-4) pirymidyno-pirymidonowe; ACTH – hormon adrenokortykotropowy; CPD – cyklobutanowe dimery pirymidyny; CRE – element odpowiedzi na cAMP; CREB – białko wiążące element odpowiedzi na cAMP; DCT – tautomeraza DOPAchromowa; DOPA – L-3,4-dihydroksyfenyloalanina; MC1R – receptor melanokortynowy 1; MITF (ang. *microphthalmia associated transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny kontrolujący melanogenezę;  $\alpha$ -MSH –  $\alpha$ -hormon stymulujący melanocyty,  $\alpha$ -melanotropina; PKA – zależna od cAMP kinaza białkowa A; POMC – proopiomelanokortyna; RFT – reaktywne formy tlenu; TYR – tyrozynaza (oksydoreduktaza monofenol, *o*-difenol:tlen); TRP1 – białko 1 pokrewne tyrozynazie; USF-1 (ang. *upstream stimulating factor*) – czynnik transkrypcyjny; UV – promieniowanie nadfioletowe

## STRESZCZENIE

Nadmierna ekspozycja na promieniowanie nadfioletowe (UV) jest jednym z głównych czynników etiologicznych nowotworów skóry. Promieniowanie UV, bezpośrednio lub w sposób pośredni, przez generowanie reaktywnych form tlenu, uszkadza DNA, białka i lipidy błonowe, działa genotoksycznie, wywołuje zapalenie oraz immunosupresję. Kluczową rolę w ochronie skóry przed uszkodzeniami wywołanymi przez promieniowanie UV odgrywają melanocyty, komórki syntetyzujące barwniki melaninowe. W pracy przedstawiono fotoprotekcyjne działanie melanin, regulację melanogenezy w odpowiedzi na promieniowanie UV i rolę białka p53 w tym procesie oraz związek między melanogeniczną a antyoksydacyjną aktywnością melanocytów. Dyskutowany jest również udział, indukowanych przez promieniowanie UV, reaktywnych form tlenu w stymulowaniu syntezy melaniny.

## WPROWADZENIE

Skóra człowieka jest jedynym narządem bezpośrednio wystawionym na działanie promieniowania nadfioletowego (UV) pochodzącego ze Słońca. Chociaż promieniowanie UV jest niezbędne do syntezy witaminy D, nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne może prowadzić do fotokancerogenezy i fotostarzenia skóry [1-3]. Promieniowanie UV, bezpośrednio lub w sposób pośredni, uszkadza kwasy nukleinowe, białka i lipidy błonowe, działa genotoksycznie, wywołuje zapalenie oraz immunosupresję [4-7]. Energia promieniowania z zakresu UVB (290-320 nm) jest bezpośrednio absorbowana przez DNA i może indukować tworzenie mutagennych cyklobutanowych dimerów pirymidyny (CPD) i fotoproduktów (6-4) pirymidyno-pirymidonowych (6-4PP) [6]. Biologiczne efekty promieniowania UVA (320-400 nm) związane są z generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT) poprzez fotoaktywację endogennych i egzogennych fotouczulaczy [5,7]. RFT wywołują oksydacyjne uszkodzenia DNA i coraz więcej dowodów wskazuje na istotny wkład UVA w fotokancerogenezę [8-10]. Ponadto, RFT mogą pośredniczyć w przekazywaniu sygnałów indukowanych w komórkach przez promieniowanie UV. W skórze RFT, szczególnie tlen singletowy i nadtlenek wodoru, tworzone są w wyniku ekspozycji zarówno na UVA jak i na UVB [11,12].

Kluczową rolę w ochronie skóry przed niebezpiecznymi skutkami działania promieniowania UV pełnią melanocyty, komórki wyspecjalizowane w wytwarzaniu i dystrybucji fotoprotekcyjnych barwników melaninowych. Promieniowanie UV stymuluje syntezę melaniny i eksport wytworzonego barwnika do keratynocytów, co objawia się brązowieniem skóry i nazywane jest opaleniem. Zazwyczaj obserwuje się wyraźną korelację między konstytutywną barwą skóry a odpornością na indukowany przez promieniowanie UV rumień i oparzenia słoneczne [13]. Co więcej, badania epidemiologiczne wskazują, że częstość występowania nowotworów skóry jest dużo wyższa u osób z jasną skórą i brakiem zdolności lub słabą zdolnością do opalania (fototyp I i II), niż u osób o ciemnej skórze, które łatwo się opalają [14,15]. Wydaje się, że nie tylko melanina, ale również sam proces melanogenezy jest mechanizmem chroniącym skórę przed promieniowaniem UV, a szczególnie przed generowaniem stresu fotooksydacyjnego.

## MELANOGENEZA

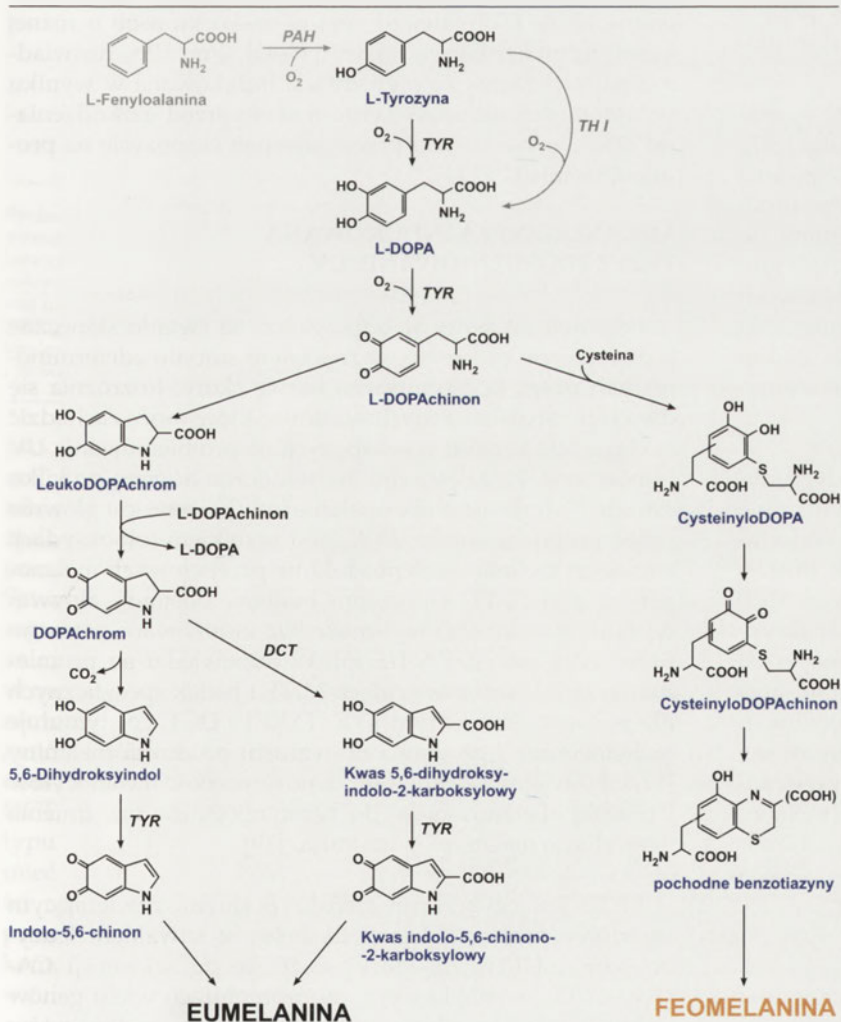
W skórze człowieka melanocyty zlokalizowane są w warstwie podstawnej naskórka. Chociaż stanowią one nieliczną populację (tylko ok. 1%) wśród komórek naskórka, dzięki swoim wypustkom każdy melanocyt pozostaje w kontakcie z około 36 keratynocytami, tworząc tzw. naskórkową jednostkę melaninową [16]. Keratynocyty wydzielają szereg substancji, które regulują przeżywalność, proliferację i różnicowanie melanocytów oraz stymulują melanocyty do wytwa-

rzania melaniny [17,18]. Gęstość melanocytów w skórze ludzi różnych ras/grup etnicznych jest podobna [19].

Melanocyty wytwarzają dwa odrębne typy barwników melaninowych: brązowo-czarną eumelaninę, złożoną głównie z monomerów typu indolowego i żółtą lub czerwoną feomelaninę zawierającą strukturalne podjednostki typu benzotiazyny i benzotiazolu, powstałe w wyniku włączenia cysteiny w szlak melanogenezy. Biosynteza melaniny zachodzi w melanosomach, cytoplazmatycznych organelach melanocytów, których bezpośrednimi prekursorami są wakuolarne domeny wczesnych endosomów [20]. Kluczowym enzymem szlaku eumelanogenezy i feomelanogenezy jest tyrozynaza (oksydoreduktaza monofenol, *o*-difenol:tlen; EC 1.14.18.1; TYR), która katalizuje obligatoryjny etap syntezy melaniny – hydroksylację L-tyrozyny do L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) i utlenianie L-DOPA do L-DOPAchiononu (Ryc. 1). W inicjowaniu procesu melanogenezy mogą również uczestniczyć dwa inne enzymy, hydroksylaza fenylalaninowa i hydroksylaza tyrozynowa I [21]. DOPAchionon jest wysoce reaktywnym związkiem i łatwo ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do leuko-DOPAchromu, który natychmiast zostaje utleniony przez kolejną cząsteczkę DOPAchiononu, a produktami tej reakcji

redoks są DOPAchrom i DOPA. Dalsze losy DOPAchromu zależą od aktywności tautomerazy DOPAchromowej (DCT; EC 5.3.2.3), która katalizuje przegrupowanie DOPAchromu do kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowego (DHICA). W nieobecności tego enzymu DOPAchrom ulega powolnej spontanicznej dekarboksylacji, tworząc 5,6-dihydroksyindol (DHI). Powstałe indole są utleniane przez tyrozynazę do indolochinonów, które polimeryzują tworząc eumelaninę. Do prawidłowej syntezy eumelaniny wymagane jest jeszcze białko TRP1 (białko 1 pokrewne tyrozynazie), które moduluje aktywność tyrozynazy [22]. Synteza feomelaniny obejmuje addycję cysteiny do DOPAchiononu z utworzeniem izomerów cysteinyl-DOPA, które po utlenieniu do chinonów ulegają cyklizacji do pochodnych benzotiazyny. Tworzenie feomelaniny zachodzi przy niskich stężeniach tyrozyny, niskiej aktywności tyrozynazy i nie wymaga obecności TRP1 i DCT [23,24].

Syntetyzowana melanina odkładana jest na fibrylach białkowej matrycy wewnątrz melanosomu. Wypełnione melaniną melanosomy są transportowane do końców wypustek melanocytów i następnie przekazywane do sąsiadujących keratynocytów na drodze fagocytozy, w której uczestniczy aktywowany przez proteazę receptor 2 (PAR-2) na powierzchni keratynocytów. [22]. Ilość i typ syntetyzowanej melaniny oraz liczba, wielkość i kształt melanosomów, a także ich rozmieszczenie w obrębie keratynocytów nie tylko determinują barwę skóry, ale odgrywają również ważną rolę w fotoprotekcji. Ciemna skóra zawiera duże, pojedyncze melanosomy o kształcie elipsoidalnym, wypełnione głównie eumelaniną, natomiast w skórze jasnej melanosomy są małe, mniej liczne, zawierają mniej melaniny i mają tendencję do tworzenia skupisk [25,26]. Melanosomy gromadzą się nad jądrami keratynocytów, tworząc struktury przypominające parasol, co osłania jądro DNA przed promieniowaniem UV [25].



Rycina 1. Szlak biosyntezy eumelaniny i feomelaniny w melanocytach. TYR – tyrozynaza, DCT – tautomeraza DOPAchromowa, PAH – hydroksylaza fenylalaninowa, THI –hydroksylaza tyrozynowa I. Szarym kolorem zaznaczono reakcje, które mogą dodatkowo uczestniczyć w inicjowaniu syntezy melaniny. Opracowanie własne na podstawie [21-24].

## REGULACJA MELANOGENEZY

Głównym determinantem pigmentacyjnego fenotypu człowieka jest receptor melanokortynowy 1 (MC1R) na powierzchni melanocytów [27]. Gen *MC1R* wykazuje wysoki polimorfizm wśród ludzi różnych ras i grup etnicznych. Zidentyfikowano ponad 60 naturalnych wariantów *MC1R*, przy czym allele typu dzikiego dominują wśród czarnoskórych mieszkańców Afryki. Niektóre warianty alleli *MC1R*, określane jako allele *R*, są typowe dla ludzi o rudych włosach i jasnej skórze, którzy są wyjątkowo wrażliwi na promieniowanie słoneczne [27,28].

MC1R należy do grupy receptorów związanych z białkiem G i reguluje zarówno ilość, jak i typ melaniny produkowanej przez melanocyty [28]. Fizjologicznymi agonistami MC1R są: hormon stymulujący melanocyty ( $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanotropina) i hormon adrenokortyko-

tropowy (ACTH), powstające w skórze w wyniku przetwarzania proopiomelanokortyny (POMC). Ponieważ komórki skóry syntetyzują konwertazy PC1 i PC2, a także białko 7B2 niezbędne do generowania enzymatycznie aktywnej formy PC2, uważa się, że potranslacyjne przemiany POMC w skórze zachodzą podobnie jak w ośrodkowym układzie nerwowym [29]. Ekspresję genu i obecność białka POMC wykryto w keratynocytach i melanocytach, a także w innych komórkach skóry, co sugeruje, że lokalnie produkowane melanokortyny mogą regulować melanogenezę poprzez mechanizmy para-, auto- lub intrakrynne [29]. Wiązanie  $\alpha$ -MSH lub ACTH do receptora MC1 prowadzi do aktywacji cyklicznej adenylationowej i wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP, co aktywuje zależną od cAMP kinazę białkową A (PKA). Po translokacji do jądra PKA fosforyluje i aktywuje czynnik transkrypcyjny CREB (białko wiążące element odpowiedzi na cAMP). Ponieważ regiony promotorowe genów *TYR*, *TYRP1* i *DCT* nie posiadają elementu odpowiedzi na cAMP (CRE), transkrypcyjna kontrola melanogenezы jest koordynowana przez czynnik MITF (ang. *microphthalmia associated transcription factor*). CREB wiąże się z domeną CRE w regionie promotorowym genu *MITF*, aktywując jego transkrypcję, a MITF reguluje ekspresję genów *TYR*, *TYRP1* i *DCT* przez wiązanie sekwencji określanych jako kasety M i E w promotorach tych genów [29,30]. Zwiększony poziom melanogenicznych enzymów stymuluje syntezę eumelaniny [31].

Fizjologicznym antagonistą receptora MC1 jest sygnałowe białko *agouti* (ASP u myszy, ASIP u człowieka [28]), które funkcjonuje jako kompetycyjny inhibitor wiązania  $\alpha$ -MSH do MC1R [32]. U myszy, ekspresja genu *agouti* powoduje przełączenie syntezy melaniny z eumelaniny do feomelaniny, a mutacje wywołujące nadprodukcję ASP prowadzą do fenotypu o żółtej sierści [29]. W prawidłowych melanocytach człowieka, które wykazują relatywnie niski konstytutywny poziom ekspresji MC1R, białko ASIP blokuje całkowicie aktywację MC1R przez  $\alpha$ -MSH i znosi stymulujący wpływ  $\alpha$ -MSH na melanogenezę [32].

Synteza MC1R jest regulowana przez jego ligandy, a także przez szereg endokrynych i parakrynych czynników, znanych ze swojego wpływu na melanogenezę. Wykazano, że  $\alpha$ -MSH i ACTH zwiększają poziom *MC1R* mRNA w hodowlach melanocytów [33,34], podczas gdy ASIP drastycznie go redukuje [33]. Wzrost poziomu transkryptu *MC1R* obserwowano w prawidłowych melanocytach człowieka eksponowanych na działanie  $\beta$ -estradiolu, hormonu zaangażowanego w hiperpigmentację, endoteliny-1, interleukiny-1 $\alpha$  i interleukiny-1 $\beta$  [33,35]. Umiarkowany spadek ekspresji *MC1R* zanotowano natomiast w przypadku TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ , cytokin zdolnych do tłumienia melanogenezы [35]. Istotną rolę w regulowaniu ekspresji *MC1R* odgrywa promieniowanie UV [33,35].

#### FOTOPROTEKCYJNE DZIAŁANIE MELANINY

Melanina zlokalizowana nad jądrami keratynocytów działa jak ekran przeciwsloneczny, absorbując i rozpraszając padające promieniowanie, co znacznie zmniejsza jego penetrację w naskórku i chroni jądrowy DNA przed uszkodzeniami wywołanymi przez promieniowanie UV [16,36].

Energia zaabsorbowanego promieniowania jest szybko i efektywnie przekształcana w ciepło w obrębie polimeru melaninowego. Dla eumelaniny stopień konwersji energii absorbowanych fotonów promieniowania UV w ciepło jest większy niż 99% [37]. Fotoprotekcyjne działanie melaniny może wynikać także z jej właściwości antyoksydacyjnych. Eumelanina jest zdolna do wygaszania stanów wzbudzonych fotouczulaczy i tlenu singletowego oraz do oddziaływania z reaktywnymi rodnikami tlenowymi, które mogą być generowane w reakcjach fotochemicznych [37,18]. Istotnie, wykazano, że melanina chroni melanocyty przed oksydacyjnymi uszkodzeniami błony wywołanymi przez promieniowanie UVA [38].

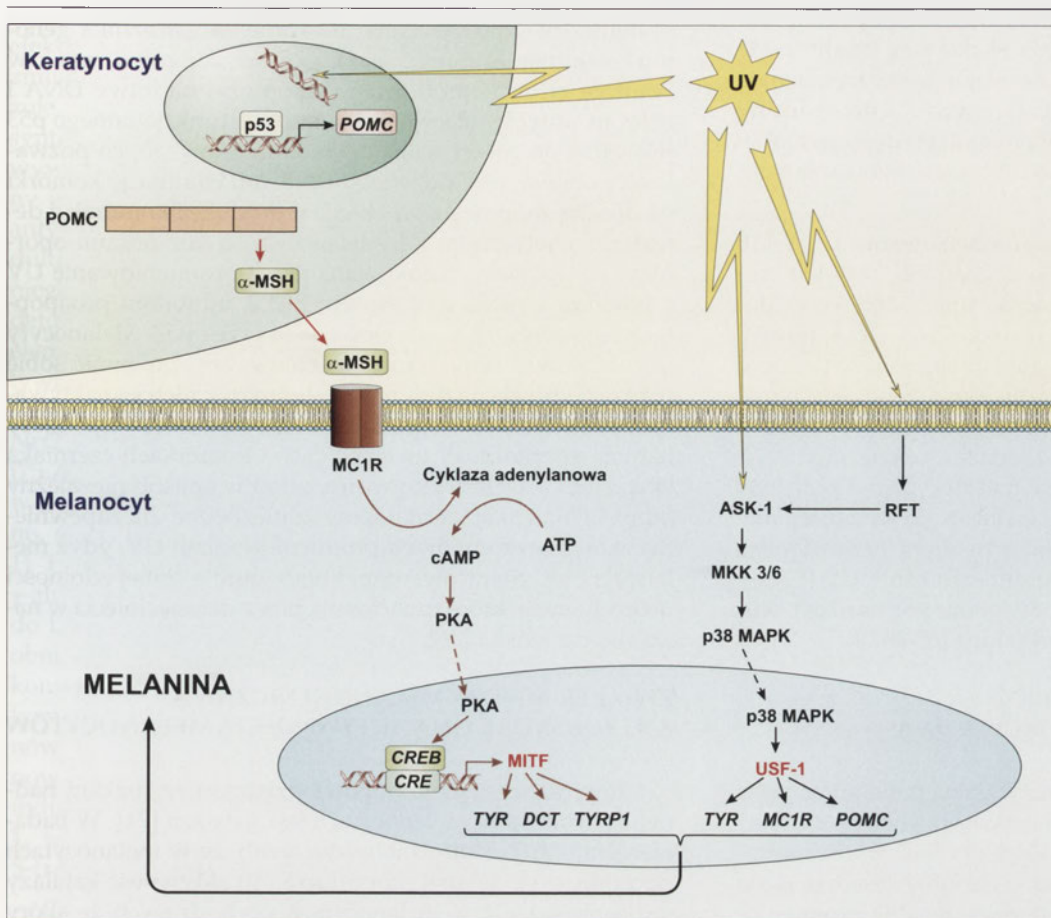
Szereg danych doświadczalnych potwierdza protekcyjne działanie melaniny przeciwko uszkodzeniom DNA wywołanym przez promieniowanie UV. Porównanie indukcji fotoproduktów DNA w hodowlach melanocytów człowieka o różnej zawartości melaniny, po ekspozycji na pojedynczą dawkę UV, wykazało odwrotną korelację między poziomem CPD i 4-6PP a stopniem pigmentacji melanocytów, przy czym poziom fotoproduktów był najniższy w melanocytach o największej zawartości melaniny [39,40]. Odwrotną korelację między zawartością melaniny a zasięgiem uszkodzeń DNA indukowanych *in situ* przez promieniowanie UVA/UVB stwierdzono w naskórku osób o różnej konstytutywnej barwie skóry [41-43]. Ponadto, doświadczalnie wykazano, że pigmentacja indukowana w wyniku powtarzanych ekspozycji chroni skórę przed uszkodzeniami DNA, wywołanymi przez następne ekspozycje na promieniowanie UV [44].

#### MELANOGENEZA INDUKOWANA PRZEZ PROMIENIOWANIE UV

Brązowienie skóry w odpowiedzi na światło słoneczne jest złożonym procesem, w znacznym stopniu zdeterminowanym przez konstytutywną barwę skóry. Rozróżnia się dwa typy opalania: natychmiastowe, które może zachodzić w ciągu kilku minut po ekspozycji na promieniowanie UV i opóźnione, które zaczyna być widoczne dopiero po kilku dniach. Natychmiastowe opalenie indukowane jest głównie przez promieniowanie UVA i jest wynikiem fotooksydacji istniejącej melaniny lub produktów przejściowych melanogenezы przez RFT. Opóźnione opalenie obejmuje aktywację funkcji melanocytów i może być indukowane zarówno przez UVB jak i UVA [16,45]. W odpowiedzi na promieniowanie UV wzrasta synteza MITF i białek specyficznych dla melanocytów, w tym TYR, TYRP1 i DCT, co stymuluje melanogenezę i prowadzi do wzrostu produkcji melaniny [19,45]. Zwiększa się również dendrytyczność melanocytów i transfer melanosomów do keratynocytów oraz zmienia dystrybucja melaniny w naskórku [19].

MITF jest czynnikiem transkrypcyjnym, zawierającym zasadowy motyw helisa-pętla-helisa z suwakiem leucynowym (b-HLH-LZ), który wiąże się do sekwencji CA-(T/C)GTG, zwanej kasetą E, w promotorach wielu genów i aktywuje ich transkrypcję. Specyficzna dla melanocytów izoforma MITF, MITF-M, uczestniczy w regulacji szlaków sygnalizacyjnych, które kontrolują rozwój, proliferację, przeżywalność i różnicowanie melanocytów, jak również





**Rycina 2.** Stymulacja melanogenezy przez promieniowanie UV. Białko p53, aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem UV, wiąże się do promotora genu proopiomelanokortyny (POMC) i aktywuje jego transkrypcję w keratynocytach.  $\alpha$ -Melanotropina ( $\alpha$ -MSH), powstająca w wyniku przetwarzania białka POMC, wiąże się z receptorem melanokortynowym 1 (MC1R) na powierzchni melanocytów, co aktywuje szlak cAMP. Czynniki transkrypcyjne MIF reguluje syntezę melanogenicznych enzymów, tyrozynazy (TYR), tautomerazy DOPAchromowej (DCT) i białka 1 pokrewnego tyrozynazie (TRP1). Aktywowana przez promieniowanie UV kinaza białkowa p38 fosforyluje czynnik transkrypcyjny USF-1. Wiązanie ufosforylowanego (reszta seryny 153) USF-1 z sekwencją kasety E w promotorach genów *MC1R*, *POMC* i *TYR* aktywuje ich ekspresję i prowadzi do wzrostu syntezy eumelaniny. Opracowanie własne na podstawie [30,52-57,69].

proces melanogenezy [46]. MIF-M reguluje transkrypcję melanogenicznych enzymów: tyrozynazy, TRP-1 i DCT, a także białka PMEL17 niezbędnego do tworzenia matrycy melanosomu oraz białka Rab27a, które uczestniczy w transporcie melanosomów w wypustkach melanocytu [30,47,48]. Synteza MIF w odpowiedzi na promieniowanie UV jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny SOX9, w sposób zależny od cAMP i PKA [49]. Wykazano, że synteza SOX9 w melanocytach wzrasta znacząco po ekspozycji na promieniowanie UVB, a SOX9 aktywuje bezpośrednio promotory genów MIF i DCT, zwiększa syntezę DCT i tyrozynazy oraz stymuluje syntezę melaniny [49]. Wzrost poziomu DCT, której aktywność wpływa na proporcje monomerów typu DHICA i DHI w polimerze eumelaninowym, może mieć istotne znaczenie dla przeciwutleniających właściwości melaniny. Stwierdzono bowiem, że inaktywacja DCT prowadzi do wzrostu poziomu RFT i ilości apoptycznych komórek w naskórku myszy po ekspozycji na promieniowanie UVA [50].

Wpływ promieniowania UV na melanogenezę zależy silnie od układu  $\alpha$ -MSH/MC1R i przejawia się na poziomie zarówno receptora jak i aktywującego go ligandu. Promie-

niowanie UV wywołuje wzrost ekspresji genów *POMC* i *MC1R* w melanocytach [51,52]. Transkrypcja tych genów regulowana jest przez czynnik USF-1 (ang. *upstream stimulating factor*), po aktywacji przez kinazę białkową p38 aktywowaną przez mitogeny (MAPK) [52]. USF-1, podobnie jak MIF, jest czynnikiem transkrypcyjnym typu b-HLH-LZ i wiąże się z zachowanymi w ewolucji motywami kasety E w promotorach genów docelowych [53]. W odpowiedzi na promieniowanie UV kinaza p38 fosforyluje resztę treoniny w pozycji 153 USF-1, a ufosforylowany USF-1 wiąże się z motywem kasety E w promotorach genu *MC1R* i genu *POMC*, indukując ich ekspresję [52,53]. Szlak kinaza p38/USF-1 pośredniczy również w indukowanej przez promieniowanie UV syntezie tyrozynazy w melanocytach [54] (Ryc. 2).

Dobrze poznana rola p38 MAPK jest zapobieganie niekontrolowanej proliferacji komórek przez zatrzymanie ich

wzrostu i apoptozę, szczególnie w odpowiedzi na reaktywne formy tlenu. RFT mogą aktywować kinazę 1 sygnalizacji apoptozy (ASK1), która jest aktywatorem kinazy p38 [55,56]. Szereg dowodów wskazuje, że w indukowanej przez promieniowanie UV aktywacji kinazy p38 pośredniczą również RFT i ASK1 [57]. Można więc przypuszczać, że sam proces melanogenezy jest odpowiedzią na stres oksydacyjny wywołany przez promieniowanie UV.

#### FOTOU CZULAJĄCE WŁAŚCIWOŚCI MELANINY

Naskórkowe melanocyty są komórkami szczególnie narażonymi na stres oksydacyjny. Promieniowanie UVA penetruje do warstwy podstawnej naskórka, w której rezydują melanocyty i generuje w tych komórkach RFT. Sam proces melanogenezy jest również źródłem RFT wewnątrz melanocytów. Anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru produkowane są podczas katalizowanej przez tyrozynazę oksydacji difenoli (DOPA, DHI, DHICA) do ich chinonów i w spontanicznych reakcjach polimeryzacji chinonowych produktów pośrednich melanogenezy [58]. Powstałe RFT mogą aktywować tyrozynazę przez wiązanie się z dwo-

ma atomami miedzi w centrum aktywnym enzymu i przekształcenie nieaktywnej formy *met* w aktywną katalitycznie formę *oko*-tyrozynazy [21,59]. Ze względu na katalazową i peroksygenazową aktywność tyrozynazy, generowany nadtlenek wodoru może być, przynajmniej częściowo, wykorzystywany przez tyrozynazę do metabolizowania substratów [58,60].

Ekspozycja melanocytów na promieniowanie UVA lub symulowane promieniowanie słoneczne (SSR, 300–400 nm) wywołuje, zależne od dawki, generowanie nadtlenu wodoru i indukowanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA [61–63]. Uważa się, że te procesy są w dużym stopniu związane z fotouczulaniem melaniny lub produktów przejściowych melanogenezy przez promieniowanie UV. Istotnie, w badaniach *in vitro* wykazano, że indukcja jednoniciowych pęknięć DNA przez UVA lub SSR jest niższa w melanocytach o mniejszej zawartości endogennej melaniny i wzrasta po stymulacji melanogenezy – przez suplementację medium hodowlanego tyrozyną, przed ekspozycją na promieniowanie UV [62,63]. Niektóre dane wskazują, że feomelanina jest bardziej skutecznym fotouczulaczem niż eumelanina [63–65].

#### MELANOGENEZA – ODPOWIEDŹ MELANOCYTÓW NA USZKODZENIA DNA

Pierwsze sugestie dotyczące związku melanogenezy z uszkodzeniami DNA lub ich naprawą pochodzą z obserwacji, że endonukleaza V bakteriofaga T4, enzym naprawiający uszkodzenia DNA przez wycinanie zasad, dodana do hodowli melanocytów po ich ekspozycji na promieniowanie UV zwiększa nie tylko naprawę DNA, ale również zawartość melaniny [66]. Kolejne badania wykazały, że małe fragmenty jednoniciowego DNA, takie jak dinukleotydy tymidynowe (pTpT), wprowadzone do hodowli melanocytów wywołują wzrost poziomu tyrozynazy oraz stymulację syntezy melaniny w nieobecności UV. Miejscowa aplikacja pTpT indukuje zwiększoną pigmentację skóry zwierząt doświadczalnych, klinicznie i histologicznie identyczną z tą wywołaną przez promieniowanie UV [66]. Co więcej, pTpT wywołuje aktywację białka supresorowego p53, które odgrywa zasadniczą rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, naśladując również pod tym względem promieniowanie UV [67]. Udział białka p53 w stymulowaniu melanogenezy potwierdziły badania, w których wykazano, że p53 zwiększa syntezę melaniny przez aktywację syntezy tyrozynazy, ale mechanizm tego procesu nie został wyjaśniony [68]. Późniejsze badania wykazały, że p53 bezpośrednio kontroluje transkrypcyjną aktywność promotora genu *POMC*, a indukcja *POMC* przez promieniowanie UV (*via* p53) zachodzi preferencyjnie w keratynocytach i tylko w niewielkim stopniu w melanocytach [69]. Po ekspozycji skóry myszy na promieniowanie UV, aktywacja p53 wzmaga transkrypcję genu *POMC* w keratynocytach, zwiększając wydzielanie  $\alpha$ -MSH, który następnie stymuluje receptor MC1R na melanocytach, dając w rezultacie wzrost produkcji melaniny (Ryc. 2). Natomiast u myszy pozbawionych genu p53 nie wykryto aktywacji *POMC*, ani wzrostu poziomu  $\alpha$ -MSH i indukowanej przez promieniowanie UV pigmentacji [69]. Wysunięto sugestię, że p53 funkcjonuje jako sensor/efektor melanogenezy indukowanej przez promieniowanie UV [69].

Białko p53, powszechnie uważane za „strażnika genomu”, reguluje ekspresję wielu genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, apoptozy, naprawy DNA i ochrony antyoksydacyjnej. Akumulacja funkcjonalnego p53 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego, co pozwala na naprawę uszkodzonego DNA lub eliminację komórki na drodze apoptozy i zapobiega reprodukcji komórek z defektem genetycznym [1]. Melanocyty są komórkami opornymi na apoptozę indukowaną przez promieniowanie UV z powodu wysokiego poziomu BCL2, inhibitora proapoptycznego genu *BAX* aktywowanego przez p53. Melanocyty używają także innych mechanizmów, aby zapewnić sobie przeżycie po ekspozycji na UV. Jednym z nich jest aktywacja genu *GADD45a*, regulatora cyklu komórkowego, który hamuje apoptozę. W melanocytach i komórkach czerniaka ekspresja *GADD45a* aktywowana jest w sposób niezależny od p53 [70]. Takie mechanizmy są niezbędne dla zapewnienia skórze ochrony przed promieniowaniem UV, gdyż melanocyty są zróżnicowanymi komórkami o słabej zdolności do proliferacji, które funkcjonują przez dziesięciolecia w naskórku człowieka [36].

#### ZWIĄZEK MIĘDZY MELANOGENICZNĄ A ANTYOKSYDACYJNĄ AKTYWNOŚCIĄ MELANOCYTÓW

Głównym enzymem odpowiedzialnym za rozkład nadtlenu wodoru w melanocytach jest katalaza [71]. W badaniach *in vitro* i *ex vivo* zaobserwowano, że w melanocytach pochodzących z jasnej skóry (typ I i II) aktywność katalazy jest mniejsza niż w melanocytach pochodzących ze skóry ciemniejszej [65,72]. Stosując pierwotne hodowle melanocytów o różnym stopniu pigmentacji wykazano, że ekspresja katalazy na poziomie mRNA i białka, oraz jej aktywność enzymatyczna korelują z poziomem tyrozynazy i zawartością melaniny w melanocytach [71]. Te dane wskazują na istnienie mechanizmu zdolnego do skoordynowanej regulacji aktywności melanogenicznej i antyoksydacyjnej, co może reprezentować synergistyczną strategię w celu ochrony przed uszkodzeniami wywołanymi przez promieniowanie UV. W konsekwencji osoby o jasnej skórze są bardziej podatne na stres fotooksydacyjny. Nie wiadomo, jaki czynnik reguluje syntezę katalazy w melanocytach. Można spekulować, że analogicznie do innych komórek [73], katalaza jest indukowana w odpowiedzi na chroniczną ekspozycję na stres oksydacyjny o niskim natężeniu, związany z syntezą melaniny. Warto zaznaczyć, że niski poziom aktywności katalazy i niski poziom syntezy tego białka, mimo niezmiennego poziomu mRNA katalazy, wykryto w naskórku pacjentów z bielactwem nabytym (*vitiligo*), chorobie o postępującym charakterze, w której dochodzi do utraty funkcjonalnych melanocytów [74].

$\alpha$ -MSH, główny stymulator melanogenezy, odgrywa ważną rolę w ochronie melanocytów przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez promieniowanie UV.  $\alpha$ -MSH jest zdolny do hamowania generowania nadtlenu wodoru w melanocytach, indukowanego przez promieniowanie UV [61]. Dodanie  $\alpha$ -MSH do hodowli melanocytów 4 dni przed ekspozycją na promieniowanie UV powodowało zmniejszenie poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA, mierzonych testem kometowym oraz hamowało tworzenie 7,8-di-

hydro-8-oxoguaniny (8-oxodG) [61]. Takiego ochronnego efektu nie obserwowano w melanocytach zawierających zmutowaną formę (utrata funkcji) receptora MC1, co wskazuje, że antyoksydacyjne działanie  $\alpha$ -MSH, podobnie jak synteza melaniny, wymaga aktywacji MC1R [61].  $\alpha$ -MSH wywołuje także podwyższenie poziomu katalazy i ferrytyny w melanocytach, co dodatkowo zwiększa ich potencjał antyoksydacyjny [61]. Ostatnio wykazano, że  $\alpha$ -MSH moduluje syntezę czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i zależnych od niego genów [75]. Nrf2 aktywuje syntezę enzymów fazy II detoksykacji, zawierających w promotorach swoich genów element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE). Konstytutywnie, Nrf2 wiązany jest przez białko Keap 1 i zatrzymywany w cytoplazmie. W warunkach stresu oksydacyjnego Nrf2 jest uwalniany od Keap 1 i translokowany do jądra [75,76]. Aktywację szlaku Nrf2 w ludzkich melanocytach w odpowiedzi na promieniowanie UVA opisano niedawno, wykazując silną indukcję oksygenazy hemowej 1 (HO-1) i umiarkowaną indukcję lekkiej podjednostki ligazy  $\gamma$ -glutamylcysteinyłowej (GCLM) [76]. W przeciwieństwie do UVA, promieniowanie UVB wywołuje w melanocytach obniżenie zawartości Nrf2 i HO-1, nawet poniżej poziomu konstytutywnego, a  $\alpha$ -MSH w fizjologicznych stężeniach kompensuje supresyjny wpływ UVB na ekspresję tych genów. Co więcej, wykazano, że w melanocytach nie ekspozycyjnych na promieniowanie UV  $\alpha$ -MSH jest zdolny do indukowania ekspresji Nrf2 i zależnych od Nrf genów HO-1,  $\gamma$ -GCS (syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinyłowej), szczególnie S-transferazy glutationowej Pi [75].

Czynnik transkrypcyjny MITF, który aktywuje transkrypcję białek niezbędnych dla syntezy melaniny, reguluje również komórkową odpowiedź na reaktywne formy tlenu przez transkrypcyjną regulację APE-1/Ref-1 (apurynowa/apirymidynowa endonukleaza-1/czynnik redoks-1) [77]. APE-1/Ref-1 jest wielofunkcyjnym białkiem zaangażowanym w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad i regulację redoks wielu czynników transkrypcyjnych, między innymi p53, AP-1, i NF- $\kappa$ B, w odpowiedzi na subtoksyczne poziomy RFT. W porównaniu z prawidłowymi melanocytami, poziom APE-1/Ref-1 jest znacząco wyższy w komórkach czerniaka, co może służyć jako adaptacyjna odpowiedź na stres oksydacyjny [78].

## PODSUMOWANIE

Udział melanocytów w ochronie skóry przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez promieniowanie UV jest złożony i nie ogranicza się tylko do fotoprotekcyjnych funkcji wytwarzanej melaniny. RFT generowane w melanocytach w wyniku fotouczulania melaniny lub wywołane przez nie uszkodzenia DNA są sygnałem do uruchomienia kaskady szlaków prowadzących do wzrostu syntezy melaniny. Melanogeneza jest więc odpowiedzią melanocytów na zwiększony poziom RFT indukowany przez promieniowanie UV. Istnieje ścisły związek między melanogeniczną a antyoksydacyjną aktywnością melanocytów, co wskazuje, że prawidłowo przebiegający proces melanogenezy chroni upigmentowane komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez promieniowanie UV. Deregulacja melanogenezy pociąga za sobą obfite i niekontrolowane generowanie RFT, co może inicjować kaskadę zdarzeń prowadzących

do uszkodzenia melanocytów. Taki scenariusz był wcześniej proponowany dla wyjaśnienia roli melatoniny w patogenezie bielactwa nabytego, choroby charakteryzującej się postępującą depigmentacją i utratą epidermalnych melanocytów [74]. Czerniak, złośliwy nowotwór skóry wywodzący się z melanocytów, wykazuje poważne nieprawidłowości w strukturze melanosomów, co wpływa na zmiany struktury syntetyzowanej melaniny [79]. Takie wadliwe melanosomy generują duże ilości RFT. RFT generowane są również w wyniku zwiększonego metabolizmu transformowanych komórek i reakcji immunologicznej skierowanej przeciwko guzowi. W komórkach czerniaka RFT pośredniczą w aktywacji wielu szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do zwiększenia przeżywalności i proliferacji oraz tłumienia apoptozy, co jest powodem wysokiej oporności czerniaka na chemioterapię [79].


## PIŚMIENNICTWO

- Ibrahim SF, Brown MD (2008) Tanning and cutaneous malignancy. *Dermatol Surg* 34: 460-474
- Beissert S, Loser K (2008) Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 84: 29-34
- Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B: Biol* 63: 41-51
- Pattison DJ, Davies MJ (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* 96: 131-157
- Halliday GM (2005) Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571: 107-120
- Cadet J, Sage E, Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571: 3-17
- Marrot L, Meunier JR (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58: S1 39-48
- Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S (2001) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* 488: 65-76
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4954-4959
- Marrot L, Belaidi JP, Meunier JR (2005) Importance of UVA photoprotection as shown by genotoxic related endpoints: DNA damage and p53 status. *Mutat Res* 571: 175-184
- Ou-Yang H, Stamatas G, Saliou C, Kollias N (2004) A chemiluminescence study of UVA-induced oxidative stress in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 122: 1020-1029
- Hakozaki T, Date A, Yoshii T, Toyokuni S, Yasui H, Sakurai H (2008) Visualization and characterization of UVB-induced reactive oxygen species in a human skin equivalent model. *Arch Dermatol Res* 300 (Suppl 1): S51-S56
- Rees JL (2004) The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 75: 739-751
- Armstrong BK, Kricger A (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B: Biol* 63: 8-18
- Maddodi N, Setaluri V (2008) Role of UV in cutaneous melanoma. *Photochem Photobiol* 84: 528-536
- Brenner M, Hearing VJ (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84: 539-549
- Hirobe T (2004) Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res* 18: 2-12
- Costin GE, Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 21: 976-994


19. Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J, Coelho SG, Zmudzka BZ, Miller SA, Wolber R, Beer JZ, Hearing VJ (2005) Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 124: 1326-1332
20. Raposo G, Marks M (2007) Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 786-797
21. Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD (2008) Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 17: 395-404
22. Hearing VJ (2005) Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci* 37: 3-14
23. Ito S (2003) A chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 16: 230-236
24. Simon J, Peles D, Wakamatsu K, Ito S (2009) Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 563-579
25. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ (2007) The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 282: 27557-27561
26. Hennessy A, Oh C, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, Rees J (2005) Eumelanin and pheomelanin concentration in human epidermis before and after UVB irradiation. *Pigment Cell Res* 18: 220-223
27. Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadekaro AL, Swope VB, Starner R (2008) The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocyte – A shift of paradigm. *Photochem Photobiol* 84: 501-508
28. Garcia-Borrón JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18: 393-410
29. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84: 1155-1228
30. Busca R, Ballotti R (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13: 60-69
31. Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ (2005) MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 571: 133-152
32. Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R, Abdel-Malek ZA (2003) Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann NY Acad Sci* 994: 359-365
33. Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA (2002) Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 15: 433-439
34. Rouzaud F, Annereau JP, Valencia JC, Costin GE, Hearing VJ (2003) Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. *FASEB J* 17: 2154-2156
35. Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, Inoue Y, Pawelek J, Ichihashi M (1998) Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol* 139: 216-224
36. Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA (2003) Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res* 16: 434-447
37. Meredith P, Sarna T (2006) The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res* 19: 572-594
38. Kwam E, Dahle J (2003) Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-a-induced membrane damage. *J Invest Dermatol* 121: 564-569
39. Smit NP, Vink AA, Kolb RM, Steenwinkel MJ, van den Berg PT, van Nieuwpoort F, Roza L, Pavel S (2001) Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes. *Photochem Photobiol* 74: 424-430
40. Hauser JE, Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Terzieva S, Schwemmer S, Babcock G, Rao MB, Ito S, Abdel-Malek ZA (2006) Melanin content and MC1R function independently affect UVR-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res* 19: 303-314
41. Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, Korossy KS, Miller SA, Beer JZ, Hearing VJ (2003) UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J* 17: 1177-1179
42. Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, Kornhauser A, Miller SA, Tadokoro T, Berens W, Beer JZ, Hearing VJ (2006) Human skin responses to UV radiation: Pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 20: E630-E639
43. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F (2006) Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res* 19: 606-614
44. Yamaguchi Y, Coelho SG, Zmudzka BZ, Takahashi K, Beer JZ, Hearing VJ, Miller SA (2008) Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Exp Dermatol* 17: 916-924
45. Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ, Ito S, Smuda C, Passeron T, Choi W, Batzer J, Yamaguchi Y, Beer JZ, Hearing VJ (2007) Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 20: 2-13
46. Widlund HR, Fisher DE (2003) Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22: 3035-3041
47. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE (2003) MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocyte and melanoma. *Am J Pathol* 163: 333-343
48. Chiaverini C, Beuret L, Flori E, Busca R, Abbe P, Bille K, Bahadoran P, Ortonne JP, Bertolotto C, Ballotti R (2008) Microphthalmia associated transcription factor (MITF) regulates rab27A gene expression and controls melanosome transport. *J Biol Chem* 283: 12635-12642
49. Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, Hoashi T, Le Pape E, Takahashi K, Ballotti R, Hearing VJ (2007) SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13984-13989
50. Jiang S, Liu XM, Dai X, Zhou Q, Lei TC, Beermann F, Wakamatsu K, Xu SZ (2010) Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: Implication for skin photoprotection against UVA radiation. *Free Radic Biol Med* 48: 1144-1151
51. Schiller M, Brzoska T, Böhm M, Metzger D, Scholzen T, Rougier A, Luger TA (2004) Solar-simulated ultraviolet-induced upregulation of the melanocortin-1 receptor, proopiomelanocortin, and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in human epidermis *in vivo*. *J Invest Dermatol* 122: 468-476
52. Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett DC, Vaultont S, Goding CR, Galibert MD (2004) UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 279: 51226-51233
53. Corre S, Galibert MD (2005) Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18: 337-348
54. Galibert MD, Carreira S, Goding CR (2001) The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced *Tyrosinase* expression. *EMBO J* 20: 5022-5031
55. Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375
56. Zhou Q, Mrowietz U, Rostami-Yazdi M (2009) Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radic Biol Med* 47: 891-905
57. Li J, Zhou Y, Wang C (2007) p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *J Biomed Sci* 14: 303-312

58. Mastore M, Kohler L, Nappi A (2005) Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. *FEBS J* 272: 2407-2415
59. Wood JM, Chavan B, Hafeez I, Schallreuter KU (2004) Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1412-1417
60. Yamazaki S, Morioka C, Itoh S (2004) Kinetic evaluation of catalase and peroxxygenase activities of tyrosinase. *Biochemistry* 43: 11546-11553
61. Song X, Mosby N, Yang J, Xu A, Abdel-Malek Z, Kadekaro AL (2009)  $\alpha$ -MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 809-818
62. Marrot L, Belaidi JP, Meunier JR, Perez P, Agapakis-Causse C (1999) The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment. *Photochem Photobiol* 69: 686-693
63. Wenczl E, Van der Schans GP, Roza L, Kolb RM, Timmerman AJ, Smit NPM, Pavel S, Schothorst AA (1998) (Pheo)Melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 111: 678-682
64. Takeuchi S, Zhang W, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ, Kraemer KH, Brash D (2004) Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15076-15081
65. Maresca V, Flori E, Briganti S, Camera E, Cario-Andre M, Taieb A, Picardo M (2006) UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. *J Invest Dermatol* 126: 182-190
66. Eller MS, Gilchrist BA (2000) Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res* 13 (Suppl 8): 94-97
67. Eller MS, Asarch A, Gilchrist BA (2008) Photoprotection in human skin – a multifaceted SOS Response. *Photochem Photobiol* 84: 339-349
68. Khlgatian MK, Hadshiew IM, Asawanonda P, Yaar M, Eller MS, Fujita M, Norris DA, Gilchrist BA (2002) Tyrosinase gene expression is regulated by p53. *J Invest Dermatol* 118: 126-132
69. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SC, Fisher DE (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128: 853-864
70. Box NF, Terzian T (2008) The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 525-533
71. Maresca V, Flori E, Briganti S, Mastrofrancesco A, Fabbri C, Mileo AM, Paggi MG, Picardo M (2008) Correlation between melanogenic and catalase activity in *in vitro* human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 200-205
72. Picardo M, Maresca V, Eibenschutz L, De Bernardo C, Rinaldi R, Grammatico P (1999) Correlation between antioxidants and phototypes in melanocytes cultures. A possible link of physiologic and pathologic relevance. *J Invest Dermatol* 113: 424-425
73. Sen P, Chakraborty PK, Raha S (2005) p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) up-regulates catalase levels in response to low doses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment through enhancement of mRNA stability. *FEBS Lett* 579: 4402-4406
74. Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M, Slominski A, Ellassiuty YE, Kemp EH, Giachino C, Liu JB, Luiten RM, Lambe T, Le Poole IC, Dammak I, Onay H, Zmijewski MA, Dell'Anna ML, Zeegers MP, Cornall RJ, Paus R, Ortonne JP, Westerhof W (2008) Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol* 17: 139-160
75. Kokot A, Metzke D, Mouchet N, Galibert MD, Schiller M, Luger TA, Bohm M (2009)  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone counteracts the suppressive effect of UVB on Nrf2 and Nrf-dependent gene expression in human skin. *Endocrinology* 150: 3197-3206
76. Marrot L, Jones C, Perez P, Meunier JR (2008) The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 79-88
77. Liu F, Fu Y, Meyskens FL (2009) MITF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J Invest Dermatol* 129: 422-431
78. Yang S, Irani K, Heffron SE, Jurnak F, Meyskens FL (2005) Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE-1/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE-1/Ref-1 inhibitor. *Mol Cancer Ther* 4: 1923-1935
79. Fruehauf JP, Trapp V (2008) Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? *Expert Rev Anticancer Ther* 8: 1751-1757

## The role of melanocytes in protection against photooxidative stress

Krystyna Stępień 

Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, 1 Narcyzów St., 41-200 Sosnowiec, Poland

 e-mail: kstepien@sum.edu.pl

**Key words:** melanocytes, melanin, melanogenesis, oxidative stress, reactive oxygen species,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone

### ABSTRACT

Excessive exposure to solar ultraviolet radiation is an essential etiological factor for skin cancer. UV radiation, directly or indirectly through the generation of reactive oxygen species (ROS), causes damage to DNA, proteins and lipids, and induces inflammation and immunosuppression. Cutaneous pigmentation afforded by melanocytes is the main photoprotective mechanism in human skin. In response to UV, melanocytes produce melanin pigments and transfer them to adjacent keratinocytes. This review describes: (i) the photoprotective action of melanin; (ii) the regulation of UV-induced melanogenesis and the role of p53 in this process; (iii) the relation between melanogenic and antioxidant activities in melanocytes. The possible involvement of UV-induced ROS in the stimulation of melanin synthesis is also discussed.

# Dinitrozyłowe kompleksy żelaza – budowa i znaczenie biologiczne

Hanna Lewandowska<sup>1</sup>

Kamil Brzóska<sup>1</sup>

Sylwia Męczyńska-Wielgosz<sup>1</sup>

Karolina Rumianek<sup>1</sup>

Grzegorz Wójciuk<sup>1</sup>

Marcin Kruszewski<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Zakład Naukowy Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

<sup>2</sup>Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki, Lublin

✉Zakład Naukowy Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa; e-mail: m.kruszewski@ichtj.waw.pl

Artykuł otrzymano 16 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 2 kwietnia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** tlenek azotu, reaktywne formy azotu, metabolizm żelaza, pula labilnego żelaza, nitrozyłacja białek

**Wykaz skrótów:** BSA – albumina surowicy wołowej; DNIC – dinitrozyłowe kompleksy żelaza (ang. *dinitrosyl iron complexes*); EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny; EDRF – czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego (ang. *endothelium-derived relaxing factor*); GMP – monofosforan guanozyny; GSH – glutation; GST – S-transferaza glutationowa; Hb – hemoglobina; HSF – czynniki transkrypcyjne szoku cieplnego (ang. *Heat Shock Transcription Factors*); HSP – białko szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*); IRE – sekwencja reagująca na żelazo (ang. *iron responsive element*); IRP – białko regulujące żelazo (ang. *Iron Regulatory Protein*); LIP – pula labilnego żelaza (ang. *Labile Iron Pool*); MRP1 (ABCC1) – białko oporności wielolekowej 1 (ang. *multidrug resistance protein 1*); NAC – N-acetylocysteina; \*NO – tlenek azotu (II); RFT – reaktywne formy tlenu; RFA – reaktywne formy azotu; sGC – rozpuszczalna cykloaza guanylanowa (ang. *soluble guanylyl cyclase*); SoxR – czynnik transkrypcyjny SoxR

**Podziękowanie:** Praca finansowana ze środków na działalność statutową IChTJ (HL, KB, GW), IMW (MK), projekt badawczy MNiSW N204 0778 33 (KR, MK) i N204 0777 33 (SM-W, MK).

## STRESZCZENIE

Powstawanie dinitrozyłowych kompleksów żelaza (DNIC) w warunkach fizjologicznych jest związane z występowaniem stanu zapalnego, chorób układu nerwowego i nowotworów. Akumulacja DNIC zbiega się z intensywną produkcją tlenu azotu przez makrofagi, komórki nerwowe, śródbłonek, komórki Langerhansa i hepatocyty. DNIC są uważane za formę, w jakiej może być w żywych komórkach przechowywany i stabilizowany tlenek azotu. Początkowo uważane były za uboczny produkt oddziaływania \*NO ze składnikami komórki, jednakże obecnie przypisuje im się istotne funkcje biologiczne. DNIC hamują agregację płytek krwi, rozszerzając naczynia krwionośne obniżają ciśnienie krwi, biorą udział w indukcji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres oksydacyjny. Ich pojawienie się w komórkach poddanych działaniu \*NO jest ściśle zsynchronizowane z zahamowaniem aktywności enzymów żelazowo-siarkowych I i II kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz mitochondrialnej akonitazy. DNIC nieodwracalnie hamują aktywność reduktazy glutationowej, a w sposób odwracalny również S-transferaz glutationowych. Biorą również udział w regulacji puli labilnego żelaza w komórce.

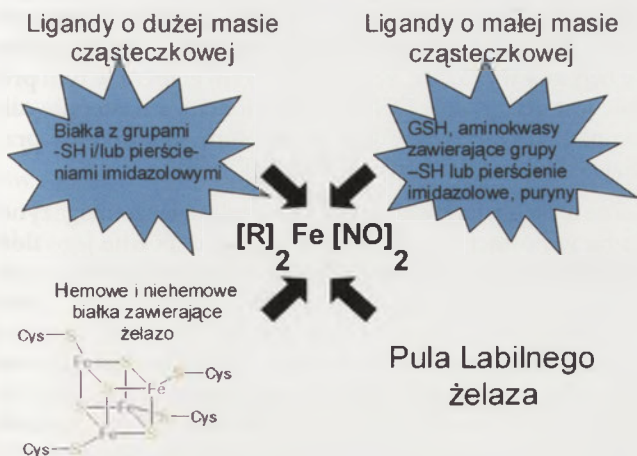
## WPROWADZENIE

Paramagnetyczne dinitrozyłowe kompleksy żelaza odkryto ponad 40 lat temu jako pierwsze kompleksy tlenu azotu naturalnie występujące w organizmach żywych. Prawdopodobnie pierwszego dowodu na tworzenie się dinitrozyłowych kompleksów żelaza w żywych komórkach dostarczyli Commoner i wsp. [1] w roku 1965. Za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego zarejestrowali oni w wątrobach szczurów, u których wywołano chemicznie zmiany nowotworowe, sygnał o wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g = 2,04$ . Sygnał ten poprawnie zinterpretowano jako pochodzący od kompleksu żelaza z tlenkiem azotu i ligandami zawierającymi grupy sulfhydryłowe [2].

DNIC powstają w organizmach żywych w warunkach fizjologicznych i patologicznych związanych ze stanem zapalnym, reperfuzyją po niedokrwieniu, chorobami układu nerwowego (np. chorobą Parkinsona), nowotworami czy zespołem odrzucenia przeszczepu. Powstawanie DNIC związane jest z intensywną produkcją tlenu azotu przez makrofagi, komórki nerwowe, śródbłonek, komórki Langerhansa lub hepatocyty [3,4]. Odkryciu DNIC poświęcano mało uwagi aż do roku 1986, kiedy tlenek azotu (II) (\*NO) został zidentyfikowany jako śródbłonkowy czynnik relaksujący (EDRF – ang. *endothelium-derived relaxing factor*) czyli substancja odpowiedzialna za rozszerzanie mięśni gładkich naczyń krwionośnych i w efekcie regulująca ciśnienie krwi. Tlenek azotu (II) i jego kompleksy pośredniczą także w przewodzeniu sygnałów nerwowych, regulacji odpowiedzi immunologicznej i apoptozy [5]. Jednocześnie, jako wolny rodnik, \*NO stosunkowo łatwo reaguje ze składnikami komórki, a jego nadprodukcja często zbiega się z występowaniem chorób neurodegeneracyjnych [6]. Ze względu na wysoki współczynnik dyfuzji i rodnikowy charakter, \*NO jest w środowisku komórkowym cząsteczką o krótkim czasie półtrwania. DNIC i nitrozotiole są uznawane za dwie stabilne formy \*NO, w których jego powinowactwo do atomów żelaza i siarki pozwala na zachowanie formy rodnikowej, a jednocześnie chroni komórki przed niebezpiecznymi skutkami działania rodnika.

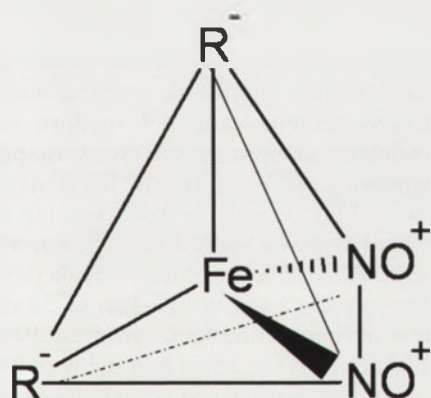
## DINITROZYŁOWE KOMPLEKSY ŻELAZA

Skład DNIC jest zróżnicowany w zależności od warunków, w jakich powstają (Ryc. 1). Atom centralny, będący jodem żelaza na formalnym stopniu utlenienia określanym jako +1 [7] jest związany w pierwszej strefie koordynacji z dwiema cząsteczkami \*NO i najczęściej dwoma innymi ligandami, które koordynują przez tiol, grupę aminową, iminową lub karboksylową. Badania DNIC techniką EPR pozwoliły na określenie struktury przestrzennej tych kompleksów w



Rycina 1. Powstawanie DNIC w komórkach ssaków.

roztworach wodnych i niejednokrotnie sugerowały występowanie w pierwszej sferze koordynacyjnej dodatkowych ligandów (np. wody). Formy krystaliczne uzyskane z rozpuszczalników niepolarnych na ogół nie mają charakteru rodnikowego (Ryc. 2).

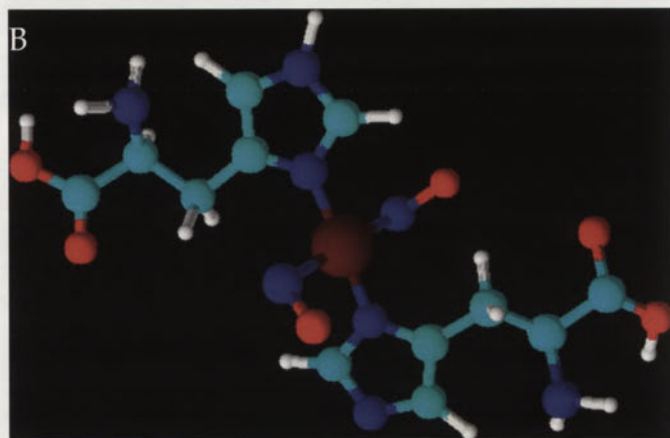


Rycina 2. Struktura przestrzenna DNIC w roztworze wodnym.

Naturalnymi ligandami tworzącymi DNIC mogą być zarówno cząsteczki o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak glutation, cysteina lub homocysteina, jak również peptydy i białka o wysokiej masie cząsteczkowej (Ryc. 3). Głównymi ligandami białkowymi tworzącymi DNIC są białka zawierające żelazo, takie jak białka hemowe, niehemowe białka żelazowo-siarkowe oraz białka zawierające jedno- lub dwuatomowe centra żelazowe. DNIC mogą tworzyć także białka niezawierające żelaza, a posiadające dostępne sterycznie pierścienie imidazolowe lub wolne grupy tiolowe oraz rodniki białek. W warunkach podwyższonej produkcji  $\cdot NO$  pierwsze ulegają nitrozylacji białka zawierające centra żelazowo-siarkowe [8].

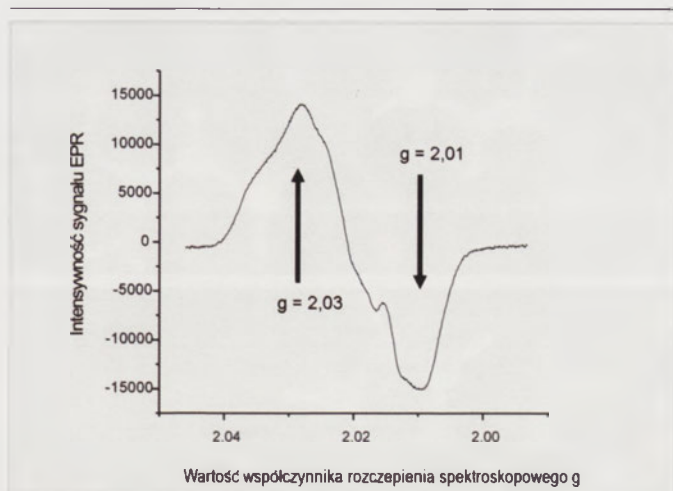
#### BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI DNIC

Ze względu na strukturę elektronową rdzenia, znane stabilne DNIC można podzielić na trzy grupy: paramagnetyczne pojedynczo-rdzeniowe  $\{Fe(NO)_2\}_n$ , dimery zawiera-



Rycina 3. DNIC o małej (A, B) i dużej masie cząsteczkowej (C). (A) DNIC z cysteiną; (B) DNIC z histydyną; (C) DNIC z białkiem MutY. Atom żelaza oznaczono kolorem brązowym, siarki – żółtym, węgla – błękitnym, azotu – niebieskim, tlenu – czerwonym, wodoru – białym.

jące sprzężoną parę  $[\{Fe(NO)_2\}_2]$ , które są diamagnetyczne z powodu parowania elektronów oraz diamagnetyczne kompleksy typu  $\{Fe(NO)_2\}_n$ . Ze względu na łatwość wykrywania metodami spektroskopowymi i powszechność występowania w układach biologicznych najczęściej badane i najlepiej scharakteryzowane są paramagnetyczne DNIC charakteryzujące się widmem EPR o wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g \sim 2,03$  [9] (Ryc. 4). Widma rezonansu elektronowego tych kompleksów są nieswoiste. Podobny sygnał EPR może pochodzić z DNIC białka zawierającego tylko jedną grupę tiolanową, jak i wie-



Rycina 4. Widmo EPR DNIC uzyskane w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej.

le takich grup, lub żadnej, a także z DNIC zawierającego w swoim składzie zarówno ligandy wielko- jak i niskocząsteczkowe. Dotychczas nie udało się sprecyzować, które z powstających w komórce ligandów wchodzi w skład DNIC mających funkcje biologiczne, jednak ostatnie doniesienia wskazują, że znaczna część tych kompleksów jest tworzona przez białka o dużej masie cząsteczkowej. Dinitrozylowe kompleksy z tymi ligandami są stosunkowo stabilne. *In vivo* diglutationylo-dinitrozylowy kompleks żelaza i inne tego typu kompleksy z ligandami o małej masie cząsteczkowej są najprawdopodobniej w równowadze z kompleksami związanymi z cząsteczkami różnych białek [10,11].

Sygnal DNIC zaobserwowano w płynach fizjologicznych, ekstraktach komórkowych i całych komórkach poddanych działaniu  $\cdot\text{NO}$  niezależnie od ich pochodzenia [11,12]. Charakterystyczny sygnał o wartości  $g = 2,03$  uzyskano także dla związków, które służyły jako modele białkowych centrów żelazowo-siarkowych znajdujących w białkach ([2Fe-2S] lub [4Fe-4S]), po reakcji z  $\cdot\text{NO}$  [13].

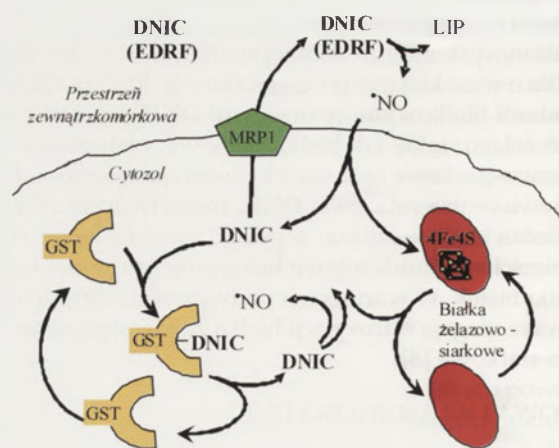
## DZIAŁANIE BIOLOGICZNE

### DNIC, METABOLIZM ŻELAZA I REAKTYWNE FORMY TLENU

Szczególne role żelaza w układach biologicznych związana jest z możliwością zmiany stopnia utlenienia w szerokim zakresie potencjału oksydoredukcyjnego, który może być dodatkowo modyfikowany przez koordynowane ligandy. Ta cecha decyduje jednocześnie o toksyczności żelaza i może prowadzić do uszkodzenia ważnych składników komórki, w tym DNA. Żelazo bierze bowiem udział w reakcji Fentona, w wyniku której tworzy się bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Żywe organizmy wykształciły liczne mechanizmy pozwalające na ścisłą regulację pobierania żelaza oraz jego przechowywanie w formie nieaktywnej w reakcji Fentona. O znaczeniu żelaza dla organizmów żywych świadczy także fakt, że większość komórek ssaków nie posiada mechanizmów umożliwiających specyficzne usuwanie nadmiaru żelaza poza obręb komórki, więc całe żelazo jakie do niej napływa zostaje zużyte lub zmagazynowane. DNIC mogą być jedyną formą w jakiej jony żelaza usuwane są z większości komórek. Badania Richardsona i Watts'a

[14] wykazały, że donory  $\cdot\text{NO}$ , ale nie  $\text{NO}$  i  $\text{ONOO}$ , powodują uwalnianie żelaza z cytosolu na zewnątrz komórki. Proces ten zależy od obecności glutationu i ATP. Szczegółowe badania wykazały, że początkowym etapem w tym procesie jest utworzenie DNIC z glutationem, a następnie cały kompleks przenoszony jest przez błonę komórkową przy udziale białka MRP1 (ABCC1) [15] (Ryc. 5).

Pomimo ścisłej kontroli poziomu żelaza i jego magazynowania w postaci kompleksów z białkami, pewna jego ilość występuje w komórce w postaci puli żelaza labilnie związanego z niskocząsteczkowymi ligandami (LIP, ang. *Labile Iron Pool*), która łatwo może wchodzić w reakcję Fentona [16]. Zwiększonemu wytwarzaniu  $\cdot\text{NO}$  i innych rodników w czasie stresu oksydacyjnego towarzyszy wzrost puli labilnego żelaza, w wyniku jego uwalniania z białek zawierających klastry żelazowo-siarkowe, takich jak akonitaza [17] lub białko Rieske'go [18]. Jednocześnie, jak wynika z niezależnych badań kilku zespołów [19-21], żelazo wchodzące w skład DNIC tworzących się w komórkach pochodzi w znaczącym stopniu z jego labilnej puli, a poziom tworzących się DNIC koreluje z poziomem LIP [20]. Badania EPR wykazały także, że jony żelaza uwolnione z ferrytyny w warunkach stresu oksydacyjnego, biorą udział w syntezie DNIC z glutationem. Tworzenie się DNIC może więc chronić komórki przed niekorzystnym działaniem zwiększonego poziomu jonów żelaza i tlenu azotu. Shumaev i wsp. [22] badał oddziaływanie DNIC z reaktywnymi formami tlenu wywołującymi stres oksydacyjny takimi jak anionrodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, nadtlenek *tert*-butylu i nadtlenoazotyn. Nadtlenek wodoru i *tert*-butylu tylko w niewielkim stopniu powodowały rozpad DNIC z albuminą surowicy wołowej (DNIC-BSA) nawet wtedy, gdy ich stężenia były o rząd wielkości wyższe od stężenia DNIC-BSA. Stąd wniosek autorów, że żelazo związane w tego typu kompleksie nie uczestniczy w reakcjach typu Fentona. Podobne wyniki autorzy uzyskali także dla DNIC z glutationem w obecności nadtlenku wodoru. Wykazali oni, że DNIC z glutationem i cysteiną hamuje w ponad 70% powstawanie rodników probukolu w układzie  $\text{H}_2\text{O}_2$ /probukol/hemina. DNIC z ligandami fosforanowymi były nieco mniej skuteczne (~50% hamowania). Autorzy sugerują, że



Rycina 5. Rola DNIC w metabolizmie żelaza. DNIC – dinitrozylowe kompleksy żelaza, LIP – pula labilnego żelaza, MRP1 – białko oporności wielolekowej ABCC1, GST – S-transferaza glutationowa.



słaba reaktywność DNIC w stosunku do reaktywnych form tlenu może mieć znaczenie dla równowagi pro- i antyoksydacyjnych reakcji w układzie sercowo-naczyniowym, jak również przyczyniać się do stwierdzonej skuteczności albuminy jako cytoprotektora i inhibitora apoptozy.

Wysoka stabilność w roztworze, brak wpływu chelatorów żelaza na rozkład DNIC, a także brak zależności kształtu sygnału EPR od temperatury wskazują na obojętny charakter tych kompleksów. Ich tworzenie może być częściowo odpowiedzialne za ochronę komórek przed szybkim wzrostem LIP do poziomów, które występują w trakcie stanu zapalnego. Liczne doniesienia wskazują także, że DNIC gromadzą się w rejonach komórki zawierających lipoproteiny o wysokiej masie cząsteczkowej, takich jak błony komórkowe [20,21], co eliminuje aktywne oksydoredukcyjne jony żelaza z bezpośredniego sąsiedztwa DNA i powoduje, że komórki stają się mniej podatne na stres oksydacyjny.

#### MODYFIKACJE BIAŁEK

DNIC o małej masie cząsteczkowej mogą modyfikować białka tworząc S-nitrozotiole lub oddziałując na centra aktywne zawierające żelazo, poprzez mechanizm bezpośredniej transnitrozylacji bądź uwalniając tlenek azotu lub jego pochodne [7]. DNIC wywołują akumulację białka szoku cieplnego HSP70 w tkankach szczurów i wykazują działanie ochronne w stanach reperfuzji po niedokrwieniu mięśnia sercowego [23]. Proponowany mechanizm akumulacji HSP70 wywoływanej DNIC jest związany z możliwością uwalniania tlenu azotu z DNIC w formie kationu nitrozonowego  $\text{NO}^+$ . Kation ten reaguje z grupami tiolowymi czynników transkrypcyjnych HSF (ang. *heat shock transcription factors*) powodując powstanie formy przejściowej – S-nitrozotiolu. Rozpad S-nitrozotiolu prowadzi do powstania rodników tiolowych, a w konsekwencji tworzenia się mostków dwusiarczkowych między cząsteczkami HSF, które ulegają trimeryzacji i w efekcie aktywacji.

#### DNIC I BIAŁKA HEMOWE

Najlepiej poznany fizjologiczny celem  $\text{NO}$  jest rozpuszczalna cyklaza guanylanowa (sGC). Tlenek azotu (II) wiąże się ze zredukowanym centrum hemowym sGC powodując uwolnienie wiążącej żelazo reszty histydyny i utworzenie kompleksu  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{NO}$ . Reakcja ta pociąga za sobą zmianę geometrii hemu i zmiany konformacyjne białka do postaci aktywnej enzymatycznie [24]. Oprócz  $\text{NO}$  do aktywacji sGC zdolne są także inne reaktywne formy azotu, takie jak S-nitrozotiole i DNIC o małej masie cząsteczkowej. Aktywacja sGC przez S-nitrozotiole jest hamowana przez chelatory żelaza, co wskazuje na kluczową rolę DNIC w tym procesie [25]. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na podwójną rolę DNIC w procesie aktywacji sGC. Aktywacja sGC może być hamowana przez S-nitrozylację jej reszt cysteinowych co powoduje niewrażliwość sGC na  $\text{NO}$ . Niewrażliwość sGC na  $\text{NO}$  uważane jest z kolei za przyczynę wielu zaburzeń układu krążenia [26]. Mayer i wsp. [27] wykazali, że chociaż w obecności fizjologicznych stężeń glutationu DNIC aktywują sGC, to usunięcie glutationu ze środowiska reakcji powoduje odwracalne zahamowanie aktywności sGC związane z jego S-nitrozylacją. Autorzy

spekulują, że mechanizm ten może być odpowiedzialny za zaburzenia funkcji układu krążenia w stanach stresu oksydacyjnego związanego ze stanami zapalnymi.

#### DNIC I ŻELAZOWE BIAŁKA NIEHEMOWE

Tlenek azotu (II) oddziałuje także z białkami zawierającymi żelazo w formie niehemowej, takiej jak jedno- lub dwuatomowe centra żelazowe oraz klastry żelazowo-siarkowe. Nitrozylacja centrów żelazowo-siarkowych prowadzi do regulacji do ich degradacji i zahamowania aktywności białka. Na przykład, nitrozylacja jedno- lub dwuatomowych centrów żelazowych lipooksygenaz i powstawanie DNIC hamuje aktywność białek [28]. Podobnie jak w przypadku lipooksygenaz, DNIC powstaje również w reakcji ferrytyny i metalotioneiny z  $\text{NO}$  [29,30]. Powstawanie DNIC w reakcji z metalotioneinami chroni przed szkodliwym działaniem reaktywnych form azotu [31].

Centra żelazowo-siarkowe biorące udział w przenoszeniu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym są trudnodostępne dla  $\text{NO}$ . Stwierdzono, że działanie  $\text{NO}$  na białko Rieske'go zawierające klastry  $2\text{Fe}2\text{S}$  powoduje degradację klastra i uwolnienie jonów żelaza. Uwolnione jony żelaza tworzą kompleksy analogiczne do DNIC małej masie cząsteczkowej [18]. Centra żelazowo-siarkowe będące elementem centrów aktywnych i biorące udział w procesach katalizy są łatwiej dostępne dla  $\text{NO}$ . Są to na ogół klastry  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ , w których trzy atomy żelaza są chelatowane przez atomy siarki reszt cysteiny w białkach, a czwarty jest koordynowany przez atomy nieorganicznej siarki [32]. Substrat reaguje z żelazem chelatowanym przez nieorganiczne atomy siarki. Najlepiej poznana grupą enzymów tego typu są mitochondrialne i cytoplazmatyczne akonitazy. Mitochondrialna akonitaza katalizuje izomeryzację cytrynianu do izocytrynianu w cyklu kwasu cytrynowego. Zawiera centrum  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ , które jest niezbędne do tworzenia kompleksu aktywnego z cytrynianem. Apoproteina cytoplazmatycznej akonitazy jest identyczna z białkiem IRP1, biorącym udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji wielu genów kodujących białka metabolizmu żelaza [32]. Wykazano, że  $\text{NO}$  powoduje degradację klastra  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  akonitazy, co prowadzi do powstania apoproteiny i aktywacji IRP1 [33]. Hamowaniu aktywności akonitazy cytoplazmatycznej i aktywacji białka IRP1 towarzyszy powstawanie sygnału EPR charakterystycznego dla DNIC [34]. Badania Kennedy i wsp. [35] wykazały, że powstawanie DNIC związanych z centrum aktywnym akonitazy, jest początkowym etapem degradacji klastra  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ . Podobnie dehydrataza dihydroksykwasy (EC 4.2.1.9) posiadająca w centrum katalitycznym klastry  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  łatwo reaguje z  $\text{NO}$  dając sygnał charakterystyczny dla DNIC, co prowadzi do zahamowania jej aktywności enzymatycznej [36].

W powstawaniu DNIC biorą także udział centra żelazowo-siarkowe pełniące funkcje strukturalne, takie jak na przykład centra  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  glikozylaz z rodziny endonukleazy III. Centra takie są jednak dużo bardziej odporne na utlenianie niż centrum katalityczne akonitazy lub dehydratazy dihydroksykwasy [36]. Jednak one także tworzą DNIC w obecności  $\text{NO}$  zarówno *in vitro*, jaki *in vivo*, chociaż do jego powstania wymagają dużo wyższych stężeń  $\text{NO}$ . Mo-

dyfikacja klastra endonukleazy III powoduje jego rozpad i całkowicie hamuje aktywność glikozydazową enzymu [37]. Na działanie  $\cdot\text{NO}$  wrażliwy jest także klaster  $[4\text{Fe-4S}]$  białka DinG należącego do nadrodziny 2 helikaz DNA i biorącego udział w procesach naprawy DNA z wycięciem nukleotydu oraz rekombinacji homologicznej. Chociaż aktywność helikazowa białka utrzymuje się nawet po 30 minutowym traktowaniu  $1\text{ mM H}_2\text{O}_2$ , już  $750\text{ }\mu\text{M}$  stężenie  $\cdot\text{NO}$  powoduje całkowite zahamowanie jego aktywności. Zahamowaniu aktywności białka towarzyszy powstanie związków z białkiem DNIC i całkowity rozpad klastra  $[4\text{Fe-4S}]$  [38]. Autorzy sugerują, że zahamowanie aktywności enzymów związanych z naprawą DNA, może leżeć u podstaw wywołanej przez  $\cdot\text{NO}$  niestabilności genetycznej. Postuluje się także, że atak  $\cdot\text{NO}$  na klastry żelazowo-siarkowe białek bakteryjnych jest jedną z przyczyn bakteriostatycznego działania tego związku [39].

### UDZIAŁ DNIC W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Ekspresja wielu genów *E. coli* zaangażowanych w obronę przed uszkodzeniami wywołanymi przez RFT i RFA powstające w czasie wybuchu tlenowego podczas aktywacji makrofagów kontrolowana jest przez zawierające centra  $[2\text{Fe-2S}]$  białko SoxR, które aktywuje transkrypcję regulonu SoxS [40]. Białko SoxR aktywowane jest także przez  $\cdot\text{NO}$ , S-nitrozotiole i DNIC o małej masie cząsteczkowej [41]. Aktywacja SoxR przez  $\cdot\text{NO}$  następuje poprzez bezpośrednią modyfikację centrów  $[2\text{Fe-2S}]$  do adduktów dinitrozylo-żelazo-ditiolowych, co zaobserwowano zarówno w nienaruszonych komórkach bakteryjnych jak i oczyszczonym białku SoxR traktowanym  $\cdot\text{NO}$  [42]. Lo i wsp. [43] wykazali, że DNIC związany z klastrem białka SoxR powstaje zarówno w obecności  $\cdot\text{NO}$ , S-nitrozotiole jak i DNIC o małej masie cząsteczkowej.

### S-TRANSFERAZY GLUTATIONOWE – MAGAZYN DNIC

S-transferazy glutationowe (GST) to grupa enzymów biorących udział w obronie komórki przed związkami toksycznymi [44]. GST są prawdopodobnie zaangażowane w wiązanie, przechowywanie i detoksykację DNIC, ponieważ mogą one działać jak pułapka rodnikowa dla tych kompleksów przy zachowaniu aktywności detoksyfikacyjnej przez pozostałe, niezwiązane z DNIC podjednostki [45]. Cytosolowe GST człowieka funkcjonują jako dimery. Można je podzielić na osiem klas na podstawie sekwencji reszt aminokwasowych, struktury trzeciorzędowej, swoistości substratu i inhibitorów oraz właściwości immunologicznych. Każda podjednostka zawiera miejsce wiązania glutationu (G-site), i miejsce wiązania substratu hydrofobowego (H-site). Najważniejszą reakcją katalizowaną przez GST jest sprzężanie atomu siarki glutationu i elektrofilowych centrów toksycznych związków organicznych, co zwiększa ich rozpuszczalność i umożliwia wydalanie [44].

Ostatnio wykazano, że klasy alfa, pi i mi GST, które stanowią 90-95% wszystkich GST ssaków, wiążą z wysokim powinowactwem DNIC, a wartości stałych dysocjacji oszacowano na  $10^{10}$ - $10^9\text{ M}$  [45]. W przypadku glutationylowego DNIC, jeden z ligandów glutationylowych wiąże się z miejscem G enzymu, a drugi zostaje oddysocjowany i zastąpio-

ny przez pierścień fenolowy reszty tyrozyny [46]. Wiązanie tak zmodyfikowanego kompleksu do pierwszej podjednostki dimeru GST indukuje oddziaływanie między podjednostkami i powoduje obniżenie powinowactwa drugiej podjednostki do DNIC, co umożliwia jej utrzymanie normalnej aktywności enzymatycznej [45]. W ten sposób GSTs może chronić białka przed toksycznym działaniem DNIC i jednocześnie zapobiegać usuwaniu DNIC na zewnątrz komórki przez białko MRP1, co spowodowałoby obniżenie komórkowego poziomu żelaza. De Maria i wsp. [46] zauważyli, że z filogenetycznego punktu widzenia ewolucyjna w nadrodzinie S-transferaz glutationowych jest ukierunkowana na optymalizację procesu wiązania DNIC, ponieważ najmłodsze ewolucyjnie klasy alfa, mi i pi wykazują wyższe powinowactwo do DNIC niż najstarsza ewolucyjnie klasa teta.

### DNIC – ZASTOSOWANIE W MEDYCYNIE

Dinitrozylowe kompleksy żelaza są donorami  $\cdot\text{NO}$  o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób sercowo-naczyniowych ze względu na udowodnione działanie rozszerzające naczynia krwionośne i są obecnie intensywnie badane [7,47,48]. Najlepiej poznane pod kątem przenoszenia  $\cdot\text{NO}$  w układach biologicznych są dinitrozylowe kompleksy żelaza z cysteiną (DNIC-Cys) i glutationem (DNIC-GSH) [11,49]. Według Mulsch'a i wsp. [50] są one aktywatorami cykazy guanylanowej i wywołują rozszerzanie naczyń krwionośnych. Dinitrozylo-L-cysteinian żelaza (II) silnie aktywuje preparat rozpuszczalnej cykazy guanylanowej i rozszerza obkurczone segmenty tętnic pozbawione śródbłonna. Jednak kompleks  $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{Cys})_2$  jest niestabilny, jego okres półrozpadu wynosi 2 minuty przy stężeniu  $10\text{ }\mu\text{M}$  w  $310\text{ K}$ . W komórkach ściany aorty kompleks zostaje przekształcony w DNIC dużej masy cząsteczkowej z ligandami białkowymi. W tej postaci DNIC są znacznie bardziej stabilne (do 2 godzin w  $310\text{ K}$ ). Kompleksy te zyskały zainteresowanie ze względu na znikomą toksyczność. DNIC-Cys i DNIC-GSH działają rozkurczowo na izolowane tętnice w zakresach stężeń i czasu odpowiadających kinetyce uwalniania  $\cdot\text{NO}$ . DNIC-Cys, który bardzo szybko dysocjuje z wydzieleniem  $\cdot\text{NO}$  w roztworze wodnym, ma szybkie, ale przemijające działanie rozkurczające na segmenty aorty pozbawione śródbłonna [51]. Z kolei DNIC-GSH uwalniający  $\cdot\text{NO}$  wolniej niż DNIC-Cys, wywołuje długotrwały i narastający efekt rozkurczania i hamowania reakcji na noradrenalinę [52]. Vanin i wsp. [53] opracowali metodę uzyskiwania rozpuszczalnego w wodzie suchego preparatu glutationylowego DNIC w dekstranie. Preparat wykazuje działanie hipotensyjne i działa rozkurczające na naczynia krwionośne, a także hamuje agregację płytki miażdżycowej. Ukazały się również doniesienia, iż preparat ów przyspiesza gojenie ran skóry u szczurów [54]. Preparat wykazuje się niską toksycznością i nie stwierdza się jego mutagennego ani proapoptycznego działania.

### PODSUMOWANIE

Postęp badań nad dinitrozyłowymi kompleksami żelaza przynosi coraz więcej wiedzy na temat ich roli w układach biologicznych. Obecnie wydaje się, że oprócz pierwotnie przypisywanej im roli „magazynu”  $\cdot\text{NO}$ , pełnią one rów-

niez istotną funkcję w przewodzeniu sygnałów komórkowych i są kluczowym elementem niektórych procesów regulujących ekspresję genów i aktywność białek zarówno na poziomie transkrypcji, translacji jak i potranslacyjnym. Zarówno nisko – jak i wielkocząsteczkowe DNIC są bardziej stabilne niż sam tlenek azotu (II) i są uważane za jego przekaźniki. DNIC pośredniczą również w katalizowanej przez żelazo reakcji tworzenia i rozkładu S-nitrozotioili. DNIC hamują agregację płytek krwi, obniżają ciśnienie krwi, rozszerzają naczynia krwionośne, biorą udział w indukcji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzi na stres oksydacyjny. Ich pojawienie się w komórkach poddanych działaniu NO jest ściśle zsynchronizowane z zahamowaniem aktywności enzymów żelazowo-siarkowych I i II kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz mitochondrialnej akonitazy. DNIC nieodwracalnie hamują działanie reduktazy glutationowej, a w sposób odwracalny również S-transferaz glutationowych. DNIC biorą też udział w regulacji puli labilnego żelaza w komórce. Skomplikowana chemia dinitrozylowych kompleksów żelaza jest powodem, dla którego od czasu odkrycia aż do niedawna nie były one gruntownie badane, jednak gwałtowny wzrost zainteresowania DNIC w ostatnich latach na pewno spowoduje, że jeszcze nie raz o nich usłyszymy.

## PIŚMIENNICTWO


- Vithayathil AJ, Ternberg JL, Commoner B (1965) Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature* 207: 1246-1249
- Woolum JC, Commoner B (1970) Isolation and identification of a paramagnetic complex from the livers of carcinogen-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 201: 131-140
- Henry Y, Ducrocq C, Drapier JC, Servent D, Pellat C, Guissani A (1991) Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 20: 1-15
- Singel DJ, Lancaster JR, Jr. Electron paramagnetic resonance spectroscopy and nitric oxide biology. W: Feelisch M, Stamler JS (eds.), *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester: John Wiley. 1996: 341-356
- Ignarro LJ (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53: 503-514
- Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111: 163-169
- van Faassen E, Vanin AF. *Radicals for Life: the Various Forms of Nitric Oxide*, Amsterdam: Elsevier Science Ltd. 2007
- Asanuma K, Iijima K, Ara N, Koike T, Yoshitake J, Ohara S, Shimosegawa T, Yoshimura T (2007) Fe-S cluster proteins are intracellular targets for nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction. *Nitric Oxide* 16: 395-402
- Woolum JC, Tiezzi E, Commoner B (1968) Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *Biochim Biophys Acta* 160: 311-320
- Ueno T, Suzuki Y, Fujii S, Vanin AF, Yoshimura T (1999) *In vivo* distribution and behavior of paramagnetic dinitrosyl dithiolato iron complex in the abdomen of mouse. *Free Radic Res* 31: 525-534
- Ueno T, Yoshimura T (2000) The physiological activity and *in vivo* distribution of dinitrosyl dithiolato iron complex. *Jpn J Pharmacol* 82: 95-101
- Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A (1993) EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 7: 1124-1134
- Tsai ML, Liaw WF (2006) Neutral  $\{Fe(NO)_2\}_9$  dinitrosyliron complex (DNIC)  $[(SC_6H_4-o-NHCOPh)(Im)Fe(NO)_2]$  (Im = imidazole): inter-

conversion among the anionic/neutral  $\{Fe(NO)_2\}_9$  DNICs and Rous-sin's red ester. *Inorg Chem* 45: 6583-6585

- Watts RN, Richardson DR (2001) Nitrogen monoxide (no) and glucose: unexpected links between energy metabolism and no-mediated iron mobilization from cells. *J Biol Chem* 276: 4724-4732
- Richardson DR, Lok HC (2008) The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochim Biophys Acta* 1780: 638-651
- Kruszewski M (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Res* 531: 81-92
- Starzynski RR, Lipinski P, Drapier JC, Diet A, Smuda E, Bartłomiejczyk T, Gralak MA, Kruszewski M (2005) Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism. *J Biol Chem* 280: 4207-4212
- Tonzetich ZJ, Do LH, Lippard SJ (2009) Dinitrosyl iron complexes relevant to Rieske cluster nitrosylation. *J Am Chem Soc* 131: 7964-7965
- Vanin AF, Men'shikov GB, Moroz IA, Mordvintcev PI, Serezhenkov VA, Burbaev DS (1992) The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1135: 275-279
- Lewandowska H, Meczynska S, Sochanowicz B, Sadlo J, Kruszewski M (2007) Crucial role of lysosomal iron in the formation of dinitrosyl iron complexes *in vivo*. *J Biol Inorg Chem* 12: 345-352
- Toledo JC, Jr., Bosworth CA, Hennon SW, Mahtani HA, Bergonia HA, Lancaster JR, Jr. (2008) Nitric oxide-induced conversion of cellular chelatable iron into macromolecule-bound paramagnetic dinitrosyliron complexes. *J Biol Chem* 283: 28926-28933
- Shumaev KB, Gubkin AA, Serezhenkov VA, Lobysheva II, Kosmachevskaya OV, Ruuge EK, Lankin VZ, Topunov AF, Vanin AF (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide* 18: 37-46
- Malyshev IY, Malugin AV, Manukhina EB, Larionov NP, Malenyuk EB, Malysheva EV, Mikoyan VD, Vanin AF (1996) Is HSP70 involved in nitric oxide-induced protection of the heart? *Physiol Res* 45: 267-272
- Derbyshire ER, Fernhoff NB, Deng S, Marletta MA (2009) Nucleotide regulation of soluble guanylate cyclase substrate specificity. *Biochemistry* 48: 7519-7524
- Severina IS, Bussygina OG, Pyatakova NV, Malenkova IV, Vanin AF (2003) Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors--S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide* 8: 155-163
- Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den AF, Beuve A (2007) Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12312-12317
- Mayer B, Kleschyov AL, Stessel H, Russwurm M, Munzel T, Koesling D, Schmidt K (2008) Inactivation of soluble guanylate cyclase by stoichiometric S-nitrosation. *Mol Pharmacol* 75: 886-891
- Holzhtutter HG, Wiesner R, Rathmann J, Stosser R, Kuhn H (1997) A kinetic model for the interaction of nitric oxide with a mammalian lipooxygenase. *Eur J Biochem* 245: 608-616
- Kennedy MC, Gan T, Antholine WE, Petering DH (1993) Metallothionein reacts with  $Fe^{2+}$  and NO to form products with a  $g = 2.039$  ESR signal. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 632-635
- Lee M, Arosio P, Cozzi A, Chasteen ND (1994) Identification of the EPR-active iron-nitrosyl complexes in mammalian ferritins. *Biochemistry* 33: 3679-3687
- Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr. (1995) Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4452-4456
- Brzoska K, Meczynska S, Kruszewski M (2006) Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond. *Acta Biochim Pol* 53: 685-691
- Soum E, Drapier JC (2003) Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the  $[4Fe-4S]$  cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. *J Biol Inorg Chem* 8: 226-232

34. Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin J, Kaldy P, Kuhn LC (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 12: 3643-3649
35. Kennedy MC, Antholine WE, Beinert H (1997) An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide. *J Biol Chem* 272: 20340-20347
36. Duan X, Yang J, Ren B, Tan G, Ding H (2009) Reactivity of nitric oxide with the [4Fe-4S] cluster of dihydroxyacid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem J* 417: 783-789
37. Rogers PA, Eide L, Klungland A, Ding H (2003) Reversible inactivation of *E. coli* endonuclease III via modification of its [4Fe-4S] cluster by nitric oxide. *DNA Repair (Amst)* 2: 809-817
38. Ren B, Duan X, Ding H (2009) Redox control of the DNA damage-inducible protein DinG helicase activity via its iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* 284: 4829-4835
39. Ren B, Zhang N, Yang J, Ding H (2008) Nitric oxide-induced bacteriostasis and modification of iron-sulphur proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 70: 953-964
40. Demple B, Ding H, Jorgensen M (2002) *Escherichia coli* SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide. *Methods Enzymol* 348: 355-364
41. Vasil'eva SV, Stupakova MV, Lobysheva II, Mikoyan VD, Vanin AF (2001) Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors. *Biochemistry (Mosc)* 66: 984-988
42. Ding H, Demple B (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5146-5150
43. Lo FC, Chen CL, Lee CM, Tsai MC, Lu TT, Liaw WF, Yu SS (2008) A study of NO trafficking from dinitrosyl-iron complexes to the recombinant *E. coli* transcriptional factor SoxR. *J Biol Inorg Chem* 13: 961-972
44. Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18
45. Lo Bello M, Nuccetelli M, Caccuri AM, Stella L, Parker MW, Rossjohn J, McKinstry WJ, Mozzi AF, Federici G, Polizio F, Pedersen JZ, Ricci G (2001) Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers; a new role for an old enzyme. *J Biol Chem* 276: 42138-42145
46. De Maria F, Pedersen JZ, Caccuri AM, Antonini G, Turella P, Stella L, Lo BM, Federici G, Ricci G (2003) The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily: suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide. *J Biol Chem* 278: 42283-42293
47. Vanin AF (2009) Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology. *Nitric Oxide* 21: 1-13
48. Mokh VP, Poltorakov CA, Serezhenkov V, Vanin AF (2010) On the nature of a compound formed from dinitrosyl complexes with cysteine and responsible for a long-lasting vasorelaxation. *Nitric Oxide, w druku*
49. Vanin AF, Sanina NA, Serezhenkov VA, Burbaev DS, Lozinsky VI, Aldoshin SM (2007) Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: spatial and electronic structures. *Nitric Oxide* 16: 82-93
50. Mulsch A, Mordvintcev P, Vanin AF, Busse R (1991) The potent vasodilating and guanylyl cyclase activating dinitrosyl-iron(II) complex is stored in a protein-bound form in vascular tissue and is released by thiols. *FEBS Lett* 294: 252-256
51. Alencar JL, Chalupsky K, Sarr M, Schini-Kerth V, Vanin AF, Stoclet JC, Muller B (2003) Inhibition of arterial contraction by dinitrosyl-iron complexes: critical role of the thiol ligand in determining rate of nitric oxide (NO) release and formation of releasable NO stores by S-nitrosation. *Biochem Pharmacol* 66: 2365-2374
52. Vedernikov YP, Mordvintcev PI, Malenkova IV, Vanin AF (1992) Effect of diethyldithiocarbamate on the activity of nitric oxide-releasing vasodilators. *Eur J Pharmacol* 212: 125-128
53. Vanin AF, Mokh VP, Serezhenkov VA, Chazov EI (2007) Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands. *Nitric Oxide* 16: 322-330
54. Shekhter AB, Rudenko TG, Serezhenkov VA, Vanin AF (2007) Dinitrosyl-iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing in animals. *Biofizika* 52: 539-547

## Dinitrosyl iron complexes – structure and biological functions

Hanna Lewandowska, Kamil Brzóska, Sylwia Męczyńska-Wielgosz, Karolina Rumianek, Grzegorz Wójciuk, Marcin Kruszewski 

Center of Radiobiology and Biological Dosimetry, Institute of Nuclear Chemistry and Technology, 16 Dorodna St., 03-195 Warszawa, Poland

e-mail: m.kruszewski@ichtj.waw.pl

**Key words:** nitric oxide, reactive nitrogen species, iron metabolism, soluble labile iron pool, protein nitrosylation

### ABSTRACT

Formation of dinitrosyl iron complexes (DNICs), which can be described by general formula  $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{L})_n$ , where L is carbonyl-, nitrosyl- or imino- complexing ligand, was observed in many kinds of living organisms, in a wide spectrum of physiological conditions associated with inflammation, ischemia/reperfusion and cancer. Accumulation of DNICs coincides with intensified production of nitric oxide in macrophages, neurons, endothelial cells, Langerhans' cells and hepatocytes. Low-molecular thiol-containing DNICs ( $\text{DNIC}(\text{RS})_2$ ) show vasodilatory action and they are proposed to play a role of nitric oxide transducers and stabilizers. DNICs have been shown to modulate redox potential of the cell via inhibition of glutathione-dependent enzymes, such as glutathione reductase, S-transferase and peroxidase. Although there is a convincing experimental evidence for their NO and  $\text{NO}^+$  donating function, the nature of DNICs formed in biological systems, their stability and biological role is still a matter of discussion.

# Homeostaza żelaza – mechanizm obronny w stresie oksydacyjnym

## STRESZCZENIE

Istota homeostazy żelaza polega na utrzymaniu ciągłości procesów biologicznych, w których uczestniczą jony żelaza i jednocześnie na ograniczeniu ich dostępności dla reakcji Fentona. Wewnątrzkomórkowa i ogólnoustrojowa homeostaza żelaza stanowią istotny czynnik obronny w stresie oksydacyjnym i pozostają pod ścisłą kontrolą potranskrypcyjnego mechanizmu regulatorowego IRP/IRE oraz hepcydyny, peptydu regulującego ilość żelaza absorbowanego z diety oraz żelaza uwalnianego z hemu przez makrofagi. Mutacje genu hepcydyny, a także genów uczestniczących w regulacji ekspresji hepcydyny prowadzą do toksycznej akumulacji żelaza w organach wewnętrznych i potęgują stres oksydacyjny. Reaktywne formy tlenu wpływają na poziom zmiennej puli żelaza poprzez transkrypcyjną i potranskrypcyjną regulację syntezy ferrytyny, a także poprzez uwalnianie żelaza z centrów żelazowo-siarkowych białek i z ferrytyny podlegającej degradacji w lizosomach. Stres oksydacyjny wywołany spożyciem alkoholu, hamuje syntezę hepcydyny, co prowadzi do zwiększenia absorpcji żelaza i nadmiernej akumulacji żelaza i uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie.

## WPROWADZENIE

Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym dla przebiegu licznych reakcji biochemicznych u niemal wszystkich organizmów żywych. Jedynym znanym wyjątkiem są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [1]. Jedna komórka *Lactobacillus plantarum* zawiera zaledwie 3–4 atomy żelaza [2], podczas gdy ich liczba w komórce *Escherichia coli* dochodzi do  $2 \times 10^5$  [3] a w organizmie dorosłego człowieka zawartość żelaza wynosi około 3–4 g [4]. Ta niezwykła zdolność organizmów pro- i eukariotycznych do gromadzenia i zateżnienia żelaza w ich komórkach jest niewątpliwie wyrazem dużego biologicznego zapotrzebowania na żelazo i zapobiegania jego niedoborowi. Decydująca dla biologicznego znaczenia żelaza okazała się szeroka zmienność potencjału oksydoredukcyjnego (redoks) układu dwóch głównych form żelaza jonowego:  $Fe^{2+}$  (jon żelazawy) /  $Fe^{3+}$  (jon żelazowy). Potencjał redoks pary  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  może być precyzyjnie dostosowany do specyfiki konkretnej reakcji biochemicznej przez wiążące żelazo ligandy oraz przez ładunek elektryczny i strukturę przestrzenną aminokwasów znajdujących się w bezpośrednim otoczeniu. Centra aktywne białek, w których ulokowane są atomy żelaza występują głównie w formie hemu lub klastrów żelazowo-siarkowych [Fe-S]. Do białek, których funkcję i aktywność warunkują wbudowane w ich cząsteczki atomy żelaza należą białka transportujące tlen cząsteczkowy ( $O_2$ ), enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego i cyklu Krebsa, enzymy inaktywujące toksyczne formy  $O_2$  i biorące udział w syntezie DNA, kolagenu oraz czynniki transkrypcyjne. Niezbędność tych wszystkich białek dla normalnego funkcjonowania organizmów żywych jest miarą biologicznego znaczenia żelaza.

Czynnikiem, który miał istotne konsekwencje dla biologicznego wykorzystania żelaza oraz określił w toku ewolucji kształt jego metabolizmu jest tlen. Pojawienie się tlenu w atmosferze Ziemi było bezpośrednio związane z procesem fotosyntezy u sinic [5]. W kolejnych latach tlen osiągnął na tyle znaczące stężenie w środowiskach zasiedlonych przez organizmy żywe, że stał się dla nich substratem w pozyskiwaniu energii wykorzystywanej do syntezy ATP. Szereg reakcji redoks zachodzących w tym procesie odbywa się przy udziale kompleksów białkowych zawierających w swych centrach katalitycznych żelazo. Z drugiej strony, pojawienie się tlenu w atmosferze ziemskiej stało się zagrożeniem dla biologicznego wykorzystania żelaza. W przeciwieństwie do jonów  $Fe^{2+}$ , jony  $Fe^{3+}$ , będące dominującą formą jonowego żelaza w środowisku tlenowym są bardzo słabo rozpuszczalne w roztworach wodnych o fizjologicznym pH [6]. Kolejnym niekorzystnym elementem współistnienia tlenu i żelaza w układach biologicznych jest generowanie rodnika wodorotlenowego (hydroksylogowego) ( $\cdot OH$ ) w obecności jonów  $Fe^{2+}$  i częściowo zredukowanych form tlenu, takich jak anionrodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot -}$ ) i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). Rodnik  $\cdot OH$

Paweł Lipiński✉

Rafał R. Starzyński

Agnieszka Styś

Monika Straciło

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec

✉ Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska; tel.: (22) 756 17 11 w. 332, e-mail: p.lipinski@ighz.pl

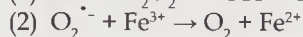
Artykuł otrzymano 7 marca 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 22 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** ferrytyna, hepcydyna, IRE, IRP, stres oksydacyjny, żelazo

**Wykaz skrótów:** Ft – ferrytyna; FLVCR – (ang. *feline leukemia virus, subgroup C, receptor*); Fpn – ferroportyna; IRE – (ang. *iron responsive element*); IRP – (ang. *iron regulatory protein*); LIP (ang. *labile iron pool*) – zmienna pula żelaza; RFT – reaktywne formy tlenu; TfR1 – receptor ferrytyny 1

jest jedną z najbardziej reaktywnych chemicznie cząsteczek istniejących w przyrodzie. Posiada silne właściwości utleniające i reaguje z większością związków organicznych. Prawdopodobny mechanizm powstania rodnika  $\cdot\text{OH}$  *in vivo* opisują 2 reakcje określane jako cykl Fentona [7], w nawiązaniu do obserwacji poczynionych przez niemieckiego chemika Fentona, który pod koniec XIX w. opisał silne właściwości utleniające mieszaniny soli żelazawych i  $\text{H}_2\text{O}_2$  [8]. Pierwsza z tych reakcji to właściwa reakcja Fentona, druga ilustruje mechanizm regeneracji jonu  $\text{Fe}^{2+}$  przez  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .



Jedną z ewolucyjnych strategii ograniczających niekorzystne oddziaływanie między tlenem a żelazem okazał się rozbudowany system białek silnie i swoiście wiążących jony żelaza. Z jednej strony zapewniają one rozpuszczalność jonów  $\text{Fe}^{3+}$ , a tym samym umożliwiają transport żelaza w płynach biologicznych, jego przemieszczanie przez błony biologiczne, dostarczenie do pełniących funkcje metaboliczne zależnych od jonów żelaza białek. Z drugiej strony, ten ściśle regulowany obieg żelaza w komórce i w organizmie znacznie ogranicza udział jonów żelaza w reakcji Fentona. Zbyt restrykcyjna gospodarka żelazem przeciwdziała powstawaniu rodnika  $\cdot\text{OH}$ , może jednak prowadzić do obniżenia lub zahamowania aktywności białek zawierających w swych centrach aktywnych jony żelaza [9]. Istota homeostazy żelaza polega bowiem na utrzymaniu ciągłości procesów biologicznych, w których uczestniczą jony żelaza i jednocześnie na ograniczeniu ich dostępności dla reakcji Fentona. Chociaż te dwa uwarunkowania homeostazy żelaza są ze sobą nierozdzielnie związane, w niniejszym artykule zwrócimy przede wszystkim uwagę na rolę ścisłej kontroli metabolizmu żelaza jako na czynnik obronny w stresie oksydacyjnym.

## ZARYS KOMÓRKOWEJ I OGÓLNOUSTROJOWEJ HOMEOSTAZY ŻELAZA

W ostatnich 15 latach dokonał się niebywały postęp w poznaniu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesów fizjologicznych związanych z utrzymaniem homeostazy żelaza u ssaków. Najbardziej istotnymi osiągnięciami jest ustalenie różnych wzorców molekularnej regulacji komórkowego metabolizmu żelaza w różnych typach komórek organizmu oraz identyfikacja molekularnego podłoża sygnalizacji między enterocytami absorpcyjnymi, hepatocytami, makrofagami wątroby i śledziony i erytroblastami, co jest warunkiem niezbędnym prawidłowego obiegu żelaza w organizmie (Ryc. 1).

Wewnątrzkomórkowa homeostaza żelaza jest wynikiem skoordynowanej regulacji kilku procesów: transportu żelaza do komórki, jego magazynowania oraz usuwania do środowiska pozakomórkowego. Procesy te mają zapewnić jego wykorzystanie do syntezy hemu i centrów [Fe-S] oraz ograniczyć toksyczność żelaza. Jak już wspomniano w procesach tych uczestniczą liczne białka, spośród których do najlepiej poznanych należą receptor transferyny 1 (TfR1) [10], białko dzięki któremu zdecydowana większość komórek ssaków pobiera żelazo związane z transferyną (Tf), ferrytyna (Ft),

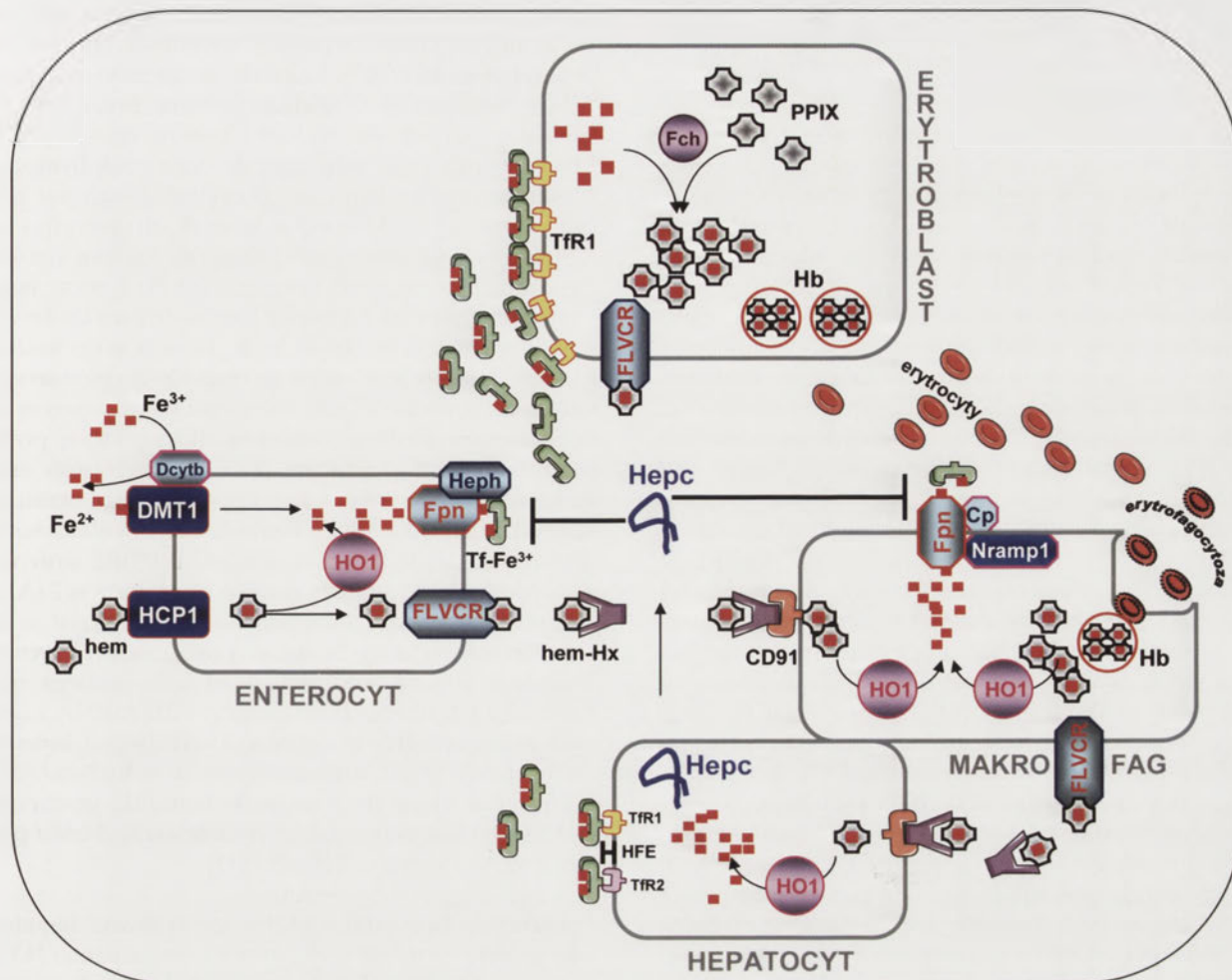
zachowane w ewolucji białko, wszechobecne w komórkach organizmów żywych [11] oraz ferroportyna (Fpn), transporter żelaza jonowego z komórek do środowiska pozakomórkowego [12]. Kluczowym białkiem w metabolizmie żelaza każdej komórki jest oksygenaza hemowa 1 (HO1). Dzięki aktywności tego enzymu możliwe jest ponowne wykorzystanie żelaza zawartego w cząsteczkach hemu [13].

## ZMIENNA PULA ŻELAZA

Stałą frakcją żelaza we wszystkich komórkach jest cytoplazmatyczna zmienna pula żelaza (LIP, ang. *labile iron pool*), [14]. Zmienna pula żelaza występuje również w mitochondriach, endosomach, lizosomach i w jądrze komórkowym [15]. LIP jest frakcją jonów  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  związanych w formie chelatów z różnymi niskocząsteczkowymi ligandami, wykazującymi niskie powinowactwo do obu form jonowego żelaza. Cytoplazmatyczna LIP jest pulą podlegającą dynamicznym zmianom, która leży na skrzyżowaniu komórkowych szlaków metabolicznych żelaza. Z jednej strony jest zasilana przez żelazo transportowane do komórki oraz przez żelazo pochodzące z rozpadu wewnątrzkomórkowych białek wiążących ten metal. Z drugiej strony, z puli tej pobierane jest żelazo do syntezy hemu i centrów [Fe-S]. Ponieważ LIP jest głównym źródłem żelaza czynnego w reakcji Fentona [16], w warunkach fizjologicznych jego stężenie w tej puli jest utrzymywane na możliwie najniższym poziomie (w zależności od typu komórki od 0,1 do 1,2  $\mu\text{M}$  [14]), takim jednak, który zapewnia płynny przebieg reakcji biochemicznych, dla których niezbędny jest ten metal. Głównym białkiem regulującym poziom LIP jest Ft. Wykazano, że w komórkach z nadprodukcją podjednostki ciężkiej Ft (H-Ft) [17] lub w komórkach, w których zahamowano aktywność lizosomów (miejsce degradacji Ft) [18] poziom LIP zmniejsza się. Z drugiej strony zmniejszenie syntezy Ft w komórce prowadzi do wzrostu poziomu LIP [9]. Wahania stężenia żelaza w LIP, które stanowi zaledwie 3–5% całkowitego żelaza zawartego w komórce są wskaźnikiem komórkowego niedoboru lub nadmiaru tego pierwiastka i czułym impulsem oddziałującym na systemy regulujące wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza, a wśród nich na system IRP/IRE (patrz niżej). Sens tej regulacji polega na tym, że odchylenia od konstytutywnego poziomu LIP wpływają na funkcjonowanie systemu IRP/IRE, a poprzez niego na stosowne zmiany w syntezie Ft i TfR1, które determinują szybki powrót LIP do fizjologicznego stężenia.

## POTRANSKRYPCYJNY MECHANIZM REGULACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO METABOLIZMU ŻELAZA

Bez względu na typ komórek, kontrola syntezy Ft i TfR1 odbywa się głównie poprzez potranskrypcyjny mechanizm regulujący translację lub stabilność kodujących te białka mRNA. Elementami tego mechanizmu są struktury RNA określane jako sekwencje reagujące na jony żelaza (IREs, ang. *iron responsive elements*) oraz dwa cytoplazmatyczne białka kontrolujące homeostazę żelaza (IRP1 i IRP2, ang. *iron regulatory proteins*) [19]. IRP1 jest białkiem dwufunkcyjnym, które występuje w cytoplazmie jako akonitaza, enzym zawierający katalityczne centrum [4Fe-4S] (holo-IRP1) lub jako białko wiążące się do IRE, pozbawione tego centrum (apo-IRP1) [20,21]. Dwie aktywności IRP1 wzajemnie się wykluczają i są przeciwstawnie regulowane przez jony żelaza



**Rycina 1.** Schemat obiegu żelaza jonowego i hemowego w organizmie. Przedstawiono główne szlaki metaboliczne żelaza w enterocytach absorpcyjnych, erytroblastach, makrofagach i hepatocytach oraz szlaki przemieszczania żelaza między tymi komórkami. Wyróżniono hepcydynę jako główne białko regulujące metabolizm żelaza, hamujące absorpcję żelaza i jego recyrkulację z makrofagów poprzez degradację ferroportyny. Szczegółowy opis zawarto w tekście. Objasnienia skrótów: Cp – ceruloplazmina; CD91 – receptor kompleksu hem-hemopeksyna; Dcytb1 – dwunastniczy cytochrom b; DMT1 – transporter metali dwuwartościowych; Fch – ferrochelataza; FLVCR – ang. *feline leukemia virus, subgroup C, receptor*; Fpn – ferroportyna; Hb – hemoglobina; HCP1 – ang. *heme carrier protein 1*; HFE – białko hemochromatozy; Hepc – hepcydyna; Heph – hefajstyna; HO1 – oksygenaza hemowa 1; Hx – hemopeksyna; Nrp1 – ang. *natural resistance-associated macrophage protein 1*; PPIX – protoporfiryna IX; Tf – transferyna; TfR1 – receptor transferyny 1; TfR2 – receptor transferyny 2.

zawarte w LIP. Przy niedoborze żelaza dominującą formą IRP1 w komórce jest apo-IRP1, które wiąże się z sekwencją IRE w regionie 5'UTR mRNA podjednostek Ft i hamuje ich translację w wyniku zablokowania rekrutacji małej podjednostki rybosomu. Wiązanie się IRP1 z sekwencją IRE w regionie 3'UTR mRNA TfR1 stabilizuje mRNA, prowadząc do wzrostu poziomu kodowanego przez nie białka. Odwrotna regulacja syntezy obu białek wynikająca z braku wiązania holo-IRP1 z IRE, zachodzi, gdy stężenie LIP w komórce jest wysokie [19-21]. Mimo znacznego podobieństwa IRP2 do IRP1, IRP2 nie posiada centrum żelazowo-siarkowego i nie wykazuje aktywności akonitazowej [22]. Potencjał wiązania się IRP2 z IRE jest determinowany przez poziom tego białka w cytoplazmie, który zależy od tempa jego degradacji w proteasomach [23]. W komórkach o wysokim poziomie żelaza dochodzi do przyspieszonej degradacji IRP2, która w odniesieniu do regulacji syntezy Ft i TfR1 ma ten sam skutek, jak regulacja przez holo-IRP1. Przy niedoborze żelaza poziom IRP2 ulega stabilizacji, co powoduje zablokowanie

syntezy podjednostek Ft i stabilizację mRNA TfR1, a więc analogiczny skutek jak regulacja przez apo-IRP1. Zarówno przy niedoborze jak i nadmiarze jonów żelaza konsekwencją regulacji syntezy Ft i TfR1 przez IRP1 i IRP2 jest szybki powrót do fizjologicznego poziomu LIP [19].

#### OGÓLNOUSTROJOWA HOMEOSTAZA ŻELAZA

Procesem o pierwszorzędym znaczeniu dla utrzymania ogólnoustrojowej homeostazy żelaza u ssaków jest odzyskiwanie żelaza jonowego zawartego w hemoglobinie fagocytowanych przez makrofagi starych erytrocytów, w celu jego ponownego wykorzystania (reutilizacji) do syntezy hemu i hemoglobiny w erytroblastach szpiku kostnego, komórkach prekursorowych erytrocytów. Ponadto żelazo hemowe zawarte w diecie jest łatwo przyswajalne przez organizm i może stanowić bogate źródło żelaza w zapobieganiu/leczeniu niedokrwistości na tle niedoboru żelaza. Regulacja homeostazy żelaza w enterocytach, ery-

troblastach, makrofagach i hepatocytach jest przykładem ilustrującym, jak ściśle powiązanie i wzajemne oddziaływanie wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych hemu i żelaza jonowego ma ogromne znaczenie dla obiegu żelaza w całym organizmie.

Enterocyty absorpcyjne dwunastnicy zaopatrujące cały organizm w żelazo, pobierają je z diety w formie jonowej (nieorganicznej) i w formie hemu (organicznej), uwolnionego głównie z cząsteczek hemoglobiny i mioglobiny. Są to komórki spolaryzowane, które na odcinku błony komórkowej kontaktującym się ze światłem jelita oraz na odcinku zwróconym w stronę naczyń krwionośnych posiadają dwa tandemy białek (oksydaza lub reduktaza/transporter). W transporcie żelaza jonowego z dwunastnicy do enterocytu biorą udział dwunastniczy cytochrom b (Dcytb) [24] i transporter metali dwuwartościowych (DMT1) [25]. Z enterocytu do krwiobiegu żelazo jest uwalniane przez ferroporynę (Fpn) [26] przy współudziale zależnej od jonów miedzi ferooksydazy hefajstyny (Heph), [27]. Chociaż od dawna panuje pogląd, że żelazo zawarte w cząsteczkach hemu (żelazo hemowe) jest znacznie lepiej absorbowane niż żelazo nieorganiczne [28], to szlak absorpcji hemu jest słabo poznany. Na błonie wierzchołkowej enterocytów absorpcyjnych zidentyfikowano białko transportujące hem – HCP1 (ang. *heme carrier protein*), [29], którego biologiczna funkcja stała się jednak przedmiotem kontrowersji [30]. Bez względu na to, w jaki sposób cząsteczki hemu wnikają do wnętrza enterocytów, dalszy transport żelaza hemowego do krwi może przebiegać dwoma drogami. Po pierwsze hem może podlegać degradacji przez oksygenazę hemową 1 [28], a uwolnione w ten sposób żelazo jonowe wkracza na szlak absorpcji, w której uczestniczą Fpn i Heph, przekazując jony żelaza do transferyny, głównego nośnika tego metalu w organizmie. Za tą drogą absorpcji hemu silnie przemawia fakt, że synteza HO1 w enterocytach zwiększa się przy niedoborze żelaza [31]. W drugim, hipotetycznym jeszcze szlaku, może uczestniczyć zidentyfikowane niedawno białko FLVCR (ang. *feline leukemia virus, subgroup C, receptor*) transportujące hem z komórek do środowiska pozakomórkowego [32]. W krwi wolny hem wiąże się z dużym powinowactwem z hemopeksyną (Hx), a utworzony kompleks hem-Hx [33] jest następnie szybko wychwytywany z krążenia przez makrofagi wątroby i śledziony za pośrednictwem receptora CD91 [34].

W wyniku recyrkulacji żelaza hemowego przez makrofagi w organizmie dorosłego człowieka do krwi dostaje się w ciągu doby ok. 20 mg żelaza jonowego, czyli 10-krotnie więcej niż wynosi dobową absorpcję żelaza przez enterocyty [13]. Makrofagi fagocytują stare i uszkodzone erythrocyty i odprowadzają do krążenia żelazo uwolnione w wyniku degradacji hemu. Jest to możliwe dzięki dużej aktywności HO1 w tych komórkach [31] oraz dzięki współdziałaniu białka Nramp1 (ang. *Natural resistance-associated macrophage protein 1*) [36], Fpn [26] i zależnej od jonów miedzi ferooksydazy, ceruloplazminy (Cp) [37] w transporcie żelaza jonowego do krwi. Na błonie makrofagów zidentyfikowano również białko FLVCR transportujące do krwi nadmiar hemu znajdującego się w cytoplazmie tych komórek [38].

Komórkami o największym zapotrzebowaniu na żelazo są erythroblasty, komórki prekursorowe erythrocytów w szpiku kostnym. Dzięki wysokiej zawartości TfR1 w błonach proerythroblastów [10], komórki te intensywnie pobierają żelazo związane z Tf. Żelazo pobrane przez erythroblasty niemal wyłącznie jest wykorzystywane do syntezy hemu, który jest następnie włączany do cząsteczek hemoglobiny. Nasilenie syntezy hemu w proerythroblastach jest o ponad rząd wielkości większe niż w komórkach nieerythroidalnych [39]. W erythroblastach funkcjonuje mechanizm detoksyfikacji wolnego hemu niewykorzystanego do syntezy hemoglobiny, polegający na usunięciu jego nadmiaru do krwi przez wspomniane już białko FLVCR. Delecja genu kodującego FLVCR u myszy jest letalna na etapie życia płodowego [38], natomiast unieczynnienie tego genu we wczesnym okresie neonatalnym skutkuje niedokrwistością, której przyczyną jest zahamowanie różnicowania się erythroblastów, u podłoża którego leży z kolei toksyczność wolnego hemu niewykorzystanego do syntezy hemoglobiny. Synteza hemu pozostaje pod ścisłą kontrolą systemu IRP/IRE przynajmniej w odniesieniu do syntazy  $\delta$ -aminolewulinowej 2 (ALA-S2), cytoplazmatycznego enzymu, biorącego udział w pierwszym etapie syntezy hemu w prekursorach erythrocytów. Translacja mRNA kodującego ALA-S2 podlega regulacji zgodnie z kanonem obowiązującym dla mRNA zawierających sekwencje IRE w regionie 5'UTR [40]. Z kolei ostatni etap syntezy hemu, umiejscowiony w mitochondriach, polegający na włączeniu cząsteczki hemu do protoporfiryny IX i jest katalizowany przez ferrochelatazę, białko posiadające centrum aktywne [2Fe-2S] [41].

Odkrycie hepcydyny [42] i identyfikacja hepatocytów jako głównego miejsca jej syntezy w organizmie [43] zmieniło całkowicie pogląd na rolę tych komórek w regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu żelaza. Z komórek, których funkcja utożsamiana była głównie z gromadzeniem zapasów żelaza na potrzeby całego organizmu, hepatocyty uzyskały status komórek, sterujących ogólnoustrojowym metabolizmem żelaza.

#### REGULACJA METABOLIZMU ŻELAZA PRZEZ HEPCYDYNĘ

Hepcydyna okazała się jednym z głównych czynników, których funkcja biologiczna polega na koordynowaniu współdziałania komórek różnych typów o ściśle wyspecjalizowanych funkcjach związanych z absorpcją, transportem, magazynowaniem żelaza, jego reutilizacją oraz syntezą hemoglobiny [44,45]. Hepcydyna syntezowana jest jako prepeptyd zbudowany z 84 reszt aminokwasowych. Do krwi uwalniana jest jako peptyd o 25 resztach aminokwasowych. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność w cząsteczce hepcydyny aż 8 reszt cysteiny. Cząsteczka hepcydyny ma postać szpilki do włosów, w której wyróżnia się pętlę i dwuramienną podstawę. Badania z zastosowaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego wykazały, że struktura cząsteczki hepcydyny jest stabilizowana przez 4 mostki disiarczkowe utworzone pomiędzy resztami cysteiny. Jedno z połączeń disiarczkowych, leżące u podstawy pętli, występuje między sąsiadującymi ze sobą resztami cysteiny, charakteryzuje się wysoką reaktywnością che-



miczną. Przypuszcza się, że odgrywa ono rolę w aktywności biologicznej hepcydyny [46,47].

Po raz pierwszy powiązania między hepcydyną a metabolizmem żelaza dokonali Pigeon i wsp., którzy stwierdzili zwiększoną ekspresję mRNA hepcydyny w wątrobach myszy nastrzykiwanych dekstranem żelaza oraz u myszy karmionych dietą wzbogaconą żelazem [42]. Przełomem w badaniach nad hepcydyną okazały się prace Nicolas i wsp., którzy u myszy z nieczynnym genem *HAMP* wykazali toksyczną akumulację żelaza w wątrobie i innych organach [48], a u myszy transgenicznych z nadekspresją tego genu drastyczny niedobór żelaza objawiający się ostrą niedobarwliwą niedokrwistością mikrocytarną [49]. Ważnym krokiem potwierdzającym rolę hepcydyny w regulacji metabolizmu żelaza było zidentyfikowanie mutacji w genie *HAMP* u osób cierpiących na nowy rodzaj hemochromatozy, charakteryzującej się intensywną akumulacją żelaza w narządach wewnętrznych pacjentów, którzy nie przekroczyli 30 roku życia [50].

Wspomniane już wyżej, pionierskie prace Nicolas i wsp. [48,49] prowadzone na dwóch modelach genetycznie zmodyfikowanych myszy – na myszach z nieczynnym genem *HAMP* i z nadekspresją tego genu sugerowały, że hepcydyna hamuje zarówno absorpcję żelaza z przewodu pokarmowego, jak i przepływ żelaza z makrofagów wątroby i śledziony. Spostrzeżenia te zostały w pełni potwierdzone w oparciu o analizę przeciwstawnych fenotypów żelaza występujących z jednej strony, u hemochromatyków, z drugiej, u chorych z przewlekłym stanem zapalnym. Fenotypy te były związane, odpowiednio, z niedoborem hepcydyny na tle mutacji genu *HAMP* [50] i zależną od cytokin nadmierną syntezą hepcydyny [51].

Zarówno w przypadku hamowania absorpcji jak i recyrkulacji żelaza zaproponowano jednorodny biologiczny mechanizm działania hepcydyny, polegający na oddziaływaniu tego peptydu z ferroportyną [52]. Hepcydyna uwalniana z hepatocytów do krwi wiąże się z ferroportyną występującą w błonie komórkowej zarówno enterocytów, jak i makrofagów. W wyniku tego oddziaływania następuje przemieszczenie ferroportyny do cytoplazmy a następnie jej degradacja w lizosomach. Brak transportera żelaza z komórki do środowiska pozakomórkowego powoduje akumulację żelaza w komórkach. Akumulacja żelaza w enterocytach, które po 2 dniach funkcjonowania ulegają złuszczeniu do światła jelita oznacza zahamowanie absorpcji żelaza. Z kolei zahamowanie przepływu żelaza z makrofagów do krwi ze względu na duże dobowe ilości transportowanego tą drogą żelaza może już w ciągu kilku dni doprowadzić do obniżenia stężenia żelaza w osoczu i niedokrwistości na tle niedoboru żelaza. Brak hepcydyny oznacza brak negatywnej kontroli ilości absorbowanego żelaza i na przestrzeni kilku lat może doprowadzić do przeciążenia organizmu żelazem, co w drastycznym wymiarze obserwuje się u osób z mutacjami genu *HAMP* [50].

Wyniki badań ostatnich kilku lat pokazują różnorodność i złożoność mechanizmów molekularnych sterujących syntezą hepcydyny [44,45]. Wyodrębniono co najmniej 4 szlaki regulacji ekspresji genu *Hamp*. Szlaki te uruchamiane są

w warunkach hipoksji [53], stanu zapalnego [51], inicjują ją zmiany w aktywności erytropoezy [54] i zawartości żelaza w organizmie [55]. W regulacji syntezy hepcydyny przez żelazo uczestniczą cząsteczki sygnalizacyjne (z rodziny *bone morphogenetic proteions*, głównie BMP6, holo-Tf), rozbudowany układ receptorów/przebieżników sygnałów (HFE – białko hemochromatozy, mHJV – błonowa hemojuwelina, TfR2 – receptor transferyny 2), białek modulujących przekazywanie sygnałów (sHJV – rozpuszczalna hemojuwelina, neogenina, furyna) TMPRSS2 – matrypaza-2, i czynniki transkrypcyjne (czynniki z rodziny SMAD; głównie SMAD4). Omówienie (choćby skrótowe) regulacji syntezy hepcydyny wykracza poza zakres niniejszego artykułu, dlatego w celu zapoznania się z tym zagadnieniem odsyłamy czytelników do najnowszych prac przeglądowych [44,45].

#### ROLA IRP1 I IRP2 W REGULACJI OGÓLNUSTROJOWEJ HOMEOSTAZY ŻELAZA

W przypadku komórek o szczególnym znaczeniu dla ogólnoustrojowej homeostazy żelaza (enterocyty absorpcyjne, makrofagi, erytroblasty, hepatocyty), funkcjonowanie systemu IRP/IRE musi uwzględniać nie tylko indywidualne potrzeby tych komórek, ale również ich funkcje wynikające z roli, jaką pełnią w ogólnoustrojowym metabolizmie żelaza [56,57]. W każdej komórce aktywność wiązania się białek IRP z sekwencją IRE wyznacza intensywność syntezy ferrytyny, która jest głównym białkiem determinującym fizjologiczny poziom LIP [11]. W enterocytach absorpcyjnych i w makrofagach wątroby i śledziony system IRP/IRE kontroluje stężenie żelaza w LIP, steruje ilością żelaza, które przy udziale Fpn może być transportowane do krwi, skąd wraz z Tf rozprawdane jest po całym organizmie.

Badania nad metabolizmem żelaza prowadzone na myszach z nokautem genów *Irp1* i *Irp2* [58-62] przyczyniły się do wyjaśnienia roli białek IRP w regulacji ogólnoustrojowej homeostazy żelaza u ssaków, co więcej, ukazały nieoczekiwane dominującą rolę IRP2 w warunkach fizjologicznych [58-62]. O ile u myszy z nokautem genu *Irp1* ogólnoustrojowa homeostaza pozostaje nienaruszona, a aktywność *trans*-regulatorowa IRP2 wystarcza do jej kontroli [58], o tyle u myszy z nokautem genu *Irp2* następuje całkowite załamanie homeostazy żelaza w jelicie i w ośrodkowym układzie nerwowym [61,62]. Co prawda, badania Galy'ego i wsp. [60] prowadzone na innym modelu myszy *Irp2*<sup>-/-</sup>, nie potwierdziły obserwacji dotyczących zmian neurodegeneracyjnych obserwowanych przez LaVaute'a i wsp. [61], to jednak niewątpliwie zbieżnym elementem badań na dwóch różnych modelach myszy *Irp2*<sup>-/-</sup>, jest udokumentowanie u tych zwierząt umiarkowanej niedokrwistości mikrocytarnej, związanej z niedoborem żelaza [60,62]. Niezwykle istotną obserwacją dotyczącą roli IRP1 w kontroli ogólnoustrojowego metabolizmu żelaza było wykazanie, że u myszy *Irp1*<sup>-/-</sup>, poddanych diecie pozbawionej żelaza, regulacja syntezy ferrytyny w tkankach odbywa się zgodnie z kanonem regulacyjnym systemu IRP/IRE, co oznacza, że poziom podjednostek ferrytyny był mniejszy, wyłącznie jednak w następstwie zmian aktywności (poziomu) IRP2 [59].

## ZABURZENIE HOMEOSTAZY ŻELAZA JAKO CZYNNIK POTĘGUJĄCY STRES OKSYDACYJNY

Zaburzenie homeostazy żelaza w kierunku jego nadmiaru wzmacnia ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego poprzez zwiększenie puli żelaza katalizującego generowanie rodnika  $^{\bullet}\text{OH}$ . Ma to miejsce wówczas, gdy przekroczony zostaje potencjał ferrytyny detoksykacji jonów żelaza. Unieczynnienie u myszy genu kodującego podjednostkę ciężką Ft (H-Ft, posiadającą aktywność ferooksydazy) powoduje zamieranie zarodków we wczesnym okresie życia płodowego (między 3,5–9,5 dniem) [60]. U myszy z warunkowym nokautem genu *H-Ft*, poddanych diecie o wysokiej zawartości żelaza, obserwowano oksydacyjne uszkodzenia w wątrobie i zaburzenia w funkcjonowaniu tego narządu. [61]. Ponadto liczne badania na liniach komórkowych wykazały ścisłą zależność między syntezą Ft, poziomem LIP, odpornością na stres oksydacyjny i występowaniem uszkodzeń oksydacyjnych składników komórek [65-67]. W świetle tych badań funkcja biologiczna Ft urasta do funkcji białka o silnych właściwościach antyoksydacyjnych.

Charakterystyczną cechą homeostazy żelaza u większości ssaków jest brak fizjologicznego szlaku usuwania żelaza z organizmu. Z jednej strony brak możliwości usuwania żelaza z organizmu stanowi zabezpieczenie przed

niedoborem żelaza, z drugiej jednak strony zwiększa ryzyko przeładowania organizmu żelazem w wyniku utraty lub niedostatecznego hamowania wchłaniania żelaza z diety. U człowieka tego typu zaburzenia mają często podłoże genetyczne, określane są mianem hemochromatozy i prowadzą do stopniowego (przebiegającego w różnym tempie) nadmiernego gromadzenia żelaza w narządach wewnętrznych, co indukuje stres oksydacyjny, prowadzi do nasilenia reakcji zapalnej, uszkodzenia organelli komórkowych, naruszenia struktury i funkcji narządów (wątroby, serca, trzustki). W konsekwencji u chorych w zaawansowanym stadium hemochromatozy diagnozuje się marskość i nowotwory wątroby, cukrzycę, niewydolność krążenia, hipogonadyzm, zwyrodnienie stawów [68]. Podłoże genetyczne hemochromatozy stanowią mutacje genu samej hepcydyny oraz genów kodujących białka, biorące udział w pozytywnej regulacji syntezy hepcydyny. W Tabeli 1 przedstawiono wpływ mutacji tych genów u człowieka oraz ich inaktywacji u myszy na zmiany w metabolizmie żelaza.

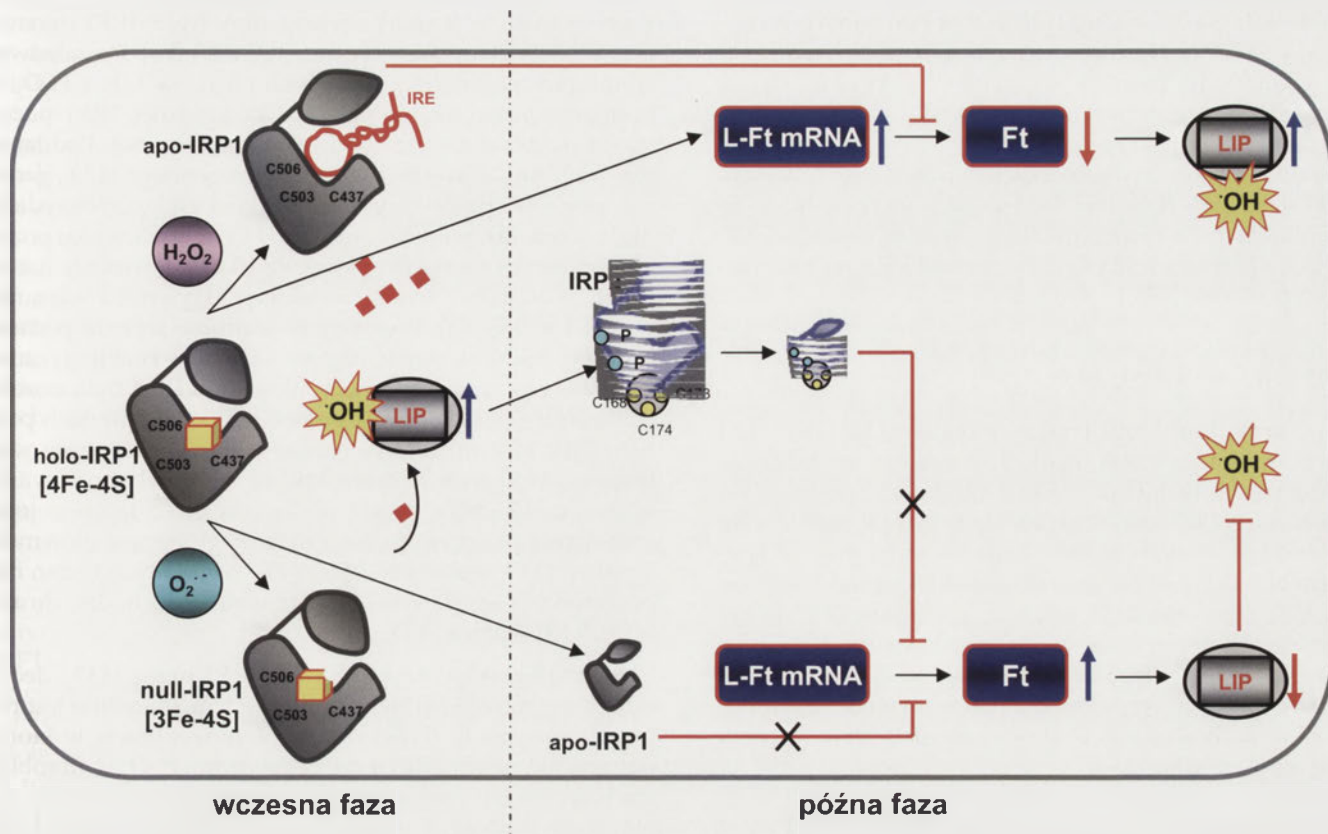
## ODDZIAŁYWANIE STRESU OKSYDACYJNEGO NA MOLEKULARNE MECHANIZMY REGULUJĄCE METABOLIZM ŻELAZA

Zaburzenie homeostazy żelaza, w następstwie którego dochodzi do wzrostu zawartości żelaza w komórkach do

Tabela 1. Mutacje i nokauty genów wywołujące hemochromatozę u człowieka i myszy.

Mutacja genu człowieka lub nokaut genu u myszy	Białko	Funkcja białka	Fenotyp
<i>HFE</i> (c,m)	HFE (białko hemochromatozy)	element kompleksu receptorów na błonie komórkowej hepatocytów oddziałujący z receptorami transferyny 1 i 2 przekazujący sygnał dla syntezy hepcydyny w odpowiedzi na holo-Tf	klasyczna hemochromatoza typu 1; akumulacja Fe w wątrobie (w hepatocytach), sercu, trzustce; u ludzi objawy występują w 3-4 dekadzie; umiarkowane obniżenie ekspresji hepcydyny [68]
<i>HJV</i> ( <i>HFE2</i> ) (c,m)	hemojuwelina	ko-receptor dla BMP6, uczestniczy w indukcji transkrypcji genu hepcydyny poprzez szlak BMP6/SMAD4	młodzieńcza hemochromatoza typu 2a; szybka akumulacja Fe w wątrobie (u ludzi – 1-2 dekada życia); drastyczne obniżenie syntezy hepcydyny [69]
<i>HAMP</i> (c,m)	hepcydyna	hamowanie absorpcji Fe i uwalnianie Fe z makrofagów poprzez oddziaływanie z ferroportyną	młodzieńcza hemochromatoza typu 2b; szybka akumulacja Fe w wątrobie (u ludzi – 1-2 dekada życia) prowadząca do ciężkiego uszkodzenia wątroby; przypadki śmiertelności; brak syntezy hepcydyny [50]
<i>TfR2</i> (c,m)	receptor transferyny 2	transport żelaza do komórek (głównie hepatocytów), bierze udział w indukcji hepcydyny przez holo-transferynę, oddziałuje z <i>HJV</i> -	hemochromatoza typu 3; umiarkowana akumulacja Fe w wątrobie; umiarkowane obniżenie syntezy hepcydyny [68]
<i>SCL40A1</i> (c)	ferroportyna	transport Fe z enterocytów i makrofagów (w mniejszym stopniu z hepatocytów)	hemochromatoza typu 4; akumulacja żelaza w wątrobie (w komórkach Kupffera); brak zmian w syntezie hepcydyny [68]
<i>BMP6</i> (m)	białko morfogenetyczne kości 6	wiodący ligand indukujący syntezę hepcydyny	akumulacja żelaza w wątrobie, przypominająca hemochromatozę typu 2a; drastyczne obniżenie syntezy hepcydyny [70]
<i>SMAD4</i> (m)	SMAD4	czynnik transkrypcyjny indukujący transkrypcję genu hepcydyny	akumulacja żelaza w wątrobie, przypominająca hemochromatozę typu 2a; drastyczne obniżenie syntezy hepcydyny [71]

c – mutacja genu u człowieka; m – nokaut genu u myszy



**Rycina 2.** Oddziaływanie reaktywnych form tlenu (RFT) na molekularne mechanizmy regulujące syntezę ferrytyny i poziom LIP. Wyodrębniono dwie fazy stresu oksydacyjnego: wczesną (<1 godziny) i późną (>6 godzin). We wczesnej fazie nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) całkowicie destabilizuje centrum [4Fe-4S] w cząsteczce IRP1, indukując aktywność wiązania się IRP1 z IRE (sekwencją regulatorową występującą w regionie 5'UTR mRNA podjednostek ferrytyny, Ft), czemu towarzyszy uwolnienie 4 atomów żelaza do cytoplazmatycznej zmiennej puli żelaza (LIP). Anionorodnik nadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) również destabilizuje centrum [4Fe-4S] w cząsteczce IRP1, ale uwalnia z niego tylko 1 atom żelaza i powoduje powstanie formy IRP1 zawierającej centrum [3Fe-4S] (tzw. formy *null*, nie posiadającej ani aktywności akonitazowej, ani aktywności *trans*-regulatorowej). W wyniku uwolnienia żelaza z centrów aktywnych cząsteczek IRP1 (a także z centrów innych enzymów żelazowo-siarkowych, czego nie zaznaczono na schemacie) wzrasta poziom LIP. Zwiększone stężenia żelaza w LIP w obecności  $H_2O_2$  prowadzi do generowania rodnika wodorotlenowego ( $\cdot OH$ ). W drugiej fazie stresu oksydacyjnego  $H_2O_2$  poprzez indukcję transkrypcji genów podjednostek Ft wpływa na wzrost poziomu ich mRNA (na rysunku zaznaczono tę regulację tylko na przykładzie podjednostki ciężkiej Ft, H-Ft). Jednocześnie apo-IRP1 (utrzymujące się w komórkach pod wpływem ciągłego działania  $H_2O_2$ ) hamuje translację tych mRNA i w konsekwencji przyczynia się do obniżenia poziomu Ft. Ta regulacja Ft, głównego białka kontrolującego poziom LIP wpływa na wzrost stężenia żelaza w tej puli, co w obecności  $H_2O_2$  prowadzi do generowania rodnika  $\cdot OH$ .  $O_2^{\cdot-}$  wpływa na obniżenie poziomu IRP1 w komórkach, przez co zmniejsza potencjał hamowania translacji mRNA podjednostek Ft przez apo-IRP i prowadzi do wzrostu syntezy Ft. Wzrost poziomu LIP w pierwszej fazie stresu oksydacyjnego powoduje degradację IRP2 (białka nie posiadającego centrum [4Fe-4S], charakteryzującego się ciągłą aktywnością wiązania się z IRE). Ma to co ma ten sam skutek dla syntezy Ft, jak zmniejszenie poziomu IRP1. W obliczu zmniejszenia poziomów IRP1 i IRP2 następuje odblokowanie translacji mRNA podjednostek Ft i wzrost poziomu Ft. Regulacja ta pociąga za sobą obniżenie stężenia żelaza w LIP, a w konsekwencji zmniejsza ryzyko generowania rodnika  $\cdot OH$ . Na schematach cząsteczek IRP1 i IRP2 zaznaczono reszty cysteinowe koordynujące centrum w [4Fe-4S], biorące udział w wiązaniu się z IRE w przypadku IRP1 oraz reszty cysteinowe odpowiedzialne za degradację IRP2.

poziomu przekraczającego zdolność ferrytyny do detoksykacji, może być czynnikiem inicjującym oksydacyjne uszkodzenia nawet przy fizjologicznym stężeniu reaktywnych form tlenu (RFT). Z drugiej strony wzrost stężenia RFT w stresie oksydacyjnym może wpływać na zaburzenie homeostazy żelaza zarówno poprzez uwolnienie żelaza z centrów aktywnych białek, jak i przez oddziaływanie na molekularne mechanizmy utrzymujące fizjologiczny poziom LIP. W obu przypadkach konsekwencją jest zwiększenie stężenia jonów żelaza aktywnych w reakcji Fentona, a tym samym nasilenie stresu oksydacyjnego. Wydaje się jednak, że oddziaływanie niektórych RFT (np.  $O_2^{\cdot-}$ ) może ograniczać to zjawisko. Ta złożona, przeciwstawna regulacja metabolizmu żelaza przez RFT znajduje odzwierciedlenie w dwuetapowej – transkrypcyjnej i potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu ferrytyny. Ogólny jej zarys przedstawiono na Ryc. 2.

## TRANSKRYPCYJNA REGULACJA GENÓW FERRYTyny PRZEZ NADTLENEK WODORU ( $H_2O_2$ )

Transkrypcyjna indukcja ekspresji genów kodujących obie podjednostki ferrytyny w różnych doświadczalnych modelach stresu oksydacyjnego jest regulacją solidnie udokumentowaną w oparciu o badania *in vitro* wykonane na liniach komórkowych oraz *ex vivo* na tkankach zwierząt [72]. Reaktywną formą tlenu aktywującą transkrypcję genów *H*- i *L-Ft* jest nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). W komórkach różnych linii człowieka i myszy poddanych działaniu  $H_2O_2$  obserwowano wzrost poziomu mRNA zarówno *H*- jak i *L-Ft* [73,74]. Wzrost ten jest z reguły większy w przypadku mRNA *H-Ft*, podjednostki posiadającej aktywność ferooksydazy. Wykazano, że transkrypcyjna indukcja genu *H-Ft* przez  $H_2O_2$  przebiega za pośrednictwem sekwencji EpRE (ang. *electrophilic response element*, określanej również jako ARE, ang. *antioxidant response element*) [74]. Sekwencję tę zidentyfikowa-

no w promotorach genów mysiej *L-Ft* i *H-Ft*, jak również w promotorach genów kodujących białka i enzymy przeciwutleniające [72,74]. Nieznane są fizjologiczne stężenia  $H_2O_2$ , które wzmacniają transkrypcję genów *Ft*. Wydaje się, że stężenia stosowane w badaniach *in vitro* ( $\geq 125 \mu M$ ) skutecznie indukują transkrypcję genów *Ft* [73,74], wielokrotnie przekraczają stężenia w komórkach *in vivo*, nawet w warunkach ekstremalnych. W tym kontekście warto zauważyć, że w fibroblastach B6 myszy inkubowanych w obecności  $100 \mu M H_2O_2$  ekspresja mRNA *H-Ft* pozostawała na niezmiennym poziomie [75].

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI IRP1 PRZEZ NADTLENEK WODORU ( $H_2O_2$ )

Drugim po transkrypcji, etapem regulacji genów *H-Ft* i *L-Ft* jest translacja, której regulacja przebiega przy udziale cytoplazmatycznych białek IRP1 i IRP2 oraz sekwencji regulatorowych IRE, znajdujących się w 5'UTR mRNA obu podjednostek. Dotychczasowe badania wykazują, że spośród dwóch IRP jedynie aktywności IRP1 są modulowane przez RFT (zarówno  $H_2O_2$  jak i  $O_2^{\cdot -}$ ). Poziom IRP2 w cytoplazmie, od którego zależy potencjał wiązania się tego białka z IRE, nie podlega regulacji przez RFT. Synteza IRP2 może być natomiast regulowana pod wpływem zmian poziomu LIP zachodzących w stresie oksydacyjnym (o czym będzie mowa poniżej).

Determinantą aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 jest brak centrum żelazowo-siarkowego [4Fe-4S] w cząsteczce tego białka oraz obecność grup -SH w resztach 3 cystein uczestniczących w wiązaniu apo-IRP1 z sekwencją IRE [20,21]. Hamowanie aktywności akonitazowej IRP1 przez  $O_2^{\cdot -}$ , u podłoża którego leży utlenienie labilnego atomu Fe i usunięcie go z centrum aktywnego nie wpływa więc na wiązanie IRP1 z IRE [76]. Forma IRP1 zawierająca centrum [3Fe-4S], która powstaje pod wpływem działania  $O_2^{\cdot -}$  jest formą białka pozbawioną aktywności enzymatycznej i *trans*-regulatorowej. Brak tej drugiej charakteryzuje więc zarówno IRP1 zawierające centrum [3Fe-4S], jak i holo-IRP1 posiadające nienaruszone centrum [4Fe-4S]. Identyfikacja IRP1 powstaje pod wpływem bezpośredniego działania  $H_2O_2$  na cząsteczkę holo-IRP1. Stwierdzono to bezspornie traktując nadtlenkiem wodoru rekombinowane IRP1 [77] oraz cytoplazmatyczne ekstrakty komórkowe [75]. Wykazano również, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $H_2O_2$  hamuje aktywność enzymatyczną IRP1 [78]. W 1995 roku dwie grupy badawcze niezależnie wykazały, że w komórkach ssaków poddanych działaniu egzogennej (dodanego do hodowli komórkowych)  $H_2O_2$  silnemu wzmoczeniu ulega aktywność wiązania się IRP1 z IRE (aktywacja IRP1) [75,79]. Tym samym zidentyfikowano nowy szlak regulacji metabolizmu żelaza w komórkach ssaków w stresie oksydacyjnym. Mimo upływu wielu lat molekularny mechanizm indukcji aktywności *trans*-regulatorowej przez  $H_2O_2$  nie został wyjaśniony. Stwierdzono jedynie, że aktywacja IRP1 przez  $H_2O_2$  wymaga zachowania integralności komórek i jest hamowana przez kwas okadainowy, inhibitor fosfataz I/IIa, co sugeruje udział w całym procesie szlaku kinazy/fosfatazy [75]. Aktywację IRP1 wywołują stosunkowo niskie stężenia  $H_2O_2$  ( $50 \mu M$ ) [75]. Jest to szybko postępujący proces, po 30–60 minutach inkubacji fibroblastów B6 myszy

z  $H_2O_2$ , ponad 50% IRP1 występuje w formie apo-IRP1, wiążącej się z IRE (w komórkach kontrolnych apo-IRP1 stanowi poniżej 10% cytoplazmatycznej puli IRP) [75]. Po zaledwie 15-minutowej inkubacji mysich fibroblastów  $Ltk^-$  z  $H_2O_2$ , a następnie po wymianie pożywki hodowlanej, IRP1 pozostaje zaktywowane przez ponad 4 godziny [80]. Poddanie mysich fibroblastów B6 działaniu egzogennej  $H_2O_2$ , generowanej w sposób ciągły przez układ glukoza/oksydaza glukozowa, utrzymujący stężenie  $H_2O_2$  w środowisku pozakomórkowym na stałym poziomie  $10 \mu M$ , powoduje już w ciągu 20–30 minut znaczącą indukcję aktywności wiązania się IRP1 z IRE [78]. Podobnie w wątrobie szczura perfundowanej buforem zawierającym składniki enzymatycznego układu generującego  $H_2O_2$ , aktywacja IRP1 była istotna (25-krotnie większa od kontrolnej) już po 20 minutach perfuzji [81]. W tym doświadczeniu warunki ekspozycji wątroby na  $H_2O_2$  były dobrane tak, że  $H_2O_2$  był generowany w tempie  $0,2 \mu M/s$ , co jest porównywalne z tempem jego uwalniania przez neutrofile i makrofagi, będące głównym źródłem  $H_2O_2$  w stanach zapalnych. Wyniki tych badań nie pozostawiają wątpliwości, że *in vivo* może dochodzić do aktywacji IRP1 przez  $H_2O_2$ .

Istotną konsekwencją aktywacji IRP1 przez  $H_2O_2$ , decydującą o jej funkcjonalnym, biologicznym znaczeniu jest regulacja syntezy *Ft* i *TfR1*. Już w pierwszej pracy, w której opisano aktywację IRP1 przez egzogenne  $H_2O_2$  w fibroblastach B6 myszy stwierdzono, że regulacja ta prowadzi do obniżenia syntezy obu podjednostek *Ft* na poziomie białka oraz stabilizacji mRNA *TfR1* [75]. Była to więc regulacja zgodna z kanonem funkcjonowania systemu IRP/IRE, wynikająca z oddziaływania apo-IRP1 z sekwencjami IRE znajdującymi się odpowiednio w 5' UTR mRNA *H-*, *L-Ft* i 3' UTR mRNA *TfR1*. Inne badania wykazały, że w komórkach HeLa traktowanych  $H_2O_2$  ( $720 \mu M$ ) występuje dwufazowa regulacja syntezy ferrytyny [74]. W pierwszej fazie (do 3 godziny po rozpoczęciu inkubacji komórek z  $H_2O_2$ ) obserwowano spadek poziomu podjednostek *Ft* będący konsekwencją aktywacji IRP1. W drugiej fazie (po 3 godzinach) następował wzrost syntezy *Ft* związany z deaktywacją IRP1 (powrotem od formy apo- do holo-IRP1), i podwyższoną ekspresją mRNA obu podjednostek *Ft*. Wydaje się, że ta regulacja nie ma jednak odniesienia do warunków fizjologicznych. Jak już wspomniano, ciągle utrzymywanie stężenia  $H_2O_2$  na poziomie zaledwie  $10 \mu M$  wystarcza do długotrwałej aktywacji IRP1 [78]. Ten sam efekt w przypadku, gdy  $H_2O_2$  jest jednorazowo dodany do hodowli komórkowych, jest możliwy przy 5–10-krotnie wyższym stężeniu  $H_2O_2$  [75]. Prawdopodobnie  $H_2O_2$  jednorazowo dodany do hodowli komórkowych ulega szybkiemu rozkładowi. Jest zatem możliwe, że deaktywacja IRP1 po kilku godzinach od dodania  $H_2O_2$  odnotowana w przytoczonych wyżej badaniach [74], jest skutkiem jego degradacji w hodowlach komórkowych.

#### OBNIŻENIE POZIOMU IRP1 PRZEZ ANIONORODNIK PONADTLENKOWY ( $O_2^{\cdot -}$ )

Do najlepiej opisanych oddziaływań biologicznych między  $O_2^{\cdot -}$  a jonami żelaza zalicza się regenerację jonów  $Fe^{2+}$  przez  $O_2^{\cdot -}$  oraz hamowanie aktywności białek zawierających enzymatyczne centra żelazowo-siarkowe [Fe-S] i usuwanie z nich żelaza. Całkowicie nowy typ oddziaływania

między  $O_2^{\cdot-}$  a metabolizmem żelaza, o charakterze specyficznej regulacji, sugerują wyniki badań przeprowadzone na myszach z nokautem genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową 1 (*Sod1*<sup>-/-</sup>). Cytoplazmatyczna SOD1, zawierająca w centrum aktywnym cynk i miedź katalizuje dysmutację  $O_2^{\cdot-}$ , czyli jego przemianę do tlenu i nadtlenu wodoru (rozkładanego następnie przez katalazę lub peroksydazę glutationową). Unięczynienie (nokaut) genu *Sod1* u myszy prowadzi do wzrostu stężenia  $O_2^{\cdot-}$  w komórkach tych zwierząt [82]. Równolegle wykazano, że synteza IRP1 w wątrobie myszy *Sod1*<sup>-/-</sup> jest obniżona w porównaniu do myszy kontrolnych zarówno na poziomie mRNA (40%), jak i białka (90%) [83]. Bardzo podobne zmiany ekspresji genu *Irp1* obserwowano w makrofagach RAW 264,7 myszy traktowanych parakwatem – ksenobiotykiem powszechnie stosowanym w badaniach *in vitro* w celu zwiększenia stężenia  $O_2^{\cdot-}$  w komórkach [wyniki własne niepublikowane]. Obniżenie poziomu IRP1 przez  $O_2^{\cdot-}$ , a tym samym zmniejszenie komórkowego potencjału IRP1 wiązania się z sekwencjami IRE występującymi w mRNA podjednostek Ft i TfR1 może stanowić przeciwwagę dla toksycznej w skutkach indukcji aktywności *trans*-regulatorowej IRP1 przez  $H_2O_2$ . Regulacja IRP1 przez  $O_2^{\cdot-}$  może być zatem niebranym dotąd pod uwagę elementem łagodzącym przebieg stresu oksydacyjnego, i dalej, reakcji zapalnej, której stres oksydacyjny jest często istotnym elementem. Drastycznie obniżoną syntezę IRP1 w rdzeniu kręgowym obserwowano w niektórych mysich modelach stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, ang. *Amiotrophic Lateral Sclerosis*) [84], neurodegeneracyjnej choroby, charakteryzującej się postępującą degeneracją motoneuronów i paraliżem mięśni szkieletowych [85]. Chociaż utrata aktywności enzymatycznej SOD1 nie jest uważana za przyczynę powstawania ALS (o czym może świadczyć brak objawów tej choroby u myszy *Sod1*<sup>-/-</sup>), to jednak biologiczna rola  $O_2^{\cdot-}$  w przebiegu ALS jest ciekawą perspektywą badawczą.

#### WZROST POZIOMU LIP WE WCZESNEJ FAZIE STRESU OKSYDACYJNEGO

Charakterystycznym zaburzeniem metabolizmu żelaza we wczesnej fazie stresu oksydacyjnego jest wzrost stężenia żelaza aktywnego w reakcji Fentona. W różnych doświadczalnych modelach stresu oksydacyjnego, w ciągu 0,5–3 pierwszych godzin po jego wywołaniu, obserwowano wzrost stężenia żelaza w LIP: w wątrobie szczurów po obniżeniu stężenia glutationu [86], w pierwotnych fibroblastach skóry człowieka poddanych działaniu promieniowania UVA [87], w limfoblastach białaczki mysiej L5178Y traktowanych  $H_2O_2$  [wyniki własne niepublikowane]. Jak już wspomniano żelazo uwalniane do LIP może pochodzić z centrów [Fe-S] destabilizowanych przez RFT. Najbardziej jednak zasobnym biologicznym źródłem żelaza zawartego w komórce jest ferrytyna. Żelazo związane w cytoplazmatycznej ferrytynie nie może być bezpośrednio uwalniane przez RFT z natywnych cząsteczek tego białka. Uznany mechanizm recyrkulacji żelaza ferrytyny w komórce jest degradacja tego białka w lizosomach [11]. Żelazo uwolnione z ulegających proteolizie cząsteczek ferrytyny transportowane jest następnie do cytoplazmy, gdzie wykorzystywane jest do syntezy hemu i rekonstrukcji centrów [Fe-S]. Zahamowanie funkcji lizosomów w erytroidalnych komórkach

K562 prowadzi do drastycznego obniżenia syntezy hemu, będącej skutkiem niedoboru żelaza [9]. Chociaż nie zidentyfikowano dotychczas molekularnego szlaku transportu żelaza z lizosomów do cytoplazmy, proces ten niewątpliwie pozostaje pod ścisłą kontrolą. W warunkach stresu oksydacyjnego prawdopodobnie wydaje się uwalnianie żelaza z cząsteczek cytoplazmatycznej ferrytyny ulegających degradacji wskutek trawienia przez enzymy proteolityczne uwalniane z lizosomów uszkodzonych przez RFT [88], a także niekontrolowanego przemieszczania się do cytoplazmy dużych ilości żelaza, uwolnionego z lizosomalnej ferrytyny, będącej w trakcie degradacji [88]. Wzrost poziomu LIP we wczesnej fazie stresu oksydacyjnego może być również konsekwencją podwyższonej aktywności HO1, u podłoża której leży transkrypcyjna aktywacja genu *Hmox1* [89]. Wykazano, że żelazo uwalniane w wyniku enzymatycznego rozpadu hemu wpływa na szybki wzrost stężenia żelaza w LIP, co jest przyczyną przejściowego (2-3 godziny) zwiększenia wrażliwości tych komórek na stres oksydacyjny wywołany promieniowaniem UVA [89].

Jak już wspomniano, poza udziałem w reakcji Fentona, żelazo zawarte w LIP wpływa również na funkcjonowanie systemu IRP/IRE, a poprzez niego na stosowne zmiany w syntezie Ft i TfR1. Zgodnie z kanonem tej regulacji wzrost poziomu LIP na początku stresu oksydacyjnego jest sygnałem do zwiększenia syntezy ferrytyny, a tym samym sygnałem inicjującym przesuniętą w czasie reakcję obronną komórek, której celem jest ograniczenie toksyczności żelaza. Mediatorem tej odpowiedzi jest IRP2, które w świetle badań na myszach z nokautem genu *Irp2* i *Irp1*, urasta do roli głównego regulatora homeostazy żelaza w odpowiedzi na niedobór i nadmiar żelaza [58-62]. Regulacja wiązania się IRP2 do IRE przez żelazo odbywa się na drodze degradacji białka w proteasomach, co skutkuje odblokowaniem translacji podjednostek ferrytyny [23]. Rzeczywiście w wątrobie szczurów, u których wywołano stres oksydacyjny przez obniżenie poziomu glutationu, obserwowano zsynchronizowaną w czasie regulację obejmującą wzrost poziomu LIP, obniżenie wiązania IRP2 do IRE i wzrost poziomu ferrytyny [86].

#### ETANOL, STRES OKSYDACYJNY I AKUMULACJA ŻELAZA W WĄTROBIE

U pacjentów cierpiących na chorobę alkoholową (ALD, ang. *alcohol liver disease*) występuje przeładowanie wątroby żelazem, któremu często towarzyszy zwłóknienie wątroby. Zwiększony poziom żelaza w wątrobie jest skorelowany z większą śmiertelnością pacjentów, u podłoża której leży marskość wątroby wywołana nadmiernym spożyciem alkoholu [90,91]. U pacjentów cierpiących na różne genetyczne odmiany hemochromatozy zaobserwowano zaostrzenie objawów choroby po spożyciu alkoholu [92]. Nawet umiarkowane picie alkoholu powoduje zwiększenie zapasów żelaza w wątrobie i podwyższone stężenie ferrytyny w surowicy i zwiększone wysycenie transferyny żelazem [90,91]. Zaproponowany niedawno molekularny mechanizm akumulacji żelaza w wątrobie w ALD wskazuje na zahamowanie syntezy hepcydyny [93]. U myszy, którym podawano przez 7 dni w diecie 10–20% etanol, stwierdzono obniżoną syntezę hepcydyny w wątrobie [94]. Zgodnie z kanonem regulacji ferryportyny przez hepcydynę [52] u myszy tych stwierdzono

również zwiększoną syntezę ferroportyny w dwunastnicy a dodatkowo także zwiększoną syntezę DMT1 [94]. Dane te wskazują na regulacyjny mechanizm akumulacji żelaza w wątrobie w ALD polegający na wzmożonej absorpcji żelaza z przewodu pokarmowego. Badania funkcjonalne aktywności 624-pz promotora genu *Hamp1* w komórkach VL-17A hodowanych z etanolem wykazały obniżoną jego aktywność. Stwierdzono również obniżone wiązanie do promotora czynnika transkrypcyjnego C/EBP $\alpha$  (ang. CCA-AT/enhancer-binding protein  $\alpha$ ) [94], o którym wiadomo, że jest silnym aktywatorem transkrypcji genów hepcydyny myszy i człowieka [95]. Kluczową obserwacją, jakiej dokonali Autorzy omawianych doświadczeń, jest zniesienie efektu hamowania syntezy hepcydyny przez etanol w obecności antyoksydantów: N-acetylocysteiny i witaminy E [94]. Sugeruje się, że RFT wytwarzane w trakcie rozkładu biologicznego etanolu odbywających się przy udziale dehydrogenazy alkoholowej i cytochromu P4502E1, uczestniczą w hamowaniu ekspresji genu hepcydyny na poziomie transkrypcji. Rola RFT w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów jest dobrze udokumentowana [96], tak więc, wspomniana sugestia jest wielce prawdopodobna, tym bardziej, że hepatocyty są głównymi komórkami wątroby, w których metabolizowany jest etanol, i w których odbywa się synteza hepcydyny [42]. Intrygujące pytanie, które oczekuje na odpowiedź jest następujące: czy obniżenie hepcydyny przez RFT ma miejsce jedynie w stresie oksydacyjnym wywołanym przez metabolizm etanolu, czy też występuje w innych modelach tego stresu.

## PIŚMIENNICTWO

- Weinberg ED (1997) The lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Persp Biol Med* 40: 578-583
- Outten CE, O'Halloran TV (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492
- Archibald FS (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* 19: 29-32
- Andrews NC (2000) Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genom Hum Genet* 1: 75-98
- Crichton RR (2001) Preface. W: *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. R. Crichton (Red.) Wiley, Chichester XV-XXII
- Schneider W, Schwyn B (1987) The hydrolysis of iron in synthetic, biological and aquatic media, W: Stumm W (red) *Aquatic Surface Chemistry*. Wiley, New York, str. 167-195
- Bartosz G (2003) *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Fenton HJH (1894) The oxidation of tartaric amid in presence of iron. *J Chem Soc* 65: 899-910
- Kakhlon O, Gruenbaum Y, Cabantchik ZI (2001) Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. *Blood* 97: 2863-2871
- Ponka P, Lok CN (1999) The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1111-1137
- Harrison PM, Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275: 161-203
- Ganz T (2005) Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab* 1: 155-157.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M (2005) Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 558-567
- Kakhlon O, Cabantchik ZI (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med* 33: 1037-1046
- Petrat F, de Groot H, Rauen U (2001) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem J* 356: 61-69
- Kruszewski M (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 531: 81-92
- Picard V, Epsztejn S, Santambrogio P, Cabantchik ZI, Beaumont C (1998) Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 273: 5382-5386
- Konijn AM, Glickstein H, Vaisman B, Meyron-Holtz EG, Slotki IN, Cabantchik ZI (1999) The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood* 94: 2128-2134
- Pantopoulos K (2004) Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 1-13
- Starzyński RR, Lipiński P (2003) IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza tlenek azotu. *Post Biol Kom* 30: 497-514
- Volz K (2008) The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 18: 106-111
- Guo B, Yu Y, Leibold EA (1994) Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem* 269: 24252-24260
- Iwai K, Klausner RD, Rouault TA (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J* 14: 5350-5357
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1148-1153
- Abboud S, Haile DJ (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 19906-19912
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21: 195-199
- Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD, Smith A (2005) Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biomaterials* 18: 339-348
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801
- Andrews NC (2007) When is a heme transporter not a heme transporter? When it's a folate transporter. *Cell Metab* 5: 5-6
- Collins JF (2006) Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol Res* 39: 25-37
- Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, Berg CL, Sassa S, Wood BL, Abkowitz JL (2004) Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118: 757-766
- Tolosano E, Altruda F (2002) Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* 21: 297-306
- Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Højrup P, Møller HJ, Moestrup SK (2005) Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106: 2572-2579
- Knutson M, Wessling-Resnick M (2003) Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 61-88
- Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B Jr, Andrews MC, Schranzhofer M, Kahawita T, Garcia-Santos D, Ponka P (2009) Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5960-5965

37. Sharp P (2004) The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc Nutr Soc* 63: 563-569
38. Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319: 825-828
39. Ponka P (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318: 241-256
40. Dandekar T, Stripecke R, Gray NK, Goosen B, Constable A, Johansson HE, Hentze MW (1990) Identification of a novel iron responsive element in murine and human erythroid  $\delta$  aminolevulinic acid synthase mRNA. *EMBO J* 10: 1903-1909
41. Chan RY, Schulman HM, Ponka P (1993) Expression of ferrochelatase mRNA in erythroid and non-erythroid cells. *Biochem J* 292: 343-349
42. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-7819
43. Zhang AS, Xiong S, Tsukamoto H, Enns CA (2004) Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood* 103: 1509-1514
44. Nemeth E, Ganz T (2009) The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 122: 78-86
45. Viatte L, Vaulont S (2009) Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 91: 1223-1228
46. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 277: 37597-37602
47. Jordan JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, Kohno H, Kim H, Schnier PD, Harvey TS, Miranda LP, Cheatham J, Sasu BJ (2009) Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* 284: 24155-24167
48. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S (2001) Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8780-8785
49. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Siriti M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4596-4601
50. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Gitrelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C (2003) Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 33: 21-22
51. Wrighting DM, Andrews NC (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108: 3204-3209
52. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093
53. Peyssonnaud C, Zinkernagel A/S, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson IRS (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 117: 1926-1932
54. Nemeth E (2008) Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 15: 169-175
55. Frazer DM, Anderson GJ (2003) The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cell Mol Dis* 30: 288-297
56. Lipiński P, Starzyński RR (2006) The role of iron regulatory proteins (IRPs) in the regulation of systemic iron homeostasis: lessons from studies on IRP1 and IRP2 knock out mice. *Postepy Hig Med Dosw* 60: 322-330
57. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW (2008) Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 28: 197-213
58. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, La Vaute T, Brazzolotto X, Berger UV, Land W, Ollivierre-Wilson H, Grinberg A, Love P, Rouault TA (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 23: 386-395
59. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Rouault TA (2004) Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities *in vivo*. *Science* 306: 2087-90
60. Galy B, Höltter SM, Klopstock T, Ferring D, Becker L, Kaden S, Wurst W, Gröne HJ, Hentze MW (2006) Iron homeostasis in the brain: complete iron regulatory protein 2 deficiency without symptomatic neurodegeneration in the mouse. *Nat Genet* 38: 967-969
61. LaVaute T, Smith S, Cooperman S, Iwai K, Land W, Meyron-Holtz E, Drake SK, Miller G, Abu-Asab M, Tsokos M, Switzer R. 3rd, Grinberg A, Love P, Tresser N, Rouault TA (2001) Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat Genet* 27: 209-214
62. Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA (2005) Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood* 106: 1084-1091
63. Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C (2000) Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem* 275: 3021-3024
64. Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kühn LC (2009) Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology* 50: 852-860
65. Lipiński P, Drapier JC, Oliveira L, Retmańska H, Sochanowicz B, Kruszewski M (2000) Intracellular iron status as a hallmark of mammalian cell susceptibility to oxidative stress: a study of L5178Y mouse lymphoma cell lines differentially sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Blood* 95: 2960-2966
66. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 357: 241-247
67. Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C, Cabantchik ZI (1999) H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood* 94: 3593-3603
68. Pietrangelo A (2006) Hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Nutr* 26: 251-270
69. Malyszko J (2009) Hemojuvelin: the hepcidin story continues. *Kidney Blood Press Res* 32: 71-76
70. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 41: 478-481
71. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX (2005) A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2: 399-409
72. Torti FM, Torti SV (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99: 3505-3516
73. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 357: 241-247
74. Tsuji Y, Ayaki H, Whitman S P, Morrow CS, Torti SV, Torti FM (2000) Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 20: 5818-5827
75. Pantopoulos K, Hentze MW (1995) Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J* 14:2917-2924.
76. Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 349: 9-23
77. Brazzolotto X, Gaillard J, Pantopoulos K, Hentze MW, Moulis JM (1999) Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide *in vitro* but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem* 274: 21625-21630
78. Pantopoulos K, Mueller S, Atzberger A, Ansorge W, Stremmel W, Hentze MW (1997) Differences in the regulation of iron regulatory pro-

- tein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 9802-9808
79. Martins EA, Robalinho RL, Meneghini R (1995) Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Arch Biochem Biophys* 316: 128-134
80. Pantopoulos K, Weiss G, Hentze MW (1996) Nitric oxide and oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol* 16: 3781-3788
81. Mueller S, Pantopoulos K, Hübner CA, Stremmel W, Hentze MW (2001) IRP1 activation by extracellular oxidative stress in the perfused rat liver. *J Biol Chem* 276: 23192-23196
82. Grzelak A, Kruszewski M, Macierzyńska E, Piotrowski Ł, Pulaski Ł, Rychlik B, Bartosz G (2009) The effects of superoxide dismutase knock-out on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett* 14: 23-34
83. Starzynski RR, Lipinski P, Drapier JC, Diet A, Smuda E, Bartłomiejczyk T, Gralak MA, Kruszewski M (2005) Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism. *J Biol Chem* 280: 4207-4212
84. Massignan T, Casoni F, Basso M, Stefanazzi P, Biasini E, Tortarolo M, Salmons M, Gianazza E, Bendotti C, Bonetto V (2007) Proteomic analysis of spinal cord of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis G93A SOD1 mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 719-725
85. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52: 39-59
86. Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A (1995) Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem* 270: 700-703
87. Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM (1999) Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6751-6756
88. Basu-Modak S, Ali D, Gordon M, Polte T, Yiakoukaki A, Pourzand C, Rice-Evans C, Tyrrell RM (2006) Suppression of UVA-mediated release of labile iron by epicatechin—a link to lysosomal protection. *Free Radic Biol Med* 41: 1197-1204
89. Kvam E, Hejmadi V, Ryter S, Pourzand C, Tyrrell RM (2000) Heme oxygenase activity causes transient hypersensitivity to oxidative ultraviolet A radiation that depends on release of iron from heme. *Free Radic Biol Med* 28: 1191-1196
90. Harrison-Findik DD (2007) Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J Gastroenterol* 13: 4925-4930
91. Cylwik B, Chrostek L, Szmitkowski M (2008) The effect of alcohol on the regulation of iron metabolism. *Pol Merkur Lekarski* 25: 273-275
92. Deugnier Y, Mosser J (2008) Modifying factors of the HFE hemochromatosis phenotype. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2: 531-540
93. Harrison-Findik DD, Klein E, Crist C, Evans J, Timchenko N, Gollan J (2007) Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology* 46: 1979-1985
94. Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K, Gollan J (2006) Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 281: 22974-22982
95. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, Inoue J, Gonzalez FJ, Leroyer P, Gilot D, Boudjema K, Guguen-Guillouzo C, Brissot P, Loréal O, Ilyin G (2002) C/EBP $\alpha$  regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem* 277: 41163-41170
96. Liu H, Colavitti R, Rovira, I Finkel T (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97: 967-974

## Iron homeostasis, a defense mechanism in oxidative stress

Paweł Lipiński<sup>✉</sup>, Rafał R. Starzyński, Agnieszka Styś, Monika Straciło

Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, 1 Postępu St., 05-552 Wólka Kosowska, Poland

<sup>✉</sup>Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 1 Postępu Str., 05-552 Wólka Kosowska; tel.: (22) 756 17 11 w. 332, e-mail: p.lipinski@ighz.pl

**Key words:** ferritin, hepcidin, iron, IRE, IRP, oxidative stress

### ABSTRACT

Iron homeostasis consists in providing iron for a variety of biochemical processes and in limiting iron availability for Fenton reaction. Intracellular and systemic iron homeostasis is an important element in the defense against oxidative stress and is controlled by post-transcriptional regulatory mechanism IRP/IRE and hepcidin, a peptide that regulates iron absorption from diet and heme iron release by macrophages. Mutations in hepcidin gene as well as in genes involved in hepcidin regulation lead to the toxic accumulation of iron in the body and exacerbate oxidative stress. Reactive oxygen species influence labile iron pool through the transcriptional and posttranscriptional regulation of ferritin gene and through the release of iron from iron-sulfur proteins and from ferritin degraded in lysosomes. Alcohol-induced oxidative stress down-regulates hepcidin expression, increases iron absorption and leads to the excessive accumulation of iron and oxidative damage in the liver.



# Budowa i funkcja białek ATP7A i ATP7B

## – ATPazy transportujących jony miedzi

### STRESZCZENIE

Organizmy żywe wykształciły skomplikowany i podlegający kontroli genetycznej system transportu i metabolizmu miedzi. Kluczową rolę w organizmie w utrzymaniu homeostazy miedzi zajmują białka ATP7A i ATP7B. Są to ATPazy typu P, które w swoim cyklu katalitycznym transportują jony miedzi poprzez błony wykorzystując energię pochodzącą z hydrolizy ATP. Badania w ostatnich latach przyniosły wiele nowych i ciekawych informacji dotyczących budowy, syntezy oraz przebiegu cyklu katalitycznego białek ATP7A i ATP7B. Białka te w komórce zlokalizowane są w aparacie Golgiego, a ich funkcją jest utrzymanie stałego stężenia jonów miedzi w organizmie poprzez usuwanie nadmiaru tego pierwiastka z komórek lub przyłączanie jonów miedzi do białek enzymatycznych. Białka ATP7A i ATP7B syntetyzowane są we wszystkich komórkach organizmu. Uczestniczą one we wchłanianiu jonów miedzi z pokarmu, wydalaniu nadmiaru miedzi do żółci i usuwaniu jej z organizmu oraz transporcie miedzi do mózgu a w organizmie matki w przekazywaniu jonów miedzi do rozwijającego się płodu i wydzielaniu ich do mleka w okresie laktacji. Stwierdzono również, że białka te mogą przyczynić się do powstawania lekooporności w przebiegu leczenia chorób nowotworowych. Zaburzenia funkcji tych białek wywołane mutacją w kodujących je genach prowadzą do ciężkich chorób metabolicznych (choroba Menkesa i choroba Wilsona).

### WPROWADZENIE – MIEDŹ, PIERWIASTEK NIEZBĘDNY I GROŹNY

Pozytywny wpływ miedzi na organizm człowieka znany jest od dawna. Już starożytni Egipcjanie, Grecy i Rzymianie doceniali bakteriobójcze właściwości tego metalu. Jednakże dopiero w XIX wieku naszej ery odkryto, że miedź jest dla organizmu człowieka niezbędnym składnikiem pokarmowym biorącym udział w metabolizmie żelaza oraz procesach krwiotwórczych. Przez kolejne lata rosła wiedza na temat tego pierwiastka i jego funkcji w organizmie. Stało się też jasne, że jest on istotny dla działania wielu kluczowych enzymów [1]. Miedź jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów eukariotycznych, ponieważ bierze udział w procesach biologicznych takich jak: oddychanie komórkowe, metabolizm żelaza, usuwanie wolnych rodników, tworzenie tkanki łącznej oraz jest istotna dla odpowiedniej pracy układu nerwowego [2].

Udział miedzi w wielu podstawowych ścieżkach metabolicznych związany jest z jej szczególnymi właściwościami chemicznymi, ponieważ może ona występować zarówno w stanie utlenionym  $\text{Cu}^{2+}$  jak i zredukowanym  $\text{Cu}^+$  [3]. Miedź w organizmie występuje głównie w kompleksach z białkami bądź aminokwasami, które wiążą jej zredukowaną formę i te zaangażowane są głównie w transport i utrzymywanie homeostazy tego pierwiastka. W wielu enzymach jak na przykład oksydaza cytochromu *c* (wytwarzanie energii przez mitochondria), dysmutaza ponadtlenkowa (przeciwutleniacz), oksydaza lizylowa (tworzenie kolagenu i elastyny),  $\beta$ -monoooksygenaza dopaminy (tworzenie neuroprzekazników), ceruloplazmina (transport żelaza) miedź występuje w obydwu formach i pełni rolę kofaktora. Funkcja białek wiążących utlenioną formę miedzi jest dotychczas nieznana [4,5]. Badania prowadzone na myszach laboratoryjnych wykazują zaburzenia w metabolizmie miedzi (*Atp7b*<sup>-/-</sup>) pokazały, że pierwiastek ten bierze również udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych i węglowodanów, co sugeruje wysoką wrażliwość biosyntezy lipidów na zmiany w stężeniu jonów miedzi i zaangażowanie tego pierwiastka w metabolizmie lipidów. Mogą wskazywać na to także wyniki badań, w których suplementacja miedzią porównała do zmniejszenia poziomu triglicerydów, cholesterolu i LDL w osoczu [6].

Wspomniane właściwości oksydoredukcyjne miedzi mają niestety także negatywny aspekt, ponieważ jony tego metalu mogą uczestniczyć w reakcjach oksydoredukcyjnych, które są źródłem rodników hydroksylowych. Tak powstałe cząsteczki powodują uszkodzenia lipidów, białek i DNA. Większość rodników hydroksylowych *in vivo* pochodzi z reakcji Fentona, czyli rozpadu nadtlenu wodoru w reakcji z metalami [7]:

Małgorzata Lenartowicz<sup>1,✉</sup>

Wojciech Krzeptowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

<sup>2</sup>Zakład Cytologii i Histologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

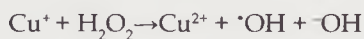
<sup>✉</sup>Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii UJ, ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków; tel.: (12) 663 24 35, e-mail: małgorzata.lenartowicz@gmail.com

Artykuł otrzymano 21 lutego 2010 r.

Artykuł zaakceptowano 24 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** ATPazy typu P, metabolizm miedzi, metaloproteiny

**Podziękowania:** Obecna praca finansowana jest z Działalności Statutowej Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu nr K/ZDS/001718.



Obecnie jest to bardzo aktualny problem, ponieważ w organizmie proces ten może nasilać się w obecności jonów kadmu. Wzrastające zanieczyszczenie kadmem powoduje, że pierwiastek ten zastępując miedź w wielu cytoplazmatycznych i błonowych białkach zwiększa poziom wolnych bądź schelatowanych jonów tego metalu, tym samym uczestnicząc w stresie oksydacyjnym inicjowanym reakcją Fentona [8].

## TRANSPORT MIEDZI W ORGANIZMIE

Miedź jest mikroelementem występującym powszechnie w pożywieniu, a dzienna zalecana dawka (RDA) tego pierwiastka wynosi od 0,9 mg do 1,35 mg [9,10]. Około 15% całej miedzi z pokarmu jest przyswajane, natomiast zdecydowana większość tego pierwiastka zostaje wydalona z organizmu [11]. Ponieważ miedź w nadmiernym stężeniu jest szkodliwa dla organizmu, głównie poprzez generowanie wolnych rodników, istnieją odpowiednie mechanizmy mające na celu regulację absorpcji, transportu i usuwania tego pierwiastka w celu zachowania odpowiedniej homeostazy.

Miedź jest absorbowana z pokarmu w jelicie cienkim, skąd trafia do krwiobiegu, gdzie w osoczu łączy się z białkami, peptydami i aminokwasami, między innymi albuminami, glutationem i histydyną [12]. W tej postaci miedź wraz z krwią rozprowadzana jest po całym organizmie. Jednak głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi jest wątroba. To właśnie wątroba gromadzi najwięcej tego pierwiastka [11], w tym organie miedź jest przyłączana do syntetyzowanych białek (ceruloplazmina, metalotioneina), a następnie ponownie trafia bezpośrednio do krwiobiegu. Do nerek miedź dociera wraz z krwią, w procesie filtracji kłębuszkowej pierwiastek ten trafia do przesączu pierwotnego, jednak ponownie w kanalikach proksymalnych ulega reabsorpcji i trafia do krwiobiegu. Tylko 2% miedzi usuwane jest wraz z moczem. To wątroba bierze udział w usuwaniu nadmiaru jonów miedzi z organizmu. Miedź wydzielana jest do syntetyzowanej w wątrobie żółci i wydzielana razem z nią do przewodu pokarmowego. Jest to główna droga usuwania miedzi z organizmu, w ten sposób usuwane jest 98% tego metalu [11,13].

Jak już wspomniano, miedź z wątroby wydzielana jest do krwi w kompleksie z ceruloplazminą, kompleks ten stanowi 65–70% miedzi w osoczu i pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego pierwiastka w organizmie, resztę (12–18%) stanowią głównie albuminy [14,15] lub inne białka np. transkuperyna, która jest zaliczana do makroglobulin [16]. Wspomniane kompleksy miedzi z białkami i aminokwasami uczestniczą nie tylko w transporcie miedzi w organizmie. Chelatowanie i sekwestracja jonów metali w nieaktywne kompleksy jest popularnym mechanizmem unieczynniania toksycznych jonów. Większość tych mechanizmów jest niespecyficzna i działa na jony różnych metali, poprzez zahamowanie importu tych jonów do komórki, bądź też ich unieczynnienie w macierzy zewnątrzkomórkowej, tak by nie mogły podlegać absorpcji [17].

## POBIERANIE MIEDZI PRZEZ KOMÓRKĘ

Transport miedzi na poziomie komórkowym jest skomplikowanym procesem a pierwsze badania tego mechanizmu przeprowadzane były na bakterii *Enterococcus hirae*, a w odniesieniu do organizmów eukariotycznych na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* [18]. Za pobieranie miedzi przez komórkę odpowiedzialne są białka zaliczane do rodziny transporterów miedzi (Ctr). Jedno z białek należących do wspomianej grupy, Ctr1, jest syntetyzowane w komórkach ssaków w dużych ilościach w jelicie, wątrobie, nerkach i sercu, natomiast niska synteza zachodzi w tkankach mózgu i mięśniach [19]. Białko to zbudowane jest z 190 reszt aminokwasowych i tworzy wbudowany w błonę homotrimer umożliwiający powstanie kanału dla jonów miedzi. Badania wykazują również, że białko Ctr1 ulega potranslacyjnej modyfikacji poprzez glikozylację [19]. Mechanizm transportu miedzi poprzez błony biologiczne nie jest dokładnie poznany. Aktualny model zakłada, że Ctr1 oddziałuje ze zredukowaną a nie utlenioną formą miedzi, która jest powszechna w środowisku zewnątrzkomórkowym. Wymaga to wcześniejszego działania metaloreduktaz o wysokim powinowactwie do miedzi, znajdujących się na przykład na powierzchni błony komórkowej [2]. Transport miedzi przez kanał w obrębie Ctr1 nie wymaga nakładów energii ze strony ATP, a opiera się na zmianach konformacyjnych w białku. Kluczową rolę dla funkcjonowania całego procesu odgrywa zachowany w ewolucji motyw MX-X-*XM* (gdzie X to reszta dowolnego aminokwasu) w drugiej domenie transbłonowej oraz zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe domeny posiadające miejsca wiązania miedzi. Pozwalają one białku hCtr1 na stabilne związanie dwóch jonów  $\text{Cu}^+$  za pomocą trzech koordynacyjnych mostków Cu-S [2,20].

Obecnie przypuszcza się, że Ctr1 nie jest jedynym transporterem miedzi. Badania wykazały, że w komórkach jelita syntetyzowany jest transporter dwuwartościowych jonów metali DMT1 (ang. *divalent metal transporter*), który wykazuje mniejsze powinowactwo także do innych metali, w tym miedzi [21]. Być może jest to główny transporter miedzi w komórkach jelita, gdyż jego synteza jest zależna od ilości tego pierwiastka dostępnej w pożywieniu. Nie obserwowano podobnej zależności w syntezie hCtr1 w hodowanych *in vitro* komórkach jelita. Jest też bardzo prawdopodobne, że synteza białek transportujących miedź do wnętrza komórki jest zależna od rodzaju tkanki. Świadczyć o tym mogą badania, w których wykazano, że wysokie stężenie miedzi powoduje spadek syntezy białka hCtr1 w hodowlach komórek nerki, a proces ten może być regulowany przez potranslacyjne mechanizmy oparte na endocytozie i degradacji wspomnianego transportera [22]. W transport miedzi przez błonę komórkową mogą być zaangażowane inne białka, jak na przykład białko prekursorowe amyloidu (APP, ang. *amyloid precursor protein*), błonowe białko, które odgrywa główną rolę w rozwoju choroby Alzheimera. Białko to posiada zewnątrzkomórkową domenę, która redukuje jony  $\text{Cu}^{2+}$ . Niewiele jeszcze wiadomo na temat roli tego białka w utrzymywaniu homeostazy miedzi, być może jego główną rolą jest zewnątrzkomórkowa redukcja  $\text{Cu}^{2+}$ . Proces ten może być bezpośrednio związany z uczestnictwem APP w procesach neurodegeneracyjnych [4].

Miedź po przejściu przez błonę komórkową trafia do cytoplazmy, jednak nie występuje tu w postaci wolnych jonów (lub występuje w tej postaci w bardzo małych ilościach). W cytoplazmie pierwiastek ten jest natychmiast wychwytywany przez obecne tu białka opiekuńcze (chaperoniny). W zależności od białka docelowego, do którego miedź ma być dostarczona, w procesie tym uczestniczą różne przENOŚNIKI [23].

Jednym z nich jest białko ATOX1 (ang. *antioxidant protein 1*). Jego cząsteczka zbudowana jest z 68 reszt aminokwasowych, białko to jest odpowiedzialne za przyłączanie miedzi i jej transport do szlaku sekrecyjnego aparatu Golgiego [23]. Szczególnie silna ekspresja genu *ATOX1* występuje w wątrobie, mózgu i nerkach [24]. Co więcej, ATOX1 funkcjonuje jako komponent ścieżki chroniącej komórkę przed negatywnym wpływem stresu oksydacyjnego [25]. Jedną cząsteczką białka przyłącza jeden jon miedzi poprzez wiązanie koordynacyjne do dwóch reszt cysteinowych zawartych w sekwencji M-X-C-X-X-C [26].

Następnym poznaną metalochaperoniną jest CCS (ang. *copper chaperone for SOD1*), białko o masie 70-kDa odpowiadające za włączanie miedzi do dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Białko to jest homodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek o 3 funkcjonalnych domenach [23]. Domena I zawiera sekwencję MTC-X-X-C wiążącą miedź. Sekwencja C-X-X-C w domenie pierwszej, która odpowiada za wiązanie miedzi, została znaleziona także w ATPazach typu P transportujących miedź i innych metalochaperoninach z grupy ATOX, aczkolwiek obecność wspomnianego motywu nie jest wymagana dla prawidłowego działania białka CCS. Domena II jest wysoce homologiczna do dysmutazy nadtlenkowej (SOD) i odpowiada za powstanie heterodimeru CCS-SOD, co ułatwia przekazanie miedzi na SOD. Jony miedzi przekazywane są przez reszty cysteinowe domeny III [27,28].

Dysmutaza nadtlenkowa zlokalizowana jest głównie w cytosolu komórki, ale może też występować w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. U ssaków, SOD1 aktywowana w cytosolu przez CCS, nie może już dostać się do mitochondrium. W momencie aktywacji w mitochondrium dojrzały enzym jest tu zatrzymywany [29,30]. Cox17 to kolejne małe białko niezbędne do funkcjonowania oksydazy cytochromu *c* (CCO). Jest ono zlokalizowane w cytoplazmie i przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Jedną cząsteczką tego białka może transportować dwa jony miedzi, gdyż zawiera 6 reszt cysteinowych zgrupowanych w motywach C-C-X-C. Za transport miedzi do CCO u ssaków odpowiadają jeszcze inne chaperoniny jak: Sco1, Sco2 i Cox11. Białka te zlokalizowano w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i prawdopodobnie pośredniczą one w przekazywaniu jonów miedzi do cząsteczki enzymu [3]. Do grupy białek związanych z transportem miedzi zaliczane jest też białko COMMD1 (ang. *Copper Metabolism MURR1 Domain 1*), zwane dawniej MURR1. Białko to współpracuje z ATPazą transportującą jony miedzi ATP7B i uczestniczy w procesie sekrecji miedzi do żółci. Nie jest dokładnie znana funkcja tego białka. Sugeruje się jednak, że uczestniczy ono w kontrolowaniu proteolizy białka ATP7B [31].

## ATP7A I ATP7B – ATPazy TRANSPORTUJĄCE JONY MIEDZI

Jednak kluczową rolę w procesie transportu miedzi, włączania tego pierwiastka do szlaku metabolicznego białek enzymatycznych i utrzymywania stałego stężenia jonów miedzi w komórce spełniają dwie ATPazy typu P, które są ściśle związane z metabolizmem tego pierwiastka. Obecny artykuł poświęcony jest charakterystyce i znaczeniu tych białek dla prawidłowej fizjologii człowieka. Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu obydwu białek prowadzą do ciężkich schorzeń metabolicznych u ludzi i związane są głównie z mutacjami w genach kodujących ATPazy transportujące miedź, czyli *ATP7A* oraz *ATP7B*, powodując odpowiednio chorobę Menkesa i chorobę Wilsona [6].

Zespół Menkesa (MD) to stosunkowo rzadko występująca choroba genetyczna, pojawiająca się w Europie z częstością 1 na 300 000 żywych urodzeń [32]. Zapadają na nią głównie chłopcy, którzy umierają zwykle przed osiągnięciem 5 roku życia. Choroba ta jest spowodowana mutacją w genie *ATP7A* zlokalizowanym w chromosomie X [33]. Mutacje w obrębie wymienionego genu to głównie mutacje nonsensowne oraz mutacje zmiany sensu, ale także małe insercje i delecje. Wspomniane mutacje mogą powodować utratę funkcji całego białka i/bądź też zaburzać jego prawidłową lokalizację. Brak właściwej funkcji białka, czyli transportu miedzi z cytosolu, może być z kolei spowodowane jego niewłaściwym fałdowaniem, lub zaburzeniami w domenie katalitycznej zaangażowanej w wiązanie ATP [4]. Defekt genetyczny powoduje znaczne upośledzenie wchłaniania miedzi w jelicie cienkim, skutkiem tego jest niedobór lub akumulacja tego pierwiastka w różnych organach. Objawy tej choroby związane są z brakiem aktywności enzymów zależnych od jonów miedzi i są to głównie: degeneracja układu nerwowego oraz uszkodzenia tkanki łącznej. Objawy nasilają się wraz z wiekiem prowadząc w konsekwencji do śmierci [32,33]. Modelem zwierzęcym zespołu Menkesa są myszy z mutacją *mottled* [33,34].

Choroba Wilsona (WND), podobnie jak choroba Menkesa, jest autosomalną chorobą genetyczną, związaną z defektem wydalania miedzi, co prowadzi do akumulacji nadmiaru tego pierwiastka w wątrobie, nerkach i mózgu oraz rogówce oka, tworząc charakterystyczny żółty pierścień, tzw. pierścień Kaysera-Fleischera. Pojawienie się pierścienia jest objawem specyficznym dla tej choroby. Choroba ta jest trudna do rozpoznania we wczesnym stadium, ponieważ objawy są niespecyficzne, a są nimi między innymi żółtaczką i marskość wątroby. Występują także symptomy neurologiczne jak depresja, symptomy przypominające chorobę Parkinsona, dystonia, ujawniające się dopiero w trzeciej dekadzie życia [35]. Za chorobę tę odpowiadają defekty w białku ATP7B. Zidentyfikowano około 300 różnych mutacji w genie *ATP7B* i są to głównie delecje, mutacje nonsensowne oraz mutacje związane z niewłaściwym splicingiem mRNA [6,32]. W przypadku choroby Wilsona, podejmowane są próby leczenia, które przy odpowiednio wczesnym zdiagnozowaniu tego zaburzenia dają dobre prognozy. Stosuje się kilka metod terapii. Jedną z nich jest podawanie penicyliny, która tworzy kompleksy z miedzią, indukując wydalanie mie-

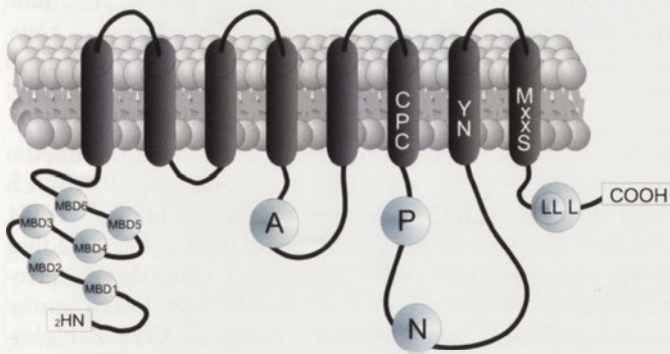
dzi z moczem. Inną metodą jest zahamowanie absorpcji miedzi z przewodu pokarmowego za pomocą siarczku cynku lub obniżenie stężenia miedzi w osoczu za pomocą  $[\text{NH}_4]_2\text{MoS}_4$  [12]. Modelami zwierzęcymi choroby Wilsona są: myszy z mutacją toksycznego mleka (ang. *Toxic Milk Mouse*), szczury LEC (ang. *Long-Evans Cinnamon*) oraz psy rasy terier Bedlington [12].

### GENY KODUJĄCE BIAŁKA ATP7A I ATP7B

Intensywne badania prowadzone na początku lat 90. minionego stulecia nad schorzeniami wywołanymi przez dziedziczne zaburzenia metabolizmu miedzi, doprowadziły do poznania genów kodujących ATPazy transportujące jony tego pierwiastka. W roku 1993 poznano strukturę genu *ATP7A*. Odkrycia tego dokonano w tym samym czasie w trzech różnych i niezależnych laboratoriach na świecie [36-38]. Co ciekawsze, wyniki tego odkrycia opublikowano jednocześnie w tym samym numerze czasopisma *Nature Genetics*. Gen *ATP7A* zlokalizowano na długim ramieniu chromosomu X w pozycji Xq13. Jest to stosunkowo duży gen obejmujący 150 kb. Sekwencje kodujące obejmują 23 eksony, których wielkość waha się od 77 do 726 bp. Kodon startowy ATG znajduje się w eksonie drugim, kodon stop TAA w eksonie 23 [39-41]. W 1993 roku nastąpiło też odkrycie genu *ATP7B* [42]. Gen ten u człowieka kodowany jest na chromosomie 13 pozycji 13q14.3 i składa się z 21 eksonów. Wielkość eksonów waha się od 77 do 1234 bp, kodon start znajduje się w eksonie pierwszym. Stwierdzono 60% podobieństwa pomiędzy genami *ATP7A* i *ATP7B* [43]. Szerokie spektrum działania ATPaz transportujących jony miedzi przyczyniło się do rozwoju intensywnych badań nad syntezą tych białek i kodujących je genów. Badania przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych wykazały, że synteza ta zachodzi zarówno w życiu postnatalnym jak i prenatalnym. Ekspresję genu *Atp7a* stwierdzono już u 7-dniowych zarodków mysich [44]. Zaobserwowano, że w okresie życia płodowego ekspresja genu *Atp7a* zachodzi we wszystkich tkankach rozwijającego się organizmu [45] a obecnie gen *ATP7A* jest uznawany za jeden z genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*) [46,47]. Stosując metodę hybrydyzacji RNA *in situ* Kuo i współpracownicy odkryli, że już u 9,5-dniowych zarodków myszy zachodzi ekspresja obydwu genów *Atp7a* i *Atp7b* [45]. Stwierdzono również, że w życiu postnatalnym w większości tkanek zachodzi ekspresja obydwu genów, jednak poziom ekspresji jest różny i zależy od rodzaju tkanki, jak również od wieku danego osobnika. Ekspresja genu *ATP7A* jest szczególnie wysoka w nerkach, mózgu, jelicie cienkim oraz w komórkach nabłonka naczyń krwionośnych [47-51]. Gen *ATP7B* ma szczególnie wysoką ekspresję w wątrobie i mózgu [39,40,52], natomiast w płucach jego ekspresja jest stosunkowo niska [52]. Dotychczas panowała opinia, że w wątrobie w życiu postnatalnym u ssaków genu *ATP7A* nie ulega ekspresji [45,53,54], jednak wyniki badań prowadzonych na myszach pozwoliły na identyfikację produktów genu *ATP7A* na poziomie mRNA i na poziomie białka. Co więcej, stwierdzono, że poziom ekspresji ściśle zależy od wieku badanych osobników i tak, u noworodków i bardzo młodych zwierząt, ekspresja ta jest bardzo wysoka, natomiast u osobników dorosłych ulega znacznemu obniżeniu [55].

### JAK ZBUDOWANE SĄ ATPazy TRANSPORTUJĄCE JONY MIEDZI

Występujące w komórkach ssaków ATPazy transportujące kationy miedziowe należą do grupy ATPaz typu P1B. Białka należące do tej grupy transportują jony metali ciężkich, takie jak  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , czy  $\text{Zn}^{2+}$ , a w swoim cyklu katalitycznym wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP [56]. Białka *ATP7A* i *ATP7B* wykazują bardzo wiele cech wspólnych w budowie cząsteczki, tak że w obecnym artykule omówiona będzie ogólnie budowa ATPaz transportujących jony miedzi z podkreśleniem specyficzności danego białka. Podobieństwo między tymi białkami nie kończy się na zbliżonym planie budowy, bowiem stwierdzono, że na poziomie sekwencji reszt aminokwasowych białka te wykazują prawie 60% homologii [43]. Zarówno *ATP7A* jak i *ATP7B* są białkami transbłonowymi. W komórkach białka te zlokalizowano w cysternach trans aparatu Golgiego, oraz w zależności od stężenia jonów miedzi w komórce, w błonie komórkowej oraz w cytoplazmie (w pęcherzykach klatrynowych) [40,52,57]. *ATP7A* jest białkiem o masie cząsteczkowej 175-180 kDa złożonym z 1500 reszt aminokwasowych, zaś cząsteczka *ATP7B* o masie cząsteczkowej 165 kDa zbudowana jest z 1465 reszt aminokwasowych. Obydwie ATPazy są pojedynczymi polipeptydami, jednak w przeciwieństwie do *ATP7A*, białko *ATP7B* nie ulega procesowi glikozylacji [48]. Łańcuchy aminokwasowe obydwu białek 8-krotnie przechodzą przez błonę, tworząc 4-hydrofilowe, zanurzone w cytosolu domeny oddzielone od siebie odcinkami transbłonowymi (Ryc. 1). Ten plan budowy jest zachowany w ewolucji i charakterystyczny dla wszystkich ATPaz typu P. Domeny transmembranowe (ang. *TMS-transmembrane segments*) nie tylko decydują o błonowej lokalizacji białka, ale również tworzą kanał dla transportu jonów metalu. Sekwencje niezbędne dla zajęcia tego procesu znaleziono w trzech różnych domenach transmembranowych. TSM 6 zawiera sekwencje reszt aminokwasowych C-P-C, która jest zachowana w ewolucji i występuje we wszystkich ATPazach typu P. Ponadto w TMS 7 sekwencje N-Y oraz sekwencja M-X-X-S (X – reszta dowolnego aminokwasu) w TMS 8 uważane są za niezbędne dla transportu jonów miedzi przez błony białkowo-lipidowe [40,58,59]. Wśród domen hydrofilowych budujących cząsteczki omawianych ATPaz, możemy wyróżnić 6 domen wiążących jony miedzi; domenę wiążącą ATP, domenę A ważną dla aktywności fosfatazy i zmian konformacyjnych w czasie cyklu katalitycznego oraz domenę obejmującą część C-terminalną białka, bardzo istotną dla prawidłowego transportu cząsteczki w obrębie cytoplazmy (Ryc. 1). Domeny wiążące kationy metalu, zlokalizowane w N-końcowej części cząsteczki, ułożone są szeregowo. Każda z nich zbudowana jest z około 70 reszt aminokwasowych [52] i zawiera zachowaną w ewolucji sekwencję reszt aminokwasowych HC-X-X-C-X-X-X-IE, która pozwala na związanie jednego kationu miedzi. Analiza rentgenograficzna wykazała, że miedź przyłączana jest do reszt cysteiny w formie zredukowanej  $\text{Cu}^+$  [40,56,60]. Badania przeprowadzone z użyciem metody magnetycznego rezonansu jądrowego oraz badania krystalograficzne pozwoliły na dokładną analizę budowy każdej z domen [40,56,61]. Badania wykazały, że pomimo podobnej funkcji jaką pełnią, domeny te różnią się znacznie składem reszt aminokwasowych i nie są równocenne pod względem peł-



**Rycina 1.** Schemat budowy ATPazy transportującej jony miedzi. Zarówno ATP7A jak i ATP7B są białkami transbłonowymi. Domeny transbłonowe mocują białko w błonie aparatu Golgiego, a równocześnie dzięki unikatowej sekwencji reszt aminokwasów (CPC- domena 6, YN- domena 7 i MXXS – domena 8) umożliwiają transport jonów przez błonę. N-końcowa część białka zawiera 6 hydrofilowych domen wiążących kationy metalu. Pozostałe hydrofilowe domeny biorą udział w cyklu katalitycznym białka przyłączając cząsteczkę ATP (subdomena N). Uwalniana w procesie hydrolizy ATP reszta fosforanowa przyłączana jest do sekwencji DKTG w obrębie subdomeny P. Domena A opowiedziana jest za proces defosforylacji cząsteczki ATPazy. C-końcowa część cząsteczki białka jest opowiedziana za prawidłowy transport białek w cyklu katalitycznym. Fragment ten zawiera sekwencję złożoną z trzech reszt leucyny w przypadku białka ATP7B i z dwóch reszt leucyny w przypadku ATP7A warunkującą właściwy transport białka w komórkach o budowie spolaryzowanej (ATP7A do błony podstawno-bocznej, ATP7B do błony wierzchołkowej), oraz transport powrotny białka na drodze endocytozy do aparatu Golgiego.

nionej funkcji. Analiza sekwencji N-końcowej białka ATP7B pokazała że domeny od 1 do 4 (charakterystyczne tylko dla komórek ssaków) nie są konieczne dla aktywności białka. Białko pozbawione tego odcinka nie tylko zachowuje możliwość transportu transbłonowego, ale utrata tego odcinka wręcz zwiększa szybkość hydrolizy i przyłączania ATP, co sugeruje, że domeny te mogą pełnić w cząsteczce funkcje autoinhibitorów [40]. Jednak istnieją sugestie, że to właśnie domeny 1-4 oddziałują z białkiem ATOX1 i do nich w pierwszej kolejności przyłączane są jony miedzi [60,62,63]. Odkryto, że w białku ATP7A są to właśnie domeny 1 i 4. Ta ostatnia, wiążąca kationy metalu, reaguje bezpośrednio z ATOX1[64], natomiast w ATP7B największe powinowactwo do ATOX1 ma domena 4, a nieco mniejsze domena 2 [40]. Domeny 5 i 6 zlokalizowane bliżej części transbłonowej cząsteczki okazały się być bardzo istotne dla zachowania zdolności katalitycznej białka [40,56,65]. Badania z użyciem metody ukierunkowanej mutagenazy wykazały, że brak fragmentu zawierającego obydwie domeny (5 i 6) prowadzi do utraty aktywności zarówno przez białko ATP7A jak i białko ATP7B. Jeżeli jednak usunięto tylko jedną ze wspomnianych domen, białka zachowywały aktywność. Stwierdzono ponadto w przypadku obydwu ATPaz brak oddziaływania pomiędzy domenami 5 i 6 a białkiem ATOX1, natomiast przypuszcza się, że te domeny pełnią funkcję regulatorową oddziałując z transbłonowymi odcinkami białka, co wpływa na powinowactwo domen transbłonowych do jonów miedzi [48,65].

Pomiędzy 6 i 7 domeną transbłonową znajduje się zbudowana z 235 reszt aminokwasowych domena wiążąca ATP [39]. Jest to zachowany w ewolucji element w budowie ATPaz transportujących jony miedzi. Można go znaleźć zarówno w ATPazach bakteryjnych, jak i w omawianych białkach ATP7A i ATP7B człowieka. W obrębie tej dużej dome-

ny można wyróżnić dwie mniejsze subdomeny: subdomenę wiązania nukleotydów (subdomena N) oraz subdomenę fosforylacji (subdomena P) zaangażowaną bezpośrednio w wiązanie ATP (Ryc. 1) [48,56]. W cyklu katalitycznym białka dochodzi do oddziaływania pomiędzy tymi subdomenami. Cząsteczka ATP przyłączana jest najpierw do subdomeny N, co prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki białka, a następnie jego fosforylacji w obrębie subdomeny P. Dokładna analiza sekwencji białek ATP7A i ATP7B wykazała obecność reszt aminokwasowych niezbędnych dla przeprowadzenia tego procesu. W białku ATP7A są to reszty: E w pozycji 1081, H w pozycji 1086, G w pozycji 1126, G w pozycji 1128 i G w pozycji 118. Natomiast w białku ATP7B niezbędne są reszty: E w pozycji 1064, H w pozycji 1069, G w pozycji 1101 i G w pozycji 1149 [40,66,67]. Domena P zawierająca zachowaną w ewolucji sekwencję reszt aminokwasów DKTG oraz GD-X-X-D jest miejscem, w którym dochodzi do przyłączenia reszty fosforanowej z ATP do cząsteczki ATPazy na drodze wytworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy resztą kwasu asparaginowego (pochodzącego z sekwencji DKTG) a resztą fosforanową uwolnioną podczas hydrolizy ATP [40,48].

Hydrofilowa domena A zlokalizowana jest pomiędzy 4 a 5 domeną transbłonową (Ryc. 1). Odcinek ten złożony jest ze 135 reszt aminokwasowych i tworzy pętlę zanurzoną w cytoplazmie [39,48]. Jest to zachowany w ewolucji motyw charakterystyczny dla wszystkich ATPaz typu P. Domena ta zawiera zachowaną w ewolucji sekwencję reszt aminokwasowych TGE, która jest niezbędna dla przeprowadzenia reakcji defosforylacji białka [22]. Szczególną rolę pełni tu reszta Glu. Mutacja w rejonie TGE powoduje, że białko cały czas jest ufosforylowane i prowadzi nieprzerwanie proces transportu jonów bez względu na stężenie kationów miedziowych w komórce [22,56,59]. Jak się okazało, rola tej domeny nie ogranicza się tylko do udziału w procesie defosforylacji, bierze ona też aktywny udział w transporcie jonów miedzi przez błonę plazmatyczną. Domena ta może wykonywać ruch rotacyjny, co umożliwi domenom transbłonowym przeprowadzenie reakcji transportu jonów metalu przez błonę [68].

C-końcowa domena obydwu białek: ATP7A i ATP7B również zanurzona jest w cytoplazmie. Jest to domena zbudowana z około 90 reszt aminokwasowych i zawiera sekwencje niezwykle ważne dla transportu tych białek. W białku ATP7A w pozycji 1487-1488 znaleziono dileucynową sekwencję odpowiadającą za transport powrotny białka z błony komórkowej do aparatu Golgiego [48,52,69]. Okazało się też, że sekwencja ta nie tylko warunkuje recykulację białka, ale w komórkach o budowie polarnej odpowiada również za kierowanie białka ATP7A do błony podstawno-bocznej w czasie transportu z aparatu Golgiego do błony komórkowej. Badania prowadzone ze zmutowaną formą białka, w którym doszło do insercji dodatkowej reszty alaniny w obrębie motywu dileucynowego w komórkach linii MDCK wykazały, że białko ATP7A transportowane było błędnie do błony wierzchołkowej [46,52,70]. W białku ATP7B podobną funkcję spełnia trileucynowa sekwencja LLL znaleziona w pozycji 1454-1456. Również w tym przypadku sekwencja ta warunkuje recykulację białka do aparatu Golgiego. W komórkach, w których doszło do mutacji

genu *ATP7B*, w wyniku której jedna z reszt leucyny zastąpiona została przez resztę alaniny, zaobserwowano brak transportu powrotnego tego białka [46,48,71]. Sekwencja LLL warunkuje również prawidłowy wydzielniczy transport białka *ATP7B* do błony wierzchołkowej w komórkach o budowie polarnej [46,48,59,72]. Oprócz omawianego tutaj motywu dileucynowego C-końcowa domena białka *ATP7A* zawiera również dodatkową sekwencję odpowiadającą za prawidłowy transport. Jest to sekwencja DTAL znajdująca się w pozycji 1497-1500 i kończąca łańcuch aminokwasowy białka *ATP7A*. Przypuszcza się, że jej obecność umożliwia oddziaływanie pomiędzy *ATP7A* a niskocząsteczkowym białkiem AIPPI (ang. *ATPase-interacting PDZ protein*), co z kolei stanowi sygnał do transportu *ATP7A* w kierunku błony podstawno-bocznej w komórkach o budowie spolaryzowanej [40,48,52,73]. W białku *ATP7B* znaleziono również dodatkową sekwencję warunkującą jego transport do błony wierzchołkowej w komórkach o budowie spolaryzowanej. Sekwencja ta, złożona z 63 reszt aminokwasowych, znajduje się w N-końcowej części cząsteczki w rejonie poprzedzającym pierwszą domenę wiążącą kationy miedzi i jest charakterystyczna tylko dla *ATP7B* [57,71,72].

## PRZEBIEG I REGULACJA CYKLU KATALITYCZNEGO

Cykl katalityczny białek *ATP7A* i *ATP7B* jest ściśle związany z ich budową i polega na transporcie jonów miedzi przez błonę. Energia potrzebna dla zajścia tej reakcji pochodzi z hydrolizy cząsteczki ATP. Cykl ten ma taki sam przebieg w przypadku obydwu białek i składa się z pięciu następujących po sobie reakcji. W pierwszym etapie jony miedzi przyłączane są do domen wiążących jony metalu zlokalizowanych w N-końcowej części cząsteczki. Następne etapy to przyłączenie cząsteczki ATP do hydrofilowej subdomeny N, hydroliza ATP i ufosforylowanie białka w obrębie subdomeny P. Energia wytworzona w tym etapie pozwala na transport jonów przez błonę w obrębie domeny transbłonowej. W kolejnym etapie następuje defosforylacja białka przy udziale domeny A [48,57,66]. Jak już wspomniano wcześniej, miedź jest pierwiastkiem niesłychanie reaktywnym i dlatego w komórkach jony miedzi nie mogą występować w postaci wolnej, ale muszą być połączone z odpowiednimi białkami. Specyfika transportu w przypadku ATPaz transportujących kationy Cu w porównaniu z innymi ATPazami typu P polega na tym, że nie wytwarzają one gradientu stężenia transportowanych jonów tak jak to jest w przypadku ATPazy wapniowej lub ATPazy sodowo-potasowej. Białka *ATP7A* i *ATP7B* w czasie cyklu katalitycznego są pośrednikiem przekazującym jon otrzymany od cząsteczki donora, w tym przypadku białka ATOX1, do cząsteczki akceptora np. zależnego od jonów miedzi enzymu lub innej cząsteczki o charakterze metaloproteiny [56]. Porównanie kinetyki cyklu katalitycznego wykazało, że proces transportu jonów jak i reakcje cząstkowe w opisanym cyklu przebiegają szybciej w przypadku białka *ATP7A* [48,74]. Zidentyfikowano również szereg czynników wpływających na szybkość cyklu katalitycznego. Najważniejszym z nich jest stężenie jonów miedzi w komórce. Innym poznanym czynnikiem jest odczyn środowiska reakcji: przy obniżeniu pH do wartości poniżej 7 dochodzi do znacznego zwiększenia szybkości reakcji białka *ATP7B* [75]. Wynik taki może wskazywać, że zmiany pH w obrębie różnych przedziałów w komórce

mogą wpływać na szybkość transportu jonów [48]. Bardzo istotną rolę w procesie katalitycznym odgrywają również białka oddziałujące z ATPazami. Jak już wspomniano wcześniej, ATOX1 jest białkiem z grupy metalochaperonin i głównym dostawcą jonów Cu<sup>+</sup> dla białek *ATP7A* i *ATP7B*. Jedna cząsteczka białka ATOX1 zawiera jeden atom miedzi przyłączony poprzez wiązanie koordynacyjne do dwóch reszt cysteinowych [26]. Przypuszcza się, że białko ATOX1 również spełnia pośrednio rolę regulatora cyklu. Według teorii proponowanej przez Arguello i Gonzalez Guerrero domeny 1-4 wiążące kationy metalu przy braku jonów miedzi oddziałują z subdomeną N (wiązącą ATP). Zablockowana subdomena N nie wiąże ATP, co blokuje możliwość przeprowadzenia reakcji transportu. W momencie, gdy białko ATOX1 dostarczy jony miedzi do ATPazy, domeny 1-4 przyłączają kationy metalu i następuje odblokowanie subdomeny N. Umożliwia to przyłączenie cząsteczki ATP i kontynuację cyklu katalitycznego [48,59,76]. Okazało się, że dla prawidłowego przebiegu cyklu niezbędna jest także obecność związków o charakterze reduktorów takich jak glutaredoksyna. Białko to jest enzymem należącym do grupy oksydoreduktaz białkowo-disulfidowych a działanie jego polega na przywracaniu grup tiolowych białek do postaci zredukowanej. W przypadku omawianych ATPaz proces ten zapobiega utlenianiu grup tiolowych wchodzących w skład sekwencji MCX-XC w N-końcowych domenach wiążących kationy miedzi, gdyż przyłączanie jonów miedzi możliwe jest tylko do formy zredukowanej [40,59].

Dlaczego białka *ATP7A* i *ATP7B* są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania zależnych od jonów miedzi enzymów?

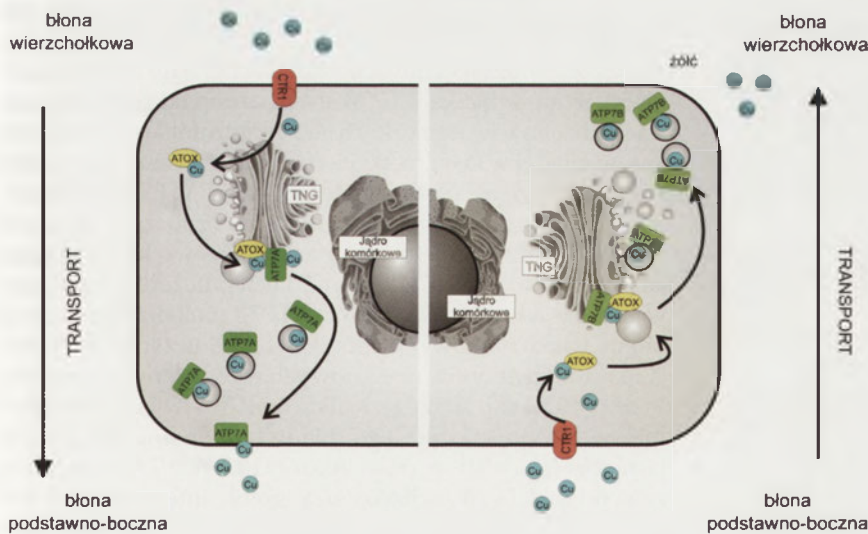
Główną rolą białek ATPaz transportujących jony Cu jest utrzymanie stałego stężenia jonów miedzi w organizmie poprzez usuwanie nadmiaru tego pierwiastka z komórek, jednak równie ważną funkcję spełniają one transportując jony do tych obszarów komórki, w których zostaną przyłączone do białek zależnych od miedzi. Czynnikiem regulującym cykl katalityczny tych ATPaz jest stężenie jonów miedzi w komórce. W przypadku, gdy stężenie to nie wykracza poza poziom fizjologiczny, zarówno białko *ATP7A* jak i *ATP7B* znajduje się w cysternach trans aparatu Golgiego. W organelum tym zachodzi proces potranslacyjnej obróbki białek zawierających w swoim składzie kationy miedzi. Białko *ATP7A* uczestniczy we włączaniu jonów miedzi do apo-tyrozynazy, która jest nieaktywną formą enzymu tyrozynazy. Tyrozynaza zawiera w swoim centrum aktywnym dwa atomy miedzi i jest enzymem biorącym udział w procesie melanogenezy, poprzez katalizowanie procesu przemiany aminokwasu tyrozyny do 1,3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA), a następnie utleniania DOPA do DOPA-chinonu. Potwierdziły to badania przeprowadzone na komórkach pochodzących od ludzi z mutacją w genie *ATP7A* (choroba Menkesa). Ponadto stwierdzono, że u pacjentów takich występują zaburzenia w pigmentacji skóry i włosów [77]. Następnym enzymem zależnym od jonów miedzi jest oksydaza lizylova. Obróbka potranslacyjna tego białka, również zachodzi w aparacie Golgiego i przebiega przy udziale białka *ATP7A*. Oksydaza lizylova prowadzi reakcję deaminacji oksydacyjnej lizyny, co z

kolei jest krokiem prowadzącym do wytworzenia wiązań sieciujących w cząsteczkach kolagenu i elastyny warunkujących odporność mechaniczną tkanki łącznej [40]. U pacjentów z chorobą Menkesa występuje obniżenie aktywności oksydazy lizolowej, co prowadzi do licznych nieprawidłowości w budowie skóry, szkieletu i naczyń krwionośnych [33]. Monooksydaza peptydylo-glicylo-alfa-amidowa (PAM) jest następnym enzymem, który w swoim składzie zawiera atomy miedzi. Podobnie jak w przypadku wyżej wymienionych białek enzymatycznych, obróbka potranslacyjna PAM zachodzi w aparacie Golgiego przy współudziale białka ATP7A. PAM jest enzymem niezbędnym dla prawidłowej syntezy neuropeptydów. Bierze on udział w potranslacyjnej obróbce tych białek katalizując reakcje alfa-amidacji. Znaczne obniżenie aktywności PAM obserwowano u myszy laboratoryjnych z mutacją w genie *Atp7a*. Przypuszcza się, że zaburzenia neurologiczne występujące u pacjentów z chorobą Menkesa również związane są między innymi z obniżeniem aktywności PAM [78, 40]. W komórkach wątroby białko ATP7B dostarcza jony Cu niezbędne dla syntezy ceruloplazminy, białka wiążącego i transportującego kationy miedzi w organizmie. Jedna cząsteczka ceruloplazminy wiąże 6 atomów miedzi. Stwierdzono, że około 70% miedzi w osoczu związane jest właśnie z ceruloplazminą i w takiej formie transportowane z krwią do tkanek i narządów. Przyłączenie atomów miedzi do ceruloplazminy jest również elementem potranslacyjnej obróbki tego białka i zachodzi w strukturach aparatu Golgiego. Liczne badania szczurów z mutacją w genie *Atp7b* oraz wyniki analiz materiału pobranego od pacjentów z chorobą Wilsona (spowodowanej mutacją w genie *ATP7B*) potwierdzają niezbędność białka ATP7B w procesie dojrzewania cząsteczki apo-ceruloplazminy [79,80].

Białka ATP7A i ATP7B regulują stężenie miedzi w komórkach oraz są niezbędne w wielu ważnych procesach zachodzących w organizmie

W przypadku, gdy stężenie jonów miedzi w komórce wzrasta, osiągając niebezpiecznie wysoki poziom, rolą białek ATP7A i ATP7B jest przywracanie ich stężenia fizjologicznego. Proces ten zachodzi na drodze transportu białka w pęcherzykach klatrynowych do błony komórkowej i usunięcia nadmiaru miedzi z komórki. Po raz pierwszy transport taki obserwowano w przypadku białka ATP7A w komórkach linii CHO [81]. Należy też podkreślić, że większość informacji o transporcie miedzi w komórce uzyskano właśnie w trakcie badań nad białkiem ATP7A. Fizjologiczne stężenie jonów miedzi w osoczu wynosi od 15 do 20  $\mu\text{M}$ . W badaniach nad lokalizacją i transportem białka ATP7A wykorzystuje się zwykle komórki hodowane w medium zawierającym dodatkowo 189–200  $\mu\text{M}$  miedzi. Jest to stężenie o wiele wyższe od fizjologicznego; w tych warunkach wykryto badane białko zarówno w aparacie Golgiego, jak i w cytoplazmie komórki (pęcherzyki), a także wbudowane w błonę cytoplazmatyczną komórki. Wyniki te wskazują jednoznacznie, że nadmiar miedzi usuwany jest z komórki na drodze egzocytozy. Stwierdzono, że dochodzi do fuzji pomiędzy błoną cytoplazmatyczną a błoną pęcherzyków transportujących białko i usunięcia kationów miedzi z komórki. Następnie białko na drodze endocytozy wraca z powrotem do aparatu Golgiego [48,82]. Jak już wspomniano wcześniej, w badaniach nad procesami transportu wykorzystywano komórki z mutacjami w genie *ATP7A*. Pozwoliło to ustalić, że za prawidłowy przebieg procesu endocytozy odpowiedzialna jest C-końcowa domena białka zawierająca dileucynowy motyw w pozycji 1487–1488. W komórkach o budowie spolaryzowanej np. enterocytach

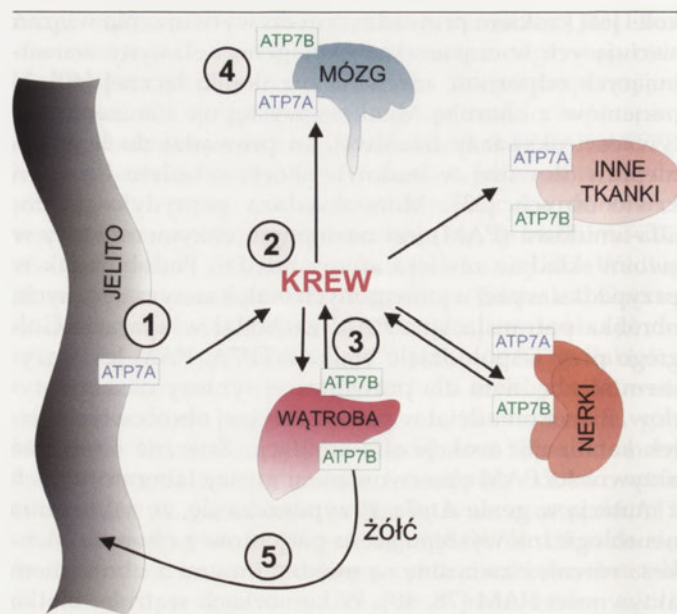
czy komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych, w których można wyróżnić błonę wierzchołkową skierowaną do światła jelita czy światła kanalika oraz błonę podstawno-boczną, przez którą odbywa się transport do naczyń krwionośnych. Białko ATP7A transportowane jest selektywnie w kierunku błony podstawno-bocznej (Ryc. 2) [48,52,82,83]. Wyniki takie otrzymano analizując *in vitro* lokalizację białka w komórkach linii Caco-2 (stanowiących najbardziej rozpowszechniony model nabłonka jelita) oraz w komórkach linii MDCK (traktowanych jako model nabłonka występującego w kanalikach nerkowych) [46,70,84]. Na poziomie organizmu transport taki umożliwia pobieranie jonów miedzi z pokarmu, gdyż pozwala na przeniesienie jonów miedzi z enterocytów do naczyń krwionośnych, a w nerce na reabsorpcję kationów miedzi z moczu pierwotnego [70,84,85] (Ryc. 3). U pacjentów z chorobą Menkesa (mutacja w genie *ATP7A*), miedź akumulowana jest w komórkach nabłonkowych jelita i w komórkach kanalików proksymalnych nerki [86,85]. Podstawno-boczną lokalizację



**Rycina 2.** Transport miedzi z udziałem białek ATP7A i ATP7B w komórkach o budowie spolaryzowanej. Jony miedzi transportowane są przez błonę komórkową przy udziale białka CTR1. Następnie przyłączane są do metalochaperony ATOX i w takiej postaci transportowane do cystern trans aparatu Golgiego (TGN), w których zachodzi przekazywanie jonów  $\text{Cu}^+$  do białek ATP7A i ATP7B. Wzrost stężenia kationów miedziowych w komórce prowadzi do usunięcia nadmiaru tego pierwiastka na drodze transportu aktywnego. W komórkach o budowie spolaryzowanej, np. w enterocytach, pod wpływem zwiększającego się stężenia kationów miedziowych, białko ATP7A transportowane jest do błony podstawno-bocznej (lewa strona). Natomiast białko ATP7B transportowane jest do błony wierzchołkowej (strona prawa), jak to ma miejsce w hepatocytach, a jony miedzi wydzielane są do żółci.

zając białka ATP7A obserwowano również w komórkach łożyska i komórkach gruczołu mlekowego, ponieważ bierze ono udział w transporcie jonów miedzi poprzez łożysko do rozwijającego się płodu [40,52,87] oraz w wydzielaniu kationów miedzi do mleka matki w okresie laktacji [52,83,87,88]. W łożysku syntezę białka ATP7A stwierdzono w komórkach syncytiotrofoblastu, cytotrofoblastu oraz w komórkach naczyń krwionośnych płodu, co wskazuje na to, że bierze ono bezpośredni udział w przekazywaniu kationów miedziowych z krwiobiegu matki do krwi płodu [83,87]. Natomiast w komórkach gruczołu mlekowego w okresie laktacji białko ATP7A reguluje stężenie miedzi w komórkach wydzielniczych poprzez usuwanie nadmiaru jonów tego pierwiastka z powrotem do krwiobiegu matki [40,52,88]. Jak wspomniano już wcześniej, za wybiórczy transport białka ATP7A do błony podstawno-bocznej w komórkach spolaryzowanych odpowiadają sekwencje zlokalizowane w C-terminalnej części cząsteczki [40,48,73]. Wiadomo, że miedź jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, a białko ATP7A pełni ważną rolę w dostarczaniu tego mikroelementu do mózgu. Bardzo wysoka synteza białka ATP7A w splocie naczyniówkowym wskazuje, że bierze ono udział w przekazywaniu jonów miedzi poprzez barierę krew-mózg. Syntezę białka ATP7A stwierdzono w różnych populacjach komórek nerwowych, a wyniki najnowszych badań wskazują, że uczestniczy ono również w procesie rozwoju układu nerwowego i tworzeniu połączeń pomiędzy neuronami [48,88,89].

Nieco mniej wiadomo o transporcie białka ATP7B. W komórkach, w których stężenie miedzi mieści się w granicach fizjologicznych, białko ATP7B podobnie jak białko ATP7A zlokalizowano w aparacie Golgiego. Badania transportu ATP7B przeprowadzone na komórkach o budowie niepolarnych np. fibroblastach pierwotnych, komórkach linii HeLa czy linii CHO-K1 wykazały, że przy podwyższonym stężeniu jonów miedzi w komórce białko to transportowane jest w pęcherzykach do cytoplazmy [52,90,91]. Jednak w przeciwieństwie ATP7A nie znaleziono białka ATP7B wbudowanego w błonę cytoplazmatyczną komórek niepolarnych [52]. Szczególnie wysoki poziom syntezy białka ATP7B wykryto w komórkach wątroby. Hepatocyty pierwotne i komórki linii HepG2 posłużyły do badania transportu białka ATP7B. Hepatocyty są komórkami o budowie spolaryzowanej, w których część wierzchołkowa zwrócona jest do światła kanalików żółciowych, a część podstawno-boczna do naczyń krwionośnych. Okazało się, że w takich komórkach białko ATP7B przy podwyższonym poziomie jonów miedzi, transportowane jest do błony wierzchołkowej (Ryc. 2). Nie było jednak do końca wyjaśnione, czy dochodzi do fuzji pomiędzy błoną pęcherzyków wydzielniczych z błoną cytoplazmatyczną [66,71,72,92]. Jednak wykorzystanie metody immunohistochemicznej wykazało, że istnieje kolokalizacja markerów błony wierzchołkowej (MRP2) i białka ATP7B, co sugeruje, że zachodzi proces transportu miedzi przez błonę plazmatyczną, podobnie jak w przypadku białka ATP7A [71,72,92]. W wyniku tego procesu, w hepatocytach zachodzi wydzielanie miedzi do żółci i w następnym etapie wydalanie jej z organizmu poprzez przewód pokarmowy (Ryc. 3) [46,92]. U pacjentów cierpiących na chorobę Wilsona spowodowaną mutacją w genie *ATP7B*, nie dochodzi do



**Rycina 3.** Rola białek ATP7A i ATP7B w transporcie miedzi w organizmie człowieka. Jony miedzi pochodzące z pokarmu wchłaniane są w jelicie cienkim przy udziale białka ATP7A (1), gdzie związane z białkami osocza docierają do wszystkich tkanek organizmu (2). Z krwią miedź dociera do wątroby, gdzie przy udziale białka ATP7B przyłączana jest do cząsteczek ceruloplazminy i w takiej postaci opuszcza ten narząd (3). Jednak przechodzenie jonów miedzi przez ściany naczyń krwionośnych możliwe jest tylko z udziałem białka ATP7A. Jest to szczególnie ważne przy pokonywaniu bariery krew-mózg. W procesie tym biorą udział zarówno białka ATP7A jak i ATP7B (4). Wraz z krwią miedź dociera także do nerek, w których w procesie filtracji przechodzi do przesączu pierwotnego, a następnie w komórkach kanalików nerkowych przy udziale białka ATP7A ulega reabsorpcji i z powrotem powraca do krwiobiegu (4). Wydalanie miedzi z organizmu odbywa się na drodze wydzielania jej nadmiaru do żółci (5). Jest to proces zależny od białka ATP7B. Miedź usuwana jest z organizmu wraz z kałem poprzez przewód pokarmowy.

wydzielania i wydalania miedzi wraz z żółcią, a nadmiar miedzi akumulowany w wątrobie osiąga poziom toksyczny i prowadzi do licznych uszkodzeń tego organu [66,12]. Podobnie jak w przypadku białka ATP7A, na drodze endocytozy zachodzi recykulacja białka ATP7B do aparatu Golgiego. Syntezę białka ATP7B stwierdzono także w łożysku. Zachodzi ona w komórkach syncytiotrofoblastu. Stężenie jonów miedzi w krwi matki jest 5-krotnie wyższe niż w krwi rozwijającego się płodu, dlatego białko ATP7B w komórkach łożyska pełni funkcję regulacyjną i zabezpiecza przed nadmiernym stężeniem tego pierwiastka we krwi rozwijającego się płodu [83,87]. W komórkach gruczołu mlekowego w okresie laktacyjnym, białko ATP7B zlokalizowano przy błonie wierzchołkowej komórek wydzielniczych. Służy ono jako nośnik kationów miedziowych wydzielanych do mleka matki [40,52,88]. Syntezę białka ATP7B stwierdzono również w mózgu, chociaż jego rola w tym organie nie jest tak jasno określona jak w przypadku białka ATP7A. Wiadomo, że synteza ATP7B zachodzi szczególnie intensywnie w komórkach Purkiniego, w których równocześnie stwierdzono syntezę ceruloplazminy. Takie wyniki wskazują, że ATP7B bierze udział w przyłączaniu miedzi do syntetyzowanych w tych komórkach cząsteczek ceruloplazminy [74].

#### CO JESZCZE WIADOMO O FUNKCJI TYCH BIAŁEK?

Stężenie jonów miedzi jest najważniejszym czynnikiem regulującym w komórce transport białek ATP7A i ATP7B.



Jednak stwierdzono, że również pod wpływem pewnych hormonów w komórkach może zachodzić transport tych białek niezależnie od stężenia jonów metalu. Insulina i estrogeny są czynnikami regulującymi nie tylko transport omawianych białek, ale również ekspresję genów *ATP7A* i *ATP7B*. Badania *in vitro* komórek linii Jeg-3 pokazały, że pod wpływem insuliny następował wzrost ekspresji zarówno genu *ATP7A*, jak i poziomu białka *ATP7A*. Obserwowano również, niezależny od stężenia jonów miedzi, transport białka *ATP7A* do błony podstawno-bocznej. W tych samych komórkach obserwowano zarówno obniżenie ekspresji genu, jak i spadek syntezy białka *ATP7B*, które w badanych komórkach było zlokalizowane w aparacie Golgiego [87]. Poszukiwania czynników regulujących poziom syntezy i aktywności *ATPaz* transportujących jony miedzi wydają się bardzo istotne w świetle ostatnich badań nad udziałem tych białek w procesie inicjacji i w przebiegu leczenia chorób nowotworowych [93]. Znacznie podwyższoną syntezę białka *ATP7A* obserwowano w komórkach raka piersi [94], komórkach raka trzustki [95] oraz w przypadku raka pęcherza [96]. Ponadto stwierdzono, że omawiane białka, a szczególnie *ATP7A*, biorą udział w rozwoju lekooporności w trakcie procesu chemioterapii. Okazało się bowiem, że obniżają one skuteczność leków przeciwnowotworowych zawierających w swoim składzie atomy platyny takich jak cisplatyna, oksaliplatyna, karboplatyna i satraplatyna [75,97]. *ATPazy* transportujące jony miedzi mogą być odpowiedzialne za lekooporność poprzez przyspieszanie wydalania leków z komórek nowotworowych, tak jak w przypadku doksorubicyny [96], jak również obniżają ich aktywność poprzez zamykanie leków w pęcherzykach klatrynowych. W takiej postaci leki tracą swoje działanie cytotoksyczne [93,96]. Dlatego bardzo ważne jest dokładne poznanie budowy tych białek, przebiegu ich cyklu katalitycznego oraz badanie czynników wpływających na ich syntezę i regulujących ich działanie.

## PIŚMIENNICTWO

- Fox PL (2003) The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals* 16: 9-40
- Nose Y, Rees EM, Thiele DJ (2006) Structure of the Ctr1 copper transporter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci* 31: 604-607
- Horn D, Barrientos A (2008) Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life* 60: 421-429
- Bertini I, Rosato A (2008) Menkes disease. *Cell Mol Sci* 65: 89-91
- Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R (2009) Copper accumulation by cultured astrocytes. *Neurochem Int* 55: 175-185
- Huster D, Lutsenko S (2007) Wilson disease: not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism. *Mol Biosyst* 3: 816-824
- Perron NR, Brumaghin JL (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53: 75-100
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40
- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M (2001) Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101: 294-301
- Sadhra SS, Wheatley AD, Cross HJ (2007) Dietary exposure to copper in the European Union and its assessment for EU regulatory risk assessment. *Sci Total Environ* 374: 223-234
- Wijmenga C, Klomp LW (2004) Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc Nutr Soc* 63: 31-39
- DiDonato M, Sarkar B (1997) Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson disease. *Biochim Biophys Acta* 1360: 3-16
- Cherian MG, Kang YJ (2006) Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol* 231: 138-144
- Healy J, Tipton K (2007) Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm* 114: 777-781
- Suzuki KT, Someya A, Komada Y, Ogra Y (2002) Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J Inorg Biochem* 88: 173-182
- Liu N, Lo LS, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, Nguyen M, Goforth J, Chu YH, Vivas E, Tsai M, Westbrook T, Linder MC (2007) Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J Nutr Biochem* 18: 597-608
- Dameron CT, Harrison MD (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 67: 1091-1097
- Lenartowicz M (2002) Genetyczna regulacja transportu i metabolizmu miedzi. *Post Biol Kom* 29: 221-236
- Maryon EB, Molloy SA, Zimnicka AM, Kaplan JH (2007) Copper entry into human cells: progress and unanswered questions. *Biometals* 20: 355-364
- De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM (2009) Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4237-4242
- Tandy S, Williams M, Leggett A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, Srai SK, Sharp P (2000) Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem* 275: 1023-1029
- Petris MJ, Smith K, Lee J, Thiele DJ (2003) Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem* 278: 9639-9646
- Prohaska JR, Gybina AA (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr* 134: 1003-1006
- Naeve GS, Vana AM, Eggold JR, Kelner GS, Maki R, Desouza EB, Foster AC (1999) Expression profile of the copper homeostasis gene, *rAtox1*, in the rat brain. *Neuroscience* 93: 1179-1187
- Kelner GS, Lee M, Clark ME, Maciejewski D, McGrath D, Rabizadeh S, Lyons T, Bredesen D, Jenner P, Maki RA (2000) The copper transport protein *Atox1* promotes neuronal survival. *J Biol Chem* 275: 580-584
- Huffman DL, O'Halloran TV (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 70: 677-701
- Eisses JF, Stasser JP, Ralle M, Kaplan JH, Blackburn NJ (2000) Domains I and III of the human copper chaperone for superoxide dismutase interact *via* a cysteine-bridged Dicopper(I) cluster. *Biochemistry* 39: 7337-7342
- Laliberté J, Whitson LJ, Beaudoin J, Holloway SP, Hart PJ, Labbé S (2004) The Schizosaccharomyces pombe Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways. *J Biol Chem* 279: 28744-28755
- Kawamata H, Manfredi G (2008) Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Hum Mol Genet* 17: 3303-3317
- Reddehase S, Grumbt B, Neupert W, Hell K (2009) The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1. *J Mol Biol* 385: 331-338
- Van de Sluis B, Groot AJ, Vermeulen J, van der Wall E, van Diest PJ, Wijmenga C, Klomp LW, Vooijs M (2009) COMMD1 promotes pVHL and O<sub>2</sub>-independent proteolysis of HIF-1α via HSP90/70. *PLoS One* 4: e7332
- Warrell DA, Cox TM, Firth JD, Benz EJ (2005) Oxford Textbook of Medicine. t. 3. Oxford University Press
- Tumer Z, Moller LB (2009) Menkes disease. *Eur J Hum Genet* doi 10.138/iejgh.2009.187

34. Reed V, Boyd Y (1997) Mutation analysis provides additional proof that mottled is the mouse homologue of Menkes disease *Hum Mol Genet* 6: 417-423
35. Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 55: 175-185
36. Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP (1993) Isolation of candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein *Nat Genet* 3: 14-19
37. Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paytner JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhavne M, Siemieniak D (1993) Isolation of partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 3: 20-25
38. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitshier J (1993) Isolation of candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3: 7-13
39. Harris ED (2000) Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr* 20: 291-310
40. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dymitriev OY (2007) Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87: 1011-1046
41. Horn N, Tumer Z (1999) Molecular genetics of intracellular copper transport. *J Trace Elem Exper Med* 12: 297-313
42. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW (1993) The Wilson gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to Menkes disease. *Nat Genet* 5: 327-337
43. Vaskobojnik I, Greenough S, La Fontaine S, Mercer JFB, Camakaris J (2001) Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic mouse mutant. *Biochem Biophys Res Com* 281: 966-970
44. Cecchi C, Biasotto M, Tosi M, Avner P (1997) The mottled mouse as a model for human Menkes disease: identification of mutations in the *Atp7a* gene. *Hum Mol Genet* 6: 425-433
45. Kuo YM, Gitshier J, Packman S (1998) Developmental expression of the mouse mottled and toxic milk genes suggest distinct functions for the Menkes and Wilson disease copper transporters. *Hum Molec Genet* 6: 1043-1049
46. Linz L, Lutsenko S (2007) Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr* 39: 403-407
47. Ravia JJ, Stephen RM, Ghishan FK, Collins JF (2005) Menkes copper ATPase (ATP7A) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on the brush-border and basolateral membrane domains. *J Biol Chem* 280: 36221-36227
48. Lutsenko S, Gupta A, Burkhead JL, Zuzel V (2008) Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys* 476: 22-32
49. Moore SD, Cox DW (2002) Expression in mouse kidney of membrane copper transporters *Atp7a* and *Atp7b*. *Nephron* 92: 629-634
50. Godwin SC, Shawker T, Chang B, Kaler SG (2006) Brachial artery aneurysms in Menkes disease. *J Pediatr* 149: 412-415
51. Grande DK, Kaler SC, Albers GM, Pettechak JA, Thorpe CM, DeMello DE (2006) Severe bilateral planlobular emphysema and pulmonary arterial hypoplasia: Unusual manifestations of Menkes disease. *Am J Med Genet A* 139: 151-155
52. La Fontaine S, Mercer JFB (2007) Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 463: 149-167
53. Harris ED, Reddy MCM, Majumdar S, Cantera M (2003) Pretranslational control of Menkes disease gene expression. *Biometals* 16: 55-61
54. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomika M, Godman M, Howell SB (2004) Increased expression of copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Canc Res* 10: 4661-4669
55. Lenartowicz M, Wiczerzak K, Krzeptowski W, Dobosz P, Grzmil P, Starzynski R, Lipinski P (2010) Developmental changes in the expression of *Atp7a* gene in the liver of mice during the postnatal period. *J Exp Zool* 313: 209-217
56. Barry AN, Shinde U, Lutsenko S (2010) Structural organization of human Cu-transporting ATPases: learning from building blocks. *J Biol Inorg Chem* 15: 47-59
57. Velthuis NA, Gaeth AP, Pearson RB, Gabriel K, Camakaris J (2009) The multi layered regulation of copper translocating P-type ATPases. *Biometals* 22: 177-190
58. Arguello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B ATPases. *Biometals* 20: 233-248
59. Van der Berghe PVE, Klomp LWJ (2010) Posttranslational regulation of copper transporters. *J Biol Inorg Chem* 15: 37-46
60. Ralle M, Lutsenko S, Blackburn NJ (2004) Copper transfer to the N-terminal domain of the Wilson disease protein (ATP7B): X-ray absorption spectroscopy of reconstituted and chaperone loaded metal binding domains and their interaction with exogenous ligands. *J Inorg Biochem* 98: 765-744
61. Arnesano F, Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Molteni E, Huffman DL, O'Halloran DV (2002) Metallochaperones and metal transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* 12: 255-271
62. Achila D, Banci L, Bertini I, Bounce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL (2006) Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5729-5734
63. Yatsunyk LA, Rosenzweig AC (2007) Cu (I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein. *J Biol Chem* 282: 8622-8631
64. Banci L, Bertini I, Cantini F, Dela-Malva N, Migliardi M, Rosato A (2007) The different intramolecular interactions of soluble copper-binding domains of the Menkes protein, ATP7A. *J Biol Chem* 282: 23140-23146
65. Carter MA, Forbes J, La Fontaine S, Cox D, Mercer JF (2004) Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *Biochem J* 380: 805-813
66. De Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LWJ (2007) Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* 44: 637-688
67. Dymitriev O, Tsivkovskii R, Abidgaard F, Morgan CT, Markley JL, Lutsenko S (2006) Solution structure of the N-terminal domain of the Wilson disease protein: distinct of the nucleotide binding environment and effect of disease mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5302-5307
68. Toyoshima C, Norimatsu Y, Iwasawa S, Tsuda T, Ogawa H (2007) How processing of asparthylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19831-19836
69. Lane C, Petris MJ, Benmerach A, Greenough M, Camakaris J (2004) Studies on endocytic mechanism of the Menkes copper-translocating P-type ATPase (ATP7A; MNK). Endocytosis of Menkes protein. *Biometals* 17: 87-98
70. Greenough M, Pase L, Vaskoboinik I, Petris MJ, O'Brien AW, Camakaris J (2004) Signals regulating trafficking of Menkes (MNK; ATP7A) copper-transporting ATPase in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1463-C1471
71. Carter MA, La Fontaine S, Shield K, Deal Y, Mercer JFB (2006) ATP mediates vesicular sequestration of copper: Insight into biliary copper extraction. *Gastroenterol* 130: 493-506
72. Guo Y, Nyasae L, Braiterman LT, Hubbard AL (2005) NH2-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediated its Cu dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells. *Am J Physiol* 289: G904-G916
73. Stephenson SE, Dubach D, Lim CM, Mercer JF, La Fontaine S (2005) A single PDZ domain protein interacts with the Menkes copper ATPase ATP7A. A new protein implicated in copper homeostasis. *J Biol Chem* 280: 33270-33279
74. Barnes N, Tsivkovskii R, Tsivkovskaia N, Lutsenko S (2005) The copper-transporting ATPases, menkes and Wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum. *J Biol Chem* 280: 9640-9645

75. Safei R, Otani S, Larson BJ, Rasmussen ML, Howell SB (2008) Transport of the cisplatin by the copper efflux transporter ATP7B. *Mol Pharmacol* 73: 461-468
76. Gonzalez-Guerrero M, Arguello JM (2008) Mechanisms of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5992-5997
77. Petris MJ, Strausak D, Mercer JF (2000) The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Molec Genet* 9: 2845-2851
78. Proud VK, Mussel HG, Kaler SG, Young DW, Percy AK (1996) Distinctive menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype. *Am J Med Genet* 65: 44-51
79. Hellman NE, Gitlin JD (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 20: 291-310
80. Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogbeem AJ, De Jong GJ, Gitlin JD (2002) Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 277: 46632-46638
81. Petris MJ, Mercer JF, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA, Camacaris J (1996) Ligand regulates transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulate trafficking. *EMBO J* 15: 6084-6095
82. Hardman B, Michalczuk A, Greenough M, Camacaris J, Mercer JF, Ackland ML (2006) Hormonal regulation of the Menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placental Jeg-3 cells. *Biochem J* 402: 241-250
83. Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B, Hubbard A (2007) Dynamics of endogenous protein ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper dependent redistribution between two intracellular sides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1118-G1194
84. Lenartowicz M, Windak R, Tytko G, Kowal M, Styryna J (2010) Effects of copper supplementation on structure and content of elements in the kidneys of mosaic mutant mice. *Biol Trace Elem Res* 136: 204-220
85. Kodama H, Murata Y, Kobayashi M (1999) Clinical manifestations and treatment of menkes disease and its variants. *Pediatr Int* 41: 423-429
86. Hardman B, Manuelpillai U, Wallace EM, van der Wasenburg S, Carter M, Mercer JF, Ackland ML (2004) Expression and localization of Menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placenta. *Placenta* 25: 515-517
87. Ackland ML, Anikijenko P, Michalczuk A, Mercer JF (1999) Expression of Menkes copper-transporting ATPase, MNK in the lactating human breast: possible role in copper transport into milk. *J Histochem Cytochem* 47: 1553-1562
88. El Meskini R, Cline LB, Eipper BA, Ronnet GV (2005) The developmentally regulated expression of Menkes protein ATP7A suggest a role in axon extension and synaptogenesis. *Dev Neurosci* 27: 333-348
89. Niciu MJ, Ma XM, Meskini RE, Ronnett GV, Mains RE, Eipper BA (2006) Developmental changes in the expression of the Atp7a during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience* 139: 947-964
90. Forbes JR, Cox DW (2000) Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* 9: 1927-1935
91. La Fontaine S, Theophilos MB, Firth SD, Gould R, Parton RG, Mercer JFB (2001) Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localisation of the Wnd, murine homologue of the Wilson copper ATPase. *Hum Mol Genet* 10: 361-370
92. Roelofsen H, Wolters H, Luyn MJAV, Miura N, Kuipers F, Vonk JR (2000) Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 119: 782-793
93. Zhang Y, Li M, Yao Q, Chen C (2009) Roles and mechanisms of copper transporting ATPases in cancer pathogenesis. *Med Sci Monit* 15: RA1-5
94. Nagaraja GM, Othman M, Fox BP, Alsaber R, Pellegrino CM, Zeng Y, Khanna R, Tamburini P, Swaroop A, Kandpal RP (2006) Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene* 25: 2328-2338
95. Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bahakta V, Capruso G, Lattimore S, Akada M, Sunamura M, Prime W, Campbell F, Brentnall TA, Costello E, Neoptolemos J, Lemoine NR (2005) Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 129: 1454-1463
96. Owatari S, Akune S, Komatsu M, Ikeda R, Firth SD, Che XF, Yamamoto M, Tsukawa K, Kitazano M, Ishizawa T, Takeuchi T, Aiku T, Mercer JF, Akijama S, Furukawa T (2007) Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res* 67: 4860-4868
97. Samimi G, Howell SB (2006) Modulation of the cellular pharmacology of JM118, the major metabolite of irinotecan, by copper influx and efflux transporters. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 781-788

## Structure and function of ATP7A and ATP7B proteins – Cu-transporting ATPases

Małgorzata Lenartowicz<sup>1,✉</sup>, Wojciech Krzeptowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Evolution, <sup>2</sup>Department of Cytology and Histology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, 6 R. Ingardena St., 30-060 Cracow, Poland

✉e-mail: malgorzata.lenartowicz@gmail.com

**Key words:** P-type ATPases, copper metabolism, metalloproteins

### ABSTRACT

Living organisms have developed refined and genetically controlled mechanisms of the copper metabolism and transport. ATP7A and ATP7B proteins play the key role in copper homeostasis in the organism. Both proteins are P-type Cu-transporting ATPases and use the energy of ATP hydrolysis to transfer the copper ions across the cellular membranes. Both proteins are localised in Golgi apparatus and involved in regulation of overall copper status in the body and their function is the export of excess copper from the cells and delivery of copper ions to Cu-dependent enzymes. Moreover in organism Cu-transporting ATPases are involved in absorption of dietary copper, Cu removal with the bile, placental copper transport and its secretion to the milk during lactation. Moreover it is known that Cu-transporting ATPases play a role in generation of anti-cancer drug resistance. Disturbances of ATP7A and ATP7B function caused by mutations lead to severe metabolic diseases Menkes and Wilson diseases, respectively.

# Udział domen jądrowych w reakcji komórki na uszkodzenia DNA

Daniel Wysokiński

Janusz Błasiak

Katarzyna Woźniak

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel./faks: (42) 635 47 76, e-mail: woźniak@biol.uni.lodz.pl

Artykuł otrzymano 15 września 2009 r.  
Artykuł zaakceptowano 12 stycznia 2010 r.

**Słowa kluczowe:** ciała jądrowe PML, jąderko, ciała Cajala, uszkodzenia i naprawa DNA, apoptoza

**Wykaz skrótów:** APL (ang. *acute promyelocytic leukemia*) – ostra białaczka promielocytowa; BLM (ang. *Bloom's syndrome*) – helikaza DNA, utrata funkcji BLM jest przyczyną zespołu Bloom'a; Mdm2 (ang. *mouse double minute 2*) – ligaza ubikwityny, negatywny regulator p53; PML (ang. *promyelocytic leukemia*) – białko jądrowe charakterystyczne dla ciał PML, ulega fuzji z białkiem RAR $\alpha$ , co leży u podstaw ostrej białaczki promielocytowej; RAR $\alpha$  (ang. *retinoic acid receptor  $\alpha$* ) – receptor  $\alpha$  kwasu retinowego; SC35 (ang. *splicing component 35*) – czynnik składania pre-mRNA z grupy białek SR; Sm – białkowy kompleks tworzący rdzeń czynników składania pre-mRNA z grupy U-snRNP; SUMO-1 (ang. *small ubiquitin-like modifier*) – małe białko ubikwitynopodobne; WRN (ang. *Werner's syndrome*) – helikaza DNA, utrata funkcji WRN jest przyczyną zespołu Wernera

## STRESZCZENIE

Wszystkie komórki organizmu człowieka podlegają różnorodnym uszkodzeniom, wśród których uszkodzenia materiału genetycznego mogą być szczególnie niebezpieczne. Reakcja komórki na uszkodzenia DNA jest procesem złożonym, obejmującym sygnalizację uszkodzeń, ich naprawę oraz ewentualne uruchomienie procesu apoptozy lub też śmierć komórki. Wiąże się z poważnymi zmianami w jądrze komórkowym spowodowanymi modyfikacjami potranslacyjnymi białek i ich dynamicznym przemieszczaniem się oraz zmianą ekspresji wielu genów. Zmiany te występują nie tylko w miejscu uszkodzenia DNA, ale zachodzą na terenie całego jądra komórkowego obejmując jego domeny – ciała PML, jąderko i ciała Cajala.

## WPROWADZENIE

W komórce eukariotycznej występuje szereg mechanizmów chroniących jej genom przed następstwami uszkodzeń DNA i powstaniem mutacji. Po przekroczeniu krytycznego progu uszkodzeń DNA mechanizmy te kierują komórkę na drogę apoptozy. Detekcja uszkodzeń DNA, uruchomienie procesów naprawczych oraz drogi indukcji apoptozy kontrolują złożone mechanizmy, często występujące w postaci kilku równoległych dróg alternatywnych i obejmujące szereg białek, które łączą się w dynamiczną, samoregulującą się sieć oddziaływań w obrębie różnych przedziałów komórkowych.

Jądro komórki eukariotycznej charakteryzuje się złożoną, a jednocześnie uporządkowaną strukturą. Mimo, iż wewnątrz jądra komórkowego nie ma błon biologicznych, to jego wnętrze ma budowę wysoce zorganizowaną, domenową. Domeny jądrowe są obszarami o wyraźnej strukturalnej i funkcjonalnej odrębności, pełniącymi ważne funkcje w metabolizmie jądrowym. Charakteryzują się określoną morfologią i specyficznym zestawem składników, chociaż skład cząsteczkowy poszczególnych domen jądrowych cechuje się dużą dynamiką i może ulegać ilościowym jak i jakościowym zmianom w zależności od fazy cyklu komórkowego, typu i aktywności metabolicznej komórki, czy czynników zewnętrznych oddziałujących na komórkę. Wśród domen jądrowych powszechne są m.in.: jąderko, ciała PML i ciała Cajala.

W prawidłowej komórce, nie poddanej stresowi, antagonistyczne działanie mechanizmów pro- i antyapoptotycznych utrzymywane jest w dynamicznej równowadze. Równowaga ta warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórki. Uszkodzenia DNA wywołują łańcuch zdarzeń obejmujący zmianę wzoru ekspresji genów, modyfikacje białek i ich translokacje do odpowiednich miejsc docelowych. Mechanizmy te są obecnie obiektem intensywnych badań nie tylko ze względów poznawczych, ale również ze względu na ich znaczenie w patogenezie wielu chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych czy też wirusowych.

## CIAŁA PML

Ciała PML określane są także jako domeny jądrowe 10 (ND10), domeny onkogenne czy ciała Kremera. Definiowane są przez obecność białka PML, stanowiącego ich swoisty marker. Po raz pierwszy dokładnie zidentyfikowano je u pacjentów z ostrą białaczką promielocytową (APL), która spowodowana jest, w większości przypadków (ponad 98%), translokacją między genem *PML* i genem receptora kwasu retinowego *RAR $\alpha$*  – t(15;17). Wynikiem tej translokacji jest białko fuzyjne PML/RAR $\alpha$  [1,2]. Białko to zachowuje większą część funkcjonalnych domen białek składowych, lecz skutkiem jego obecności jest dezintegracja ciał PML i rozproszony, mikropunktowy rozkład ich składników. W leczeniu ostrej białaczki promielocytowej stosuje się kwas *trans*-retinowy (ATRA) (ang. *all-trans*

*retinoid acid*), co przywraca prawidłową strukturę ciał PML w promielocytach, a także umożliwia postęp różnicowania się tych komórek i czasową remisję choroby.

W przeciwieństwie do innych analogicznych domen, jak ciała Cajala, ciała PML nie są zachowane w ewolucji. Występują wyłącznie w komórkach wyższych kręgowców, a brak ich m.in. u roślin, drożdży, *Drosophila melanogaster* czy *Xenopus laevis* [2]. W typowej komórce ssaka występują w postaci sferycznych agregatów o białkowym rdzeniu o średnicy w przedziale 0,2–1 µm i w ilości ok. 5–30 [2–4]. Są to struktury dynamiczne, większość ich składników ustawicznie krąży między innymi przedziałami jądra komórki, a same ciała także mogą się przemieszczać [1–3,5]. Większość ciał w interfazie jest względnie nieruchoma lub wykazuje niewielkie oscylacje, część jednak jest w stanie przemieszczać się na większe odległości, przy czym ruch ten wydaje się nie być przypadkowym, dyfuzyjnym przemieszczaniem, a raczej ruchem skoordynowanym, celowym [4,5]. Wraz z wejściem komórki w fazę S cyklu komórkowego następuje strukturalna destabilizacja ciał PML, zwiększa się ich liczba, a maleje średnica, co jest skutkiem rozszczepiania ciał macierzystych na mniejsze, zachowujące cechy ciał wyjściowych; rośnie także ich ruchliwość [4]. Powyższe fakty tłumaczy się ścisłym związkiem tych struktur z chromatyną, a także macierzą jądrową; ich dynamika zdaje się odzwierciedlać ruchy i zmiany topologii chromatyny. Podczas mitozy ciała ulegają rozpadowi, większość składników przemieszcza się do nukleoplazmy, a pozostają jedynie reszkowe agregaty MAPP – mitotyczne nagromadzenia białka PML (ang. *mitotic accumulations of PML protein*) [6].

Ciałom PML przypisuje się wysoką wszechstronność. Występują w nich, konstytutywnie lub w określonych warunkach, czynniki biorące udział w szeregu procesów, takich jak: supresja nowotworowa i apoptoza [7,8], remodelowanie chromatyny [9], utrzymywanie stabilności genomowej i naprawa DNA [10], transkrypcja [11] czy proteasomalna degradacja białek [12].

Poza typowymi ciałami PML, opisanymi powyżej, zidentyfikowano także alternatywne postacie tych struktur. W limfocytach pacjentów z zespołem ICF (ang. *immunodeficiency, centromere instability, facial dysmorphism*) w fazie G2 cyklu komórkowego występują, obok typowych ciał, także tzw. „gigantyczne” ciała PML lub ciała HP1, które poza wyjątkowo dużą średnicą, charakteryzują się obecnością satelitarnego okołocentromerowego DNA oraz dużym nagromadzeniem czynników remodelowania chromatyny [9]. Innym wariantem ciał PML są występujące w niektórych typach komórek nowotworowych, pozbawionych aktywnej telomerazy, ciała APB (ang. *ALT-associated PML bodies*), uczestniczące w mechanizmie alternatywnego wydłużania telomerów (ALT) [13].

## BIAŁKO PML

Wśród najistotniejszych i najobficiej występujących składników ciał PML wyróżnić należy wspomniane wcześniej białko PML, będące czynnikiem o wielu funkcjach, oddziałujące z szeregiem składników jądra komórkowego i biorące udział w wielu różnych procesach komórkowych,

między innymi regulacji stabilności strukturalnej samych ciał PML [1,2,14]. *Locus* genu *PML* o wielkości ok. 35 tys. pz podzielony jest na 9 eksonów. W efekcie alternatywnego składania powstaje kilka izoform tego białka o masach cząsteczkowych w zakresie 48–97 kDa. Scharakteryzowano 7 izoform PML i chociaż najobficiej występują izoformy I i II, to najlepiej poznanym białkiem PML jest prawdopodobnie izoforma IV. We wszystkich izoformach występuje identyczna N-końcowa część, natomiast różnią się one końcem C wskutek alternatywnego składania eksonów 4–9. W stałej N-końcowej części (pierwsze trzy eksony) występują trzy domeny bogate w resztkę cysteiny: domena *RING finger*, dwie *B-box* (B1 i B2) oraz  $\alpha$ -helikalna domena *coiled-coil* (CC), które razem tworzą trzyczęściowy motyw RBCC/TRIM. Domena ta występuje we wszystkich izoformach PML, jak również w fuzyjnym białku PML/RAR $\alpha$ . Różnice w C-końcowej części białka warunkują zróżnicowanie oddziaływań z innymi białkami, co dodatkowo podkreśla wielofunkcyjność PML.

W białku PML występują trzy miejsca kowalencyjnego wiązania białka SUMO-1 oraz motyw oddziaływań o charakterze hydrofobowym SIM (ang. *SUMO-interacting motif*) [15]. Białko SUMO-1 jest także istotnym składnikiem ciał PML. Jest to małe białko, homologiczne do ubikwityny, które wiąże się kowalencyjnie z różnymi białkami przy udziale enzymów: E1 – enzym aktywujący SUMO (Aos1/Uba2), E2 – enzym koniugujący (Ubc9) oraz E3 – ligazy SUMO. Elementy tego cyklicznego mechanizmu enzymatycznego również wykazują lokalizację w ciałach PML, a wiele składników tych ciał ulega sumoilacji [16,17].

Kluczową rolę w regulacji integralności ciał PML odgrywa prawdopodobnie zarówno sumoilacja jak i fosforylacja białka PML. Nadprodukcja SUMO-1 przeciwdziała rozpadowi ciał PML pod wpływem uszkodzeń DNA [5]. W białku tym zidentyfikowano ponadto miejsce sumoilacji zależnej od fosforylacji, które składa się z klasycznego motywu sumoilacji oraz przyległego motywu bogatego w resztkę proliny, ulegającego fosforylacji [18]. Jednym z kompleksów, który fosforyluje białko PML jest kinaza Cdk2/cyklina A. Osiąga ona szczyt aktywności między fazą G2 a mitozą, co wiąże się prawdopodobnie z kontrolowanymi przez fosforylację zmianami w jądrze komórkowym, w tym przebudową ciał PML w momencie rozpoczęcia fazy podziałowej [1]. Białko PML ulega także acetylacji [19]. Acetylowane są resztki lizyny: 487 i 515. Poziom acetylacji wzrasta pod wpływem białka p300 o aktywności acetylotransferazy, a także po działaniu na komórki inhibitora deacetylazy histonowej – trichostatyny A. Acetylacja białka PML wzmaga jego sumoilację.

W odpowiedzi na pęknięcia dwuniciowe DNA białko PML jest fosforylowane w specyficznych miejscach przez kinazy punktów kontrolnych CHK2, ATM i ATR [20,21]. Inaktywacja czynników ATM, ATR, CHK2, a także NBS1 skutkuje brakiem reakcji ciał PML na pęknięcia dwuniciowe DNA [22]. Są to kluczowe czynniki regulujące reakcję komórki na uszkodzenia DNA. Aktywacja kinazy ATM w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące skutkuje fosforylacją białka PML oraz, obecnej poza nukleoplazmą także w ciałach PML, kinazy CHK2. W następstwie fosforylacji

kinaza CHK2 częściowo opuszcza ciała PML (niewielka frakcja tego białka nadal pozostaje w ciałach) i przemieszcza się do miejsc uszkodzeń DNA. Dochodzi jednocześnie do reorganizacji samych ciał PML.

Ze względu na niewielką liczbę białek stale obecnych w ciałach PML, a obecność wielu białek o przejściowej lokalizacji w tych strukturach, a także szereg reakcji modyfikacji odbywających się na terenie ciał PML, można postawić tezę, iż stanowią one „mikrośrodowisko” pomagające w koordynacji odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA. Skupione w jednym miejscu kinazy sygnałowe, jak i białka przez nie fosforylowane mogą szybciej i efektywniej pełnić swoją funkcję, niż gdyby były one rozmieszczone w nukleoplazmie.

#### CIAŁA PML A USZKODZENIA I NAPRAWA DNA

Na początku lat 90. XX wieku zaobserwowano, że w miejscach powstawania dwuniciowych pęknięć DNA, dochodzi do szybkiej reakcji komórki, na którą składa się szereg zjawisk obejmujących m.in. zmiany w strukturze chromatyny, modyfikacje potranslacyjne białek czy akumulację specyficznych białek w miejscu uszkodzenia. Jako marker dwuniciowych pęknięć DNA uznaje się fosforylowany w pozycji reszty Ser139 wariant histonu H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Za fosforylację tego histonu odpowiadają kinazy białkowe ATM, ATR oraz DNA-PK. Do miejsca uszkodzenia rekrutowane są jednocześnie białka związane z naprawą DNA, takie jak RAD51 czy składniki kompleksu MRN: MRE11, RAD50 i NBS1. Miejsca takie określa się mianem skupisk naprawczych (ang. *repair foci*) [10].

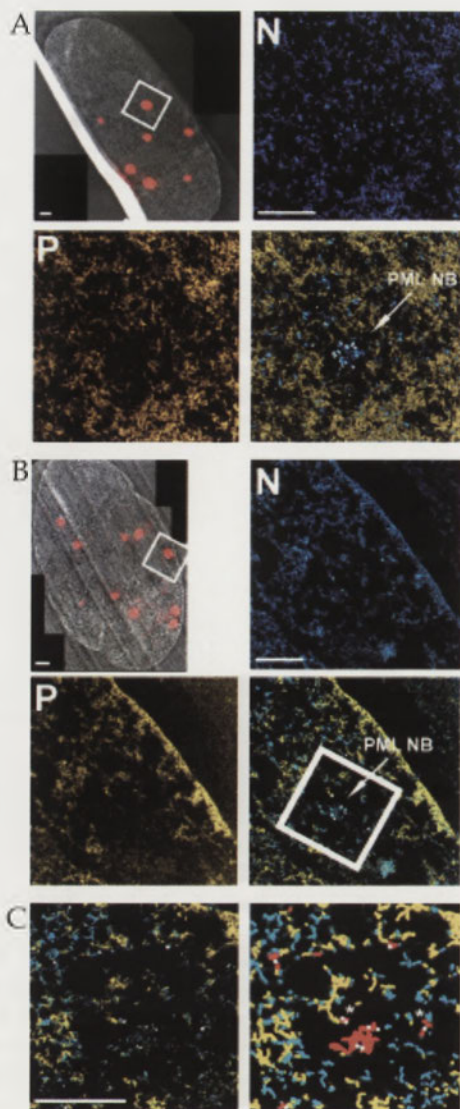
Poza efektami opisanymi powyżej, uszkodzenia DNA pociągają za sobą również reakcje poszczególnych domen jądrowych, wśród których najlepiej scharakteryzowane pod tym kątem są ciała PML. Wiele czynników stresotwórczych, jak metale ciężkie, szok cieplny czy też chemioterapeutyki, skutkują znacznymi zmianami zarówno w strukturze, kinetyce jak i składzie tych struktur jądrowych. W tym kontekście ciała PML zdają się być czułymi sensorami uszkodzeń w jądrze komórkowym i szereg danych sugeruje ich wielostronny udział w inicjacji i

koordynacji mechanizmów naprawy DNA.

Czynniki genotoksyczne prowadzą do szybkiej przebudowy ciał PML, w wyniku czego powstają liczne punktowe mikrociałka (ang. *microspeckles*) [5,22] (Ryc. 1). Bezpośrednio po ekspozycji na czynnik genotoksyczny wzrasta kinetyka ciał, a mikrociałka powstają przez rozszczepianie macierzystych ciał. Jest to bezpośrednia reakcja na uszkodzenia DNA, zwłaszcza na pęknięcia dwuniciowe. Reakcja taka jest efektem bardzo czułym i proporcjonalnie zależnym od ilości pęknięć [21]. Ekspozycja na promieniowanie UV prowadzi do rozpadu ciał PML i dystrybucji mikropunktowej ich składników – obserwuje się małe, punktowe skupiska białek, a efekt w tym przypadku jest proporcjonalny do dawki promieniowania [23] (Ryc. 2). Wspomniane mikrociałka mają kompozycję zbliżoną do prawidłowych ciał PML, jednakże nie są one tożsame z macierzystymi ciałami; rozpadowi towarzyszy zmiana lokalizacji wielu składników (m.in. Sp100, SUMO-1) do nukleoplazmy [23].

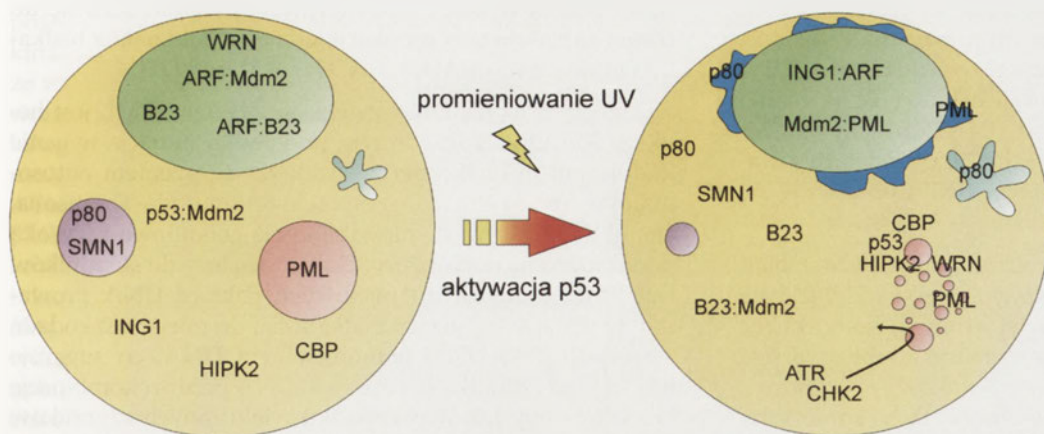
Stwierdzono także asocjacje ciał PML z miejscami uszkodzeń indukowanych promieniowaniem jonizującym (IRIF, ang. *ionizing radiation-induced foci*), przy czym ciała PML nie powstają w takich miejscach *de novo*, a jedynie ulega zmianie ich lokalizacja [21]. Przy dawkach nieletalnych po reakcji na uszkodzenia DNA następuje odtworzenie prawidłowych, typowych ciał PML, co wydaje się być tożsame z zakończeniem naprawy powstałych uszkodzeń i odtworzeniem stanu wyjściowego. Zauważono ponadto, iż w komórkach napromieniowanych UV składniki ciał PML kolokalizują z jednoniciowymi fragmentami DNA, a kolokalizacja ta nie ma związku z procesem apoptozy. Jednoniciowy DNA stanowi prawdopodobnie produkt pośredni procesów naprawczych [23].

Ważną rolę w reakcji komórki na stres genotoksyczny przypisuje się białku PML, stanowiącemu zasadniczy składnik ciał PML. W komórkach pozbawionych ekspresji PML nie obserwuje się ciał PML. W limfocytach pacjentów z ostrą białaczką promielocytową, u których białko PML występuje w formie nieprawidłowej – połą-



Rycina 1. Analiza ultrastruktury ciał PML w prawidłowych diploidalnych fibroblastach człowieka (NHDFs) przy użyciu techniki korelacyjnego spektroskopowego obrazowania elektronowego z mikroskopią świetlną (LM/ESI) przed i po wywołaniu uszkodzeń DNA przez etopozyd. Region zawierający ciało PML zaznaczono białym kwadratem. (A) Fibroblast z wyznakowanym fluorescencyjnie białkiem PML. Mapy występowania cząsteczek azotu (N) i fosforu (P). Ciało PML (ciemnoniebieski obszar w centralnej części obrazu wskazany przez strzałkę) ma kształt symetrycznie promieniowy z wieloma widocznymi połączeniami z otaczającą chromatyną (kolor żółty). (B) Fibroblast z wyznakowanym fluorescencyjnie białkiem PML po inkubacji (30 min) z 20  $\mu$ M etopozydem. W odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcia DNA ciało PML ulega dezintegracji (utrata pierwotnego kształtu, nieliczne połączenia z chromatyną) (obszar wskazany przez duży, biały kwadrat i strzałkę). (C) Ciało PML pokazane na obrazie (B) w większym powiększeniu (strona lewa) i ten sam obraz (strona prawa) przedstawiający strukturę zawierające białko PML (kolor czerwony) i inne niechromosomalne białka (kolor niebieski). Widoczne są mikrociałka PML (białe gwiazdki) wśród włókien chromatynowych oraz duże przestrzenie międzychromatynowe (kolor czarny). Wymiar kresek 500 nm. Rycina pochodzi z pracy [22]; wykorzystano ją za zgodą autorów.

- nukleoplazma
- jąderko
- ciała Cajala
- cząsteczki jąderkowe
- ciała PML
- granule interchromatynowe



**Rycina 2.** Zmiany w strukturze jądra komórkowego powstające w reakcji na uszkodzenia DNA wywołane przez promieniowanie ultrafioletowe i w wyniku aktywacji białka p53. Zmiany te mają skomplikowany charakter i obejmują bardzo dużą liczbę cząsteczek, dlatego pokazano tylko wybrane zmiany lokalizacji białek. Białko p53 oraz HIPK2 i CBP przemieszczają się do ciał PML. Występuje przejściowa akumulacja białek ATR i CHK2 w ciałach PML, po czym przemieszczają się one do nukleoplazmy. Białko WRN opuszcza jąderko i przemieszcza się do ciał PML. Białko ING1 przemieszcza się z nukleoplazmy do jąderka wraz z ARF, a białko B23 opuszcza jąderko, częściowo wiążąc się z białkiem Mdm2. Białko Mdm2 ulega przemieszczeniu do jąderka, prawdopodobnie z białkiem PML. Ostatecznie ciała PML ulegają dezintegracji do formy mikropunktowej; białko PML częściowo przemieszcza się do cząsteczek jąderkowych i granul interchromatynowych, duża jego część ulega równomiernemu rozproszeniu w nukleoplazmie, podobnie jak białka SMN1 (wg [10], zmodyfikowane).

czonę ze swoim fuzyjnym partnerem – receptorem RAR $\alpha$ , również ciała te nie występują. Z tego powodu uważa się to białko za czynnik nukleacji ciał PML, jego obecność w prawidłowej formie warunkuje właściwą strukturę ciał PML, a także prawdopodobną funkcję w regulacji ich integralności zarówno w warunkach stresu, jak i w warunkach prawidłowych.

Proponuje się model, w którym rozpad ciał PML związany jest bezpośrednio ze zmianami torsyjnymi i strukturalnymi chromatyny w następstwie pęknięć nici DNA. Tak więc mechaniczne zmiany w chromatynie wpływałyby bezpośrednio na związane z nią ciała PML, naruszając tym samym ich integralność. Byłaby to pierwsza, bezpośrednia reakcja na uszkodzenia i jednocześnie sygnał alarmowy mobilizujący łańcuch zdarzeń zakończony aktywacją mechanizmów naprawy DNA. Dodatkowo powstanie mikrociałek i przemieszczenia części składników ciał wiąże się z reorganizacją chromatyny kontrolowaną przez kinazy ATM, ATR i CHK2, i/lub jako efekt fosforylacji białka PML przez te kinazy.

Interesujący jest fakt, że pomimo wielu ważnych funkcji w komórce białko PML nie jest niezbędne dla przeżycia komórki czy całego organizmu. Myszy pozbawione tego białka są żywotne, rozwijają się prawidłowo, mają jednak podwyższony poziom wymiany siostrzanych chromatyd i wyższą podatność na choroby nowotworowe [23]. W komórkach bez ekspresji PML poddanych działaniu etopozydu dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie S, a ekspozycja takich komórek na promieniowanie UV podwyższa częstość indukcji apoptozy. Tak wysoka wrażliwość na czynniki genotoksyczne świadczyć może o mniej

skutecznej naprawie DNA w komórkach pozbawionych białka PML [23].

Białka NBS1 i MRE11 są składnikami kompleksu MRN, stanowiącego element systemu wykrywania i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Białka te kolokalizują w ciałach PML w komórkach nie poddanych stresowi genotoksycznemu. Po indukcji uszkodzeń promieniowaniem  $\gamma$  czynniki te opuszczają ciała tworząc z kolejnymi białkami specyficzne skupiska IRIF. Powrót do równowagi w komórce wiąże się z ponownym przemieszczeniem się tych białek do ciał PML [10,22]. Jest to przykład udziału ciał PML w reakcji komórki na uszkodzenia DNA poprzez uwalnianie specyficznych czynników w ściśle określonych warunkach.

Białko PML jest ponadto ważnym ogniwem w regulacji i rekrutowaniu białka TopBP1 (ang. *topoisomerase  $\beta$ -interacting protein 1*) do ciał PML w odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem jonizującym [24]. Białko TopBP1 bierze udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA oraz w regulacji wejścia komórki w fazę S cyklu komórkowego.

Wiele białek pod wpływem stresu genotoksycznego przemieszcza się do ciał PML lub też je opuszcza. Odbywa się to drogą potranslacyjnych modyfikacji tych białek, bądź też przez zmianę powinowactwa do innych składników ciał, co skutkuje sekwestracją w ciałach lub uwolnieniem do nukleoplazmy. Sumoilacja np. białka RIP- $\beta$  (ang. *RPA-interacting protein  $\beta$* ) prowadzi do jego akumulacji w ciałach PML w warunkach fizjologicznych, a jego uwalnianie pod wpływem promieniowania UV jest konsekwencją desumoilacji [10,25].

#### HELIKAZY Z RODZINY RECQ

Wśród składników ciał PML są białka BLM, WRN i RECQL4 – helikazy z rodziny RECQ. Mutacja w genie BLM leży u podstaw autosomalnego, recesywnego schorzenia – zespołu Blooma, które charakteryzuje się wysokim poziomem wymiany siostrzanych chromatyd, wysoką częstością aberracji chromosomowych, czy utratą heterozygotyczności i przez to dużym ryzykiem zachorowania na choroby nowotworowe. Białko BLM występuje w nukleoplazmie oraz w ciałach PML na granicy faz G1 i S. Nie występuje natomiast w ciałach w komórkach pozbawionych białka PML,

co wskazuje na zależny od PML mechanizm rekrutacji helikazy BLM do tych domen jądrowych. Za jego lokalizację do ciał odpowiada N-koniec; koniec C z kolei związany jest z lokalizacją jąderkową. Komórki bez funkcjonalnego białka PML wykazują podwyższony poziom wymiany siostrzanych chromatyd, aczkolwiek jest on niższy niż w komórkach z zespołem Blooma. Sugeruje to, że ciała PML odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji helikazy BLM. Białko BLM związane jest z rekombinacją DNA i utrzymywaniem stabilności genomowej; w ogniskach uszkodzeń indukowanych promieniowaniem jonizującym (IRIF) obserwuje się kolokalizację BLM z RAD51 [10].

Ważne jest również oddziaływanie białka BLM z białkiem p53. W komórkach pozbawionych białka p53, BLM nie występuje w ciałach PML. Z drugiej strony – komórki bez białka BLM są mniej wrażliwe na indukcję apoptozy drogą zależną od p53. Ekspresja *BLM* jest tkankowo-specyficzna; najwyższy jej poziom występuje w limfocytach i komórkach szybko dzielących się [2]. Uszkodzenia DNA prowadzą do przemieszczenia się BLM z ciał PML do miejsc uszkodzeń. W miejscach uszkodzeń DNA zidentyfikowanych dzięki stwierdzeniu obecności fosforylowanego histonu H2AX, białko BLM kolokalizuje z białkami naprawczymi, w tym RAD50, RAD51 i BRCA1 [10]. Rolą BLM w naprawie DNA jest prawdopodobnie dodatkowo składanie kompleksów naprawczych w miejscach uszkodzeń; jest to jedno z białek najwcześniej transportowanych do miejsc uszkodzeń DNA. Helikaza BLM jest fosforylowana przez kinazy ATR i ATM aktywowane uszkodzeniami DNA. Białko to ulega także sumoilacji, który to proces ma miejsce w ciałach PML. Mutacja w miejscu sumoilacji BLM prowadzi do braku sekwestracji tego białka w ciałach PML. Co więcej, nie ulegające modyfikacji białko BLM indukuje formowanie kompleksów naprawczych także mimo braku uszkodzeń DNA [10].

BLM związane jest z indukcją fosforylacji histonu H2AX pod wpływem stresu replikacyjnego. Komórki pozbawione BLM poddane działaniu kamptotecyny, która wprowadza pęknięcia DNA podczas replikacji, wykazują zaburzenia w fosforylacji histonu H2AX w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [25]. Stwierdzono współdziałanie BLM i topoizomerazy 3 $\alpha$  (TopoIII $\alpha$ ). Oba białka kolokalizują w ciałach PML w warunkach homeostazy komórkowej, najprawdopodobniej tworząc kompleks. Pod wpływem stresu replikacyjnego białko BLM ulega fosforylacji w pozycji Thr99, oddysocjuje od topoizomerazy 3 $\alpha$  i przemieszcza się do miejsc zaburzonej replikacji, gdzie kolokalizuje z histonem  $\gamma$ -H2AX i bierze udział w stabilizacji widełek replikacyjnych [26].

Kolejną helikazą z rodziny RECQ obecną w ciałach PML jest helikaza WRN. Mutacja *WRN* także skutkuje autosomalnym, recesywnym schorzeniem – zespołem Wernera. Wśród objawów wyróżnić należy przedwczesne starzenie i niestabilność genomową prowadzącą do nowotworów. Białko WRN oddziałuje z p53 i pośredniczy w aktywacji genów zależnych od p53. W warunkach fizjologicznych białko to występuje w jąderku, natomiast indukcja uszkodzeń DNA prowadzi do jego fosforylacji przez kinazę ATM i w konsekwencji do przemieszczenia się do miejsc uszkodzeń, a także przejściowo do ciał PML (Ryc. 2). W ciałach PML białko to podlega potranslacyjnym modyfikacjom: sumo-

ilacji i prawdopodobnie acetylacji [27]. WRN oddziałuje z wieloma partnerami białkowymi i bierze udział w wielu procesach komórkowych, w tym w naprawie DNA, gdzie współdziała z RPA, RAD52 i NBS1. Odgrywa także rolę w stabilizacji widełek replikacyjnych; przemieszcza się do miejsc zablokowanej replikacji, gdzie współdziała z białkami naprawczymi RAD51, RAD54 i RAD54B [27].

Trzecią helikazą DNA związaną z ciałami PML jest helikaza RECQL4. Także w tym przypadku mutacja w genie kodującym to białko ma związek ze schorzeniem autosomalnym, recesywnym – zespołem Rothmunda-Thomsona, charakteryzującym się niestabilnością genomową i wysoką podatnością na nowotwory. Białko to należy do składników ciał PML; indukcja dwuniciowych pęknięć DNA prowadzi do zmiany lokalizacji białka z ciał do miejsc uszkodzeń i asocjacji z RAD51 i jednoniciowym DNA, co sugeruje udział tego czynnika w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną. Jak w przypadku wielu innych czynników naprawczych, także i to białko jest uwalniane z ciał PML w następstwie uszkodzeń DNA, co jasno wskazuje na udział tych ciał w regulacji jego aktywności [28].

#### CIAŁA PML A REGULACJA p53

Białko p53 reguluje wzrost, różnicowanie, starzenie komórkowe, apoptozę i integralność genomu poprzez udział w regulacji replikacji DNA, naprawy uszkodzeń DNA i cyklu komórkowego. Pod wpływem stresu genotoksycznego ulega ono różnorodnym modyfikacjom, takim jak fosforylacja, acetylacja czy sumoilacja, które prowadzą do zwiększenia jego poziomu i aktywności. Charakter tych modyfikacji zależy od rodzaju i stopnia uszkodzeń DNA. Zwiększenie poziomu p53 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i rozpoczęcia naprawy DNA. W przypadku, gdy komórka nie może naprawić uszkodzeń DNA, uruchomiony zostaje proces apoptozy.

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym dla co najmniej 30 różnych genów, jednym z nich jest gen *PML* [29]. W warunkach stresu genotoksycznego aktywowane białko Ras rekrutuje do ciał PML białko p53 oraz CBP. Tu aktywność proapoptotyczna p53 regulowana jest przez oddziaływanie z izoformą IV PML oraz acetylotransferazą CBP. Powstaje przejściowy trimer: p53/PML/CBP. Białko PML jest tu niezbędne dla prawidłowej acetylacji p53; acetylowana jest reszta lizyny 382, przez co p53 zostaje aktywowane jako czynnik transkrypcyjny [30,31].

W warunkach wysokiego poziomu uszkodzeń DNA w białku p53 fosforylowane są reszty seryny: 15 i 20 przez kinazę CHK2 oraz reszty seryny 9 i treoniny 18 przez kinazę CK1 (także przy udziale białka PML-IV). Kinazy te również obecne są w ciałach PML. Szereg procesów fosforylacji skutkuje spadkiem powinowactwa białka Mdm2 do p53. Dodatkowo kinaza ATM fosforyluje białko Mdm2 na reszcie seryny 395, promując jego degradację, a fosforylacja reszty treoniny 216 przez kompleks kinaza CDK2/cykлина A prowadzi do związania tego białka przez ARF i jego translokację do jąderka przy jednoczesnym zablokowaniu aktywności ligazy E3 ubikwityny [8,31]. Indukcja proapoptotycznych genów, takich jak *PUMA* i *BAX* jest silnie związana z



fosforylacją seryny 46. Modyfikacja tego miejsca prowadzi do izomeryzacji p53 i ostatecznie oddysocjowania jego inhibitorów iASPP i Mdm2 [8].

Fosforylacja reszty seryny 46 białka p53 odbywa się za pośrednictwem kilku kinaz. Wśród nich należy wyróżnić kinazę HIPK2 (ang. *homeodomain interacting protein kinase 2*) ze względu na jej związek z ciałami PML. W prawidłowych warunkach poziom tej kinazy jest niski dzięki działaniu zależnego od ubikwityny systemu degradacji. W obecności uszkodzeń DNA degradacja HIPK2 jest hamowana przez ATM lub ATR. Wówczas kinaza ta lokalizuje się w ciałach PML i fosforyluje resztę seryny 46 w p53 (Ryc. 2). Dodatkowo HIPK2 wiąże acetylotransferazę CBP i wzmacnia acetylację reszty lizyny 382, która konieczna jest do całkowitej aktywacji p53. HIPK2 może efektywnie fosforylować p53 tylko w prawidłowych ciałach PML, w obecności funkcjonalnego białka PML, a prawdopodobnie także składnika ciał PML, białka Sp100. Ta modyfikacja p53 jest centralnym etapem indukcji apoptozy przy udziale ciał PML [8].

## JĄDERKO

### STRUKTURA JĄDERKA

Jąderko jest najwcześniej zidentyfikowaną substrukturą jądra komórkowego. Początek badań nad jąderkiem przypada na wczesne lata XIX wieku. Jest to jądrowa domena łączona przede wszystkim z transkrypcją rDNA oraz kolejnymi etapami biogenezy rybosomów: dojrzewaniem rRNA, składaniem kompleksów rybonukleinowych i ostatecznie – składaniem podjednostek rybosomalnych. Ze względu na tak podstawowe funkcje w komórce oczywistym wydaje się fakt, że jest to domena powszechna w całym królestwie organizmów eukariotycznych [32,33] (Ryc. 3).

Jąderko jest obecne stale w jądrze komórki, ulegając dezintegracji tylko na czas jej podziałów. Rozpad jąderka w komórkach ssaków następuje w profazie podziałowej, natomiast odtwarzane jest ono pod koniec mitozy. Odtwarzanie jąderka jest ściśle związane z obecnością tandemowych powtórzeń genów rRNA stanowiących organizator jąderkowy

(NOR). Na podstawie obrazu z mikroskopu elektronowego wyróżnia się trzy główne składniki jąderka: centra fibrylarne (FC) – charakteryzujące się obecnością rDNA i aparatu transkrypcyjnego, gęsty składnik fibrylarny (DFC) – wyrażany obecnością nowo powstałego transkryptu oraz będący miejscem dojrzewania rRNA, zawierający także obficie czynnik transkrypcyjny UBF oraz m.in. białka cyklu SUMO – SUMO-1 i Ubc-9 oraz składnik granularny (GC) – miejsce składania podjednostek rybosomalnych [33].

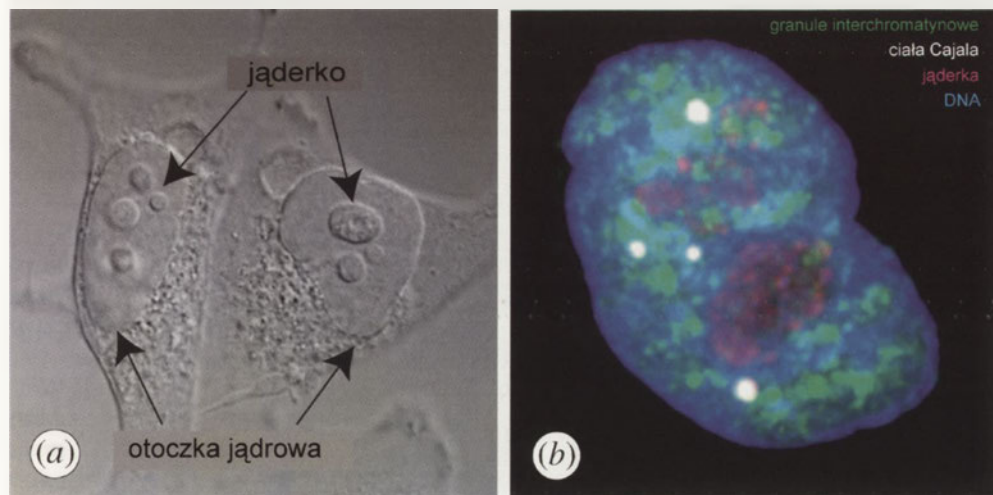
### JĄDERKO KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ

Jąderka komórek nowotworowych charakteryzują się większą średnicą oraz często nieregularnym kształtem. Podobny efekt obserwuje się w komórkach prawidłowych egzogennie pobudzanych do intensywnych podziałów. Oczywistym wytłumaczeniem tego efektu jest wysokie zapotrzebowanie komórki na nowe białka, a w konsekwencji wysokie tempo produkcji rybosomów. Mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę podziałów komórki oraz biogenezę i funkcjonowanie rybosomów są bezpośrednio sprzężone. Ponadto podwyższone tempo produkcji rybosomów wiąże się często ze zmianami jakościowymi w strukturze samych rybosomów, co pozwala mechanizmom translacyjnym na masową syntezę specyficznych białek, a takie nieprawidłowości wiążą się z wysokim ryzykiem transformacji nowotworowej [34].

### JĄDERKO A USZKODZENIA I NAPRAWA DNA

Przez długi czas istniało przekonanie, iż jąderka są strukturami będącymi wyłącznie wyrazem aktywnego procesu produkcji rybosomów, jednak współcześnie szereg badań zdaje się temu przeczyć i rysuje jąderko jako domenę wielofunkcyjną związaną także z całą gamą procesów nie mających związku z biogenezą rybosomów. Zidentyfikowano w jąderku około 700 białek, z czego zdecydowanej większości (ok. 80%) nie przypisuje się udziału w biogenezie rybosomów. Jąderko ma związek z takimi procesami jak dojrzewanie białek jądrowych, transport mRNA, regulacja senescencji komórkowej, supresja nowotworowa oraz reakcja na stres i uszkodzenia DNA, a także

koordynacja naprawy DNA [10]. Szereg doniesień wskazuje na udział jąderka w reakcji na czynniki uszkodzające DNA, zarówno w kierunku naprawy DNA jak i indukcji apoptozy (Tabela 1) [35,36]. Istnieje także ścisła zależność między jąderkiem a innymi domenami jądrowymi, takimi jak ciała PML czy ciała Cajala. Jąderko, podobnie jak inne domeny jądrowe, jest strukturą o wysokiej dynamice. Duża część jądrowych składników istnieje w stanie ciągłej wymiany między jąderkiem a nukleoplazmą i ciałami jądrowymi, a także niektóre czynniki z innych domen jądrowych czasowo trafiają do jąderka. Jak jednak osza-



Rycina 3. Struktura jądra komórkowego. (a) Komórki człowieka (HeLa). Zaznaczono otoczkę jądrową oraz jąderka. (b) Obraz trójwymiarowy jądra komórkowego z wyznakowaną koiliną i fibrylarną. DNA wybarwiono barwnikiem DAPI (ang. *4'-6-diamidino-2-fenylindole*). Widoczne są ciała Cajala, jąderka, granule interchromatynowe i chromatyna. Rycina pochodzi z pracy [64]; wykorzystano ją za zgodą autora.

**Tabela 1.** Zestawienie wybranych białek jądrowych związanych z reakcją komórki na uszkodzenia DNA.

Białko	Aktywność	Niektóre białka oddziałujące	Procesy komórkowe	Główna lokalizacja wewnątrzjądrowa
<b>ABH2</b>	białko naprawy DNA i RNA	SLX4 (endonukleaza zaangażowana w rekombinację i naprawę DNA)	naprawa alkilacyjnych uszkodzeń DNA	nukleoplazma, jąderko
<b>ARF, p14</b>	regulator p53, produkt alternatywnego składowania genu <i>p16</i>	ING1, Mdm2, B23, TOPOI, WRN	obróbka rRNA, supresja nowotworowa	jąderko, nukleoplazma (po indukcji uszkodzeń DNA)
<b>ATR</b>	kinaza punktów kontrolnych, detektor uszkodzeń DNA	BRCA1, p53, RPA1, WRN, NBS1	sygnalizacja uszkodzeń DNA, indukcja procesów naprawczych	jąderko, ciała PML, miejsca uszkodzeń DNA i zatrzymanej replikacji
<b>B23, NPM1, nukleofosmina, numatryna</b>	wielofunkcyjna fosfoproteina jądrowa	ARF, BRCA1, Mdm2	biogeneza i organizacja jąderka, regulacja apoptozy	szybka wymiana: jąderko/nukleoplazma, centrosomy
<b>BLM</b>	helikaza DNA	RAD51, RPA1, PML, p53, ATM, BRCA1, XRCC2, RAD50, MRE11	rekombinacja i naprawa DNA, stabilność telomerów	jąderko, ciała PML, miejsca uszkodzeń DNA, kompleks synaptonemalny, telomery
<b>Ligaza DNA III</b>	ligaza DNA	XRCC1	naprawa DNA (BER)	jąderko
<b>DNA-PK<sub>cs</sub></b>	podjednostka katalityczna kinazy białkowej zależnej od DNA	WRN, p53, ATM, PCNA, BRCA1, MRE11, RPA1	sygnalizacja uszkodzeń DNA, naprawa DNA (NHEJ), regulacja aktywności telomerazy	nukleoplazma, jąderko
<b>FEN1</b>	endonukleaza DNA	CDK2, PCNA, WRN, BLM	replikacja i naprawa DNA (BER)	nukleoplazma, jąderko
<b>ING1</b>	supresor nowotworowy	p53, PCNA, ARF	remodelowanie chromatyny, naprawa DNA	heterochromatyna, jąderko
<b>Ku70, XRCC6</b>	helikaza DNA	Ku80 (XRCC5), WRN, MRE11, p53, JNK1,	naprawa DNA (NHEJ), składanie pre-mRNA, stabilność telomerów	jąderko, chromatyna, granule interchromatynowe
<b>Ku80, XRCC5</b>	helikaza DNA	Ku70 (XRCC6), WRN, PCNA, ATM, ATR	naprawa DNA (NHEJ), stabilność telomerów	jąderko, chromatyna, granule interchromatynowe
<b>Mdm2</b>	regulator p53, ligaza ubikwityny	p53, PML, SUMO-1, PIAS1, RB1, ARF	regulacja odpowiedzi na stres i uszkodzenia DNA	nukleoplazma, jąderko, ciała PML, miejsca uszkodzeń DNA
<b>p53</b>	supresor nowotworowy	Mdm2, BLM, BRCA1/2, RAD51, PML, ATM, WRN, RPA1, TOPOII, SUMO-1, SMN1	odpowiedź na stres i uszkodzenia DNA (regulacja na poziomie białka i DNA)	nukleoplazma, jąderko, ciała Cajala, ciała PML, miejsca uszkodzeń DNA
<b>PARP1</b>	polimeraza poli(ADP-rybozy), białko naprawcze	p53, kaspazy 3 i 7, TOPOI, WRN, XRCC1, PCNA	naprawa DNA (BER), składanie pre-mRNA, proteoliza	jąderko, chromatyna, centromery, miejsca naprawy DNA
<b>PML</b>	wielofunkcyjna fosfoproteina jądrowa	Mdm2, DAXX, p53, SUMO-1, TopBP1, ATR	naprawa DNA, apoptoza, regulacja cyklu komórkowego i senescencja, supresja nowotworowa	ciała PML, jąderko, miejsca uszkodzeń DNA
<b>RAD17</b>	białko naprawy DNA	ATR, ATM, RAD1 i 9, HUS1	replikacja, regulacja cyklu komórkowego, reakcja na uszkodzenia DNA	chromatyna, jąderko
<b>RAD50</b>	białko naprawy DNA, egzonukleaza	BRCA1, MRE11, NBS1, BLM, ATM	naprawa DNA (NHEJ), kontrola cyklu komórkowego, rekombinacja mejozy, stabilność telomerów, hipermutacje somatyczne	ciała PML, jąderko, miejsca replikacji i uszkodzeń DNA, telomery

<b>RAD52</b>	białko naprawy DNA	RAD51, RPA1, SUMO-1, Smc5, Smc6	rekombinacja i naprawa DNA, stabilność rDNA	miejsca uszkodzeń DNA, jąderko
<b>RECQL4</b>	helikaza DNA	RAD51, UBR1/2, PARP1	rekombinacja i naprawa DNA	jąderko, ciała PML, miejsca uszkodzeń DNA
<b>SAP130, SF3b</b>	mała jądrowa rybonukleoproteina, czynnik składania pre-mRNA	U11/12snRNA, U2AF2, SMNDC1	składanie pre-mRNA, naprawa DNA, regulacja transkrypcji	nukleoplazma, granule interchromatynowe, jąderko
<b>SMUG1</b>	glikozylaza uracylowa	RBP, TRIP13	naprawa DNA (BER)	jąderko, nukleoplazma
<b>SSRP1, FACT</b>	białko wiążące DNA	SR, CK2, helikaza DNA II, TOPOII, histon H2A/B	detekcja uszkodzeń DNA, regulacja transkrypcji i aktywacja p53	chromatyna, jąderko

cowano, zdecydowanie więcej cząsteczek opuszcza jąderko niż do niego trafia. Efekt taki jest szczególnie intensywny w komórce poddanej ekspozycji na czynniki uszkadzające. Pierwszą reakcją jąderka na czynniki stresotwórcze, takie jak wolne rodniki, jest natychmiastowe zatrzymanie syntezy rRNA [35,36].

Oddziaływanie szeregu czynników stresotwórczych, jak hamowanie proteasomalne i transkrypcyjne, zaburzenie biogenezy rybosomów, szok cieplny czy uszkodzenia DNA prowadzi do natychmiastowej reorganizacji jąderka, której towarzyszy ruch cząsteczek zarówno do jąderka jak i z jąderka do nukleoplazmy [36] (Ryc. 2). Uważa się, że jąderko jest, obok mitochondriów, jednym z miejsc o najintensywniejszym przemieszczaniu cząstek w odpowiedzi na stres i uszkodzenia DNA [35]. Muszą zatem istnieć specjalne mechanizmy warunkujące precyzyjne kierowanie białek do jąderka. W wielu białkach zidentyfikowano specyficzne sekwencje odpowiadające za taką lokalizację – sygnał lokalizacji jąderkowej (NoLS). W przeciwieństwie do sygnału lokalizacji jądrowej, mechanizm translokacji do jąderka nie został jednoznacznie sprecyzowany. Spekuluje się, że przynajmniej w przypadku części białek opiera się on na oddziaływaniu między sekwencją NoLS białka translokowanego, a białkiem B23 – nukleofosminą, które to białko pełni być może funkcję transportera do jąderka [37].

Nukleofosmina (NPM, B23, numatryna) obficie występuje w składniku granularnym jąderka (GC). Podlega fosforylacji w cyklu komórkowym, od fosforylacji też zależy kinetyka tego białka. Jest fosforylowana przez kinazy CK1 i CK2. Mutacja w genie *NPM* leży u podłoża jednej trzeciej przypadków ostrej białaczki szpikowej. Poza tym NPM w formie fuzyjnej NPM/RAR $\alpha$  występuje w części białaczek promielocytowych, a fuzyjny produkt mutacji lokalizuje się w jąderku [34].

W przypadku wielu białek transport między jąderkiem i nukleoplazmą jest prawdopodobnie związany z przyłączeniem przez białko GTP. Na przykład wiązanie GTP przez nukleosteminę pozwala jej na oddziaływanie z innymi jądrowymi białkami i na translokację do jąderka. Odłączenie GTP powoduje z kolei powrót tego białka do nukleoplazmy. Prawdopodobnie mechanizm ten dotyczy dużej grupy białek. Ponadto obniżenie poziomu GTP w komórce może

aktywować kinazy JNK1 i JNK2, biorące udział w uruchamianiu mechanizmów odpowiedzi na stres. Świadczy to może o związku między poziomem GTP w komórce a ruchami cząsteczek na osi jąderko – nukleoplazma. Poza tym kinaza JNK2 fosforyluje czynnik transkrypcyjny polimerazy RNA I – TIF-IA, blokując w ten sposób syntezę rRNA w komórce w warunkach stresu [37,38].

Spektakularnym przykładem rearanżacji domen jądrowych jest reakcja jądra komórkowego na zahamowanie transkrypcji. Jest to proces fizjologiczny, energozależny, a segregacja składników, która wtedy następuje, dotyczy zarówno wielu składników jąderka jak i innych ciał jądrowych. Konsekwencją takiej rearanżacji jest zmiana struktury typowego jąderka w złożoną formę, na którą składa się ciało centralne oraz kilka typów czapeczek jąderkowych, różniących się składem. Czapeczki te stanowią odrębne struktury wieloskładnikowe i znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie ciała centralnego jąderka. Część składników jądrowych ulega przemieszczeniu do czapeczek, niektóre elementy (zwłaszcza ze składnika granularnego jąderka) trafiają do nukleoplazmy. W czapeczkach ponadto znajdują się niektóre komponenty ciał Cajala: koilina, Sm czy scaRNA (ang. *small Cajal body-specific RNA*) – małe RNA specyficzne dla ciał Cajala oraz ciał PML (PML, Sp100) (Ryc. 2). Proces ten nie jest przypadkowy; podlega precyzyjnej kontroli. Świadczy to o ścisłym funkcjonalnym związku między tymi domenami [39,40].

Struktury przyjąderkowe zaobserwowano także w komórkach poddanych działaniu promieniowania UV-C (Ryc. 2). Towarzyszył temu rozpad ciał PML i przemieszczenie części ich składników w okolice jąderka, gdzie wraz z innymi cząsteczkami tworzyły one charakterystyczne jąderkowe czapeczki. Inne czynniki genotoksyczne jak promieniowanie jonizujące czy chemioterapeutyki dawały nieco inne efekty, aczkolwiek w każdym przypadku powstawały struktury zawierające składniki zarówno jąderka jak i ciał PML. Białko PML może być w warunkach stresu efektywnie kierowane do jąderka. Dokładniejsze analizy pozwoliły ustalić, iż stres genotoksyczny prowadzi do akumulacji w jąderku trzech izoform białka PML: I, IV i V, przy czym najobficiej występującą i najistotniejszą w tym zjawisku wydaje się być izoforma I PML. W C-końcowym fragmencie PML-I zidentyfikowano sygnał lokalizacji jąderkowej (NoLS), a

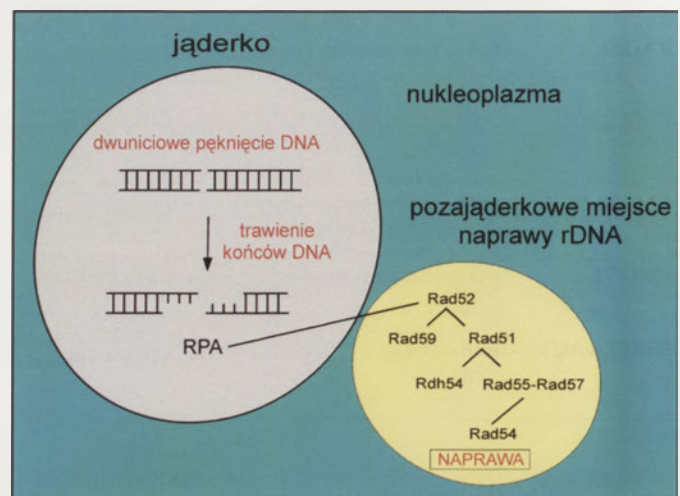
obecność w komórce tego wariantu jest niezbędna, aby w jąderku można było zaobserwować PML [41].

Rybosomalne białko „S27-like” (RPS27L) jest bezpośrednio aktywowane przez białko p53 na poziomie transkrypcji. Po indukcji uszkodzeń DNA białko to częściowo kolokalizuje z fosforylowanym histonem  $\gamma$ -H2AX. Białko RPS27L bierze udział w odpowiedzi na uszkodzenia DNA przez modulowanie systemów naprawczych, jak i punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Poza tym przeciwdziała indukcji apoptozy na drodze zależnej od p53. Funkcje te pełni przynajmniej częściowo razem z innym białkiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA – p21 [42].

Endonukleaza Flap 1 (FEN1) jest białkiem o ważnej roli w procesie replikacji (wycinanie starterów), a także w naprawie DNA przez wycinanie zasad (BER) i naprawie pęknięć dwuniciowych przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Rozpoznaje specyficzne struktury przestrzenne w DNA niezależnie od ich sekwencji. W ten sposób usuwa zawady przestrzenne w DNA i w konsekwencji umożliwia dalszy postęp widełek replikacyjnych. Delecja genu *FEN1* skutkuje wysoką podatnością komórki na uszkodzenia DNA. Wśród białkowych partnerów endonukleazy FEN1 są m.in. helikaza WRN i białko PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*). Ważną rolą FEN1 wydaje się być jej udział w stabilizacji genów rDNA w warunkach stresu. Ekspozycja na promieniowanie UV stymuluje wyraźną jąderkową akumulację tego białka, co wynika z jego fosforylacji indukowanej działaniem UV [43].

Geny rDNA, ze względu na charakter tandemowych sekwencji powtórzonych jak i wysokie tempo transkrypcji oraz specyficzną lokalizację w jądrze są szczególnie narażone na nieuprawnioną rekombinację homologiczną. Dwuniciowe pęknięcia DNA w obrębie tych sekwencji skutkować mogą poważnymi konsekwencjami. Według nowych doniesień istnieją mechanizmy, które skutecznie zabezpieczają komórkę przed destabilizacją genetyczną rDNA. Uszkodzenia w obrębie tych genów są naprawiane na zewnątrz jąderka; następuje wypełnienie uszkodzonego fragmentu do nukleoplazmy i dopiero tu aktywowane są mechanizmy naprawcze (Ryc. 4). Ważnym czynnikiem zaangażowanym w ten proces jest białko Rad52, którego aktywność regulowana jest przez sumoilację. Zablockowanie tego procesu prowadzi do hiperrekombinacji rDNA, tak więc modyfikacja ta zdaje się stanowić element koordynacji tego typu naprawy w odpowiednim miejscu i czasie [44-46]. Ważna jest tu także obecność białek Smc5-Smc6 biorących udział w naprawie DNA przez rekombinację homologiczną oraz niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Dimer Smc5-Smc6 ma aktywność ligazy E3 w cyklu SUMO, wykazującej specyficzną substratową w stosunku do szeregu białek naprawczych. Dimer ten występuje też obficie na zakończeniach telomerów, co pozwala przypuszczać, że może brać udział również w analogicznym procesie – regulacji aktywności białek naprawczych na telomerach i ewentualnym wypełnianiu uszkodzonych fragmentów w celu niezaburzonej, kontrolowanej naprawy DNA [45,46].

Wyraźny związek z jąderkiem występuje w przypadku helikazy RECQL4 [47]. Oddziałuje ona m.in. z ligazami ubi-



Rycina 4. Powstawanie pozajądrowych miejsc naprawy w reakcji komórki na dwuniciowe pęknięcia rDNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (wg [46]) zmodyfikowane). Skróty występujące na rycinie: RPA (ang. *replication protein A*) – białko biorące udział w replikacji i naprawie DNA; Rad52, Rad51, Rad59, Rad55-Rad57, Rad54 – białka naprawy DNA przez rekombinację homologiczną, Rdh54 – białko biorące udział w rekombinacji i naprawie DNA u drożdży, homolog RAD54b.

kwityny: UBR1 i UBR2, a także z białkiem RAD51. Natura tych oddziaływań nie jest znana. W warunkach fizjologicznych RECQL4 w większości występuje w nukleoplazmie, w niewielkim zaś stopniu także na terenie jąderka. Poddanie komórki stresowi oksydacyjnemu powoduje wyraźną akumulację jąderkową tego białka. Reakcji takiej nie obserwuje się w innych typach czynników uszkadzających, jak promieniowanie jonizujące, UV czy etopozyd. Czynniki te z kolei wyzwalają reakcję helikazy WRN (Ryc. 2). Nadtlenek wodoru zwiększa akumulację RECQL4 w jąderku dwukrotnie, a antybiotyk – streptonigryna nawet 46-krotnie. Stanowi to wyraźny dowód na to, iż reakcja helikazy RECQL4 jest specyficznie indukowana stresem oksydacyjnym. RECQL4 oddziałuje ponadto z białkiem PARP-1 – polimerazą poli-(ADP-rybozy), oddziałującą również z WRN [48]. Białko PARP-1 jest aktywowane po indukcji pęknięć DNA. Odgrywa ważną rolę w naprawie przez wycinanie zasad (BER). PARP-1 wraz z PARP-2 mają kilku wspólnych partnerów białkowych związanych bezpośrednio z naprawą DNA: XRCC1, polimerazę DNA  $\beta$ , ligazę DNA III. Jest możliwe, że PARP-1 współdziała z RECQL4 w odpowiedzi na uszkodzenia spowodowane wolnymi rodnikami. Białka PARP-1 i -2 oddziałują również z nukleofosminą i nukleoliną, białkami typowo jąderkowymi. Mają one sygnały lokalizacji jądrowej i jąderkowej; akumulują w jąderku niezależnie od siebie. Mutacja w sekwencji NoLS znosi zdolność asocjacji tych białek z nukleofosminą. Uważa się, że białka PARP-1 i -2 w jąderku odpowiadają za stabilizację rDNA [48].

Nukleofosmina należy do białek wczesnej odpowiedzi na stres. Jej ekspresja znacznie wzrasta tuż po ekspozycji komórki na promieniowanie UV i wpływa na poziom ekspresji kolejnych białek, jak np. PCNA, który m.in. odgrywa rolę pomocniczą w naprawie DNA jako czynnik zwiększający procesywność polimerazy DNA  $\delta/\epsilon$ . Poziom NPM w komórce determinuje dalsze losy komórki po uszkodzeniu DNA, a więc kieruje komórkę ku efektywnej naprawie, bądź w stronę apoptozy [49-51].

## ZWIĄZEK JĄDERKA Z APOPTOZĄ

Jąderko, podobnie jak mitochondria, należy do centralnych punktów związanych z regulacją i indukcją apoptozy. W warunkach stresu w jąderku pojawia się białko Mdm2, najważniejszy czynnik negatywnej regulacji p53. Zmiana lokalizacji skutkuje zwiększeniem puli wolnego p53 w jądrze, co wiąże się z aktywacją tego białka. Z p53 oddziałuje też nukleostemina, jąderkowe białko o ważnej roli w komórkach macierzystych, a także w nowotworach. Bierze udział w regulacji cyklu komórkowego (progresja z fazy G1 do S i z G2 do fazy M). Prawdopodobnie bierze także udział w regulacji dojrzewania rRNA. Jak udowodniono, nukleostemina oddziałuje bezpośrednio z białkiem p53, a także ARF – hamując ich aktywność. W komórkach tkanek ulegających regeneracji (np. po utracie kończyny przez traszkę) obserwuje się silny wzrost ekspresji nukleosteminy, czemu towarzyszy wznowienie podziałów komórek już zróżnicowanych. Podobny efekt obserwuje się w części nowotworów, co jednoznacznie potwierdza udział tego białka w regulacji podziałów komórki [32].

Do jąderka po ekspozycji komórki na promieniowanie UV przemieszcza się supresor nowotworowy – ING1 (ang. *inhibitor of growth family, member 1*) (Ryc. 2). Tu oddziałuje z jąderkowym białkiem związanym z supresją nowotworową ARF (ang. *alternate reading frame*), a nadprodukcja ARF skutkuje zmianą lokalizacji ING1 do jąderka, co wskazuje na bezpośrednią zależność między tymi czynnikami. ARF może wiązać Mdm2 i w ten sposób stabilizować p53 [35]. Także nukleofosmina związana jest ze zmianą lokalizacji ARF do jąderka, gdzie najprawdopodobniej zachodzi bezpośrednia asocjacja tych białek. Promieniowanie UV prowadzi do dysocjacji tych czynników; nukleofosmina przemieszcza się do nukleoplazmy i bezpośrednio wiąże Mdm2. Nukleofosmina jednak ma także zdolność negatywnej regulacji syntezy p53 i jest w stanie skutecznie ograniczyć poziom syntezy p53 w komórkach z nadprodukcją tego białka. Uważa się zatem, że nukleofosmina w warunkach fizjologicznych działa supresorowo na apoptozę zależną od p53. Natomiast w warunkach, gdy uszkodzenia są zbyt silne, by mogły ulec efektywnej naprawie, pozwala na indukcję procesu apoptozy. Ostateczny los komórki zależy więc od stosunku ilościowego powyższych czynników, a prawidłowa ich synteza i dystrybucja stanowi precyzyjny mechanizm decydujący o kierunku reakcji komórki na uszkodzenia DNA. W komórkach nowotworowych wysoki poziom syntezy nukleofosminy może być jednym z czynników uodparniających je na apoptozę, skutecznie przeciwdziałając aktywacji białka p53. Co ciekawe, także białko PML ulega translokacji do jąderka w warunkach stresu. Jest to proces niezależny od ARF, zachodzi natomiast oddziaływanie z innym białkiem jąderkowym – L11, efektem czego jest również sekwestracja Mdm2 w jąderku i aktywacja p53 [49-51].

## CIAŁA CAJALA

Ciała Cajala zaobserwował po raz pierwszy w 1903 r. hiszpański neurolog Santiago Ramon y Cajal, podczas badań układu nerwowego szczura. Używając techniki srebrnej do kontrastowania błon komórkowych komórek nerwowych zaobserwował on w okolicy jąderka niewielkie

ciemne punkty, które nazwał ciałkami dodatkowymi (jąderka). Z biegiem lat stwierdzono ich obecność w innych typach komórek u różnych taksonów; początkowo nie utożsamiane ze sobą przybierały różne nazwy (*Binnekörper*, ciała kłębuszkowate). W przeciwieństwie do ciał PML, występujących wyłącznie w komórkach wyższych kręgowców, ciała Cajala powszechne są zarówno wśród roślin jak i zwierząt, w oocytach płazów i owadów oraz u drożdży [52-55].

Struktura ich w obrazie z mikroskopu elektronowego przypomina grupę zasocjowanych ze sobą gęstych kłębków poprzedzielanych materiałem o niższej gęstości. Średnica (od ok. 0,2  $\mu\text{m}$  do ponad 2  $\mu\text{m}$ ) i liczba ciał jest zmienna i zależy od typu komórki, fazy cyklu komórkowego i aktywności metabolicznej jądra.

Ciała Cajala związane są m.in. z biogenezą rybonukleinowych czynników składania pre-mRNA, tworzeniem trimerów U4/U6•U5 i ich regeneracją po cyklu składania pre-mRNA, a także z modyfikacją jąderkowych snoRNA. Z modyfikacjami RNA związane są specyficzne dla ciał Cajala – scaRNA. Ciała Cajala są ściśle związane z jąderkiem, o czym świadczy obecność w ciałach wielu składników jąderka, takich jak: fibrylaryna, Nopp140, NAP57 (DKC1) czy rybosomalne białko S6. Mimo, że zidentyfikowano w nich poli(A)RNA, brak nowo powstałego transkryptu czy kluczowych czynników składania (SR, SC35), wyklucza ich bezpośredni udział w procesie transkrypcji czy w pierwszych zasadniczych etapach obróbki pre-mRNA [55]. Biorą udział w transkrypcji genów histonów (asocjacja ciał z *locus* genów histonów), a także w dojrzewaniu mRNA histonów.

Markerowym białkiem ciał Cajala jest białko p80 – koilina. Jest to wielofunkcyjna fosfoproteina, oddziałująca z całym szeregiem partnerów białkowych, występująca obficie w różnych obszarach komórki (także w cytoplazmie). Podobnie jak w przypadku białka PML, obecność koiliny nie jest konieczna dla przeżycia komórki czy rozwoju organizmu – myszy pozbawione tego białka rozwijają się prawidłowo i mogą się rozmnażać. Ciała Cajala biorą też udział w regulacji cyklu komórkowego. Znajdują się w nich kompleksy kinazy Cdk2/cykliny E, a także związane z nimi białko NPAT (ang. *nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus*), biorące udział w biogenezie histonów [52-55].

## UDZIAŁ CIAŁ CAJALA W INDUKCJI APOPTOZY

Istnieją dowody świadczące o funkcjonalnym związku ciał Cajala z ciałami PML. Często w jądrze część ciał obu typów wykazuje przejściowe asocjacje. Białko ciał Cajala – koilina (p80) bezpośrednio wiąże ligazę E3 cyklu SUMO – PIASy – ważny składnik ciał PML. Usunięcie fragmentu genu *PIASy* kodującego motyw odpowiedzialny za asocjacje PIASy z koiliną znacznie redukuje efekt asocjacji między tymi ciałami [56]. Niedawno stwierdzono również obecność w ciałach Cajala w neuronach ssaków enzymu E2 cyklu SUMO – białka UBC9. Co więcej, w warunkach stresu osmotycznego i hamowania metylotransferaz w ciałach Cajala przejściowo lokalizuje SUMO-1. Ponadto zidentyfikowano w koilinie i białku SMN (ang. *survival of motoneurons*) związanym z atrofią mózgowo-rdzeniową, miejsca sumoilacji. Sumoilacja białek może mieć związek z

reorganizacją tych domen w odpowiedzi na stres i uszkodzenia DNA [57]. Reakcje takie zaobserwowano, poddając komórki działaniu promieniowania UV. Podobnie jak jąderko i ciała PML, także ciała Cajala pod wpływem UV ulegają szybkim i ukierunkowanym reorganizacjom (Ryc. 2). Część składników zostaje z ciał uwolniona i przemieszcza się do innych miejsc w jądrze, pozostałe tworzą szczątkową pozostałość ciał Cajala. Towarzyszy temu formowanie kompleksów zawierających koilinę i aktywator proteasomalny PA28 $\gamma$ , który wydaje się być dla tej reakcji kluczowy [58].

Ważnym składnikiem ciał Cajala jest wspomniany już kompleks białkowy SMN, pełniący funkcję w dojrzewaniu rybonukleinowych czynników składania pre-mRNA. Kompleks SMN składa się z białka SMN1 oraz kilku białek Gemin (1-7). Mutacja w genie *SMN* leży u podstaw ciężkiego schorzenia o charakterze neurodegeneracyjnym – rdzeniowej atrofii mięśni SMA (ang. *spinal muscular atrophy*), co prowadzi do degeneracji neuronów rogów brzusznych rdzenia kręgowego, następnie do atrofii mięśni i ostatecznie śmierci [59]. Prawidłowe białko SMN1 w komórkach nerwowych ma właściwości czynnika antyapoptotycznego, natomiast utrata 7 eksonu i mutacja w odcinku C-końcowym prowadzi do apoptozy. Wydaje się, że prawidłowa funkcja tego białka jak też przyczyna choroby, związana jest przede wszystkim ze zdolnością do autoasocjacji i dimeryzacji. Ponadto białko SMN1 posiada zdolność do bezpośredniego oddziaływania z białkiem p53, a mutacja w genie *SMN* leżąca u podstaw zespołu SMA wiąże się z brakiem asocjacji SMN-p53. W prawidłowych komórkach endogenna aktywacja p53 prowadzi do lokalizacji w ciałach Cajala zarówno SMN1 jak i p53. Z kolei w komórkach pacjentów z zespołem SMA po aktywacji p53 lokalizuje w jąderku, a brak jest tego białka w ciałach Cajala, co sugeruje, że mechanizm obumierania neuronów wiąże się z nadmierną dostępnością biologiczną aktywnego p53 i w konsekwencji indukcją apoptozy [60]. Także wyciszenie genu *SMN* przez interferencję RNA powoduje degradację neuronów, a wprowadzenie inhibitora kaspaz zatrzymuje apoptozę [61]. Podane informacje wskazują na istotną rolę ciał Cajala w regulacji żywotności komórek, a jeden z istotnych komponentów tych ciał – kompleks SMN wydaje się być kolejnym ważnym ogniwem sieci oddziaływań decydujących o losie komórki.

Innym składnikiem ciał Cajala, związanym z apoptozą, jest białko FLASH (ang. *FLICE-associated huge protein*). Białko to występuje w ciałach Cajala obficie, aczkolwiek obecność jego stwierdzono także w ciałach PML. Pierwotnie zidentyfikowane zostało jako element szlaku indukcji apoptozy drogą receptorową – jako czynnik oddziałujący z FLICE (ang. *FADD-homologous ICE/CED-3-like protease*), który stanowi ważne ogniwo w tym szlaku. Dokładny mechanizm działania tego białka w indukowaniu apoptozy nie został ostatecznie i zgodnie przyjęty [62]. Jako element ciał PML z kolei FLASH oddziałuje z białkiem Sp100. Prawdopodobnie aktywacja receptora CD95 powoduje uwolnienie FLASH z ciał jądrowych i translokację do cytoplazmy, gdzie spełnia swoją rolę w wyzwaniu apoptozy [63].

## PODSUMOWANIE

Ciała PML są jednym z wielu ogniw w reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Ciała te, to dynamiczne kompleksy, będące komórkowymi magazynami wielu białek, których aktywność i lokalizacja regulowane są przez modyfikacje potranslacyjne zachodzące w dużym stopniu w obrębie tych kompleksów. W ciałach PML gromadzone są nie tylko białka naprawy DNA, ale również cząsteczki jednoniciowego DNA powstające w trakcie naprawy DNA. Można uznać więc, że ciała PML są aktywnymi miejscami metabolizmu uszkodzonego DNA.

Dwie powszechne w komórkach eukariotycznych domeny jądrowe: jąderka oraz ciała Cajala, kojarzone są w dużej mierze z metabolizmem RNA oraz biogenezą rybosomów. Jak wynika z najnowszych badań, mogą być one także ważnymi ogniwami w reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Liczne informacje z ostatnich kilku lat wskazują, że jąderko pełni jedną z głównych funkcji w tych procesach. Badania proteomiczne pokazują, że w obrębie jąderka występuje szereg białek pełniących kluczowe role w reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Na podstawie najnowszych badań przypuszczać można, że ciała Cajala także mogą uczestniczyć w powyższych procesach, aczkolwiek wydaje się, że jest jeszcze zbyt wcześnie na konstrukcję spójnego modelu reakcji komórki na uszkodzenia DNA z udziałem ciał Cajala. Jąderko, podobnie jak omawiane wcześniej ciała PML, uznać można zatem za czuły sensor uszkodzeń DNA, w którym decydują się przyszłe losy komórki, a więc czy pozostanie ona przy życiu, czy też skierowana zostanie na drogę apoptozy. Rola ciał Cajala w tych procesach stanowi może wyzwanie i cel kolejnych badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Eskiw CH, Bazzett-Jones DP (2002) The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity? *Biochem Cell Biol* 80: 301-310
2. Borden KLB (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 22: 5259-5269
3. Ching RW, Dellaire G, Eskiw CH, Bazzett-Jones DP (2005) PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* 118: 847-854
4. Dellaire G, Ching RW, Dehghani H, Ren Y, Bazzett-Jones DP (2006) The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci* 119: 1026-1033
5. Eskiw CH, Dellaire G, Mymryk JS, Bazzett-Jones DP (2003) Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* 116: 4455-4466
6. Dellaire G, Eskiw CH, Dehghani H, Ching RW, Bazzett-Jones DP (2006) Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J Cell Sci* 119: 1034-1042
7. Salomoni P, Ferguson BJ, Wyllie AH, Rich T (2008) New insights into the role of PML in tumor suppression. *Cell Res* 18: 622-640
8. Kriehoff-Henning E, Hofmann TG (2008) Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2185-2194
9. Luciani JJ, Depetris D, Usson Y, Metzler-Guillemain C, Mignon-Ravix C, Mitchell MJ, Megarbane A, Sarda P, Sirma H, Moncla A, Feunteun J, Mattei M-G (2006) PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at G2 phase. *J Cell Sci* 119: 2518-2531
10. Dellaire G, Bazzett-Jones DP (2007) Beyond repair foci: subnuclear domains and the cellular response to DNA damage. *Cell Cycle* 6: 1864-1872

11. Ihara M, Yamamoto H, Kikuchi A (2005) SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4. *Mol Cell Biol* 25: 3506-3518
12. St-Germain JR, Chen J, Li Q (2008) Involvement of PML nuclear bodies in CBP degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Epigenetics* 3: 342-349
13. Fasching CL, Neumann AA, Muntoni A, Yeager TR (2007) DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) – associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res* 67: 7072-7077
14. Condemine W, Takahashi Y, Le Bras M, de The H (2007) A nucleolar targeting signal in PML-1 addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J Cell Sci* 120: 3219-3227
15. Ulrich HD (2009) The SUMO system: An overview. *Methods Mol Biol* 497: 3-16
16. Synowiec E, Książek D, Błasiak J, Woźniak K (2008) Rola modyfikacji SUMO w utrzymaniu stabilności genomowej. *Postepy Biochem* 54: 1-8
17. Palvimo JJ (2007) PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Bioch Soc Trans* 35: 1405-1408
18. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 45-50
19. Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T (2008) Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420-24425
20. Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26: 963-977
21. Varadaraj A, Dovey CL, Laredj L, Ferguson B, Alexander CE, Lubben N, Wyllie AH, Rich T (2007) Evidence for the receipt of DNA damage stimuli by PML nuclear domains. *J Pathol* 211: 471-480
22. Dellaire G, Ching RW, Ahmed K, Jalali F, Tse KCK, Bristow RG, Bazett-Jones DP (2006) Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2 and ATR. *J Cell Biol* 175: 55-66
23. Bøe SO, Haave M, Jul-Larsen Å, Grudic A, Bjerkvig R, Lønning PE (2006) Promyelocytic leukemia nuclear bodies are predetermined processing sites for damaged DNA. *J Cell Sci* 119: 3284-3295
24. Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, Chang KS (2003) PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol Cell Biol* 23: 4247-4256
25. Tembe V, Henderson BR (2007) Protein trafficking in response to DNA damage. *Cell Signal* 19: 1113-1120
26. Rao VA, Fan AM, Meng LH, Doe CF, North PS, Hickson ID, Pommier Y (2005) Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase III $\alpha$ , and colocalisation with  $\gamma$ -H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol Cell Biol* 25: 8925-8937
27. Otterlei M, Bruheim P, Ahn B, Bussen W, Karmakar P, Baynton K, Bohr VA (2006) Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest. *J Cell Sci* 119: 5137-5146
28. Petkovic M, Dietschy T, Freire R, Jiao R, Stagljar I (2005) The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability. *J Cell Sci* 118: 4261-4269
29. de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, Lowe SW (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13: 523-535
30. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406: 207-210
31. Haupt S, Louriya-Hayon I, Haupt Y (2003) P53 licensed to kill? Operating the assassin. *J Cell Biochem* 88: 76-82
32. Tsai RY, Meng L (2009) Nucleostemin: a latecomer with new tricks. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 2122-2124
33. Stark LA, Taliansky M (2009) Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the nucleolus and disease. *EMBO rep* 10: 35-40
34. Montanaro L, Trerè D, Derenzini M (2008) Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol* 173: 301-310
35. Tembe V, Henderson BR (2007) Protein trafficking in response to DNA damage. *Cell Signal* 19: 1113-1120
36. Mayer C, Grummt I (2005) Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* 4: 1036-1038
37. Lechertier T, Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P (2007) A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *J Cell Sci* 120: 265-275
38. Tsai RYL, McKay RDG (2005) A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 153: 179-184
39. Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D (2005) Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 16: 2395-2413
40. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433: 77-83
41. Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, Janin A, de The H (2006) Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* 66: 6192-6198
42. Li J, Tan J, Zhuang L, Banerjee B, Yang X, Fung Ling Chau J, Lee PL, Hande MP, Li B, Yu Q (2007) Ribosomal protein S27-like, a p53-inducible modulator of cell fate in response to genotoxic stress. *Cancer Res* 67: 11317-11326
43. Guo Z, Qian L, Liu R, Dai H, Zhou M, Zheng L, Shen B (2008) Nucleolar localization and dynamic roles of flap endonuclease 1 in ribosomal DNA replication and damage repair. *Mol Cell Biol* 28: 4310-4319
44. Bergink S, Jentsch S (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modification in DNA repair. *Nature* 458: 461-467
45. Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, Jentsch S, Rothstein R, Aragón L, Lisby M (2007) The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* 9: 923-931
46. Eckert-Boulet N, Lisby M (2009) Regulation of rDNA stability by sumoylation. *DNA Repair* 8: 507-516
47. Woo LL, Futami K, Shimamoto A, Furuichi Y, Frank KM (2006) The Rothmund-Thomson gene product RECQL4 localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. *Exp Cell Res* 312: 3443-3457
48. Meder VS, Boeglin M, de Murcia G, Schreiber V (2004) PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci* 118: 211-222
49. Maignel DA, Jones L, Chakravarty D, Yang C, Carrier F (2004) Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol* 24: 3703-3711
50. Colombo E, Bonetti P, Denchi EL, Martinelli P, Zamponi R, Marine JC, Helin K, Falini B, Pelicci PG (2005) Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19<sup>Arf</sup> protein stability. *Mol Cell Biol* 25: 8874-8886
51. Gjerset RA (2006) DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *J Mol Histol* 37: 239-251
52. Cioce M, Lamond AI (2005) Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 105-131
53. Zienkiewicz K, Niedojadło J (2004) Natura i funkcje ciała Cajala w świetle nowych badań. *Post Biol Kom* 31: 313-327
54. Morris GE (2008) The Cajal body. *Biochem Biophys Acta* 1783: 2108-2115
55. Kołowerzo A, Smoliński DJ, Bednarska E (2009) Poly(A) RNA a new component of Cajal bodies. *Protoplasma* 236: 13-19
56. Sun J, Xu H, Subramony SH, Hebert MD (2005) Interactions between coilin and PIASy partially link Cajal bodies to PML bodies. *J Cell Sci* 118: 4995-5003
57. Navascues J, Bengoechea R, Tapia O, Casafont I, Berciano MT, Lafarga M (2008) SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163: 137-146

58. Cioce M, Boulon S, Matera AG, Lamond AI (2006) UV-induces fragmentation of Cajal bodies. *J Cell Biol* 175: 401-413
59. Malatesta M, Scassellati C, Meister G, Plöttner O, Bühler D, Sowa G, Martin TE, Keidel E, Fisher U, Fakan S (2004) Ultrastructural characterisation of a nuclear domain highly enriched in survival of motor neuron (SMN) protein. *Exp Cell Res* 292: 312-321
60. Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL (2002) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J Biol Chem* 277: 2852-2859
61. Trülsch B, Garnett C, Davies K, Wood M (2007) Knockdown of SMN by RNA interference induces apoptosis in differentiated P19 neural stem cells. *Brain Res* 1183: 1-9
62. Barcaroli D, Dinsdale D, Neale MH, Bongiorno-Borbone L, Ranalli M, Munarriz E, Sayan AE, McWilliam JM, Smith TM, Fasa E, Knight RA, Melino G, De Laurenzi V (2006) FLASH is an essential component of Cajal bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14802-14807
63. Krieghoff E, Milovic-Holm K, Hofmann TG (2007) FLASH meets nuclear bodies. CD95 receptor signals *via* a nuclear pathway. *Cell Cycle* 6: 771-775
64. Sleeman JE (2004) Dynamics of the mammalian nucleus: can microscopic movements help us to understand our genes. *Phil Trans R Soc Lond A* 362: 2775-2793

## Involvement of nuclear domains in the cellular response to DNA damage

Daniel Wysokinski, Janusz Blasiak, Katarzyna Wozniak✉

Department of Molecular Genetics, University of Lodz, 12/16 Banacha St., 90-237 Lodz, Poland

✉e-mail: wozniak@biol.uni.lodz.pl

**Key words:** PML nuclear bodies, nucleolus, Cajal bodies, DNA damage and repair, apoptosis

### ABSTRACT

All cells of human organism are continuously damaged, and a damage of the genetic material can be especially dangerous. The reaction of the cell to DNA damage is a complex process, which includes damage signaling, repair, apoptosis or cell death. It is connected with serious changes in the cell nucleus, which are caused by posttranslational modifications and dynamic relocalizations of proteins as well as alterations in the expression of many genes. These changes are not limited to the sites of DNA damage, but involve whole cell nucleus, including its domains: PML bodies, nucleolus and Cajal bodies.



# Termodynamiczne aspekty oddziaływania niskocząsteczkowych ligandów z DNA

## STRESZCZENIE

DNA jest celem molekularnym dla wielu antybiotyków oraz leków przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych. Coraz pełniejsze poznanie genomu człowieka stwarza unikalną możliwość stworzenia w niedalekiej przyszłości nowej generacji leków o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych, których mechanizm działania polegać będzie na wybiórczym blokowaniu wybranych genów, w tym genów odpowiedzialnych za transformację nowotworową i niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych. Wymaga to jednak poszerzenia wiedzy na temat wybiórczego oddziaływania niskocząsteczkowych ligandów z określonymi sekwencjami DNA. Jedną z dróg uzyskania takich informacji jest termodynamiczny opis kompleksów ligand-DNA. Rozwój technik pomiarów mikrokalorymetrycznych pozwala na bezpośrednie i precyzyjne wyznaczenie profilu termodynamicznego procesu powstawania kompleksu. Uzyskanie pełnego profilu termodynamicznego pozwala określić udział poszczególnych rodzajów oddziaływań w trwałości, strukturze i selektywności powstających kompleksów.

## WPROWADZENIE

Coraz pełniejsze poznanie genomu człowieka stwarza unikalną możliwość wybiórczego blokowania wybranych genów, w tym genów odpowiedzialnych za transformację nowotworową i niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych. Uważa się, że najskuteczniejszym sposobem wyciszenia aktywności niepożądanych genów jest uniemożliwienie ich ekspresji na jak najwcześniejszym etapie poprzez zablokowanie sekwencji promotorowych. Regulacja na dalszych etapach, np. poprzez blokowanie lub degradację mRNA, może być dużo mniej skuteczna. Wybiórcze zablokowanie genów zaangażowanych w podstawowe procesy podziału komórkowego przez specyficznie wiążące się z nimi ligandy spowoduje zatrzymanie podziałów komórkowych, co jest szczególnie ważne nie tylko w terapii przeciwnowotworowej, ale również przeciwwirusowej.

Nasuającym się podejściem w tak zaprojektowanej terapii jest zastosowanie krótkich, syntetycznych fragmentów jednoniciowego DNA o odpowiednio dobranej sekwencji. Oligonukleotydy po dotarciu do wnętrza komórki mogą bowiem tworzyć silne i trwałe kompleksy zarówno z dwuniciowym DNA jak i jednoniciowym RNA wpływając na ekspresję genów na różnych poziomach [1]. Informacje na temat prób zastosowania takich cząsteczek w terapii szeregu chorób pojawiły się w literaturze już w latach 70. ubiegłego stulecia [2]. Możliwe jest zaprojektowanie oligonukleotydów o takiej wielkości i sekwencji, że wiążąc się będą silnie i selektywnie jedynie z sekwencjami promotorowymi zasad w podwójnej helisie DNA [1]. Nadzieje związane z oligonukleotydami antysensowymi okazały się jednak zbyt optymistyczne. Krótkie fragmenty jednoniciowego DNA wprowadzone do organizmu ulegają bowiem szybkiej degradacji przez nukleazy obecne w surowicy. Ich średni okres półtrwania jest krótszy niż 15 min [3], co uniemożliwia dotarcie związku do jego celu molekularnego. Zastosowane modyfikacje chemiczne zabezpieczające przed działaniem enzymów wpływają niekorzystnie na i tak trudny transport oligonukleotydów przez błony komórkowe. Zdolność do wiązania się z określonymi sekwencjami DNA wykazują również niektóre białka. Przy próbach wykorzystania białek jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych występują również problemy z ich transportem i trwałością [4].

Niskocząsteczkowe ligandy zdolne do wybiórczego wiązania się z wybranymi, krótkimi sekwencjami par zasad są zatem obiecującą alternatywą zarówno klasycznych leków przeciwnowotworowych, jak i oligonukleotydów antysensowych. Aktualny stan wiedzy na temat takich ligandów jest jednak niezadowalający i wymaga intensywnych badań eksperymentalnych w celu ustalenia elementów struktury odpowiedzialnych za selektywne wiązanie się z wybranymi sekwencjami oraz określenia oddziaływań fizykochemicznych odpowiedzialnych za trwałość tych kompleksów.

Karolina Jagiełło

Anita Dopierała

Jan Mazerski

Katedra Technologii Leków i Biochemii,  
Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska, ul.  
Gdańsk

Katedra Technologii Leków i Biochemii,  
Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska, ul.  
Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; tel.: (58)  
347 11 16, e-mail: janmaz@chem.pg.gda.pl

Artykuł otrzymano 11 stycznia 2010 r.  
Artykuł zaakceptowano 17 marca 2010 r.

**Słowa kluczowe:** niskocząsteczkowe ligandy DNA, termodynamika oddziaływania ligand-DNA, interkalacja, wiązanie w małym rowku

**Wykaz skrótów:** DSC – różnicowa kalorymetria skaningowa; ITC – izotermiczna kalorymetria miareczkująca; SPR – technika rezonansu plazmonów powierzchniowych

Oddziaływanie różnorodnych niskocząsteczkowym ligandów z DNA jest obecnie intensywnie badane w wielu laboratoriach na całym świecie [5]. Centralnym celem jest uzyskanie informacji nie tylko na temat struktury kompleksów ligand-DNA i dynamiki tworzenia tych kompleksów, ale także wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu. Zastosowanie pomiarów termodynamicznych dla scharakteryzowania oddziaływań niskocząsteczkowych ligandów z DNA stwarza możliwość uzyskania informacji na temat udziału poszczególnych typów oddziaływań w całkowitej zmianie entalpii swobodnej towarzyszącej utworzeniu kompleksu związku z DNA. Informacja na temat tego, jakie człony składają się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej pozwala ocenić, który fragment struktury związku odpowiada za jego zdolność do selektywnego oddziaływania z wybraną sekwencją DNA.

## SPOSOBY ODDZIAŁYWANIA NISKOCZĄSTECZKOWYCH LIGANDÓW Z DNA

Odkąd poznano budowę i rolę kwasów nukleinowych w żywych organizmach rozpoczęto badania zmierzające do wyjaśnienia wpływu różnorodnych substancji chemicznych na ich strukturę i aktywność. Jednym z ważnych aspektów okazało się poznanie mechanizmu rozpoznawania specyficznych sekwencji podwójnej helisy DNA przez biopolimery oraz związki niskocząsteczkowe.

Rozróżniamy dwa podstawowe mechanizmy oddziaływania substancji chemicznych z dwuniciowym DNA:

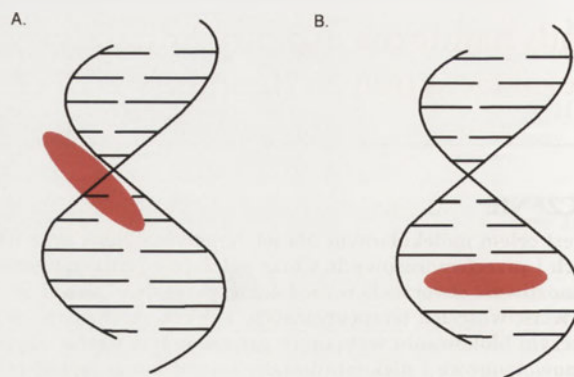
1. związki posiadające odpowiednie grupy funkcyjne (substancje bogate w elektrony, nukleofile, bądź substancje z niedoborem elektronów, elektrofile) mogące tworzyć addukty z DNA poprzez wiązania kowalencyjne;
2. DNA posiada wiele miejsc zdolnych do tworzenia silnych oddziaływań fizykochemicznych. Możliwe jest więc powstawanie względnie trwałych, niekowalencyjnych kompleksów DNA z ligandami o odpowiednich właściwościach.

Ponadto, przyjmuje się powszechnie, że warunkiem utworzenia kowalencyjnego adduktu z DNA jest wcześniej powstanie kompleksu niekowalencyjnego.

Wyróżniamy dwa podstawowe sposoby niekowalencyjnego oddziaływania niskocząsteczkowych związków chemicznych z DNA zaprezentowane schematycznie na Ryc. 1: interkalacja oraz wiązanie w małym rowku DNA [6]. Procesy te mogą być poprzedzone oddziaływaniami elektrostatycznymi, które ułatwiają dotarcie związków w pobliże podwójnej helisy DNA. W celu racjonalnego projektowania nowych ligandów zdolnych do specyficznego oddziaływania z DNA niezbędne jest dokładne zrozumienie sposobu, w jaki cząsteczki rozpoznają sekwencję i wiążą się z DNA.

### INTERKALACJA

Interkalacja została po raz pierwszy opisana przez Lermana [7] w roku 1961. Typowe interkalatory to związki



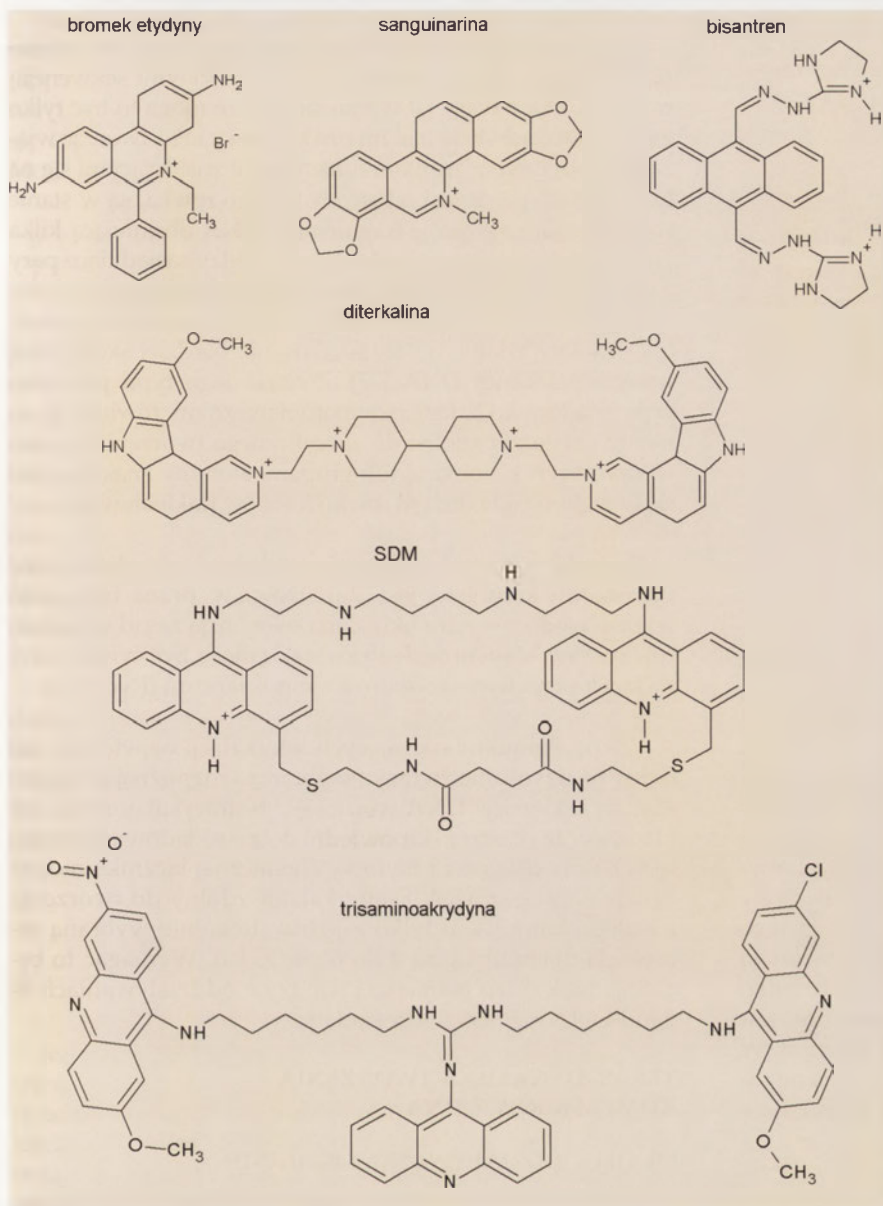
Rycina 1. Sposoby niekowalencyjnego oddziaływania ligandów z DNA. A – wiązanie w rowku, B – interkalacja.

posiadające płaski, skondensowany układ pierścieni aromatycznych lub heteroaromatycznych, który może wnikać pomiędzy sąsiednie pary zasad w helisie DNA. Struktury wybranych interkalatorów, bromku etydyny oraz sanguinaryny, przedstawiono na Ryc. 2. Powstający w ten sposób kompleks jest stabilizowany przez oddziaływanie typu  $\pi$ - $\pi$  płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi zasad. Interkalacja powoduje zmiany w strukturze DNA, skutkujące rozwinięciem helisy, jej usztywnieniem oraz wydłużeniem [8]. Większość klasycznych interkalatorów tworzy najtrwalsze kompleksy pomiędzy parami zasad GC, chociaż znane są również interkalatory o innych preferencjach [9].

Oprócz klasycznych interkalatorów znane są związki o bardziej skomplikowanym mechanizmie oddziaływania z DNA. Interkalacja odgrywa w tym mechanizmie kluczową rolę jednakże specyficzna budowa ligandu wymusza nietypową strukturę kompleksu (Ryc. 3).

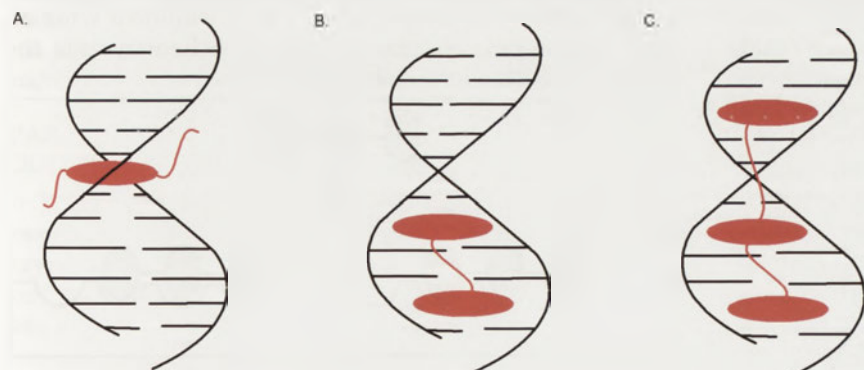
Wśród cząsteczek tego typu wyróżnić można:

1. interkalatory przebijające [10], (ang. *threading intercalators*), które mają duże podstawniki po przeciwnych stronach interkalującego układu aromatycznego. Płaski układ wnika pomiędzy pary zasad, a podstawniki lokują się w małym i dużym rowku helisy DNA (Ryc. 3A). W celu utworzenia kompleksu jeden z podstawników musi „przejsć” pomiędzy parami zasad, co wymaga odkształcenia struktury helisy. Proces przebiega wolniej niż w przypadku klasycznych interkalatorów, natomiast powstający kompleks jest bardziej stabilny. Przykładem tego typu cząsteczek jest bisantren (Ryc. 2);
2. bisinterkalatory, w których strukturze występują dwa połączone alifatycznym łącznikiem układy skondensowanych pierścieni aromatycznych (Ryc. 3B). Najczęściej związki tego typu wykazują większe powinowactwo do podwójnej helisy DNA niż pojedyncze układy wielopierścieniowe wchodzące w ich skład. Przykładem bisinterkalatora jest syntetyczny lek przeciwnowotworowy, diterkalina (Ryc. 2). Diterkalina tworzy kompleks z d(CGCG)<sub>n</sub>, w którym dwa układy aromatyczne interkalują do dwóch miejsc CpG, pomijając środkowy układ GpC w duplekcie, a sztywny łącznik lokuje się w dużym rowku [11-13].



Rycina 2. Struktury chemiczne interkalatorów.

Interkalacja do sąsiednich miejsc w duplekcie jest zdecydowanie niekorzystna, co prawdopodobnie wiąże się z sumarycznym wpływem efektów sterycznych, elektrostatycznych i czynników konformacyjnych szkieletu DNA.



Rycina 3. Schemat nieklasycznego oddziaływania interkalatorów z DNA. A – Interkalatory przebijające, B – bisinterkalatory, C – multiinterkalatory.

Bisinterkalatory mogą mieć identyczne lub różne układy skondensowanych pierścieni zdolnych do interkalacji. Stwierdzono, że również budowa i długość łącznika ma istotny wpływ na zdolność do wiązania się z DNA [14];

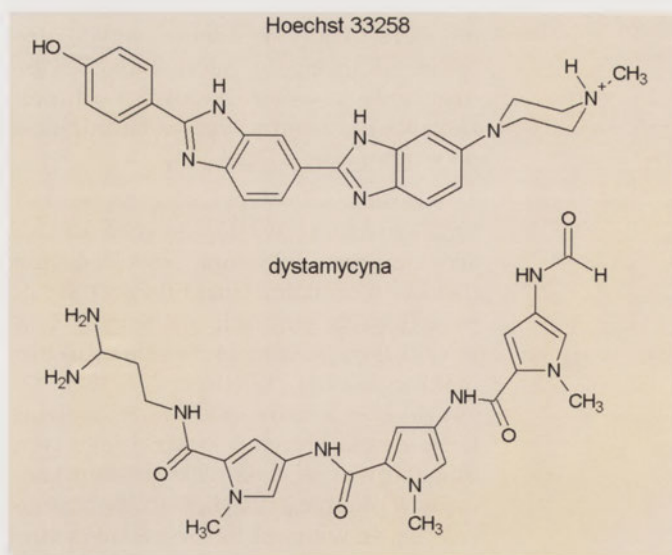
3. bisinterkalatory przebijające, w których strukturze występują dwa układy aromatyczne połączone kowalencyjnie dwoma łącznikami znajdującymi się po przeciwnych stronach pierścieni. Częściki tego typu mają zwykle strukturę makrocykliczną [15] (Ryc. 2, SDM). Nie jest do końca jasny mechanizm molekularny dzięki któremu związki tego typu mogą utworzyć kompleks bisinterkalacyjny w obrębie jednej helisy DNA. Sugeruje się, że wymaga to rozerwania jednej z nici helisy;

4. multiinterkalatory, mające kilka układów aromatycznych, z których jednak tylko trzy mogą równocześnie interkalować do DNA [16], schematycznie taki sposób interkalacji przedstawiono na rycinie 3C (przykładową strukturę multiinterkalatora zaprezentowano na rycinie 2, trisaminoakrydyna).

#### ZWIĄZKI ODDZIAŁUJĄCE W MAŁYM ROWKU DNA

Związki oddziałujące z DNA w małym rowku posiadają najczęściej kilka pierścieni aromatycznych (np fenylowych, furanowych, pirolowych) połączonych w taki sposób, aby możliwa była rotacja pierścieni i dopasowanie związku do kształtu rowka (Ryc. 1). Kompleksy tego typu stabilizowane są przez szereg oddziaływań niekowalencyjnych, przede wszystkim wiązań wodorowych oraz w pewnym stopniu oddziaływań van der Waalsa i oddziaływań hydrofobowych. Większość dotychczas poznanych molekuł oddziałujących z DNA w małym rowku wykazuje preferencje w stosunku do fragmentów DNA bogatych w pary AT. Głównie wynika to z faktu, iż preferencyjnie dochodzi do utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu związanym z węglem C2 tyminy lub atomem N3 adeniny oraz donorami tych wiązań występującymi w strukturze związku [17]. Wiele związków tej klasy to powszechnie stosowane barwniki oraz leki.

Barwnik Hoechst 33258 (Ryc. 4) jest prawdopodobnie jednym z najlepiej poznanych związków, które wiążą się w małym rowku podwójnej helisy DNA. Stosowany jest do badania procesu apopto-

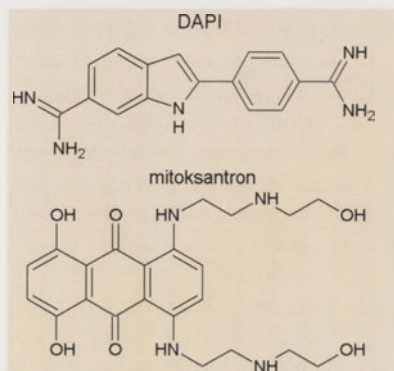


Rycina 4. Struktury chemiczne związków oddziałujących z DNA w małym rowku.

toży, etapów cyklu komórkowego i wybarwienia jąder komórkowych. Związek ten wykazuje preferencję w stosunku do sekwencji A3T3 [18].

Dystamycyna jest to antybiotyk przeciwnowotworowy odkryty w latach 50. (Ryc. 4). Dla utworzenia stabilnego kompleksu z DNA wymagana jest obecność co najmniej 4 par AT [19]. W ostatnim czasie wykazano, że dystamycyna wiąże się z DNA w formie dimeru, wypełniając cały mały rowek helisy [20-22]. Znane są również analogi tego związku charakteryzujące się odmienną selektywnością względem sekwencji DNA [23]. W związkach takich, jeden lub więcej pierścieni N-metylopirolowych zastąpiony jest pierścieniem imidazolowym lub 3-hydroksypirrolowym. W małym rowku wiążą się również poliaminy alifatyczne takie jak spermina i spermidyna [24]. Związki te wiążąc się z DNA, stabilizują jego strukturę helikalną.

Wśród związków oddziałujących z DNA występują cząsteczki, które w zależności od sekwencji zasad podwójnej helisy i warunków reakcji, mogą oddziaływać z DNA bądź na drodze interkalacji, bądź poprzez wiązania się w małym rowku. Przykładem takiego związku jest barwnik DAPI (Ryc. 5). W przypadku fragmentów DNA bogatych w pary AT wiążąc ten wiąże się w małym rowku. Powstały kompleks stabilizowany jest wiązaniami



Rycina 5. Struktury chemiczne związków o różnym sposobie wiązania do DNA.

wodnorodnymi utworzonymi przez DAPI z grupami funkcyjnymi znajdującymi się na krawędzi par AT od strony małego rowka. W przypadku fragmentów bogatych w pary GC (brak co najmniej trzech kolejno ułożonych par AT) DAPI ulega interkalacji pomiędzy parami zasad GC [25].

## SEKWENCYJNA SELEKTYWNOŚĆ ODDZIAŁYWAŃ

Z punktu widzenia medycyny na szczególnie zainteresowanie zasługują związki wiążące się z określonymi sekwencjami DNA. Przez wiele lat wydawało się, że mogą to być tylko związki wiążące się w małym rowku. Związki te, tworząc wiązania wodorowe z grupami funkcyjnymi znajdującymi się na krawędziach par zasad od strony małego rowka, są w stanie rozpoznawać sekwencję fragmentów DNA obejmującą kilka par zasad. Interkalatory wchodzą pomiędzy sąsiadujące pary zasad, zatem generalnie charakteryzują się preferencją jedynie względem par AT bądź GC [26]. Ostatnio znaleziono jednak interkalatory zdolne do rozpoznawania bardziej skomplikowanych sekwencji DNA [27]. Związki tego typu posiadają poza płaskim układem heteroaromatycznym również fragmenty cząsteczki zdolne do specyficznego tworzenia wiązań wodorowych z atomami lub grupami atomów znajdującymi się w małym bądź dużym rowku kwasów nukleinowych.

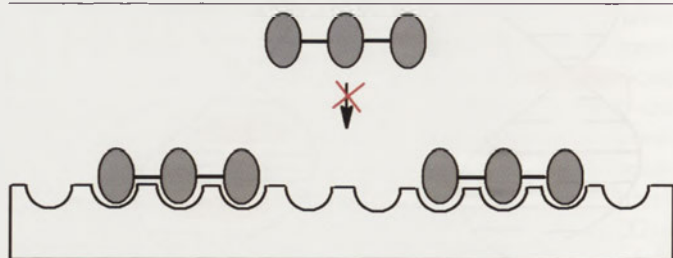
Związki tego typu ulegają interkalacji, a jednocześnie utworzony kompleks jest stabilizowany przez tworzenie wiązań wodorowych z określoną sekwencją zasad w małym rowku. Przykładem takiego związku może być syntetyczny związek przeciwnowotworowy mitoksantron (Ryc. 5).

Wśród ligandów ulegających interkalacji największe nadzieje na uzyskanie związku wybiórczo rozpoznającego pożądaną sekwencję DNA wiąże się z bisinterkalatorami. Zakłada się, że poprzez odpowiedni dobór układów interkalujących oraz długości i budowy chemicznej łącznika można będzie zaprojektować bisinterkalator zdolny do tworzenia trwałego kompleksu tylko z jedną, dowolnie wybraną sekwencją obejmującą od 4 do 6 par zasad. Wymagać to będzie jednak dużo pełniejszej wiedzy o oddziaływaniach ligand-DNA niż obecnie posiadana.

## TERMODYNAMIKA TWORZENIA KOMPLEKSÓW Z DNA

### MODEL ODDZIAŁYWANIA LIGAND-DNA

Zaproponowano szereg modeli opisujących oddziaływanie niskocząsteczkowych ligandów z DNA. Najczęściej stosowanymi są modele z wykluczonym sąsiedztwem (ang. *neighbor exclusion models*), w których podwójna helisa DNA traktowana jest jako nieskończenie długa, jednowymiarowa matryca. Ligand może oddziaływać z więcej niż jedną jednostką matrycy i nie ma on dostępu do miejsc wiązania tworzących ciągi krótsze niż liczba zajmowanych miejsc. Liczba dostępnych miejsc maleje więc nieliniowo wraz ze wzrostem stopnia obsadzenia matrycy. Schematycznie zostało to przedstawione na rycinie 6.



Rycina 6. Schemat oddziaływania liganda z matrycą w modelach z wykluczonym sąsiedztwem.

Najszerze zastosowanie wśród modeli tego typu znalazł model zaproponowany w 1974 przez McGhee i von Hippel [28]. Znane są dwie wersje tego modelu. W wersji prostszej nie uwzględnia się oddziaływań pomiędzy stykającymi się ligandami i wówczas równanie wyprowadzone przez McGhee i von Hippel ma postać:

$$\frac{v}{L} = K(1-nv) \left( \frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right)^{n-1} \quad (1)$$

gdzie: L – molowe stężenie wolnego liganda, v – gęstość wiązania, czyli średnia liczba cząsteczek liganda związana przez jednostkę matrycy ( $v=B/D$ , B – stężenie molowe związanego liganda, D – ogólne molowe stężenie jednostek matrycy), K – wewnętrzna stała wiązania, n – wielkość miejsca wiązania (liczba jednostek matrycy wyeliminowanych jako potencjalne miejsca wiązania, wyrażona w parach zasad). W przypadku zastosowania tego modelu do opisu oddziaływania ligand-DNA jednostką matrycy jest para zasad.

W bardziej rozwiniętej wersji tego modelu bierze się dodatkowo pod uwagę możliwość oddziaływania pomiędzy sąsiadującymi ze sobą ligandami. Parametrem opisującym takie oddziaływania jest parametr kooperatywności  $\omega$ . Równanie wyprowadzone dla oddziaływań z uwzględnieniem parametru kooperatywności ma postać:

$$\frac{v}{L} = K(1-nv) \left( \frac{(2\omega-1)(1-nv)+v-R}{2(\omega-1)(1-nv)} \right)^{n-1} \left( \frac{1-(n+1)v+R}{2(1-nv)} \right)^2$$

gdzie  $R = \sqrt{(1-(n+1)v)^2 + 4\omega v(1-nv)}$  (2)

Jeżeli  $\omega > 1$  to mamy do czynienia z wiązaniem kooperatywnym, czyli obecność związanego liganda sprzyja przyłączeniu w jego najbliższym sąsiedztwie kolejnego liganda. Jeżeli  $\omega < 1$  jest to wiązanie antykooperatywne: obecność związanego liganda przeszkadza związaniu kolejnego liganda w ciągu. Jeżeli  $\omega = 1$  wiązanie jest niekooperatywne, czyli ligand wiąże się z taką samą stałą do wszystkich typów miejsc wiązania. Dla oddziaływań niekooperatywnych równanie (2) sprowadza się do równania (1). Model McGhee-von Hippel nie zawsze daje się zastosować w praktyce, zdarzają się bowiem układy wyraźnie odbiegające od przyjętych założeń. Najczęściej jest to wynikiem: i) dużych różnic w powinowactwie do różnych sekwencji zasad – więcej niż jedna stała wiązania; ii) różnic w stechiometrii wiązania – więcej niż jedna wartość n; iii) oddziaływania ligandu nie tylko z najbliższymi sąsiadami – więcej niż jedna wartość  $\omega$ .

#### PARAMETRY TERMODYNAMICZNE ODDZIAŁYWAŃ LIGAND-DNA

Wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu tworzenia kompleksów ligand-DNA pozwala określić jakie czynniki decydują o powinowactwie liganda do biopolimeru i jakie zjawisko fizykochemiczne jest termodynamiczną siłą napędową tego oddziaływania.

Do najczęściej eksperymentalnie wyznaczanych parametrów termodynamicznych należą: K – wewnętrzna stała

wiązania i  $\Delta H$  – zmiana entalpii oddziaływania. Wyznaczone doświadczalnie wartości stałej wiązania oraz zmiany entalpii oddziaływań wykorzystuje się do obliczenia zmian standardowej entalpii swobodnej układu oraz entropii układu, zgodnie z wzorem:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

Na obserwowaną zmianę entalpii swobodnej składają się zmiany entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych,  $\Delta G_{pe}$  oraz zmiany entalpii swobodnej oddziaływań nieelektrostatycznych (oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania van der Waalsa, inne),  $\Delta G_i$ :

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_i \quad (4)$$

Wartość  $\Delta G_{pe}$  można wyznaczyć korzystając z liniowej zależności logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [MX]. Entalpia swobodna oddziaływań elektrostatycznych może być wówczas obliczona zgodnie z zależnością:

$$\Delta G_{pe} = - \frac{\ln K_1 - \ln K_2}{\ln [MX]_1 - \ln [MX]_2} RT \ln [MX] \quad (5)$$

Z kolei zmianę entalpii swobodnej oddziaływań nieelektrostatycznych można podzielić na 4 czony: i) zmiana entalpii swobodnej konformacyjnych przekształceń DNA i liganda,  $\Delta G_{konf}$ ; ii) zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji podczas kompleksowania,  $\Delta G_{r+t}$ ; iii) zmiana entalpii swobodnej oddziaływań hydrofobowych związana z przejściem ligandu z roztworu do DNA,  $\Delta G_{hyd}$ ; iv) zmiana entalpii swobodnej słabych oddziaływań niekowalencyjnych (oddziaływań van der Waalsa, interakcji dipol-dipol, itd.),  $\Delta G_{mol}$  [29].

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol} \quad (6)$$

Każdy z członów składających się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej, zgodnie z równaniem (6), można wyznaczyć teoretycznie bądź doświadczalnie. Co najmniej dwa czony równania przyjmują zawsze wartości dodatnie ( $\Delta G_{r+t}$ ,  $\Delta G_{konf}$ ). Zatem aby doszło do utworzenia kompleksu pozostałe czony muszą posiadać na tyle dużą wartość ujemną, aby całkowita zmiana entalpii swobodnej była mniejsza od zera. Wykazano, że dla większości interkalatorów oraz związków wiążących się z DNA w małym rowku, członem równania (6) promującym tworzenie kompleksu ligand-DNA jest człon opisujący oddziaływania hydrofobowe,  $\Delta G_{hyd}$  [18].

Znajomość wszystkich członów składających się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej pozwala ocenić, który fragment struktury związku odpowiada za jego zdolność do oddziaływania z DNA, a co za tym idzie za jego aktywność biologiczną. Taka informacja może być użyteczna dla racjonalnego projektowania nowych leków [30].

Podstawowym parametrem termodynamicznym wyznaczanym dla kompleksów ligand-DNA jest wewnętrzna stała wiązania,  $K$ . Wyznaczana jest ona najczęściej metodami spektroskopowymi, poprzez pomiar zmian w widmie związku w trakcie dodawania kolejnych porcji DNA (bądź zmian w widmie DNA miareczkowanego roztworem ligandu) [31]. Uzyskane wyniki prezentuje się najczęściej w postaci wykresu zależności ułamka molowego formy skompleksowanej od logarytmu stosunku stężeń DNA-ligand. Zależność taką analizuje się poprzez numeryczne dopasowanie do danych eksperymentalnych odpowiedniego modelu teoretycznego. Metoda spektrofotometryczna pozwala zatem określić również stechiometrię badanego procesu, czyli wyznaczyć liczbę par zasad biorących udział w wiązaniu jednej cząsteczki związku.

Inną metodą jest technika rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR, ang. *Surface Plasmon Resonance*), która umożliwia badanie zjawisk zachodzących na powierzchni warstewki złota, na której immobilizowane są cząsteczki DNA. Tak skonstruowany chip oraz chip referencyjny (bez DNA) omywane są roztworem liganda o zadanym stężeniu. Jednocześnie rejestruje się zmiany wartości współczynnika załamania światła przy powierzchni chipu. Pozwala to z jednej strony ocenić dynamikę tworzenia kompleksu, a z drugiej dostarcza informacji o stopniu obsadzenia DNA cząsteczkami liganda. Uzyskane dane prezentuje się graficznie w postaci krzywej wiązania, do której dopasowuje się numerycznie odpowiedni model oddziaływań [29,32].

Obie te metody pozwalają ponadto wyznaczyć zmiany entalpii oddziaływania związku z DNA, co wymaga jednak przeprowadzenia doświadczenia w co najmniej dwóch różnych temperaturach. Wartości tej funkcji termodynamicznej można wyznaczyć wykorzystując równanie van't Hoffa, opisujące zależność stałej wiązania od temperatury, zgodnie z wzorem [33]:

$$\frac{\ln K_{T_1} - \ln K_{T_2}}{T_1 - T_2} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (7)$$

gdzie  $K$  – stała wiązania,  $\Delta H$  – zmiana entalpii reakcji,  $R$  – stała gazowa,  $T$  – temperatura wyrażona w kelwinach.

Wartości parametrów termodynamicznych wyznaczonych omówionymi powyżej metodami obarczone są jednak zwykle dużą niepewnością pomiarową. Wynika to z pośredniego sposobu ich wyznaczania. Dlatego dużym zainteresowaniem cieszą się metody bezpośredniego, kalorymetrycznego wyznaczania zmian entalpii oddziaływania. Najczęściej stosowane są w tym celu: izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC, ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) oraz różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC, ang. *Differential Scanning Calorimetry*).

W metodzie ITC następuje bezpośredni pomiar zmian efektów cieplnych w czasie dodawania związku do układu zawierającego kwas nukleinowy. Informacje na temat stechiometrii reakcji oraz stałej wiązania można uzyskać tą

techniką podczas jednego doświadczenia. Miareczkowanie z zastosowaniem metody ITC wykorzystano również do badania kinetyki oddziaływań makrocząsteczek [34,35]. Obecnie technika ITC znajduje coraz szersze zastosowanie, ze względu na prostotę jej wykonania oraz dokładność uzyskiwanych wyników [36,37].

Druga metoda, DSC, wnosi użyteczne informacje o temperaturze przejść oraz zmianach pojemności cieplnej, które są wykrywane, kiedy próbka jest ogrzewana w szerokim zakresie temperatur. Na podstawie profili cieplnych może być badana ponadto odwracalność reakcji. Wszystko to umożliwia oszacowanie czynników stanowiących siłę napędową reakcji [38,39].

## INTERPRETACJA PARAMETRÓW TERMODYNAMICZNYCH

Badania termodynamiki niekowalencyjnych oddziaływań niskocząsteczkowych ligandów z DNA wykazały, iż zmiany entalpii są głównie wynikiem zmian w układzie wiązań wodorowych [40,41]. Dodatnia wartość zmian entropii jest wynikiem uwalniania cząsteczek wody z warstwy oddziaływań międzycząsteczkowych, natomiast ujemna wartość tej funkcji termodynamicznej jest związana ze zmianami konformacyjnymi reagentów [42,43]. Ujemna (często duża) wartość  $\Delta C_p$  połączona z dodatnią wartością zmian entropii układu jest traktowana jako wskaźnik oddziaływań hydrofobowych między molekułami [44].

Ze względu na polianionową strukturę DNA, w analizie termodynamicznej procesu tworzenia kompleksu ligand-DNA należy brać pod uwagę udział w tym procesie oddziaływań elektrostatycznych. Jeśli ligand posiada ładunek dodatni, to będzie przyciągany w pobliże ujemnie naładowanych grup fosforanowych łańcucha kwasu nukleinowego wchodząc w skład podwójnej warstwy elektrycznej otaczającej makrocząsteczkę. Udział kationowego ligandu w tworzeniu tej warstwy zależy silnie od stężenia innych kationów w roztworze. Skutkuje to zależnością stałej wiązania  $K$  od stężenia soli w mieszaninie reakcyjnej [45].

## PRZYKŁADY ANALIZY TERMODYNAMICZNEJ KOMPLEKSÓW LIGAND/DNA

### LIGANDY WIĄŻĄCE SIĘ W MAŁYM ROWKU DNA

Wszystkie dotychczas zbadane związki wiążące się z DNA w małym rowku posiadały podobne profile termodynamiczne, dla wszystkich uzyskano ujemną wartość  $\Delta C_p$ . Tak więc główną siłą napędową oddziaływania niskocząsteczkowego związku z DNA w małym rowku jest transfer cząsteczki z roztworu w pobliże dupleksu. Stwierdzono, iż tworzeniu kompleksu towarzyszy wysoce energetyczny efekt hydrofobowy oraz silny wzrost entropii układu w wyniku uwalniania cząsteczek wody i podstawiania przeciwnionów podwójnej warstwy elektrycznej przez kationy ligandu. Dodatnia zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji w wyniku kompleksowania jest kompensowana przez  $\Delta G_{\text{hyd}}$  oraz  $\Delta G_{\text{pe}}$ . Dane uzyskane dla kilku związków przedstawione zostały w tabeli 1 [18,46,47].

Tabela 1. Parametry termodynamiczne dla oddziaływań kilku związków z A3T3 w temperaturze 25°C.

Związek	$\Delta G_{obs}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	K (*10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta C_p$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{hyd}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
Hoechst 32258 [15]	-7,7	+4,4	+12,1	0,46	-330	-26,4
netropsyna [46]	-8,6	-5,8	+2,9	2,44	-213	-17,0
berenil [47]	-8,0	+0,6	+8,6	0,75	-146	-11,7

## INTERKALATORY

Podobnie jak dla związków, które wiążą się z podwójną helisą w jej małym rowku, tworzeniu kompleksu DNA-interkalator towarzyszy silny efekt hydrofobowy, związany z transportem molekuł z roztworu do kompleksu. W przypadku interkalatorów dodatnia zmiana entalpii swobodnej związanej z utratą swobody rotacji i translacji jest kompensowana nie tylko przez  $\Delta G_{hyd}$ , ale również przez istotny wkład energetyczny wynikający z oddziaływań niekowalencyjnych. Wy tłumaczyć to można faktem, iż w przypadku związków wiążących się z DNA w małym rowku, nie powstają żadne „nowe” oddziaływania: najczęściej cząsteczka wody zostaje podstawiona cząsteczką liganda. Natomiast w przypadku interkalatorów, związek wchodząc pomiędzy pary zasad „tworzy” nowe silne oddziaływania. Ponadto, interkalatory wchodząc pomiędzy pary zasad powodują częściowe rozwinięcie helisy i jej wydłużenie, natomiast brak jest doniesień o zmianach konformacyjnych w strukturze związków, czego wynikiem jest niezerowa wartość  $\Delta G_{konf}$  [6,48]. Zatem proces tworzenia kompleksu DNA-interkalator może hipotetycznie przebiegać w dwóch etapach [49]: 1) DNA → DNA\* i 2) DNA\* + Ligand → DNA\*Ligand. W pierwszym etapie cząsteczka kwasu nukleinowego ulega konformacyjnym zmianom (rozwinęciu) umożliwiając późniejszą interkalację. W drugim etapie związek wiąże się z rozwiniętą cząsteczką DNA. Parametry termodynamiczne dla wybranych interkalatorów przedstawione zostały w tabeli 2.

Tabela 2. Przykłady parametrów termodynamicznych oddziaływań ctDNA-interkalator w temperaturze 25°C, 10 mM NaCl [50].

Związek	$\Delta G_{obs}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	K (*10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta C_p$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{hyd}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
sanguinarina	-8,15	-6,98	1,17	1,21	-140,80	-11,26
bromek etydyny	-8,41	-8,23	0,18	1,90	-159,77	-12,78

## LIGANDY WIĄŻĄCE SIĘ W MAŁYM ROWKU BĄDŹ INTERKALUJĄCE

Zastosowanie różnych technik spektroskopowych i kalorymetrycznych do badań oddziaływań pomiędzy DNA

Tabela 3. Parametry termodynamiczne dla oddziaływań DAPI-DNA.

Mechanizm	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	K (M <sup>-1</sup> )
interkalacja	-	-8,0 [52]	-	1,2×10 <sup>5</sup> [53]
wiązanie w małym rowku wiązanie z A2T2 w 25°C [52]	-10,6	-4,4	+6,2	5,5×10 <sup>4</sup>

i DAPI pozwoliło potwierdzić, iż związek ten może tworzyć dwa różne kompleksy z DNA charakteryzujące się różnym powinowactwem związku do kwasu [50,51]. Wiązanie DAPI do poly[d(A-T)] jest silniejsze (stała wiązania jest około

1000 razy większa) i bardziej kooperatywne niż wiązanie molekuły do poly[d(G-C)] [52]. Profil termodynamiczny uzyskany dla oddziaływań DAPI z cząsteczką DNA bogatą w pary AT okazał się analogiczny jak dla netropsyny. Procesowi tworzenia kompleksu towarzyszy silny wzrost entropii układu w wyniku uwalniania cząsteczek wody i podstawiania przeciwjonów podwójnej warstwy elektrycznej przez kationy ligandu. Dane uzyskane przedstawione zostały w tabeli 3. Niewielka jest natomiast ilość doniesień dotyczących termodynamiki interkalacji DAPI do podwójnej helisy DNA. Wykazano jedynie, iż zmiana entalpii tego oddziaływania wynosi -8 kcal/mol.

## PODSUMOWANIE

W ostatnim czasie wiele ośrodków naukowych podjęło próby zastosowania rozważań termodynamicznych dla scharakteryzowania oddziaływań niskocząsteczkowych ligandów z DNA. Takie podejście stwarza bowiem możliwość uzyskania informacji na temat udziału poszczególnych typów oddziaływań (oddziaływań elektrostatycznych, hydrofobowych, van der Waalsa itd.) w całkowitej zmianie entalpii swobodnej towarzyszącej utworzeniu kompleksu związku z DNA. Informacja na temat tego, jakie człony składają się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej pozwoli ocenić, który fragment struktury związku odpowiada za jego zdolność do oddziaływania z DNA. Zastosowanie dodatkowo DNA o różnych sekwencjach zasad pozwoli określić preferencje związków, w tym również elementów

ich struktury do określonych nukleotydów lub ich sekwencji. Taka wiedza, wraz z wiedzą na temat genomu człowieka jest potrzebna dla racjonalnego projektowania nowych leków przeciw-

nowotworowych i przeciwwirusowych o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych. Specyficzne wiązanie małych ligandów z określonymi sekwencjami nukleotydów to jednak zagadnienie istotne nie tylko z punktu widzenia projektowania nowych chemoterapeutyków. Zagadnienie

to może być również kluczowe w terapii wielu chorób o podłożu genetycznym umożliwiając regulację ekspresji genów wybranych białek. Obserwowany szybki rozwój diagnostyki chorób o podłożu genetycznym pozwala na rozpoczęcie ich leczenia zanim pojawią się objawy fizjologiczne.

Zastosowanie niskocząsteczkowych ligandów jako potencjalnych leków chorób o podłożu genetycznym jest jednak znacznie ograniczone. Wynika to głównie z wciąż niepełnej wiedzy na temat mechanizmu rozpoznawania sekwencji zasad podwójnej helisy DNA przez cząsteczki chemiczne. W prowadzonych obecnie badaniach wykorzystuje się technikę *in vitro* i nie ma pewności, że obserwowana w tych warunkach wysoka selektywność sekwencyjna potwierdzi się również w komórkach. Nie można również wykluczyć występowania efektów ubocznych takiej terapii wynikających z występowania sekwencji docelowej w regionach promotorowych różnych białek. Zgromadzona dotychczas wiedza pozwala mieć jednak nadzieję na uzyskanie w niedalekiej przyszłości nowej generacji leków o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Wraight CJ, White PJ (2001) Antisense oligonucleotides in cutaneous therapy. *Pharmacol Ther* 90: 89-104
2. Zamecnik PC, Stephenson ML (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 280-284
3. Heidenreich O, Kang S-H, Xu X, Nerenberg M (1995) Application of antisense technology to therapeutics. *Mol Med Today* 1: 128-133
4. Torchilin VP, Lukyanov AN (2003) Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discov Today* 8: 259-266
5. Chaires JB (1998) Drug-DNA interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8: 314-320
6. Haq I (2002) Part II: The thermodynamics of drug-bipolymer interaction. Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys* 403: 1-15
7. Luzzati V, Masson F, Lerman LS (1961) Interaction of DNA and proflavine: a small-angle x-ray scattering study. *J Mol Biol* 3: 634-639
8. Suh D, Chaires JB (1995) Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorg Med Chem* 3: 723-728
9. Ren J, Chaires JB (1999) Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* 38: 16067-16075
10. Tanious FA, Yen SF, Wilson WD (1991) Kinetic and equilibrium analysis of a threading intercalation mode: DNA sequence and ion effects. *Biochemistry* 30: 1813-1819
11. Gao Q, Williams LD, Egli M, Rabinovich D, Chen SI, Quigley GJ, Rich A (1991) Drug-induced DNA repair: X-ray structure of DNA-ditercalinium complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2422-2426
12. Williams LD, Gao Q (1992) DNA-ditercalinium interactions: implications for recognition of damaged DNA. *Biochemistry* 31: 4315-4324
13. Delbarre A, Delepierre M, Garbay C, Igolen J, Le Pacq JB, Roques BP (1987) Geometry of antitumor drug Ditercalinium bisintercalated into d(CpGpCpG)<sub>2</sub> by <sup>1</sup>H NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2155-2159
14. Stańczak A, Szumilak M (2009) Bisinterkalatory jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. *Wiadomości Chemiczne* 63: 847-875
15. Veal JM, Li Y, Zimmerman SC, Lamberson CR, Cory M, Zon G, Wilson WD (1990) Interaction of a macrocyclic bisacridine with DNA. *Biochemistry* 29: 10918-10927
16. Wirth M, Buchardt O, Koch T, Nielsen PE, Norden B (1998) Interactions between DNA and mono-, bis-, tris-, tetrakis-, and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study. *J Am Chem Soc* 110: 932-939
17. Wemmer DE, Dervan PB (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Curr Opin Struct Biol* 7: 355-361
18. Haq I, Ladbury JE, Chowdhry BZ, Jenkins TC, Chaires JB (1995) Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J Mol Biol* 271: 244-257
19. Wang AHJ, Teng M (1990) Crystallographic and modeling methods in molecular design. Springer-Verlag New York str.123-150
20. Wemmer DE (2000) Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 439-461
21. Pelton JG, Wemmer DE (1989) Structural characterization of a 2:1 distamycin A-d(CGCAAATTTGAC) complex by two-dimensional NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5723-5727
22. Wang L, Kumar A, Boykin DW, Bailly C, Wilson WD (2002) Comparative thermodynamics for monomer and dimer sequence-dependent binding of a heterocyclic dication in the DNA minor groove. *J Mol Biol* 317: 361-374
23. Woods CR, Faucher N, Eschgfäller B, Bair KW, Boger DL (2002) Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 2647-2650
24. Wemmer DE, Dervan PB (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Curr Opin Struct Biol* 7: 355-361
25. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RJ, Fox K, Wydra RL, Strowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29: 8452-8461.
26. Muller W, Crothers DM (1975) Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *Eur J Biochem* 54: 267-277
27. Chaires JB, Leng F, Przewłoka T, Fokt I, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W (1997) Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J Med Chem* 40: 261-266
28. McGhee JD, von Hippel PH (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol* 86: 469-489
29. Mazur S, Tanious FA, Ding D, Kumar A, Boykin DW, Simpson IJ, Neidle S, Wilson WD (2000) A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation. *J Mol Biol* 300: 321-337
30. Ladbury JE (2002) Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochimica Acta* 380: 209-215
31. Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 73: 804-808
32. Davis TM, Wilson WD (2001) Surface plasmon resonance biosensor analysis of RNA-small molecule interactions. *Methods Enzymol* 340: 22-51
33. Tellinghuisen J (2004) Van't Hoff analysis of K (T): How good ... or bad? *Biophys Chem* 326: 125-127
34. Todd MJ, Gomez J (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Analytic Biochem* 296: 19-23
35. Spencer SD, Raffa RB (2004) Isothermal titration calorimetric study of Rnase-A kinetics (cCMP→3'-CMP) involving end-product inhibition. *Pharmaceutic Reas* 21: 1642-1647
36. Naghibi H (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5597-5599
37. Liu Y, Sturevant JM (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. *Protein Sci* 4: 2559-2561
38. Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D, Fokt I, Przewłoka T, Priebe W (1996) Parsing the Free Energy of Anthracycline Antibiotic Binding to DNA. *Biochemistry* 35: 2047-2053
39. Chaires JB (1997) Energetics of Drug-DNA Interactions. *Biopolymers* 44: 201-215
40. Velazquez-Campoy A (2001) The binding energetics of first and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. *Arch Biochem Biophys* 390: 169-175
41. Holdgate GA (2001) Making cool drugs hot: isothermal titration as a tool to study binding energetics. *Biotechniques* 31: 164-184
42. Ward WHJ, Holdgate GA (2001) Isothermal titration calorimetry in drug discovery. *Prog Med Chem* 38: 309-376



43. Kwong P (2002) HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420: 678-682
44. Lin Z (1995) The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *J Biol Chem* 270: 1011-1014
45. Record MT, Anderson CF, Lohman TM (1978) Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Quart Rev Biophys* 11: 103-178
46. Jain S, Zon G, Sundaralingam M (1989) Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTACAC). *Biochemistry* 28: 2360-2364
47. Taberero L, Verdaguer N, Coll M, Fita I, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Aymami J (1993) Molecular structure of A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin. *Biochemistry* 32: 8403-8410
48. Ren J, Jenkins TC, Chaires JB (2000) Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* 39: 8439-8447
49. Baginski M, Polucci P, Antonini I, Martelli S (2002) Binding free energy of selected anticancer compounds to DNA-theoretical calculations. *J Mol Model* 32: 25-32
50. Manzini G, Xodo L, Barcellonal ML, Quadrifoglio F (1985) Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids. *Nucleic Acids Res* 13: 8955-8967
51. Freyer M, Buscaglia R, Nguyen B, Wilson WD, Lewis EA (2006) Binding of netropsin and 4,6-diamidino-2-phenylindole to an A2T2 DNA hairpin: A comparison of biophysical techniques. *Anal Biochem* 355: 259-266
52. Wilson WD, Tanius FA, Barton HJ, Jones RJ, Fox K, Wydra RL, Strokowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29: 8452-8461

## Thermodynamics aspects of interactions between small ligands and DNA

Karolina Jagiełło, Anita Dopierała, Jan Mazerski 

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, 11/12 Narutowicza St., 80-233 Gdańsk, Poland

e-mail: janmaz@chem.pg.gda.pl

**Key words:** small DNA-ligands, thermodynamic profile of ligand-DNA interactions, intercalators, minor groove binders

### ABSTRACT

DNA is a molecular target for many anticancer and antiviral drugs. Therefore, a clear understanding of the interaction of small molecules with DNA is important in the rational design of ligands that can bind to DNA with high affinity and selectivity. There are several methods to investigate interactions between drug and DNA. Some of them measure changing into DNA structures, such as lengthening and untwisting of helix of DNA. Other techniques measure changing in drug environment. With the increasing availability of sensitive microcalorimeters, particular interest has arisen in the thermodynamics of drug-DNA interaction. Using such methods permit direct determination of enthalpy changes associated with reactions. One experiment permits to obtain also binding constant, hence an almost complete thermodynamic profile can be established. This profile offers key insights into the molecular forces that drive complex formation and permit to estimate which kind of interaction are responsible of forming these complexes.

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

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

Redaktor Naczelny lub Redaktor Prowadzący pracę podejmuje decyzję o przyjęciu lub odrzuceniu manuskryptu na podstawie własnej opinii i opinii dwóch niezależnych recenzentów, w ciągu 6 tygodni od momentu otrzymania artykułu. W przypadku, kiedy praca wymaga poprawek od autorów, 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 jakości materiału ilustracyjnego, które będą odpowiadały aktualnym wymogom Redakcji. Artykuły powinny być pisane językiem naukowym, lecz zrozumiałym dla niespecjalistów. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy winni unikać składni obojętnej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie skrótów nawet, jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z prac nadesłanych do Redakcji podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonania skrócenia tekstu i wprowadzenia koniecznych zmian, również w materiale ilustracyjnym.

## PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

## ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

**Strona 1 (tytułowa)** zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrótowy 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 KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in an open conformation. *Nature* 430: 806-810
- Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
- Dołowy K, Szewczyk A, Piłka S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe Śląsk, Katowice, Warszawa
- Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and dynamics of the endoplasmic reticulum luminal 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
- Darzynkiewicz 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 czerń i biel).

## PRZESYŁANIE PRAC:

Prace w formie elektronicznej prosimy przysyłać na adres: [postepy@nencki.gov.pl](mailto:postepy@nencki.gov.pl)

W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego oprogramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskiecie lub płycie CD; zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

**Sławomir Piłka**, Redaktor Naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## OPLATA ZA DRUK:

Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, od 1 stycznia 2006 roku, Towarzystwo pobiera od Autorów opłatę, pokrywającą częściowo koszt druku artykułu. Opłata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 150 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem:

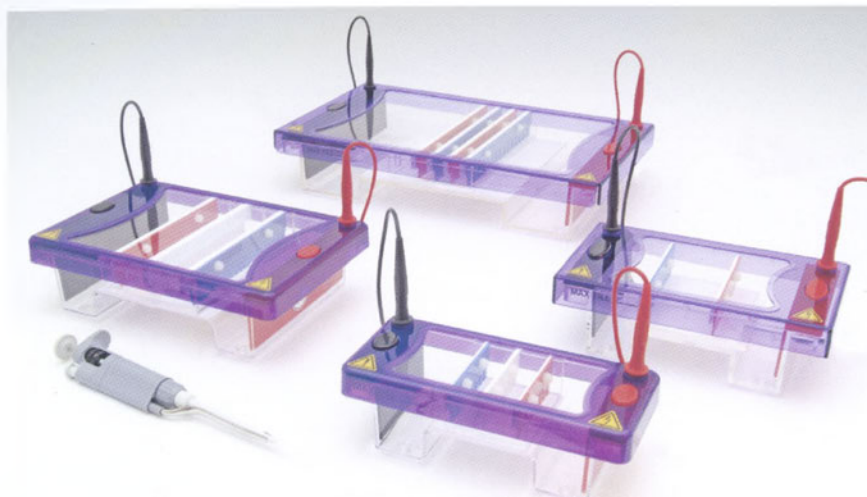
[www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm](http://www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm)

## KOREKTA:

Powinna być wykonana na pliku pdf przesłanym przez redakcję, w formie komentarzy lub skreśleń, w programie Adobe Reader V. 8 lub nowsza (program bezpłatny, <http://get.adobe.com/reader/>).

Korekta obejmuje błędy: literówki, znaki interpunkcyjne oraz błędy zawinione przez redakcję, pozostałe zmiany są objęte dodatkiem 10% do opłaty za druk.

# Aparaty do elektroforezy horyzontalnej firmy Cleaver Scientific Ltd



- Aparaty wykonane metodą odlewową z wysoce odpornego plastiku.
- Wyjątkowo trwałe i łatwe do wymiany elektrody (99,99% platyny).
- Wyjątkowa ekonomiczność i uniwersalność zestawów.
- Możliwość zakupienia zestawów z jedną, dwiema lub trzema tackami o różnej długości.
- Różne opcje wylewania żeli.
- Szeroki wybór grzebli.

## Dostępne modele:

	MultiSUB mini	MultiSUB midi	MultiSUB choice	MultiSUB maxi
<b>Wymiary zestawu (szer. x dł. x wys.)</b>	21x9x9 cm	22x12,5x9 cm	26,5x17,5x9 cm	39,5x23x9 cm
<b>Ilość tacek</b>	1-2	1-2	1-3	1-2
<b>Rozmiar żelu (szer. x dł)</b>	7x7, 7x10 cm	10x7, 10x10 cm	15x7, 15x10, 15x15 cm	20x10, 20x20, 20x25 cm
<b>Maks. ilość próbek</b>	32, 64	50, 100	70, 140, 210	200, 450, 550
<b>Ilość buforu</b>	225 ml	300 ml	500 ml	1200
<b>Grubość grzebli</b>	0,75   1   1,5   2 mm	0,75   1   1,5   2 mm	0,75   1   1,5   2 mm	0,75   1   1,5   2 mm
<b>Wielkość grzebli</b>	1-16 próbek	1-25 próbek	1-35 próbek	1-50 próbek

Oprócz tego firma Cleaver Scientific Ltd posiada w swej ofercie: aparaty do elektroforezy pionowej, blottingu, comet assay, izoelektroogniskowania, zasilacze, suszarki do żeli, termobloki, transiluminatory, wytrząsarki, urządzenie do archiwizacji żeli, komory do PCR, przesłony i pudełka do pracy z materiałami radioaktywnymi, chłodzące pojemniki, stojaki na probówki i pipety, oraz pozostałe drobne wyposażenie.



abo Grażyna Tarnowska Borejsza  
 ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk  
 Biuro: ul. Wichrowe Wzgórze 123, 80-293 Gdańsk  
 tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80  
 e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl



**Cleaver**  
 Scientific Ltd

# 100 % Program Gwarancji Przeciwciał - bez ryzyka\*

## Łatwy, prosty, przyjazny

Martwisz się, czy przeciwciało, które zamówiłeś będzie działało? Niepotrzebnie – teraz jesteś chroniony korzystając z naszego 100 % Programu Gwarancji Przeciwciał – bez ryzyka\*. Teraz nic nie ryzykując, możesz dołączyć do grona naukowców, którzy wypróbowali nasze przeciwciała przez okres trzydziestu lat.

## Przetestuj nasze przeciwciała

Zamów jakiegokolwiek przeciwciało i jeżeli nie otrzymasz zadowolających wyników, gwarantujemy zwrot pieniędzy\*. Jeśli widzisz szanse przydatności naszych przeciwciał i otrzymania pozytywnych wyników, w aplikacji metodycznej lub gatunkowej, nie sprawdzonej i nie wskazanej przez nas w specyfikacji technicznej, chcemy Ci pomóc gwarantując zwrot pieniędzy\* w wypadku niepowodzenia. Jeżeli przeciwciała stosowane były zgodnie z metodyką zalecaną w specyfikacji technicznej, a były wadliwe – również gwarantujemy zwrot pieniędzy\*.

## Łatwe zasady uczestnictwa w programie

1. Zamów przeciwciało wysyłając zamówienie na adres mailowy: [dzial.handlowy@merck.pl](mailto:dzial.handlowy@merck.pl) lub na numer fax: (22) 53 59 995
2. Jeżeli nie otrzymasz zadowolających wyników, wypełnij formularz dostępny on-line w przeciągu 6 miesięcy od daty otrzymania produktu, wraz z udokumentowanymi wynikami testów:  
[www.merck4biosciences.com/norisk](http://www.merck4biosciences.com/norisk)

Dostarczamy jakościowo zwalidowane przeciwciała, serwis techniczny oraz chronimy Twoje badania. Więcej informacji dotyczących warunków uczestnictwa w 100 % Programie Gwarancji Przeciwciał – bez ryzyka dostępnych jest na:

[www.merck4biosciences.com/norisk](http://www.merck4biosciences.com/norisk)

*\*Gwarancja jest ważna do:*

- 1) aplikacji metodycznych zwalidowanych przez firmę Merck, opisanych w specyfikacjach technicznych.
- 2) nieprzetestowanych aplikacji metodycznych lub gatunkowych niesprawdzonych i niewskazanych w specyfikacji technicznej.

*Prosimy o uważne sprawdzenie specyfikacji technicznej do przeciwciała. Dla niektórych przeciwciał pewne aplikacje lub specyficzność gatunkowa została sprawdzona. W takim przypadku, w specyfikacji technicznej widnieje informacja, że przeciwciało nie jest rekomendowane do danej aplikacji lub do badania białek pochodzących z danego gatunku. Gwarancja nie obejmuje takich przeciwciał. Wyniki testów powinny zostać przedłożone, w przeciągu 6 miesięcy od daty otrzymania produktu, poprzez wypełnienie formularza dostępnego on-line. Nie ma możliwości zwrotu gotówki, oferujemy wymianę na nowy lub inny produkt.*

*Oferta jest ważna na zamówienia zrobione od 1 lutego 2010 r.*

*Więcej informacji dotyczących warunków uczestnictwa w programie gwarancji przeciwciał dostępnych jest na: [www.merck4biosciences.com/norisk](http://www.merck4biosciences.com/norisk).*