

POSTĘPY BIOCHEMII

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
WARSZAWA 2007
TOM 53
NUMER 2



Białka RasGRP
Kinazy receptorowe roślin
Białka kotwiczące w ośrodkowym
układzie nerwowym



PL ISSN 0032-5422

Indeksowane w Medline /PubMed

www.postepybiochemii.pl

<http://pib.roln.org.pl>

NucliSENS™ system

Przełom w ekstrakcji kwasów nukleinowych

AUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



NucliSENS™
— easyMAG

PÓŁAUTOMATYCZNA EKSTRAKCJA MAGNETYCZNA



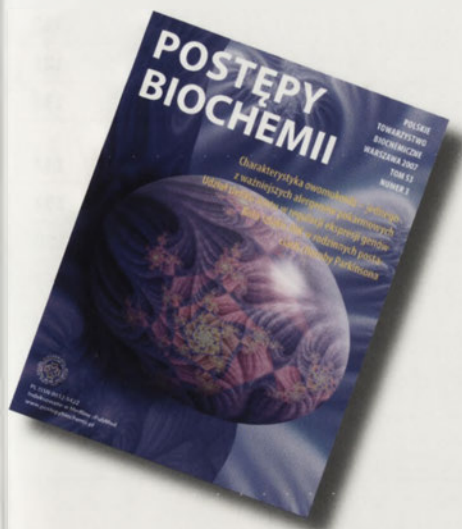
NucliSENS™
— miniMAG

Ekstrakcja NucliSENS

- technologia Boom'a® – ekstrakcja na magnetycznych cząstkach silikonowych
- jednoczesna ekstrakcja DNA i RNA
- jeden standardowy protokół izolacji dla wszystkich rodzajów próbek
- wysoka wydajność ekstrakcji
- ten sam zestaw odczynników dla każdego protokołu
- systemy posiadają certyfikat CE-IVD



B I O M É R I E U X



W NASTĘPNYM NUMERZE:

Charakterystyka owomukoidu – jednego z ważniejszych alergenów pokarmowych

Anna Winiarska-Mieczan,
Małgorzata Kwiecień

Udział tlenu azotu w regulacji ekspresji genów

Katarzyna Oszejka, Janusz Szmraj,
Jacek Bartkowiak

Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona

Marek Jankowski

Rysunek na okładce:

Front cover image „*Arabidopsis thaliana*” by Harry Turner (e-mail: harry.turner@nrc-cnrc.gc.ca), NRC Communications and Corporate Relations, National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

MAPA POLSKIEJ BIOCHEMII

90 lat Katedry i Zakładu Biochemii I Wydziału Lekarskiego
Akademii Medycznej w Warszawie
Anna Barańczyk-Kuźma

99

WYDARZENIA/OPINIE/KOMENTARZE

Wiadomości krajowe
pod red. Teresy Wesołowskiej

102

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

Białka RasGRP – czynniki aktywujące Ras
Mateusz Szamałek, Wanda Baer-Dubowska

112

Szlaki przekazywania sygnału w reakcji roślin na zranienie
Jadwiga Szczegielniak

121

Kinazy receptorowe roślin

Anna Jakubowska, Maciej Ostrowski, Stanisław Kowalczyk

133

Aneksyny – białka kontrolujące organizację i prawidłowe funkcjonowanie błon biologicznych – od *Arabidopsis thaliana* do *Homo sapiens*

Joanna Bandorowicz-Pikuła

143

Czy aneksyna AnnAt1 z *Arabidopsis thaliana* uczestniczy w odpowiedzi organizmu na stres wywołany czynnikami abiotycznymi?

Karolina Maria Górecka, Kazimierz Trębacz, Ryszard Górecki,
Sławomir Pikuła

154

Rola aneksyn w procesie mineralizacji

Anna Sekrecka, Marcin Balcerzak, Cyril Thouverey, Rene Buchet,
Sławomir Pikuła

159

Udział aneksyn w zależnym od wapnia procesie wydzielania katecholamin

Paulina Podszywałow-Bartnicka, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek,
Ludmiła Żylińska, Joanna Bandorowicz-Pikuła

164

Aneksyn w chorobie spichrzeniowej Niemanna-Picka typu C

Małgorzata E. Buszewska, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek,
Anna Tylki-Szymańska, Joanna Bandorowicz-Pikuła

169

Występowanie oraz funkcja tokochromanoli u roślin, zwierząt i u człowieka

Renata Szymańska, Jerzy Kruk

174

FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW

Nowe aspekty badań nad prionem [PSI+] w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

Takao Ishikawa

182

Białka kotwiczące i ich udział w przekazywaniu sygnałów w zagęszczeniach postsynaptycznych w ośrodkowym układzie nerwowym

Małgorzata Beręsewicz

188



ADVANCES IN BIOCHEMISTRY VOL. 53, NO. 2, 2007

90 Anniversary of Department and Chair of Biochemistry, Warsaw Medical University	99
Events/Opinions/Comments	102

REVIEWS

RasGRP proteins – Ras-activating factors	112
Wound signal transduction pathways in plants	121
Plant receptor kinases	133
Annexins – proteins involved in organization and function of biological membranes – from <i>Arabidopsis thaliana</i> to <i>Homo sapiens</i>	143
Participation of annexin At1 in plant response to abiotic stress	154
Annexins in mineralization process	159
Participation of annexins in Ca ²⁺ -regulated secretion of catecholamines	164
Annexins in Niemann-Pick type C disease	169
Occurrence and function of tocochromanols in plants, animals and men	174
New aspects of research upon the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [PSI+] prion	182
Scaffold proteins in postsynaptic density in the central nervous system	188

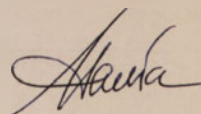
KILKA SŁÓW OD REDAKTORA

Szanowni Państwo,

Drugi numer „Postępów Biochemii” w tym roku przynosi jak zwykle artykuły z różnych dziedzin, ale na szczególną uwagę zasługuje coraz częstsze pojawianie się na łamach naszego kwartalnika prac przeglądowych poświęconych biochemii i biologii molekularnej roślin. W tym numerze z tej dziedziny polecam szczególnie Państwa uwadze „Szlaki przekazywania sygnału w reakcji roślin na zranienie” Jadwigi Szczegielniak oraz „Kinazy receptorowe roślin” Anny Jakubowskiej, Macieja Ostrowskiego i Stanisława Kowalczyka. Z prawdziwą przyjemnością witam pojawienie się nowych twarzy w dziale FORUM MŁODYCH BIOCHEMIKÓW, Małgorzaty Beręsewicz, autorki pracy „Białka kotwiczące i ich udział w przekazywaniu sygnałów w zagęszczeniach postsynaptycznych w ośrodkowym układzie nerwowym” i Takao Ishikawy, który zapoznaje nas z „Nowymi aspektami badań nad prionem [PSI+] w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*”. Sądzę też, że z przyjemnością przeczytacie Państwo niezmiernie ciekawy artykuł przeglądowy „Białka RasGRP – czynniki aktywujące Ras”, autorstwa Mateusza Szamałki i Wandy Baer-Dubowskiej oraz pracę z pogranicza dziedzin, „Występowanie oraz funkcja tokochromanoli u roślin, zwierząt i u człowieka”, której autorami są Renata Szymańska i Jerzy Kruk.

W tym numerze przedstawiamy także nową propozycję dla autorów: przygotowanie cyklu artykułów, którego autorzy pochodzą z jednego ośrodka badawczego lub współpracujących ze sobą placówek naukowych, poświęconych jednemu zagadnieniu. Dziś seria pięciu artykułów przedstawia rodzinę homologicznych białek wiążących jony wapnia, występujących w organizmach eukariotycznych, rodzinę aneksyn. Zapraszamy autorów z innych ośrodków badawczych do podjęcia tej nowej inicjatywy redakcji. Propozycję prosimy kierować na adres poczty elektronicznej redaktora naczelnego.

Życząc miłej lektury, jak zwykle ponawiam moją gorącą prośbę o kierowanie Państwa opinii i uwag, które pomagają redakcji w codziennej pracy nad udoskonalaniem naszego czasopisma, na adres poczty elektronicznej s.pikula@nencki.gov.pl. Dziękuję za uwagę i zapraszam do częstego odwiedzania naszej strony internetowej pod adresem www.postepybiochemii.pl.



Sławomir Pikula

PARTNER POSTĘPÓW BIOCHEMII

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



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

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

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

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 850 egz.

DNA DIGESTION MADE AS EASY AS... CHILD'S PLAY!



Fermentas *FastDigest*[™] restriction enzymes set the new standard.

Benefit from their convenience,
simplicity and speed:

- **One universal buffer** for all digests
- **One temperature** for all digests
- **Complete Digestion in Five minutes**

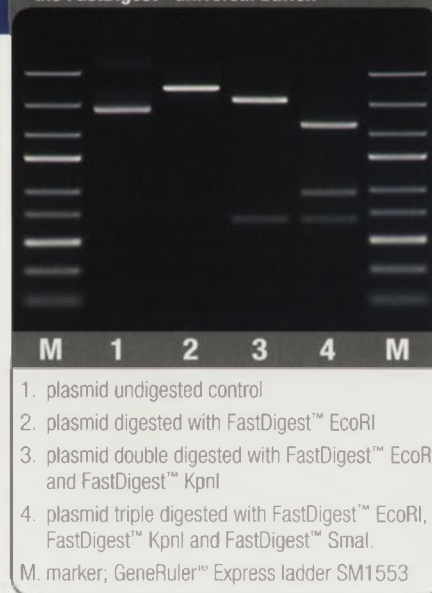
Eliminate sequential digestions, buffer changes,
star activity concerns, tedious reaction times.

Fermentas is a leader in the field of restriction enzyme research and molecular biology products. We discovered over 30% of all known restriction enzymes. Our expertise, developed over thirty years, is the basis of our diverse product line which now includes restriction enzymes, DNA/RNA modification enzymes, PCR-related products, ladders/markers for DNA, RNA and protein analysis, various molecular biology kits, nucleotides and reagents.

Our extensive experience in molecular biology enables us to supply the high quality products you need, for even the most demanding applications.

We are committed to supplying superior products backed by the best possible support and service.

Five minute multiple digestions in
the FastDigest[™] universal buffer.



ISO 9001 | ISO 14001

abe

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



Fermentas
LIFE SCIENCES

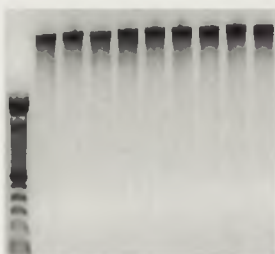


**“Crushing” Lysis Efficiency
Nothing Resists It!**

FastPrep[®]-24 System

Lyse any tough or frozen sample in just 40 seconds or less!

The FastPrep[®]-24 system offers the ultimate in speed and performance for the lysis of biological samples. Developed for difficult and resistant tissues and cells, 24 x 2 ml or 2 x 50 ml samples are lysed thoroughly within 40 seconds! A wide range of FastPrep[®] kits provide ready-to-use protocols for the isolation of highly pure DNA, RNA and proteins.



Genomic DNA from human ovarian tissue
lysed with the FastPrep[®]-24 for 20 sec.
Courtesy of Dr. David Smith, Oncotech Inc.

The next generation FastPrep[®]-24 from the world's leader in sample lysis, Bio101™ Systems. +5,000 users worldwide already use FastPrep[®], your organization should be next. Order your FastPrep[®]-24, (Cat. No 6002500).



www.mpbio.com

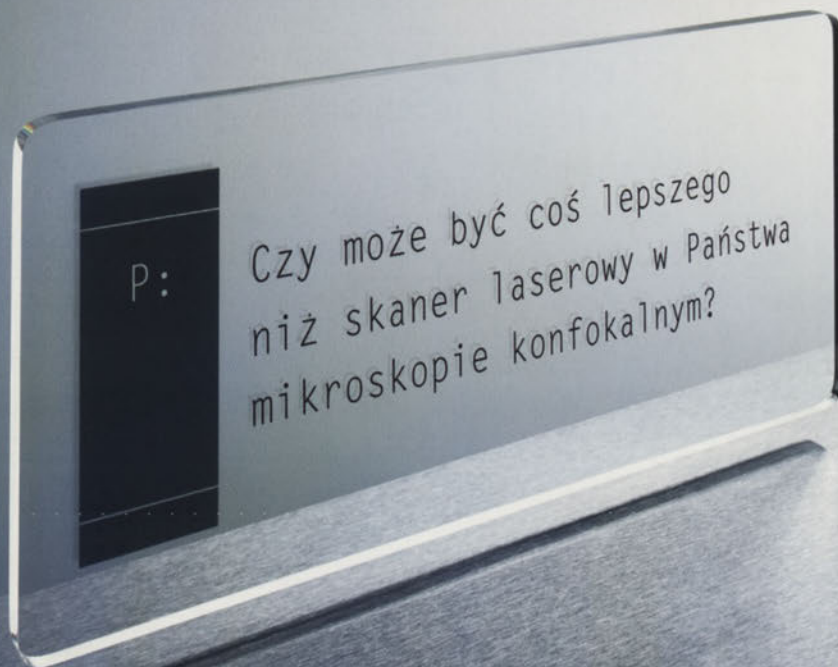


DYSTRYBUTOR: abo Grażyna Boreysza
ul. Podleśna 6a, 80-255 Gdańsk
Biuro: ul. Malachowskiego 1, 80-262 Gdańsk
tel.: (58) 341 21 43; fax: (58) 520 33 80 [p://rcin.org.pl](http://rcin.org.pl)
e-mail: abo@abo.com.pl; www.abo.com.pl



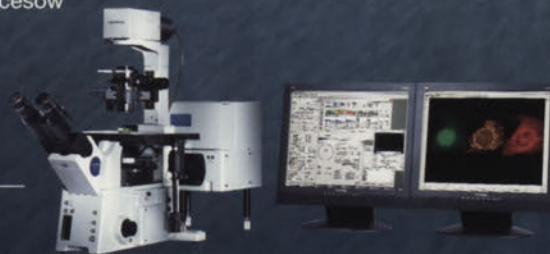
 **BIO 101[®] Systems**

Division of MP Biomedicals



O: TAK DWA SKANERY LASEROWE

Odpowiedź jest prosta: nowy mikroskop konfokalny Olympus FluoView FV1000 pracuje z dwoma skanerami, a nie jak inne podobne systemy, tylko z jednym. Wprowadzenie dodatkowego skanera stwarza zupełnie nowe możliwości w analizie żywych komórek, rozwiązuje problem utraty danych podczas rejestracji procesów. W systemach konfokalnych poprzedniej generacji do pobudzenia komórek i do obserwacji używany był jeden tylko układ skanujący. Powodowało to, że niemożliwe było rejestrowanie szybkiej odpowiedzi komórek podczas i bezpośrednio po stymulacji. Dwa zsynchronizowane układy skanujące zastosowane w mikroskopie FV1000 umożliwiają jednoczesne prowadzenie obserwacji procesów oraz dokonywanie stymulacji. Ułatwia to wszechstronną, precyzyjną dokumentację i analizę zjawisk na poziomie komórkowym, bez utraty istotnych informacji. FluoView FV1000 wprowadza nową jakość w badaniach procesów przeżyciowych: rejestrację i zrozumienie zjawisk w stopniu poprzednio nieosiągalnym. Wystarczy tylko chwila pracy z naszym nowym systemem, aby to potwierdzić. Z nami rozwiązanie Państwa problemów badawczych będzie dwa razy prostsze.



Wiecej informacji pod adresem:
Olympus Polska Sp. z o.o.
Tel. (22) 860 00 77, Faks (22) 831 04 53
mikroskopy@olympus.pl
www.olympus.pl

Horizons in Molecular Biology

12th-15th September 2007
Göttingen, Germany

NEW

HORIZONS CAREER FAIR FOR SCIENTISTS
12th September 2007, 10:00-17:00

NEW

Cell Biology

Jiri Bartek
Bernd Bukau
Tim Hunt
Stefan Müller
Phillip Zamore

Structural Biology

Hashim Al-Hashimi
Nenad Ban
Roland Beckmann
Kevin Gardner

Developmental Biology

Markus Affolter
John Gurdon
Andrew McMahon
Claudio Stern

Neuroscience

Jean-Pierre Changeux
Joachim Herz
Larry Zipursky

Systems Biology

Patrick Cramer
Friedrich Lottspeich
Michael Yaffe



Georg August University
Göttingen



Max Planck Institutes for
> Biophysical Chemistry
> Experimental Medicine



Göttingen Center
for Molecular Biosciences

Horizons

in Molecular Biology

www.horizons.uni-goettingen.de

90 lat Katedry i Zakładu Biochemii I Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie

Profesor dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma

**Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl**

W 2006 roku minęło 90 lat od powstania Katedry i Zakładu Biochemii będącej obecnie jednostką I Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie. Historia Zakładu Biochemii rozpoczyna się w 1916 roku, kiedy to na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Warszawskiego powołano Katedrę i Zakład Chemii Fizjologicznej. Mieszczący się przy Krakowskim Przedmieściu 26/28 Zakład został zorganizowany przez wybitnego polskiego biochemika – prof. Jakuba Karola Parnasa (Fot. 1), który przez trzy lata był jego pierwszym kierownikiem.



Fotografia 1. Prof. Jakub Karol Parnas.

W początkowym okresie prof. Parnas wraz z asystentem Stanisławem Przyłęckim prowadzili wykłady z chemii fizjologicznej dla studentów Wydziału Lekarskiego, a następnie także dla studentów Wydziałów Farmacji i Weterynarii. W latach 1919–1927 Zakładem kierował prof. Stanisław Bądryński, który

prowadził wykłady z biochemii i chemii farmaceutycznej z elementami fizjologii. Pracownikami Zakładu byli Stanisław Przyłęcki, Janina Opieńska i Waclaw Giedroyc. Od 1928 do 1939 roku kierownikiem Zakładu Chemii Fizjologicznej był prof. Stanisław Przyłęcki, który poza zagadnieniami biochemicznymi wykładał również wirusologię i chemię analityczną. Do wybuchu drugiej wojny światowej w Zakładzie pracowało już 17 osób.

W czasie okupacji nauczanie biochemii odbywało się na tajnym uniwersytecie, a skrypt przygotowany przez prof. Przyłęckiego został po wojnie wydany jako pierwszy podręcznik z biochemii, z którego przez wiele lat korzystali studenci medycyny. Na tajnym uniwersytecie oprócz prof. Przyłęckiego wykładali także Włodzimierz Niemierko, Antoni Dmochowski, Józef Heller (późniejszy kierownik Zakładu) i Ludwik Hirszfeld.

W lutym 1945 roku na Uniwersytecie Warszawskim uruchomiono dwa pierwsze kursy medycyny. Wykłady z chemii fizjologicznej dla studentów Wydziału Lekarskiego prowadził Włodzimierz Niemierko – po raz pierwszy zorganizowano także ćwiczenia laboratoryjne. W 1946 roku kierownictwo Zakładu Chemii Fizjologicznej objął prof. Piotr Wierchowski (późniejszy kierownik Zakładu Chemii AM).

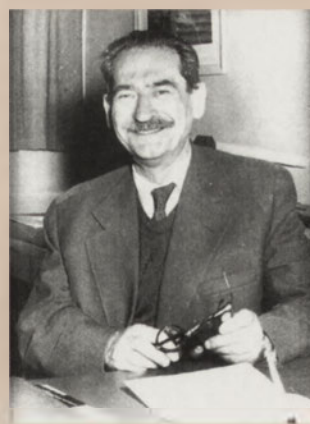
W roku 1949 utworzono Akademię Lekarską, którą w 1950 roku przemianowano na Akademię Medyczną, a stanowisko kierownika Zakładu Chemii Fizjologicznej miał objąć Ernest Sym, jednak zanim objął tę funkcję zginął w wypadku samochodowym. Od 1951 roku przez ponad 10 lat kierownikiem Zakładu był prof. Józef Heller (współpracujący wcześniej we Lwowie z prof. Parnasem), który pełnił tę funkcję do czasu objęcia stanowiska dyrektora Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Prof. Józef Heller (Fot. 2) odegrał ważną rolę w organizowaniu środowiska naukowego biochemii polskiej i tworzeniu instytucji naukowych. Między innymi był współtwórcą utworzonego w 1957 roku Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (a także przez ponad 10 lat jego dyrektorem), założycielem i pierwszym redaktorem



Fotografia 3. Prof. Irena Mochnacka.

wydawanego do dziś kwartalnika „Postępy Biochemii”, członkiem-założycielem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, Europejskiego Towarzystwa Endokrynologii Porównawczej, członkiem Deutsche Akademie der Naturforscher und Ärzte „Leopoldina”, a także członkiem komitetów redakcyjnych czasopism Life Sciences i Molecular and Cellular Biochemistry.

Po prof. Hellerze kierownikiem Zakładu Chemii Fizjologicznej została jego wychowanka prof. Irena Mochnacka (Fot. 3), która pełniła tę funkcję przez 14 lat (od 1962 do 1975 roku) aż do przejścia na emeryturę. Prof. Mochnacka, którą wielu lekarzy-absolwentów Warszawskiej Akademii Medycznej wciąż pamięta, była absolwentką Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, gdzie uzyskała też stopień doktora medycyny. Habilitowała się w 1950 roku na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wro-



Fotografia 2. Prof. Józef Heller.

poień doktora medycyny. Habilitowała się w 1950 roku na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wro-

clawiu, skąd w 1953 roku przeniosła się do Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie. Po roku uzyskała tytułu profesora nadzwyczajnego. Na wykładach prof. Mochnackiej, podczas których Profesor własnoręcznie pisała na tablicy wzorami omawiane przemiany biochemiczne, sala na Krakowskim Przedmieściu była zawsze wypełniona. Były to jedne z najlepszych wykładów, a zdanie egzaminu z biochemii u prof. Mochnackiej było ogromnym, pełnym wrażeń sukcesem.

Prof. Irena Mochnacka wiele czasu poświęcała pracy redakcyjnej w głównym polskim czasopiśmie biochemicznym „Acta Biochimica Polonica” pełniąc funkcję sekretarza, a następnie redaktora naczelnego. Czasopismo to do dziś ma znaczną rangę wśród biochemików (IF 1,863).

W roku 1970, w wyniku zmian organizacyjnych w Akademii Medycznej związanych z tworzeniem instytutów, nazwę Zakładu Chemii Fizjologicznej zmieniono na Zakład Biochemii i włączono do Instytutu Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego. Zakład Biochemii przeniesiono z terenu Uniwersytetu Warszawskiego na Krakowskim Przedmieściu do nowo wybudowanego gmachu Akademii Medycznej przy ulicy Banacha 1.

W roku 1975 kierownikiem Zakładu Biochemii została doc. Teresa Szymczyk-Wasiluk (Fot. 4), wieloletni pracownik Zakładu. Prof. Szymczyk-Wasiluk jako jedna z pierwszych w Akademii Medycznej wprowadziła egzaminy i sprawdziany testowe, najpierw dla studentów Oddziału Stomatologii, a następnie dla studentów Wydziału Lekarskiego. Zespół dydaktyczny, pod kierunkiem prof. Szymczyk-Wasiluk, opracował szereg skryptów ułatwiających studentom przyswajanie wiedzy biochemicznej.

W 1993 roku, w wyniku kolejnych zmian w strukturze organizacyjnej Uczelni i rozwiązaniu części instytu-

tów, Zakład Biochemii powrócił do macierzystego Wydziału Lekarskiego i został przemianowany na Katedrę i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie. W roku 1999 prof. Szymczyk-Wasiluk przeszła na emeryturę i w wyniku konkursu została kierowniczką Katedry i Zakładu Biochemii.

Pracując w Zakładzie Biochemii już jako studentka Akademii Medycznej (w ramach koła naukowego), a następnie na kolejnych stanowiskach naukowo-dydaktycznych, uzyskałam wszystkie stopnie naukowe (Fot. 5).

Obecnie w Zakładzie wraz ze mną pracuje 18 osób (Fot. 6), które poza pracą naukową zajmują się nauczaniem biochemii. Uczymy studentów I Wydz. Lekarskiego, studentów Oddziału Lekarsko-Dentystycznego oraz studentów Wydziału Nauki o Zdrowiu (Oddziałów Pielęgniarstwa, Położnictwa, Ratownictwa Medycznego, Dietetyki). Prowadzimy także dwa odrębne kursy biochemii w języku angielskim, dla studentów zagranicznych studiujących medycynę na II Wydziale Lekarskim AM w ramach tzw. English Divisions (kurs dwu semestralny dla studentów II roku medycyny i jedno semestralny

dla studentów I roku). Uczymy na studiach dziennych, wieczorowych i uzupełniających (tzw. pomostowych). W roku akademickim 2005/06

prowadziliśmy zajęcia (wykłady, seminaria, ćwiczenia laboratoryjne) z biochemii dla ponad 1200 studentów, realizując ponad 4500 godzin dydaktycznych. Od kilku lat nasi studenci biorą udział w Ogólnopolskim Konkursie Wiedzy Biochemicznej Studentów Akademii Medycznych „SUPERHELISA”. W minionym roku akademickim 3-osobowy zespół naszej Uczelni zajął zaszczytne II miejsce, a w bieżącym roku akademickim (w maju) my będziemy organizowali kolejny, już IV Konkurs.

Od 2002 roku w naszym Zakładzie prowadzona jest bardzo aktywna wymiana studentów i doktorantów w ramach kierowanego przeze mnie programu CEEPUS (Central European Exchange Program for University Studies). CEEPUS jest partnerem programu medycznego STUDY OF MEDICAL CHEMISTRY koordynatorem którego jest Uniwersytet w Zagrzebiu. Główną formą działalności programu jest wymiana pracowników naukowych i studentów w celu realizacji wspólnych projektów badawczych, wykonywania części badań do prac magisterskich i doktorskich. Corocznie młodzi pracownicy naszego Zakładu oraz studenci pracujący w kole naukowym wyjeżdżają do Chorwacji czynnie uczestnicząc



Fotografia 5. Prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma.



Fotografia 4. Prof. Teresa Szymczyk-Wasiluk.



Fotografia 6. Zespół naukowy kierowany przez prof. Annę Barańczyk-Kuźmę.

w szkole letniej, a także my gościmy u siebie profesorów i studentów z uczelni partnerskich – ci ostatni, podczas pobytów trwających od 1 do 3 miesięcy, włączają się do prowadzonych przez nas badań. Poza studentami programu CEEPUS przyjmujemy także studentów przyjeżdżających w ramach programu SOCRATES-ERASMUS, którego działalność koordynuję (jako uczelniany koordynator) od roku 1998.

Badania naukowe prowadzone w Zakładzie dotyczą procesów biotransformacji w ośrodkowym układzie nerwowym w warunkach fizjologicznych i patologicznych (choroby neurodegeneracyjne, zatrucia narkotykami, lekami psychotropowymi), enzymatycznych

i nieenzymatycznych układów antyoksydacyjnych w tkankach prawidłowych i zmienionych nowotworowo, biochemicznych i molekularnych markerów diagnozowania i monitorowania procesu nowotworowego, genetycznych i epigenetycznych mechanizmów mutagenyzy i kancerogenyzy chemicznej. Badania prowadzone są na tkankach ludzkich (z operacji, autopsji), szczurzych i mysich (w tym zwierząt transgenicznych) oraz na hodowlach komórkowych (fibroblasty płuc chomika chińskiego V79, limfocyty ludzkie transfekowane wirusem Epsteina-Barra). W ramach międzynarodowego projektu badawczego zamawianego we współpracy z Kliniką Neurologii AM w

Warszawie i Kliniką Neurologii w Ulm (Niemcy) założyliśmy stale powiększany, jedyny w Polsce bank transfekowanych limfocytów pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi (ALS, MSA, PSP). Zebrany materiał posłuży do badań nad patogenezą tych nieuleczalnych obecnie chorób.

Zarówno praca naukowa (aktualnie 7 asystentów ma otwarte przewody doktorskie i prace w trakcie opracowywania wyników) jak i dydaktyczna dostarczają pracownikom Katedry i Zakładu Biochemii wiele satysfakcji, tym bardziej, że są one bardzo dobrze oceniane przez władze Uczelni (liczne nagrody naukowe i dydaktyczne), a także przez studentów (wyniki ankiet).

Do wszystkich członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

KOLEŻANKI, KOLEDZY, SZANOWNI PAŃSTWO,

Polskie Towarzystwo Biochemiczne liczy już sobie prawie 50 lat (powstało w 1958 roku) i tyleż lat ma jego Statut, który nie był zmieniany od powstania Towarzystwa. Od pewnego czasu wypowiedane są opinie, iż statut ten wymaga zmian i aktualizacji. Takie głosy między innymi dało się słyszeć na ostatnim Walnym Zebraniu PTBioch w Lublinie w 2005 roku. W związku z tym, przy Zarządzie Głównym Towarzystwa powołano Komisję Statutową, która zaproponowała zmiany w Statucie. Projekt nowego Statutu zamieszczono na stronie internetowej naszego Towarzystwa (www.ptbioch.edu.pl) pod 'linkiem' 'zmiany Statutu'. Apeluję do wszystkich Państwa o zapoznanie się z tym projektem i przesłanie swoich uwag lub komentarzy na mój adres (dzugajan@biol.uni.wroc.pl) **do końca sierpnia 2007 roku**. Dla ułatwienia streszczam poniżej dwie najważniejsze zmiany:

1. Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może zostać każdy, kto 'jest zainteresowany biochemią lub naukami pokrewnymi', a nie – jak dotychczas – tylko osoby mające dorobek naukowy w zakresie biochemii lub nauk pokrewnych (paragraf 11). Jednocześnie wprowadza się zapis, na mocy którego członkostwo jest ściśle związane z opłaceniem składki; inaczej mówiąc, ustaje automatycznie z chwilą upływu terminu, za który składka została opłacona. Według dotychczas obowiązującego statutu Zarząd Główny może skreślić członków zalegających ze składkami dwa lata lub dłużej dopiero po dwukrotnym upomnieniu.

2. Dotychczasowe Walne Zebranie członków, będące najwyższą władzą Towarzystwa, projektuje się zastąpić Zebraniem Delegatów wybieranych przez Oddziały proporcjonalnie do ich liczebności (paragraf 13). Chodzi o to, że od wielu już lat w Walnych Zebraniach, odbywających się co trzy lata, bierze udział tylko niewielka liczba członków (kilkadziesiąt osób na ponad tysiąc ogółu członków). Uważamy, że instytucja Zebrania Delegatów mogłaby być ciałem bardziej reprezentatywnym.

Przedstawiając Państwu te propozycje, gorąco zachęcam wszystkich członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do przesyłania na mój adres, pocztą elektroniczną lub tradycyjną, swoich opinii o nowym projekcie Statutu w terminie do końca sierpnia br. Projekt, po zapoznaniu się z Państwa głosami, zostanie jeszcze raz przedyskutowany przez Komisję Statutową, a następnie przez Zarząd Główny Towarzystwa, po czym zostanie poddany korespondencyjnemu powszechnemu głosowaniu przez ogół członków Towarzystwa. Zarówno projekt jak i tryb jego głosowania zamierzamy oczywiście skonsultować z prawnikiem oraz Radą Towarzystw Naukowych przy Polskiej Akademii Nauk. Oczekując Państwa wypowiedzi, łączę moje wyrazy szacunku

Przewodniczący Komisji Statutowej

Prof. Andrzej Dzugaj

Zakład Fizjologii Zwierząt IZ UW.

ul. Z. Cybulskiego 30, 50-205 Wrocław

tel. (48-71) 328-82-46; e-mail: dzugajan@biol.uni.wroc.pl

Prezes Polskiej Akademii Nauk, prof. Michał Kleiber, zapowiada położenie większego nacisku na badania w kluczowych dziedzinach i wspieranie karier młodych naukowców. Jego zdaniem konieczne też będą zmiany w strukturach niektórych jednostek badawczych i w administracji PAN. Prof. Kleiber został wybrany na prezesa PAN 11 grudnia 2006 r., a swoją funkcję zaczął pełnić w 2007 roku. Według nowego prezesa PAN, polska nauka potrzebuje, w dziedzinie badań poznawczych, większej specjalizacji, ponieważ uczeni w naszym kraju nie mogą osiągać sukcesów we wszystkich istniejących dziedzinach nauki. Aby specjalizacja ta przyniosła jak największe korzyści, trzeba – jego zdaniem – skoncentrować się na dziedzinach, które obecnie są najważniejsze dla Polski oraz na tych, które najszybciej się rozwijają i pogłębiają naszą wiedzę o świecie. Według Prezesa PAN do takich dziedzin należą: **nowoczesne – biologia molekularna oraz nauka o materiałach, biotechnologia** i wszystko to co się wiąże z rozwojem społeczeństwa informacyjnego, czyli **informatyka i telekomunikacja**. Strategiczną dziedziną jest też oczywiście **energetyka**. Jak zaznacza prof. Kleiber, ważne są także **badania socjologiczne**, bowiem obecnie zachodzące procesy, takie jak mieszanie się kultur lub starzenie się społeczeństw, będą wymagały reakcji ze strony rządów wielu państw, także Polski, a do tego niezbędne są teoretyczne podstawy. Dla Polski szczególnie ważne są **dziedziny związane z naszą kulturą i tożsamością narodową**. Polscy uczeni muszą np. stale badać język polski i historię naszego kraju.

Prof. Kleiber planuje utworzenie w najbliższych miesiącach Centrum Badawczego w ramach PAN, którego zadaniem ma być zarządzanie działalnością jednostek badawczych Akademii i określanie dziedzin nauki, w których badania będą dla PAN kluczowe. W jego skład mają wejść członkowie PAN, a także przedstawiciele Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które finansuje działalność poszczególnych jednostek PAN.

Pierwszym zadaniem nowo powołanego organu Akademii ma być **ocena placówek wchodzących w skład PAN**, według kryteriów ostrzejszych niż stosowane przez MNiSW w ocenie jednostek badawczych. Jednym z kryteriów, według których będzie to można ocenić, jest m.in. **zdolność danej placówki do generowania „mistrzów”**, czyli uczonych wybitnych w swojej dziedzinie. Instytut musi posiadać też **zdolność do współpracy z wiodącymi ośrodkami z innych krajów i umiejętność tworzenia szans rozwoju dla młodych naukowców**. To ostatnie jest szczególnie ważne, ponieważ w Polsce, podobnie jak w innych krajach europejskich, w placówkach badawczych zatrudnionych jest zbyt mało młodych, zdolnych naukowców. Prof. Kleiber uważa, że nauki nie sposób uprawiać bez młodzieży. Rozwój nauki jest dynamiczny dzięki wykorzystaniu potencjału młodych ludzi, charakteryzujących się odwagą i brakiem uprzedzeń w podejściu do zagadnień. Aby wspomóc kariery młodych ludzi i jednocześnie pozwolić jednostkom naukowym wybierać tych najzdolniejszych, PAN musi, według nowego prezesa, **nawiązać ściślejszą współpracę z uczelniami**. Chodzi zwłaszcza o prowadzenie studiów doktoranckich. Z jednej strony pozwoli to uniwersytetom pozyskać kadrę wykładowców, których potrzeba coraz więcej. Z drugiej strony – instytuty będą mogły włączyć doktorantów w swoje prace badawcze i wyłonić spośród nich swoich przyszłych pracowników. Niektóre instytuty, zdaniem prof. Kleibera, powinny stawać się współwłasnością PAN-u i uczelni. W przyszłości mogą nawet zostać przez uczelnie wchłonięte. W obrębie samej Akademii nowy prezes chce **integrować niektóre jednostki**. Chodzi o to, aby słabsze i mniejsze instytuty mogły zostać włączone w skład większych, by dzięki temu korzystać z lepszej infrastruktury i możliwości współpracy międzynarodowej, co podniesie jakość prowadzonych tam badań. Pewne jednostki może czekać likwidacja pełna lub częściowa, z tym, że nie nastąpi to nagle, raczej stopniowo (wg PAP – Nauki w Polsce).

Wypowiedzi podsekretarza stanu w MNiSW, prof. Krzysztofa Kurzydłowskiego, Prezesa Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej – prof. Macieja Żylicza oraz prof. Michała Kleibera podczas spotkania informacyjnego, dotyczącego programów Europejskiej Rady Badań (ERC) oraz możliwości pozyskania finansowania na projekty 7. Programu Ramowego, potwierdziły politykę Prezesa PAN-u wobec młodych naukowców, przedstawioną zaraz po podjęciu przez Niego nowej funkcji kilka miesięcy wcześniej. Resort nauki poprze wszelkie inicjatywy umożliwiające młodym polskim naukowcom karierę w sektorze badań i rozwoju oraz zachęci wybitnych uczonych z całej Europy do pracy w Polsce. Prezes Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, prof. Maciej Żylicz, podkreślił, iż należy wykorzystać maksymalnie potencjał Europejskiej Rady Badań, bowiem jest to szansa, aby młodzi naukowcy chcieli realizować swoje granty w Polsce i tutaj lokowali laboratoria badawcze. W Polsce pracuje wielu młodych naukowców (w tym ponad 30 tys. słuchaczy studiów doktoranckich). Według prof. Kurzydłowskiego jest to ważny atut przy podejmowaniu działań umożliwiających tej grupie rozwijanie kariery w kraju, nie tylko na polskich uczelniach, ale też w innych jednostkach związanych z pracami badawczo-rozwojowymi. Ilość placówek badawczych można zwiększyć, wykorzystując środki pozyskiwane z różnych programów operacyjnych Unii Europejskiej. Zadeklarował nagradzanie i promowanie instytucji, które wspierają i przyciągają młodych naukowców do Polski.

Na całość badań w ramach 7. Programu Ramowego Komisja Europejska przeznaczyła 54,5 mld euro (ok. osiem mld euro rocznie). Jest to 40 proc. więcej niż w poprzednim, 6.PR. Nowością jest też przywiązanie szczególnej uwagi wspieraniu młodych naukowców oraz wprowadzenie programu IDEE, którego celem jest finansowanie badań innowacyjnych i przełomowych. Na jego realizację ERC przeznacza 14 proc. ogólnego budżetu 7.PR, czyli ponad jeden mld euro rocznie. Ważny jest fakt, że uży-

skany grant badawczy można przemieścić do innego miejsca pracy, ponieważ środki przyznawane są osobie, a nie instytucji. Według prof. Kleibera ta zaleta powoduje, że warto zabiegać o zainteresowanie naukowców i stwarzać im jak najlepsze warunki do pracy badawczej. O granty w ramach 7.PR ubiegać się mogą obywatele ze wszystkich kontynentów. Warunkiem ograniczającym jest wymóg, aby miejscem ich pracy docelowej było laboratorium na terenie UE.

W 7.PR istnieją dwa typy grantów – dla młodych naukowców (1/3 całego budżetu 7.PR) i dla pozostałych uczonych (2/3 budżetu). Każdego roku dla każdej z tych grup realizowany będzie jeden konkurs. 45 proc. dostępnych środków przypadnie na badania z dziedziny nauk ścisłych, 40 proc. – na nauki o życiu, a pozostałe 15 proc. – na nauki społeczne i humanistyczne. Jedna osoba będzie mogła realizować maksymalnie jeden projekt.

O grant dla młodych naukowców może ubiegać się osoba, która chce pracować na terenie UE, jest samodzielna merytorycznie i uzyskała stopień doktora 2-9 lat wcześniej. ERC przyzna im ok. 200 grantów rocznie (każdy na pięć lat), za łączną kwotę ponad 300 mln euro. Z danych szacunkowych wynika, że Polsce może zostać od kilkunastu do 20 grantów. Ideą systemu konkursów jest nie masowość finansowania nauki, ale wspieranie badań najwybitniejszych. Szczegółowe informacje na temat 7.PR i warunków ubiegania się o granty badawcze można znaleźć na stronie internetowej: <http://erc.europa.eu>

Europejska Rada Naukowa (ERC) rozpoczęła działalność w lutym 2007 r. w Berlinie. W jej skład wchodzi 22 członków, przedstawicieli państw członkowskich i stowarzyszonych. Jest wśród nich wielu noblistów i laureatów innych prestiżowych nagród. Ośmiu reprezentuje nauki ścisłe i technologiczne, siedmiu nauki o życiu, a pięciu nauki humanistyczne i społeczne. Przewodniczącym Rady jest grecki uczyony – Fotis Kalatas, a **jedynym zasiadającym w niej Polakiem – prof. Michał Kleiber**, prezes Polskiej Akademii Nauk. ERB ma być niezależnym ciałem eksperckim dba-

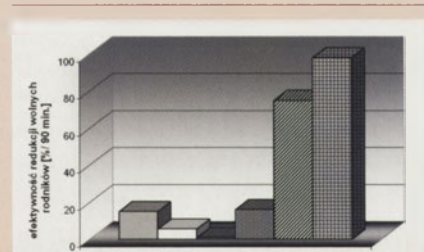
jącym o to, aby rozwój badań w Europie przebiegał zgodnie z wymogami naukowej doskonałości (PAP – Nauka w Polsce, kwiecień 2007).

Prozdrowotne walory polskich produktów pasiecznych przedstawiają naukowcy z Zakładu Biochemii Akademii Rolniczej w Krakowie: **prof. Henryk Kołoczek i adiunkci dr Paweł Kaszycki oraz Adam Świderski**. Są to wyniki kompleksowych badań nad wartością odżywczą i leczniczą miodu, pyłku pszczelego kwiatowego oraz pierzgi, prowadzone w Zakładzie Biochemii Akademii Rolniczej w Krakowie we współpracy ze Zrzeszeniem Pszczelarzy „Apipol”, realizowane od 2005 roku przy wsparciu finansowym budżetu państwa i Komisji Europejskiej. W trzech kolejnych minirozdziałach, badacze wykazują, że zarówno bogate w przeciwutleniające miody, jak i pyłek oraz pierzga są źródłem aktywnych biologicznie substancji i powinny służyć do produkcji nowoczesnych preparatów, stosowanych w diecie człowieka zgodnie z zasadami tzw. żywienia terapeutycznego.

Analizy prowadzono z zastosowaniem specjalistycznej aparatury i nowoczesnych metod badawczych: chromatografii wysoko- (HPLC) i średniociśnieniowej (FPLC), technik elektroforetycznych, spektroskopii UV/VIS oraz chromatografii gazowej sprzęgniętej ze spektrometrią mas (GC/MS). Metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, w unikatowej wersji pomiarowej tzw. *L-band EPR*) wykorzystano do określenia własności przeciwutleniających aktywnych biologicznie związków, poprzez bezpośrednie obserwacje zdolności zmiatania stabilnych wolnych rodników.

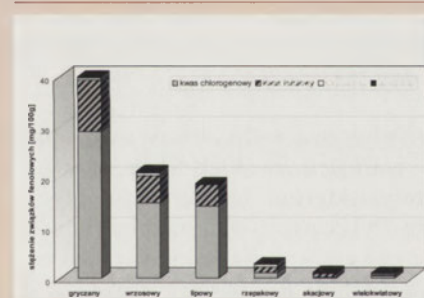
Badania przeciwutleniaczy w polskich miodach nektarowych. Znaczną część swych zdrowotnych właściwości miód zawdzięcza obecności przeciwutleniaczy – substancji przeciwdziałających szkodliwym wolnorodnikowym reakcjom utleniania. W badaniach ogólnych własności przeciwutleniających analizowano, w warunkach *in vitro*, zdolności do zmiatania wolnych rodników przez polskie nektarowe miody odmianowe: akacjowy, gryczany, lipowy, rzepakowy,

wielokwiatowy i wrzosowy. Szczególnie wysokie aktywności wykazano dla miodu gryczanego i wrzosowego (Ryc. 1). Wiadomo jest, że wiele spo-



Rycina 1. Aktywności antyoksydacyjne odmianowych miodów polskich. Od lewej: miód rzepakowy, lipowy, akacjowy, wielokwiatowy, wrzosowy, gryczany.

śród związków fenolowych, takich jak: kwercetyna, kempferol, apigenina z grupy flawonoidów, czy też kwasów fenylopropenowych: kawowego, chlorogenowego i ferulowego, przejawia silne aktywności przeciwutleniające. Stosując analizy HPLC, w badanych miodach oznaczano przeciwutleniacze fenolowe. Wymienione miody – gryczany i wrzosowy, a także lipowy, wyróżniły się pod względem wysokiej zawartości kwasu chlorogenowego i ferulowego (Ryc. 2).



Rycina 2. Antyoksydanty fenolowe w polskich miodach nektarowych.

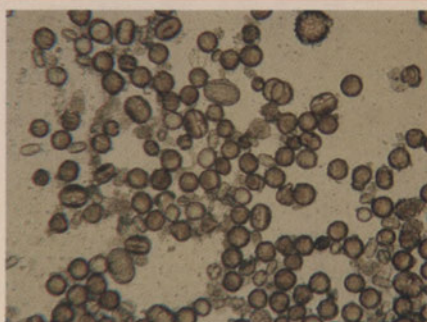
Obecnie trwają prace nad identyfikacją szeregu innych przeciwutleniaczy we frakcjach wydzielonych z poszczególnych odmian miodów. W toku badań stwierdzono bowiem, że działanie przeciwutleniające wykazują również inne obecne w miodach substancje o różnej polarności, rozpuszczalności i właściwościach chemicznych. Dotyczy to, m.in. frakcji białkowej. Białka to ważne i biologicznie aktywne składniki miodów, odpowiedzialne m.in. za cenne właściwości przeciwbakteryjne, enzymatyczne i przeciwzapalne. Miód gryczany wyróżniał się szczególnie dużą

zawartością białka oraz aktywnością przeciwutleniającą tej frakcji. W analizach elektroforetycznych wykazano dużą – w porównaniu z pozostałymi miodami – ilość białek niskocząsteczkowych, być może z grupy cytochromów, które mogą przyczyniać się do szczególnej aktywności przeciwutleniającej tego miodu. Ta interesująca frakcja białkowa jest również obecnie badana przez nasz Zespół.

Polskie miody słyną z wysokiej jakości i mnogości odmian. Ich wartość lecznicza i walory dietetyczne zależą głównie od gatunku rośliny, z której pszczoły zebrały nektar. Miody szczególnie bogate w przeciwutleniacze mogą być pomocne w profilaktyce chorób nowotworowych i krążenia, a także przydatne w hamowaniu wolnorodnikowych procesów starzenia.

Badania przeciwutleniaczy umożliwią w przyszłości pełniejszą standaryzację miodów pod względem cennych dla człowieka związków czynnych biologicznie oraz pozwolą wskazać miody o szczególnie wartościowych cechach prozdrowotnych. Przyczynią się też zatem do zwiększenia konkurencyjności miodów polskich na rynkach Unii Europejskiej i całego świata (autorzy: Paweł Kaszycki, Henryk Kołoczek).

Pyłek pszczeli kwiatowy i pierzga – wartościowe składniki naturalnej diety ukierunkowanej terapeutycznie. Pyłek pszczeli kwiatowy (Ryc. 3)



Rycina 3. Mikroskopowy obraz pyłku pszczelego kwiatowego (pow. ok. 100x).

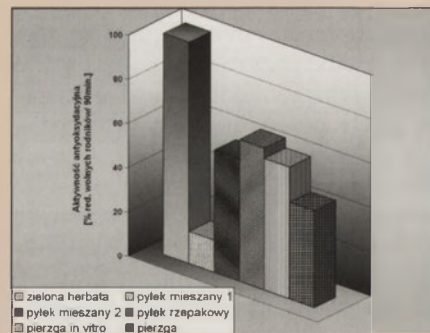
jest mieszaniną obnóży pyłkowych o składzie, zabarwieniu oraz zawartości substancji aktywnych, zależnych od rodzaju pożytku pszczelego (czyli dostępnego dla pszczoł pokarmu). Jest to produkt niezwykle odżywczy, stanowiący cenny materiał energe-

tyczny (bogaty skład węglowodanów, białek i lipidów) i źródło błonnika pokarmowego. Szerokie zastosowanie w medycynie ludowej i klasycznej wiąże się z wysoką zawartością czynnych biologicznie związków: glikozydów, fenoli, karotenoidów, tokoferoli, fitosteroli, jak również: aminokwasów, makro- i mikroelementów oraz witamin i enzymów. Pszczoły, dodając wydzielinę gruczołów ślinowych do pyłku, przetwarzają go w zapas pokarmowy – pierzgę, która jest trwalsza i lepiej przyswajalna w wyniku przemian biochemicznych podczas beztlenowej fermentacji mlekowej.

W Zakładzie Biochemii AR w Krakowie analizowano skład, własności i wartość odżywczą pyłku pszczelego i pierzgi, określając ich przydatność jako dodatków wspomagających leczenie. Badano pyłek odmianowy (pożytek rzepakowy) oraz dwie próby pyłku mieszanego, pozyskanego z kilkunastu gatunków roślin, różniące się proporcjami poszczególnych składników (próby te zawierały m.in. pyłek zebrany z: jabłoni, śliwy, rzepaku, koniczyny, ostrożeńca, mniszka oraz pięciornika). Pierzgę naturalną porównywano natomiast z preparatem otrzymanym w laboratorium (tzw. pierzga *in vitro*), wytworzonym według specjalnie opracowanej technologii kontrolowanej fermentacji.

W badaniach wszystkich prób charakteryzowano frakcje wzbogacone w różnorodne czynne substancje (m.in. cukry, białka, witaminy, glikozydy, fenole i flawonoidy, karotenoidy, kwasy tłuszczowe, fitosterole), uzyskane w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikami o różnej polarności. Wykazano między innymi wysokie, porównywalne z wzorcowymi wyciągami z herbaty zielonej, aktywności przeciwutleniające (Ryc. 4), istotnie podnoszące prozdrowotną wartość preparatów.

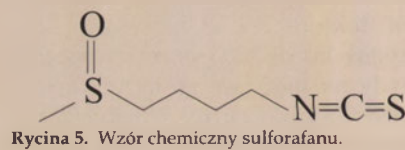
Wykonane badania potwierdziły, że pyłek pszczeli i pierzga są źródłem unikatowego zestawu biologicznie aktywnych substancji, łatwo przyswajalnych i występujących w szczególnie korzystnych proporcjach. Produkty te mogą zatem służyć jako dodatki do diety, jak również być niezwykle cennym surowcem farmaceu-



Rycina 4. Aktywność antyoksydacyjna pyłków, pierzgi i zielonej herbaty.

tycznym (autorzy: Paweł Kaszycki, Henryk Kołoczek).

Ziołomiód brokułowy – naturalny przeciwnowotworowy produkt leczniczy. Ziołomiody, obok innych produktów pasiecznych, mogą być cennymi składnikami diety prozdrowotnej. W Zakładzie Biochemii AR w Krakowie, we współpracy z Przedsiębiorstwem Pszczelarskim „Apipol – Kraków”, prowadzono badania nad opracowaniem biotechnologii produkcji ziołomiodu wzbogaconego w **sulforafan – aktywny biologicznie składnik pochodzący z brokułów** (Ryc. 5).



Soki warzyw z grupy roślin krzyżowych są szczególnie bogate w glukozynolany – związki glikozydowe, zawierające w cząsteczce atom siarki. Produkty metabolicznych przemian glukozynolanów, jak np. glukorafaniny, wykazują działanie lecznicze, przeciwdziałając rozwojowi nowotworów. Hydroliza glukozynolanów z udziałem enzymu mirozynazy (tioglukozydaza, EC 3.2.3.1) prowadzi do powstania biologicznie czynnych pochodnych izotiocyjanianowych. W przypadku glukorafaniny jednym z produktów jest sulforafan. Postulowane chemoprotekcyjne działanie sulforafanu jest wynikiem indukcji enzymów uczestniczących w szlakach metabolizmu kancerogenów.

Ziołomiody są naturalnymi produktami spożywczymi, powstałymi w wyniku przetworzenia przez pszczoły wziętków, będących wy-

ciągami roślinnymi w syropie sacharozowym. Zazwyczaj tzw. wziętek pszczeli to pożytek przynoszony do ula przez pszczoły; w tym przypadku podaje się pszczołom surowiec w postaci wcześniej przygotowanych ekstraktów.

Prace badawcze obejmowały optymalizację enzymatycznej hydrolizy glukorafaniny w soku z brokułów, opracowanie warunków ekstrakcji sulforafanu, przygotowanie wziętku i wreszcie – efektywny transfer sulforafanu do ziołomiodu. Pszczoły, traktując uzyskaną pożywkę brokułową jako wziętek, wprowadzały go do wola i wzbogacały w szereg własnych czynników (enzymy, hormony), po czym produkt zagęszczaly do konsystencji miodu i pokrywały warstwą wosku. Zastosowana receptura ekstrakcji sulforafanu gwarantowała jego aktywność i trwałość chemiczną, a podawane dawki były fizjologicznie bezpieczne, to znaczy nie stwarzały jakiegokolwiek zagrożenia pojawienia się objawów nadmiaru związków siarki. Otrzymany ziołomiod (Ryc. 6) był pełnowartościowym produktem spożywczym, zawierającym sulforafan w stężeniu warunkującym jego aktywność biologiczną (1.2 μ M) (autorzy: Henryk Kołoczek, Paweł Kaszycki, Adam Świdorski).



Rycina 6. Brokuł (*Brassica oleracea* var. *cymosa*). Z lewej – próbka ziołomiodu brokułowego.

Uszkodzenia DNA mają wpływ na powstawanie nowotworów. Polscy naukowcy wykazali, że zaburzenie współdziałania dwóch enzymów odpowiedzialnych za naprawę DNA jest istotne w procesie rozwoju nowotworu. Badania nad rolą stresu oksydacyjnego w mutagenезie i rakowaceniu komórek płuc prowadził prof. Jarosław Kuśmierk, kierownik Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN

w Warszawie. Profesora wyróżniono Nagrodą Wydziału Nauk Biologicznych PAN. Wyniki badań, uzyskane we współpracy z zespołami prof. Barbary Tudek z Instytutu Biochemii i Biofizyki i prof. Ryszarda Olińskiego z Collegium Medicum w Bydgoszczy, zostały opublikowane w prestiżowym amerykańskim piśmie „Journal of the National Cancer Institute”. W wywiadzie dla PAP-u prof. Kuśmierk szeroko przedstawił tezy badań i wyniki prac. W każdym żywym organizmie tlenowym, jako uboczny produkt metabolizmu, powstają niezwykle aktywne cząsteczki – reaktywne formy tlenu (RFT). Należą do nich wolne rodniki tlenowe, odpowiadające m.in. za procesy starzenia się organizmu, liczne choroby i powstawanie zmian nowotworowych. Każda komórka posiada też system obrony przeciw RFT. Składają się na niego związki przeciwutleniające (antyoksydanty) oraz specjalistyczne enzymy naprawcze. W sprawnym organizmie istnieje stan równowagi pomiędzy powstawaniem reaktywnych form tlenu a działaniem systemów ochronnych. Czasami równowaga ta może ulec przesunięciu w stronę wzmożonej produkcji RFT i dochodzi wówczas do powstania tzw. stresu oksydacyjnego – przyczyny poważnych zaburzeń w metabolizmie komórkowym. Reaktywne formy tlenu wchodzi wówczas w reakcje chemiczne ze składnikami komórki, niszcząc białka, błony komórkowe i DNA. Uszkodzenia DNA prowadzą natomiast do mutacji, a te leżą u podłoża procesów nowotworowych. Rodniki tlenowe chętnie łączą się z podstawowymi składnikami nici DNA - zasadami azotowymi. Dochodzi wówczas do uszkodzenia zasad. Jednym z ich produktów jest 8-oksoguanina (8-oksoG), powstała w wyniku przemiany w guaninie (G). 8-oksoguanina ma wysoce mutageny charakter. Sprzyja powstawaniu błędów podczas procesu podziału komórki i tworzenia potomnej nici DNA. Jeżeli błędy te nie zostaną skorygowane przez specjalistyczne enzymy naprawcze, dochodzi do mutacji, które z kolei są główną przyczyną nowotworów. Szacuje się, że w ludzkim DNA na każdy milion zasad występuje ok. dziesięć 8-oksoG, co oznacza, że przeciętna komórka zawiera ok. 104 reszt 8-oksoG. Uszkodzenia oksydacyjne DNA podlegają

intensywnej naprawie przez szereg wyspecjalizowanych enzymów. Kluczowe są dwa enzymy: hOGG1 (8-oksoguanino-glikozylaza) i hMTH1 (8-okso-dGTPaza). Rolą hOGG1 jest wycinanie 8-oksoG obecnej w DNA, natomiast hMTH1 eliminuje uszkodzone prekursor DNA zawierające 8-oksoG i tym samym nie dopuszcza do wbudowywania 8-oksoG do nowo powstającej nici DNA. Wykazanie kluczowej roli hMTH1 w utrzymaniu integralności struktury DNA w komórkach ludzkich było najważniejszym wynikiem badań zespołu prof. Kuśmierka i grup współpracujących. W pracy eksperymentalnej porównano wpływ aktywności tych enzymów na poziom 8-oksoG w DNA tkanki nowotworu płuca i tkanki zdrowej. Okazało się, że w tej pierwszej aktywność hOGG1 jest zmniejszona, natomiast hMTH1 zwiększona.

Różnica ta może być spowodowana odmienną regulacją tworzenia tych enzymów w komórkach zdrowych i zmienionych nowotworowo lub późniejszych oddziaływań z innymi składnikami szlaków naprawy DNA. Istnieje także możliwość, że zmiana aktywności jest wynikiem modyfikacji ich struktury przez produkt stresu oksydacyjnego, czyli właśnie reaktywne formy tlenu. Niektóre z tych możliwości badane są nadal w pracowniach IBB PAN w Warszawie oraz w CM AM w Bydgoszczy. Naukowcy mają nadzieję, iż poznając czynniki wpływające na aktywność hOGG1 i hMTH1, być może uda się im zaprojektować jakieś substancje, które zwiększą ich aktywność, a przez to obniżą poziom uszkodzeń oksydacyjnych. Jak na razie zalecana jest dieta bogata w przeciwutleniacze (dużo jarzyn i owoców), zubożająca reaktywne formy tlenu, a tym samym ograniczająca prawdopodobieństwo uszkodzeń DNA i powstawania mutacji inicjujących proces nowotworowy (wg PAP – Nauka w Polsce).

Modelowanie energetyki komórki mięśnia szkieletowego i serca. Dr hab. Bernard Korzeniewski z Zakładu Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego i prof. Jerzy Żołądź z krakowskiej Akademii Wychowania Fizycznego otrzymali nagrodę zespołową II Wydziału Polskiej Akademii Nauk za cykl prac do-

tyczący „teoretycznych badań regulacji procesu fosforylacji oksydacyjnej i glikozy w mięśniu szkieletowym oraz sercu”. Naukowcy opracowali model komputerowy umożliwiający zrozumienie złożonych procesów energetycznych, zachodzących w tych organach, np. w czasie treningu. Poniżej przedstawiam omówienie tezy i wyników nagrodzonych badań, autorstwa dr hab. Bernarda Korzeniewskiego.

Sama znajomość schematu przebiegu jakiegoś szlaku metabolicznego lub zespołu takich szlaków (czyli składających się nań metabolitów, enzymów i reakcji biochemicznych) nie wystarczy do pełnego, ilościowego zrozumienia jego regulacji. Regulacja ta ma szczególne znaczenie w przypadku zewnętrznego zaburzenia rozważanego układu biochemicznego. Jednym z najważniejszych układów biochemicznych w komórce zwierzęcej jest zespół szlaków metabolicznych prowadzących do produkcji energii w postaci ATP w wyniku utleniania substratów takich jak cukry lub tłuszcze. W warunkach fizjologicznych w komórkach ssaków głównym procesem dostarczającym ATP jest fosforylacja oksydacyjna w mitochondriach. Regulacja tego szlaku metabolicznego ma szczególne znaczenie w takich tkankach jak: mięsień szkieletowy, gdzie zmiany w zapotrzebowaniu na ATP są największe, oraz mięsień sercowy, gdzie musi być zachowana możliwie duża homeostaza ze względu na kluczową rolę serca dla funkcjonowania organizmu. Najczęstszym (i mającym największe znaczenie fizjologiczne) zaburzeniem układu fosforylacji oksydacyjnej w mięśniu jest przejście od spoczynku do intensywnego wysiłku w mięśniu szkieletowym (kiedy zapotrzebowanie na ATP może wzrosnąć ponad 100-krotnie) oraz zwiększenie intensywności pracy wykonywanej przez serce. Zwiększone zużycie ATP związane jest ze spotęgowaniem pracy mechanicznej oraz transportu jonów wapnia w komórce mięśniowej.

Zbudowany przez Korzeniewskiego i współpracowników (Mazat, Żołądź, Noma, Matsuoka, Liguziński) model układu energetycznego, a w szczególności fosforylacji oksydacyjnej, w komórkach mięśnia szkieletowego i serca jest komputerowym modelem dynamicznym (to znaczy

uwzględniającym zachowanie się układu w czasie). Każda reakcja enzymatyczna, proces lub blok metaboliczny uwzględniony *explicite* w modelu, opisany jest przy pomocy równania kinetycznego wyrażającego zależność szybkości danej reakcji od stężeń substratów, produktów i zewnętrznych aktywatorów/inhibitorów. Szybkości zmian stężeń metabolitów wyrażone są z kolei jako układ równań różniczkowych. Model został wszechstronnie przetestowany poprzez porównanie wyników symulacji komputerowych z danymi eksperymentalnymi.

Jednym z najważniejszych wyników teoretycznych osiągniętych przy pomocy modelu było zaproponowanie nowego mechanizmu regulacji fosforylacji oksydacyjnej w mięśniu szkieletowym i sercu. Od dziesiątków lat wiadomo, że na poziomie molekularnym skurcz mięśnia, czyli przesuwanie się wobec siebie (napędzane przez hydrolizę ATP) filamentów aktyny i miozyny, spowodowany jest uwolnieniem jonów wapnia z cystern siateczki sarkoplazmatycznej do cytoplazmy. Nieco później odkryto, że jony te aktywują także trzy enzymy cyklu Krebsa. Otóż symulacje komputerowe pokazały, że jedynie bezpośrednia aktywacja wielu (lub nawet wszystkich) kompleksów fosforylacji oksydacyjnej jest w stanie wyjaśnić szeroką gamę danych doświadczalnych zgromadzonych w literaturze, a w szczególności względną stałość stężeń metabolitów przy wzroście intensywności pracy i hydrolizy ATP – jest to tak zwany „parallel-activation mechanism” lub „each-step-activation mechanism”. Model jest w stanie opisać także zachowanie się fosforylacji oksydacyjnej przy innych zaburzeniach tego układu, na przykład podczas niskiego stężenia tlenu (hypoksja), spowodowanego ograniczonym dopływem krwi (ischemia).

Oczywiście dokładne, ilościowe poznanie funkcjonowania układu w ramach nauk podstawowych stanowi konieczny etap poprzedzający jakiegokolwiek zastosowania praktyczne. Model fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach komórek mięśniowych został już użyty do teoretycznego badania genezy chorób mitochondrialnych. Jego potencjalne możliwości są jednak znacznie większe. Byłby on

przydatny zarówno w medycynie, na przykład przy zapobieganiu zawałom serca oraz łagodzeniu ich skutków, w fizjologii wysiłku fizycznego, przy planowaniu odpowiednich metod treningu mającego polepszyć osiągnięcia sportowe, a także przy rehabilitacji po urazach.

Nagroda Kartezjusza w dziedzinie badań. Na początku marca b.r., podczas ceremonii w Brukseli, trzy projekty badawcze finansowane przez Komisję Europejską zostały uhonorowane nagrodą Kartezjusza w dziedzinie badań, o łącznej wysokości 1 miliona euro. W jednym z nich, dotyczącym stereoskopowych systemów wysokich energii, uczestniczą polscy naukowcy – prof. Michał Ostrowski z Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz dr Bronisław Rudak z Centrum Astronomicznego im. M. Kopernika PAN w Warszawie. W skład zespołu wchodzi ponadto profesorowie/doktorzy: Tomasz Bulik, Jarosław Dyks, Rafał Moderski i Marek Sikora z CAMK oraz Łukasz Stawarz z UJ.

System Stereoskopowy Wysokich Energii (High Energy Stereoscopic System, **HESS**) to zespół czterech teleskopów, który zrewolucjonizował dotychczasowe metody obserwacji astronomicznej i przyczynił się do poszerzenia wiedzy o Drodze Mlecznej i Wszechświecie. Umożliwia przestrzenną obserwację lawiny cząstek i pozwala określać energię oraz kierunek kosmicznych promieni gamma (fotonów o energiach 100 mld razy większych niż światło widzialne). Wsparcie techniczne działaniom całego polskiego zespołu zapewnia Centrum Badań Kosmicznych PAN w Warszawie. Europejskie obserwatorium HESS ulokowane jest w Namibii.

W dwóch innych nagrodzonych projektach nie ma Polaków. W ramach projektu Hydrosol opracowano metodę uzyskiwania wodoru poprzez rozkład wody z wykorzystaniem energii słonecznej, co mogłoby przyczynić się do przyjaznej środowisku produkcji wodoru na potrzeby pozyskania energii. Trzeci projekt, APOPTOSIS, znacznie przyczynił się do naszego zrozumienia zaprogramowanej śmierci komórki, umożliwiając osiągnięcie dalszych postępów w leczeniu

nowotworów i AIDS. Nagrody wręczono podczas ceremonii w Brukseli, w obecności niemieckiej minister ds. edukacji i badań, dr Annette Schawan i europejskiego komisarza ds. badań naukowych i rozwoju, dr Janeza Potočnika. Ceremonia ta zbiegła się w czasie z uroczystościami z okazji 50-lecia badań naukowych w UE.

Do finału zakwalifikowano również pięć innych projektów: NEMABS (uzyskanie jasnego obrazu cząsteczek poprzez ich barwienie); QGATES (stosowanie mechaniki kwantowej w przetwarzaniu informacji); TAMRAM (pamięć operacyjna wykorzystująca technologię zapisu magnetycznego); DYNAQPRIM (dynamika białek w jądrze komórki) oraz GLOBALIFE (drogi życiowe w procesie globalizacji).

Unijna nagroda Kartezjusza w dziedzinie badań jest przyznawana zespołom naukowców od 2000 roku za wybitne osiągnięcia naukowe lub techniczne odniesione dzięki międzynarodowym badaniom we wszystkich dziedzinach naukowych, łącznie z naukami społecznymi, humanistycznymi i ekonomicznymi. Nagrodę przyznaje jury, któremu przewodniczy pani Claudie Haigneré, była minister Francji ds. UE i astronautka Europejskiej Agencji Kosmicznej. Jury składa się z 22 wybitnych naukowców z 11 państw członkowskich UE oraz z: Brazylii, Maroka, Rosji i Turcji, zajmujących się szerokim wachlarzem dziedzin naukowych.

Tegoroczni laureaci zostali wybrani spośród 13 nominowanych, których z kolei wybrano spośród 66 zgłoszeń. Od 2004 roku nagroda przyznawana jest także w dziedzinie popularyzacji nauki. Jej zadaniem jest promowanie badań europejskich, stymulowanie wzrostu zainteresowania społeczeństw wynikami naukowymi oraz zachęcanie młodych ludzi do kariery naukowej (wg PAP – Nauki w Polsce i witryny Obserwatorium Astronomicznego UJ).

W numerze 2. „Postępów Biochemii” z 2007 roku informowałam o wyróżnieniu prof. Haliny Abramczyk – kierującej dotychczas Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej (LLSM) Międzyresortowego Instytu

tutu Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej – prestiżowym grantem UE, czyli Katedrą Marii Curie w wiodącym centrum laserowym w Europie, tj. w Max Born Institute for Nonlinear Optics and Short Pulse Spectroscopy (MBI) w Berlinie. Instytutowi temu Unia Europejska powierzyła koordynowanie prac konsorcjum laserowego LASERLAB EUROPA, składającego się z 17 europejskich centrów laserowych w dziewięciu krajach. Poniżej rozszerzam informację o dotychczasowych osiągnięciach macierzystego Zakładu Pani Profesor.

Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej Politechniki Łódzkiej kontynuuje obiecujące badania nad nowoczesną techniką diagnostyczną metodą światła rozproszonego Ramana. Chodzi o wykrywanie wczesnych zmian nowotworowych *in vivo*, w tkankach człowieka. Badania realizowane są we współpracy z Oddziałem Chirurgii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi, I Szpitalem Miejskim im. dr E. Sonnenberga w Łodzi oraz z Publicznym Ośrodkiem Zdrowia w Andrespolu pod Łodzią. Badania tego typu należą do najbardziej „gorących” i obiecujących technik diagnostycznych i zabiegowych. Zmierzają one bowiem ku zastąpieniu inwazyjnej analizy histopatologicznej zmienionej chorobowo tkanki metodą nieinwazyjną, a polegającą na badaniu tkanki *in situ* w czasie realnym, tj. w trakcie rutynowego badania lekarskiego. Można to osiągnąć za pomocą technik optycznych, takich właśnie jak spektroskopia Ramana, wykorzystując optykę światłowodową sprzężoną ze spektrometrem i detektorem.

Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej Politechniki Łódzkiej dysponuje unikatowymi w kraju układami laserowymi, w szczególności femtosekundowym układem laserowym i układem laserowym do pomiarów światła rozproszonego metodą Ramana. Tym samym zalicza się do bardzo wąskiej grupy najnowocześniejszych laboratoriów laserowych w Polsce. Współpracuje z laboratoriami zagranicznymi Francji, Niemiec i USA, a jako placówka wchodząca w skład Międzyuczelnianego Laboratorium Środowiskowego, udostęp-

nia łódzkim chemikom nowoczesną i unikatową aparaturę badawczą. Choć projekty badawcze dotyczące zastosowania spektroskopii Ramana w diagnostyce medycznej *in vivo* nie są jeszcze na świecie skomercjalizowane to trwa w tej dziedzinie wyścig. W Massachusetts Institute of Technology kończą się prace nad etapem ustalenia optymalnej konfiguracji układu eksperymentalnego, mające na celu użycie techniki Ramana jako metody optycznego rozpoznawania w diagnostyce nowotworów tkanek człowieka *in vivo*. Firma Intel (największy światowy producent procesorów komputerowych) oraz Fred Hutchinson Cancer Research Center (z dwoma laureatami nagród Nobla w swoim zespole) ogłosiły w październiku 2003 roku, że rozpoczynają prace nad budową diagnostycznego spektrometru Ramana, zwanego INTEL RAMAN BIOANALYZER, zaś w kwietniu 2004 – Palo Alto Research Center (Stanford University) we współpracy z firmą Xerox i Scipps Research Institute, prezentując szybki cytometr monitorujący zmiany nowotworowe w rutynowym badaniu krwi ludzkiej, zapowiedziały projekt, z którym wiąże się nadchodzący przełom w diagnostyce medycznej nowotworów (wg PAP – Nauka w Polsce).

Akalkulia, zaburzenie zdolności procesów liczenia, powstałe wskutek uszkodzenia mózgu, jest przedmiotem zainteresowań badawczych Marty Gryko-Sobańskiej, psychologa z Uniwersytetu Warszawskiego (doktorantka Wydziału Psychologii UW). Z tym zagadnieniem wiąże się pytanie czy można żyć bez liczb. Akalkulia występuje w 16-28 proc. przypadków przy uszkodzeniach lewej półkuli mózgu. Ponieważ jednak za procesy związane z liczeniem odpowiadają obydwie półkule, akalkulia może wystąpić też przy uszkodzeniach prawej półkuli. Zaburzenia zdolności liczenia mogą poważnie utrudnić codzienne funkcjonowanie pacjentów, którzy stają się uzależnieni od pomocy innych osób przy wykonywaniu takich czynności jak: szacowanie czasu, posługiwanie się telefonem, płacenie rachunków czy robienie zakupów. Akalkulia jest zaburzeniem występującym u osób dorosłych. Dysfunkcja systemu poznawczego dojrzałego mózgu pojawia się jako wynik cho-

roby, np. udaru lub mechanicznego urazu. Akalkulia może być także objawem wtórnym wobec zaburzeń innych funkcji poznawczych. Bywa, że współwystępuje z zaburzeniami mowy, a także pamięci oraz orientacji w przestrzeni i schemacie własnego ciała. Najczęstszymi skutkami akalkulii są zaburzenia dwóch podstawowych zdolności liczenia. Jest to niemożność wykonania prostych działań arytmetycznych i przekodowania jednej postaci liczb na drugą – na przykład czytanie lub zapis słowny liczb arabskich. Akalkulia może pojawić się zupełnie niezależnie. Najczęstszymi jej oznakami są wówczas trudności w wykonywaniu prostych działań arytmetycznych. System poznawczy może ulec tylko wybiórczemu uszkodzeniu. Możliwe są przypadki, kiedy pacjent potrafi dodawać i mnożyć, ale ma problem z dzieleniem i odejmowaniem. Może też rozumieć liczby zapisane w postaci cyfr arabskich, ale nie potrafi ich napisać w takiej formie. Spotyka się również pacjentów, którzy nie rozpoznają znaczenia niektórych znaków arytmetycznych, jak + czy x, w związku z czym nie wykonują pisemnie takich działań, choć ze słuchu rozwiązują je poprawnie. Akalkulię może zdiagnozować neuropsycholog, i mimo braku narzędzi do diagnozy w Polsce, doświadczony specjalista może ułożyć testy zezwalające na zdiagnozowanie zaburzenia. Doktorantka razem z promotorką swojej pracy doktorskiej, prof. Emilią Łojek, pracuje nad takim testem. Posiłkując się wstępną wersją testu, naukowcy przebadali już około 100 osób. Za niezbędne elementy testów do diagnozy akalkulii specjalistka uważa proste działania arytmetyczne, np. „ 4×8 ” czy „ $6 + 3$ ”, a także zadania polegające np. na przeczytaniu na głos liczb zapisanych za pomocą cyfr czy zapisaniu liczb, które dyktujemy pacjentowi. Dokładna diagnoza akalkulii musi jednak objąć także inne zadania, np. zliczanie elementów zbioru, szacowanie, porównywanie wielkości liczb, obliczenia w zeszycie, zadania tekstowe. Terapia akalkulii może przywracać utraconą zdolność lub wypracować umiejętności zastępcze, które przejmą zadania zaburzonej funkcji. W Polsce nie ma ośrodków rehabilitacji zaburzeń liczenia (wg PAP – Nauka w Polsce).

Nowe sposoby walki z otyłością. W Krakowie, w drugiej dekadzie stycznia 2007 roku, lekarze z III Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum UJ, kierowanej przez prof. Romana Hermana, pięciu pacjentom z ciężką otyłością, wszczepili pod skórę z tyłu głowy, specjalne elektrody. Teraz nawet przy pustym żołądku do mózgu przekazywana jest informacja, że są syty. Był to pierwszy tego typu zabieg wykonany na świecie. Naukowcy spodziewają się, że procedura taka stanie się skuteczną bronią przeciwko patologicznemu łaknieniu, a tym samym przeciw otyłości. Elektrody zostały wszczepione na stałe; zasilanie włączają sami pacjenci po przebudzeniu. Nie czują nienormalnego apetytu i powoli tracą nadmierną masę ciała. Metodę „oszukiwania głodu” wymyślił dr Jacek Sobocki. Dotychczas w skrajnych przypadkach ciężkiej otyłości pacjentom proponowano operacyjne zmniejszenie objętości żołądka, ale to w realiach szczupłego funduszu na ochronę zdrowia Polski jest rzadko stosowane (jedna osoba na sto potrzebujących; wg PAP – Nauka w Polsce).

Kobiety z zespołem Turnera (ZT) są znacznie bardziej zagrożone chorobami układu krążenia i innymi chorobami cywilizacyjnymi. Odkrycie to jest wspólnym sukcesem lekarzy z Akademii Medycznej w Warszawie, Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach oraz Akademii Medycznej w Gdańsku.

Zespół Turnera jest uwarunkowaną genetycznie chorobą, występującą wyłącznie u kobiet. Powoduje ją mutacja w chromosomie X. Chore osoby charakteryzują się: niskim wzrostem, kręłą budową ciała, otyłością oraz licznymi wadami układu kostnego (szpotawością kolan i łokci, skróceniem czwartej kości śródreżca i śródstopia, wadami nadgarstka i klatki piersiowej). Mają: nisko osadzone uszy, nadmiar skóry na karku, pleciwiastą szyję, przebarwienia skóry oraz szeroko rozstawione brodawki sutkowe. Często cierpią z powodu: obrzęków stóp, zaburzeń widzenia, wad układu moczowego, układu krążenia oraz serca. U pańcetek nierzadko dochodzi też do zaburzeń psychologicznych. Najważniejszym elemen-

tem choroby są jednak zaburzenia układu rozrodczego (bezpłodność), słabo zaznaczone cechy żeńskie, niedorozwój zewnętrznych i wewnętrznych cech płciowych.

Leczenie ciężkiej choroby polega na codziennym podawaniu hormonu wzrostu i estrogenów, dla stymulacji procesu wzrostu oraz rozwoju żeńskich cech płciowych. Według dr hab. med. Małgorzaty Kozłowskiej-Wojciechowskiej z Katedry Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii AM w Warszawie – współautorki przedstawianych badań – skutecznego leku nie ma. Kuracja hormonalna nie zawsze przynosi oczekiwane efekty i nie likwiduje wszystkich zagrożeń. Zespół Turnera rozpoznawany jest u jednej na 2-2,5 tys. urodzonych dziewczynek. W Polsce rodzi się około 100 chorych dziewczynek. Ogólna liczba chorych wynosi w naszym kraju prawie 10 tys.

Naukowcy postanowili sprawdzić, czy osoby dotknięte tym schorzeniem, ze względu na jego charakter, są bardziej niż reszta populacji zagrożone rozwojem innych chorób cywilizacyjnych i metabolicznych. W zespole Turnera niedobór hormonów sprzyja chorobom układu krążenia i powstawaniu otyłości. W badaniach przeprowadzonych na chorych kobietach w wieku 25 lat i grupie kontrolnej (młode i zdrowe kobiety, około 24 lat) stwierdzono, że u kobiet z ZT jest znacznie wyższa wartości indeksu masy ciała (BMI) i współczynnika otyłości (WHR; stosunek talii do bioder), w porównaniu ze zdrowymi kobietami. Stwierdzono też, że osoby chore mają znacznie podwyższone rozkurczowe ciśnienie krwi oraz wyższy poziom glukozy i cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (promiażdżycowy) we krwi z równoległym niższym stężeniem cholesterolu lipoprotein o wysokiej gęstości (antymiażdżycowy) niż u przedstawicieli grupy kontrolnej.

Naukowcy uważają więc, że kobiety z zespołem Turnera stanowią grupę podwyższonego ryzyka i są znacznie bardziej zagrożone chorobami układu sercowo-naczyniowego (chorobą niedokrwienną serca, nadciśnieniem tętniczym, zmianami miażdżycowymi) oraz cukrzycą typu 2. W opinii bada-

czy jest to spowodowane poważnymi zaburzeniami w funkcjonowaniu gruczołów płciowych, powodującymi wydzielanie niedostatecznej ilości hormonów. Autorzy badań uważają, że chore kobiety wymagają szczególnej opieki już od najmłodszych lat. Powinny znajdować się pod stałym nadzorem medycznym i wobec chorych winna być stosowana profilaktyka oparta przede wszystkim na odpowiedniej diecie, zapobiegającej otyłości. Osoby chore mają zmniejszone zapotrzebowanie energetyczne dlatego tak łatwo rozwija się u nich nadwaga i otyłość. U kobiet z zespołem Turnera należy farmakologicznie przeciwdziałać nadciśnieniu i hiperglikemii (wg PAP – Nauka w Polsce).

Drzewa zdradzają tajemnice klimatyczne. Badania prowadzone z wykorzystaniem metod dendrochronologicznych, polegających na odczytywaniu informacji o warunkach klimatycznych z rocznych przyrostów drzew, pozwalają na odtwarzanie informacji o pogodzie sprzed kilkuset, a nawet kilku tysięcy lat - zatem o warunkach klimatycznych, jakie panowały setki lat wcześniej. Pomiar instrumentalny nie pozwala na uzyskanie tak daleko wstecznych informacji. Metody dendrochronologiczne pozwalają także na dokładne określenie daty ścięcia drzewa. W Polsce tego typu badania prowadzi między innymi dr Anna Cedro, geograf i klimatolog z Zakładu Klimatologii i Meteorologii Morskiej Uniwersytetu Szczecińskiego. Pani dr Anna Cedro, posilając się badaniami dendrochronologicznymi sosny (lata 1779–2002) i dąglezi zielonej (lata 1894–2002) na Pomorzu Zachodnim, zrekonstruowała okresy z przewagą długich i mroźnych zim oraz ciepłych miesięcy zimowych dla ostatnich 220 lat. Na podstawie chronologii dębowej określiła okresy suszy i wysokich opadów w okresie letnim dla ostatnich 430 lat (lata 1568–2002). Wyniki badań przewyższają te uzyskane metodami instrumentalnymi o ponad 300 lat. Drzewa, zarówno iglaste, jak i liściaste, wykształcają przyrost co roku. Przyrosty (słoje) są szczególnym zapisem życia i rozwoju drzewa od momentu wykiełkowania aż do chwili obumarcia czy pobrania próbek. Przyrost jest wytworem tkanki twórczej (kambium), znajdującej się między drewnem a lykiem. Szerokość przyrostu rocznego

zawiera dane klimatyczne (dotyczące temperatury i opadów) i środowiskowe. Szerokość słoików zmienia się co roku. Zależy to od wielu czynników (genetyczne, środowiskowe, oddziaływanie człowieka), ale najważniejsze są parametry klimatyczne: temperatura powietrza i opady atmosferyczne. Drzewo iglaste wykształci tym węższy przyrost w nadchodzącym sezonie wegetacyjnym, im zima jest bardziej mroźna i długa. Dęby nie są wrażliwe na warunki zimowe, chyba że są one skrajnie ekstremalne. Wrażliwe są natomiast na opady w sezonie letnim. Im więcej opadów, większa wilgotność

i niższa temperatura, tym dęby wykształcają szersze przyrosty. Susze w powiązaniu z wysokimi temperaturami lata (od maja do lipca) powodują, że ten przyrost jest bardzo wąski i drzewo ma kiepską kondycję zdrowotną. Powiązanie przyrostu drzew z latami, w jakich powstały, pozwala na rekonstrukcję warunków klimatycznych, jakie miały miejsce poza okresem pomiarów meteorologicznych.

Najważniejsze przy przeprowadzaniu takich badań jest znalezienie jak najdłuższych ciągów dendrochronologicznych. Możliwe jest to dzięki badaniu jak najstarszych drzew, a to z kolei wiąże się z żywotnością poszczególnych gatunków. Pomiar szerokości przyrostu rocznego, najczęściej z dokładnością do 0,01 mm i na podstawie kilkunastu drzew, które do siebie pasują pod względem statystycznym i graficznym, składa się na chronologię dla danego siedliska. Ta chronologia jest podstawą dalszych analiz dendroklimatologicznych (wg PAP – Nauka w Polsce).

Prof. dr hab. Władysław Gałasiński – doktor honoris causa AM w Białymstoku. 15 grudnia 2006 roku odbyła się w Akademii Medycznej w Białymstoku uroczystość nadania tytułu doktora honoris causa Akademii Medycznej w Białymstoku Panu Prof. dr hab. Władysławowi Gałasińskiemu (Fot. 1). Promotorem nadania tego tytułu był prof. Jerzy Pałka, dziekan



Fotografia 1. Prof. Jerzy Pałka – dziekan Wydziału Farmacji AM wręcza akt doktora honoris causa prof. Władysławowi Gałasińskiemu (po lewej).

Wydziału Farmaceutycznego. Recenzentami byli Profesorowie: Przemysław Szafranski, Mariusz Żydowo oraz Antoni Gabryelewicz.

Prof. W. Gałasiński jest jednym z najwybitniejszych polskich biochemików-farmaceutów, organi-

zатorem i pierwszym dziekanem Wydziału Farmaceutycznego w AMB, człowiekiem o nieskazitelnej postawie moralnej i etycznej, stanowiącej wzór nauczyciela akademickiego. Prof. Gałasiński jest od 1992 roku na emeryturze, a jednak wciąż obecny w życiu Zakładu Chemii Medycznej; bierze udział w pracach naukowych, wspiera radą i pomocą. Jesteśmy z Pana Profesora bardzo dumni. (tekst prof. Jerzy Pałka).



Fotografia 2. Prof. Mieczysław Chorąży.

Więcej o Uhonorowanym Profesorze warto przeczytać w czasopiśmie AM w Białymstoku pt. „Medyk Białostocki”, nr 1/2007.

Prof. Mieczysław Chorąży doktorem honoris causa Śląskiej Akademii Medycznej (Fot. 2). Wybitny uczyony w zakresie biologii nowotworów, twórca jednej z najlepszych w Polsce placówek

onkologicznych - Instytutu Onkologii w Gliwicach, prof. Mieczysław Chorąży, został w piątek 2 marca b.r. wyróżniony tytułem doktora honoris

causa Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

Prof. Chorąży jest 50. doktorem honoris causa tej uczelni. Wcześniej Akademia wyróżniła m.in. prof. Kornela Gibińskiego, nestora internistów Polskich, i prof. Zbigniewa Religę.

Promotor postępowania, prof. Marcin Kamiński, podkreślił, że prof. Chorąży nigdy nie był pokorny, jest natomiast „człowiekiem wyrastającym ponad poziomy”. Rektor Akademii, prof. Ewa Małecka-Tendera, powiedziała o uczonym, że „to człowiek wielkiego formatu”. Podczas uroczystości prof. Chorąży wygłosił wykład pt. „Geny i genetyka – dylematy i wyzwania”.

Prof. Mieczysław Chorąży, absolwent Akademii Medycznej w Warszawie, członek rzeczywisty PAN i czynny PAU, został obdarzony godnością Członka Honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Przez 32 lata kierował Zakładem Biologii Nowotworów w Centrum Onkologii w Gliwicach, kształtując zespół badawczy zauważony przez krajowe i światowe ośrodki onkologii doświadczalnej. Do najważniejszych osiągnięć naukowych prof. Chorążego i jego zespołu należy: zbadanie niektórych elementów regulujących funkcje genów komórek eukariotycznych oraz aktywności transkrypcyjnej wątroby szczura, wykrycie dotąd nieznanymi dziedzicznych mechanizmów powodujących zachorowania na nowotwory, zwłaszcza raka płuc, oraz odkrycie funkcjonowania mechanizmów DNA w komórkach zwierzęcych. Profesor jest jednym z pionierów badań nad mutagenezą środowiskową oraz epidemiologią molekularną i pozostaje autorytetem w tym zakresie. Wniósł znaczący wkład w badania nad uszkodzeniami DNA i chromosomów u mieszkańców skupisk przemysłowych i komunalnych na Śląsku. Rozwinął współpracę z ośrodkami badawczymi w Europie i Stanach Zjednoczonych. Wyróżniony uczony jest także członkiem Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Godność doktora honoris causa nadała Mu wcześniej Akademia Medyczna w Białymstoku. Profesor Chorąży jest autorem wielu publikacji, m.in. w „Nature” i innych

prestżowych czasopismach naukowych świata. Czynnie angażuje się w działalność zmierzającą do podniesienia w społeczeństwie, a zwłaszcza wśród młodzieży, wiedzy o chorobach nowotworowych i zapobieganiu im. Zainicjował i prowadzi od 9 lat program stypendialny dla młodych naukowców z byłych republik Związku Radzieckiego, finansowany przez National Cancer Institute, NIH w Stanach Zjednoczonych i przez Narodowy Komitet UNESCO (wg PAP – Nauka w Polsce oraz witryny PAN, 03.2007).

Dr Mikołaj Olejniczak (Fot. 3) został laureatem subsydium badawczego w programie „Powroty” („Homing”) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, przyznanego po raz pierwszy w tym roku. Jest uczonym specjalizującym się w badaniach nad kwasami rybonukleinowymi (RNA). W swojej pracy doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem prof. Ryszarda Adamiaka w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, zajmował się badaniami nad strukturą oraz oddziaływaniami, w których uczestniczy TAR RNA



Fotografia 3. Dr Mikołaj Olejniczak.

wirusów HIV. Wyniki jego prac zostały opublikowane między innymi w czasopismach: *Nucleic Acids Research* oraz *Journal of Biological Chemistry*. W czasie stażu podoktorskiego, który odbył w laboratorium prof. Olke Uhlenbecka na University of Colorado w Boulder oraz na Northwestern University w Evanston w USA, zajmował się badaniami nad mechanizmem translacji. W badaniach tych wykazał, że aktywność tRNA w procesie translacji zależy od tożsamości specyficznej pary nukleotydów położonej w pętli antykodonowej. Zmieniając nukleotydy wchodzące w skład tej pary, można modulować stabilność oddziaływania tRNA z rybosomem oraz kinetykę translacji. Wyniki te wyjaśniły w jaki sposób bardzo różnorodne cząsteczki tRNA mogą funkcjonować jako równie dobre substraty w syntezie białka na rybosomie. Badania te mają znaczenie dla zrozumienia mechanizmu translacji, a także dla badań nad wprowadzaniem nietypowych aminokwasów do białek.

Wyniki zostały opublikowane m.in. w czasopismach: *Nature Structural and Molecular Biology* oraz *Journal of Molecular Biology*. Po powrocie do kraju, w 2006 roku, rozpoczął badania nad mechanizmem kontroli translacji przez niekodujące RNA bakterii. Poza subsydium „Homing” otrzymał też na ten cel finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

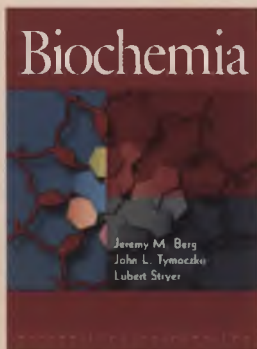
Laboratorium analiz farmaceutycznych powstaje aktualnie w strukturze Wydziału Farmaceutycznego AM w Białymstoku z zasobów finansowych Uczelni i środków pomocniczych UE w ramach programu INTERREG III A. Planowany termin uruchomienia laboratorium to druga połowa 2007 roku. Laboratorium będzie nastawione na dokonywanie oceny jakościowo-ilościowej leków i preparatów leczniczych oraz substancji toksycznych w preparatach leczniczych, żywności oraz w materiale biologicznym. Istnienie nowoczesnej jednostki badawczo-diagnostycznej pozwoli zwiększyć możliwości dydaktyczne i naukowe Wydziału oraz rozwinąć współpracę międzynarodową w zakresie wy-

soko zaawansowanych technologii. Konsekwencją rozwoju tej dyscypliny naukowej na Wydziale Farmaceutycznym AM w Białymstoku była konferencja na temat „Analiza farmaceutyczna i diagnostyka laboratoryjna a zdrowie człowieka”, zrealizowana w dniach 11-13 maja, 2007. Konferencję umieszczono w kalendarzu obchodów jubileuszu XXX-lecia Wydziału Farmaceutycznego AM w Białymstoku.

Nowoczesny **spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego**, Bruker Avance II Plus 700 MHz, drugi tej klasy w Polsce, wzbogacił Pracownię Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Instytutu Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Spektrometr przeznaczony jest przede wszystkim do badań chemicznych i biochemicznych, w tym także do wykonywania prac dyplomowych i doktorskich. Wcześniej zainstalowano taki spektrometr na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Metoda rezonansu magnetycznego nie zmienia struktury związków chemicznych ani nie niszczy żywych komórek. Poza chemią i biochemią znajduje zastosowanie jako technika obrazowania (MRI) w diagnostyce medycznej w badaniach stanu narządów wewnętrznych.

Przyrząd posiada wiele unikatowych rozwiązań technicznych. Jest wyposażony w cztery sondy o różnym przeznaczeniu, które zapewniają bardzo wysoką, dotąd nieosiągalną w kraju, czułość pomiarów, umożliwiającą analizowanie niewielkich ilości związków (masa rzędu kilkuset nanogramów) oraz ogromną rozdzielczość sygnałów. Te techniczne zalety sprawiają, iż spektrometr będzie zastosowany przy realizacji badań prowadzonych w Centrum Zaawansowanych Technologii BioTechMed, między innymi do badania strukturalnych i przesiewowych modyfikowanych kwasów nukleinowych i peptydów jako potencjalnych leków, w biotechnologii przemysłowej oraz biotechnologii roślin leczniczych stosowanych



w fitoterapii, olejków eterycznych jako antyseptyków i farmaceutyków, do sprawdzania trwałości substancji czynnych w lekach i kosmetykach oraz oceny czystości leków. Spektroskop sfinansowano z Funduszu Nauki i Technologii Polskiej (6 mln zł) (wg PAP – Nauka w Polsce).

Serwis – ibuk.pl został uruchomiony przez Wydawnictwo Naukowe w polskim Internecie. Umożliwia on korzystanie z elektronicznych wersji wybranych publikacji Wydawnictwa Naukowego PWN. Dzięki serwisowi ibuk.pl możliwe jest legalne przeglądanie pełnej, elektronicznej wersji książek oraz drukowanie wybranych fragmentów. Dzięki niskim cenom, książki oferowane przez PWN dostępne są praktycznie dla szerokich kręgów czytelników.

PWN wydał najpopularniejszy podręcznik biochemii na świecie. Nowe (2007 rok) polskie tłumaczenie podręcznika pt. *Biochemia* autorstwa: Jeremego Berga, Luberta Stryera i

John'a Tymoczko, zostało oparte na piątym wydaniu amerykańskim. Wg Wydawcy podręcznik różni się od poprzedniego, czwartego wydania. Jego motywem przewodnim jest ewolucyjne i porównawcze podejście do przedstawianych zagadnień. Czytelnik dowiaduje się o wspólnym ewolucyjnym pochodzeniu wielu makrocząsteczek, przede wszystkim białek wchodzących w skład licznych rodzin białkowych oraz o ewolucji i powiązaniach szlaków metabolicznych. Motyw ewolucyjny przewija się przez cały podręcznik, a został on szczególnie podkreślony w dwóch nowych rozdziałach, dotyczących ewolucji biochemicznej i filogenezy molekularnej, opartej na przyrównywaniu sekwencji aminokwasów białek i nukleotydowych DNA. Podręcznik składa się z 4 części: molekularny wzór życia, przekazywanie i magazynowanie energii, synteza cząsteczek życia, odpowiedź na zmiany warunków środowiska, i zawiera 34 rozdziały. Przekładu na język polski dokonali: Z. Szweykowska-Kulińska, A. Jarmolowska, H. Augustyniak, M. Dabert, J. Deckert, A. Goździcka-Józefiak, L. Hryniewiecka, W. Jarmuszkiwicz, U. Karwowska i H. Kmita.

HATTERERIA

Czyli
**Krótką rozprawą z historią
między hatterią a latimerią**
(Bernard Korzeniewski)

**Czy pampasem, czy też prerią,
Szła hatteria z latimerią.**

Powiedziała latimeria:
Bardzo jest gorąca preria.
Duszność wdziera się w me głębie
i zasycha mi w prągiebie.

Jest już ze mnie, tak to bywa,
Skamieniałość ledwo żywa.

Na to jej hatteria rzecze:
Moja droga, tam coś ciecze –
Jakaś wodna to arteria.

Odpowiada latimeria:
Chłodu mi nadzieja święta,
Widac, żeś nie w ciemnię bita.
Bita w ciemnię?! Rzeczy nowe!
Ja mam oko ciemieniowe!

Latimeria jej wyznała:
Ciemieniowo ociemniała
Jestem. Zamiast myśleć szynką,
Posługuję się szyszynką.
Tu hatteria ją prostuje:

Chyba masz mnie za szczęzuje!

*Po co duby pleść smalone,
Lepiej poszlabys na stronę
Pozwoluować trochę,
Zamiast tłuc o ścianę grochem.
Zyskasz u mnie pewne względy
Mając już trzonowe zęby.*

Latimeria: Na mą głowę!
*Dość, że pletwy mam trzonowe!
Ryba ze mnie nieco tłusta,
Ale całkiem wtórousta!
Lecz dwudyszna! W świecie tym
Czterodyszność wiedzie prym.*

*Albo Diesel. Więc do głowy,
Pójdź po olej napędowy.
Tego ci nie puszczę płazem,
Gadzie jeden, mą obrazę
Tak odeprę – to za mało
Posiąść czworonożne ciało
Troje oczu, z tyłu ogon,
Jeśliś ślepa jest odnoga
Ewolucji. Z takim wzrokiem,
Marne Twoje są widoki.*

*Ty zaś jakoś ciężko dyszysz
W tej ekologicznej niszy,
Zaś twój tępy wyraz pyska,
Coś mający z obeliska
Sprawił, że zachodzę w głowę,
Jak cię puścił dobór płciowy!?*

*Co do zaś odnogi bocznej
Ewolucji, to nie spoczne
Póki nie naświetlę wątku,
Że z takich jak Ty początków
Powstał płaz pełen skaz,
Potem gad pełen wad,
Wreszcie ssak pełen zachwytu,
Że doczłoga się do szczytu
(Jest to bлага pospolita –
Spójrz na monstrum, co to czyta).*

Latimeria odpowiada:
*Coś przytługa Twa tyrada,
Lecz katalog niedostatków
Mych potomków, który gładko
Tu przytaczasz, nie wystarczy,
By plusami się obarczyć.
Jaj składanie w zimnym piasku,
Wylażenie z jam o brzasku,
Wszyscy krewni już nieżywi,
Jako towarzystwo – kiwi
Niezbyt lotny na umyśle,
Pożywienie jarskie ściśle,
Nie stanowią wrót do chwasty.
Mój zaś sukces jest niemały,
Bo potomków moich plemię
Całą zamieszkuje Ziemię.*

Tu hatteria rzeknie z jadem
(**Chociaż jest niegroźnym gadem):**
Ta korona ewolucji,

*Co zawdzięcza Twojej chuci
Był swój, rzeknę nie bez wstrętu,
Miernego autoramentu
Być się mieni. Zjada wszystko,
W rymszok zmienia środowisko,
Wciąż się mnoży jak króliki,
Bez umiaru i logiki,
Robi wojny, HIV namnaża,
W końcu, że się tak wyrażę,
Pisze o nas, co smutniejsze,
Niecio idiotyczne wiersze.
Na rzecz jedną Cię uczulę –
Do myślenia te półkule
Są, co z przodu są, nie z tyłu.
Racz więc zatem moja miła,
Miał się w słońcu prerii prażyć,
Zamknąć swą szlachetną pra-rzyć.
**Tak to stępem oraz prerią
Szła hatteria z latimerią.***

Autor wiersza HATTERERIA, dr hab. Bernard Korzeniewski, jest biochemikiem i biofizykiem w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. W pracy naukowej zajmuje się modelowaniem energetyki komórki mięśni szkieletowego i serca, o czym napisano powyżej.

pod redakcją
Teresy Wesołowskiej

Mateusz Szamałek

Wanda Baer-Dubowska

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań; tel.: (061) 85 46 621, e-mail: baerw@amp.edu.pl

Artykuł otrzymano 7 grudnia 2006 r.

Artykuł zaakceptowano 3 stycznia 2007 r.

Słowa kluczowe: białko uwalniające nukleotydy guanylowe z białka Ras (RasGRP), czynnik wymiany nukleotydów guanylowych (GEF), białko Ras, białko Rap, estry forbolu, diacyloglicerol

Wykaz skrótów: BCR (ang. *B cell receptor*) – receptor limfocytów B; CalDAG-GEF (ang. *calcium- and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor*) – czynnik wymiany nukleotydów guanylowych regulowany jonami wapnia i diacyloglicerolem; DAG (ang. *diacylglycerol*) – diacyloglicerol; DGK (ang. *diacylglycerol kinase*) – kinaza diacyloglicerolu; EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; GEF (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) – czynnik wymiany nukleotydów guanylowych; MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenami; PLC (ang. *phospholipase C*) – fosfolipaza C; PKC (ang. *Protein Kinase C*) – kinaza białkowa C; RasGRP (ang. *Ras guanyl-nucleotide releasing protein*) – białko uwalniające nukleotydy guanylowe z białka Ras; SCR (ang. *structurally conserved regions*) – regiony, których struktura jest zachowana w ewolucji; TCR (ang. *T cell receptor*) – receptor limfocytów T; TPA (ang. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) – 13-octan 12-O-tetradekanoilforbolu

STRESZCZENIE

Charakterystyczną cechą białek G, do których należą monomeryczne białka Ras, jest regulacja ich działania przez nukleotydy guanylowe: GTP – „włączający” i GDP – „wyłączający” system informacji. Aktywność białek G, wynikająca z rodzaju związanego nukleotydu guanylowego, kontrolowana jest przez czynniki wymiany nukleotydów guanylowych (GEFs) oraz przez białka wyzwalające aktywność GTPazową białek G (GAPs), które odpowiednio aktywują i inaktywują małe białka G. Obok opisanych wcześniej i dobrze zdefiniowanych czynników GEF aktywujących Ras, w ostatnich latach opisano nową klasę tych czynników, białka RasGRP. Białka RasGRP posiadają domenę C1, umożliwiającą wiązanie diacyloglicerolu i jego analogów, np. estrów forbolu. Przyłączenie ligandu prowadzi do aktywacji RasGRP, a w konsekwencji do aktywacji białek Ras i Rap poprzez pobudzenie wymiany wiązanych przez nie nukleotydów guanylowych. Sygnał przekazywany przez RasGRP ulega wyciszeniu w wyniku fosforylacji diacyloglicerolu w reakcji katalizowanej przez kinazę diacyloglicerolu (DGK). Lokalizacja czynników RasGRP na skrzyżowaniu kaskad sygnalizacyjnych, jak również szeroki wzór ekspresji tkankowej, pociąga za sobą ich udział w istotnych zdarzeniach w funkcjonowaniu komórki. Odgrywają one ważną rolę m.in. w dojrzewaniu i funkcjonowaniu limfocytów T i B, agregacji płytek krwi i regulacji czynności komórek tłuszczowych. W artykule opisano strukturę i funkcje białek RasGRP oraz ich udział w transformacji nowotworowej.

WPROWADZENIE

Białka G stanowią nadrodzinę homologicznych białek, które, odgrywając rolę pośredników przenoszących sygnał, regulują szeroki zakres procesów zachodzących w komórce. Cechą charakterystyczną tych białek jest regulacja ich działania przez nukleotydy guanylowe: GTP – „włączający” i GDP – „wyłączający” system informacji. W przeciwieństwie do pozostałych białek tej nadrodziny, tzw. małe białka G, do których należy Ras, nie tworzą struktur oligomerycznych. Ponadto, w odróżnieniu od tripeptydowych białek G aktywowanych przez połączenie z receptorami posiadającymi siedem domen transbłonowych (7TM), małe białka G aktywowane są głównie przez czynniki wzrostu, działające na receptory o jednej domenie transbłonowej i zawierające w swej cząsteczce kinazę tyrozynową. Na podstawie homologii sekwencji ogromną rodzinę małych białek G dzieli się na podrodziny: Ras, Rho, Arf, Rab i Ran [1]. Dotychczas najdokładniej z nich zbadane – białka Ras są kluczowymi elementami dróg sygnałowych kontrolujących proliferację i różnicowanie komórkowe. U ssaków do podrodziny białek Ras zalicza się także białka Rap, które wykazują w ~50% podobne motywy strukturalne, jak u transformujących białek Ras i podobnie jak te ostatnie kontrolują wzrost i różnicowanie komórek. Ponadto, białka Rap są związane ze specyficznym dla fagocytów systemem enzymatycznym, generującym wolne rodniki tlenowe [2].

Aktywność wszystkich monomerycznych białek G, wynikająca z rodzaju związanego nukleotydu guanylowego, kontrolowana jest przez czynniki wymiany nukleotydów guanylowych (GEFs) oraz białka wyzwalające aktywność GTPazową białek G (GAPs), które odpowiednio aktywują i inaktywują małe białka G. Ponadto, w regulacji niektórych małych białek G uczestniczy trzecia klasa czynników – białka GDI, hamujące odłączenie nukleotydu guanylowego od białka G.

Czynniki wymiany nukleotydów guanylowych (GEFs), specyficzne względem Ras, zwykle posiadają tę samą domenę katalityczną i prawdopodobnie uwalniają GDP z Ras na drodze identycznego mechanizmu. Różnią się natomiast domenami regulacyjnymi i ekspresją tkankową. Obok opisanych wcześniej i dobrze zdefiniowanych czynników GEF aktywujących białka Ras: Sos1 i Sos2 oraz RasGRF-1 i RasGRF-2, w ostatnich latach opisano nową klasę tych czynników, białka RasGRP. Swoją aktywność wykazują one także wobec białek Rap [3]. Charakterystyczną cechą białek RasGRP jest domena C1, wiążąca

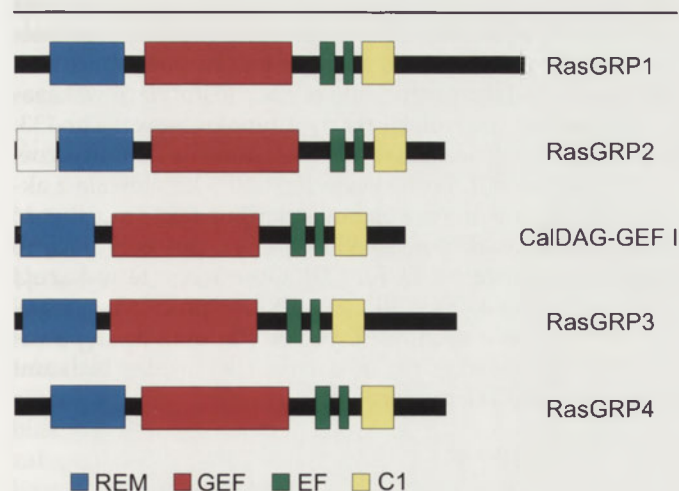
diacylglicerol (DAG) i jego analogi oraz motywy wiążące jony wapnia. Z tego powodu określane są także jako czynniki CalDAG-GEF. Białka te, poprzez obecność domeny C1, wykazują podobieństwo do kinazy białkowej C (PKC) i tym samym mogą stanowić alternatywną wobec niej drogę przekazywania sygnału inicjowanego przez związanie DAG lub estrów forbolu. Co więcej, w odniesieniu do niektórych RasGRP stwierdzono współdziałanie tych dwóch białek, mogące mieć istotne znaczenie w regulacji drogi sygnałowej Ras, szczególnie w komórkach związanych z odpowiedzią immunologiczną [4].

KLASYFIKACJA I STRUKTURA BIAŁEK RASGRP

Do tej pory opisano 4 rodzaje białek rodziny RasGRP. Różnią się one strukturą, lokalizacją i zdolnością do aktywowania specyficznych form Ras i/lub Rap.

Wykryte pierwotnie w mózgu białko **RasGRP1** (CalDAG-GEF II) o masie ~90 kDa, zbudowane z 797 reszt aminokwasowych, jest produktem genu zlokalizowanego u człowieka na chromosomie 15 (15q15) [5]. Ekspresja genu zlokalizowanego na chromosomie 11 (11q13) prowadzi natomiast do syntezy dwóch białek: 671-aminokwasowego **RasGRP2** o masie ~75 kDa [6] oraz pozbawionej 62-aminokwasowego N-końcowego odcinka izoformy CalDAG-GEF I o masie ~69 kDa [7]. Białko **RasGRP3** (CalDAG-GEF III) o masie ~78 kDa i długości 690 reszt aminokwasowych jest produktem genu zlokalizowanego na chromosomie 2 (2p25.1–2p24.1) [8]. Czynniki **RasGRP4** powstaje z kolei w wyniku ekspresji genu zlokalizowanego u człowieka na chromosomie 19 (19q13). Białko to, o masie ~75 kDa, składa się z 673 reszt aminokwasowych [9,10].

Białka rodziny RasGRP wykazują zbliżoną budowę domenową (Ryc. 1, Tabela 1). Jak przedstawiono na rycinie 1, można w niej wyróżnić dwie zasadnicze części: katalityczną i regulatorową. Pierwszą tworzą domeny REM (ang. *Ras exchange motif*) oraz GEF (CDC25), drugą – domena C1 oraz para motywów dłoni EF [5-8,10]. RasGRP2 posiada dodatkowo 62-aminokwasowy odcinek przy końcu aminowym,



Rycina 1. Budowa domenowa białek RasGRP. W strukturze wszystkich czynników RasGRP wyróżnić można domeny: REM, GEF, C1 oraz parę motywów dłoni EF. CalDAG-GEF I jest odmianą RasGRP2, pozbawioną N-końcowego odcinka potranslacyjnej modyfikacji przez mirystylację/palmitylację.

w obrębie którego znajdują się miejsca ulegające modyfikacji kowalencyjnej na drodze mirystylacji i palmitylacji. Odcinek ten odróżnia RasGRP2 od izoformy CalDAG-GEF I, pozbawionej tego motywu [6].

Domena GEF, oznaczana także jako domena homologiczna do CDC25 ze względu na jej pokrewieństwo z aktywatorem Ras z *Saccharomyces cerevisiae* [5], zajmuje centralne miejsce w sekwencji aminokwasowej białek RasGRP. Ten zbudowany z około 230 reszt region warunkuje aktywność czynników GEF poprzez zdolność wymiany nukleotydów guanylowych w białkach Ras i Rap. Domena GEF białek RasGRP jest wysoce homologiczna z regionami GEF innych białek o takiej aktywności i wykazuje blisko 50%-owe podobieństwo do Sos1 i RasGRF1 [5]. Także poszczególne białka rodziny RasGRP, w porównaniu z innymi znanymi czynnikami GEF, charakteryzują się znaczną homologią domeny GEF [9], będącej zarazem najbardziej zachowanym w ewolucji regionem tych białek [10]. W obrębie regionu GEF zidentyfikowano ponadto trzy kasety SCR (ang. *structurally conserved regions*), sekwencje o najsilniej zaznaczonym podobieństwie RasGRP do innych czynników GEF [5-7,11]. W miejscu 271. aminokwasu białka RasGRP1, odpowiadającemu pierwszej pozycji kasety SCR-2 białek rodziny Sos, znajduje się reszta argininy. Zamiana tej reszty aminokwasowej na inną sprawia, że białko RasGRP1 staje się nieaktywne. Wskazuje to na jej kluczowe znaczenie dla funkcji RasGRP1 [11].

Po N-końcowej stronie domeny GEF znajduje się, zbudowany z około 115 reszt aminokwasowych, motyw REM. Jego delecja unieczynnia białko Ras GRP1, wskazując na współdziałanie motywu REM w katalizie [11]. Ten region, typowy dla białek reagujących z Ras i uwalniających nukleotydy guanylowe, występuje także w białkach z rodziny Sos, przy czym środkowy odcinek REM białka RasGRP1 różni się od nich obecnością dodatkowej sekwencji pięciu reszt aminokwasowych [5,11].

Składająca się z około 50 reszt aminokwasowych domena C1 zlokalizowana jest w C-końcowej części białek RasGRP. Strukturalnie przypomina bogaty w reszty cysteinowe motyw palca cynkowego o schematycznej budowie $HX_{12}CX_2CX_{13/14}CX_2CX_4HX_2CX_7C$ (H – His, C – Cys, X – dowolna reszta). Dwie reszty histydynowe i pięć reszt cysteinowych bierze udział w wiązaniu dwóch jonów cynku. Sekwencja domeny C1 tworzy arkusz β , złożony z trzech przeciwrównoległych łańcuchów oraz α helisy [12-15]. Domena C1 posiada zdolność wiązania DAG i jego analogów, takich jak estry forbolu i tym samym odgrywa kluczową rolę w aktywacji białka RasGRP. Związanie ligandu wymaga obecności anionowych fosfolipidów jako kofaktorów [3,11,16].

Region domeny C1 białek RasGRP wykazuje duże podobieństwo strukturalne i zbliżone powinowactwo do ligandów z domeną C1 PKC, chimeryn i białek Munc-13 [12-14]. Białka te różnią się jednak wymaganiami dotyczącymi kofaktorów. W przypadku PKC przypuszcza się, że za jego wiązanie odpowiada domena C2 w klasycznych izoformach kinazy (PKC α , β , γ) lub region podobny do C2, czy motyw E w nowych izoformach tego enzymu (PKC δ , ϵ , θ). Żadna

Tabela 1. Budowa domenowa białek RasGRP*.

Białko	Lokalizacja domen w sekwencji aminokwasowej			
	REM	GEF	region dłoni EF	C1
RasGRP1	54-175	201-430	474-527	542-591
RasGRP2	69-183	212-445	492-543	561-610
CalDAG-GEF I	7-121	150-383	430-481	499-548
RasGRP3	8-120	148-378	425-476	495-544
RasGRP4	55-149 (171)	197-426	470-526 (?)	541-590

*według NCBI Reference Sequences

z tych struktur nie występuje w RasGRP, co zdaje się być przyczyną mniejszej zależności RasGRP od fosfolipidowego kofaktora w porównaniu z PKC [16]. Wykazano jednak pozytywny wpływ zasadowych reszt aminokwasowych, obdarzonych dodatnim ładunkiem, na siłę wiązania estrów forbolu przez domenę C1 białek RasGRP1 i -3 w obecności ujemnie naładowanej fosfatydyloseryny jako kofaktora [17].

Pomiędzy domeną GEF a C1 znajduje się ok. 53-aminokwasowy region, zawierający parę motywów dłoni EF. Zbudowane z ok. 22 (EF1) i 14 (EF2) reszt aminokwasowych domeny zdolne są do wiązania jonów wapnia, przy czym większe powinowactwo wykazuje domena EF2 [5]. Znajdujący się pomiędzy pętlami wiążącymi jony Ca^{2+} , odcinek złożony z 15 aminokwasów odróżnia tę domenę białek RasGRP od typowych par EF, rozdzielonych sekwencją 20-30 reszt aminokwasowych, występujących w wielu innych białkach [5]. Białko RasGRP4 posiada ponadto trzy dodatkowe reszty proliny w sąsiedztwie drugiego motywu EF [9]. Wyniki dotychczasowych badań nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o wpływ wiązania jonów Ca^{2+} na aktywność białek RasGRP. Chociaż pojawiają się sugestie, że obecność motywów dłoni EF jest zbędna dla funkcjonowania tych białek [11], to wykazano możliwość aktywacji RasGRP przez jonofory wapniowe [7,18,19]. Możliwa jest zatem różnorodna rola jonów Ca^{2+} w regulacji aktywności białek RasGRP. Wyklucza się natomiast wpływ Ca^{2+} na wiązanie ligandów przez domenę C1 [16].

MECHANIZM DZIAŁANIA

AKTYWACJA

Aktywacja białek RasGRP jest następstwem wiązania ligandu przez domenę C1. Skuteczność wiązania jest uzależniona od rodzaju kwasu tłuszczowego w pozycji *sn*-2 DAG [20] oraz obecności anionowych fosfolipidów w roli kofaktora [3,16]. Ponieważ DAG jest tzw. mediatorem drugiego rzędu, aktywność RasGRP *in vivo* jest uzależniona od fosfolipazy C (PLC), enzymu generującego DAG, znajdującej się z kolei pod kontrolą nadrzędnych układów przekazywania sygnału [21]. Obecnie znanych jest 12 izoform PLC, podzielonych na 5 klas w zależności od mechanizmu aktywacji:

- PLC β , regulowana przez receptory sprzężone z białkiem G (GPCR ang. *G protein coupled receptor*) za pośrednictwem podjednostek G_{α} , a także $G_{\beta\gamma}$,

- PLC γ , regulowana przez receptory o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej (RTK), np. EGFR, PGDFR, TCR, BCR, za pośrednictwem fosforylacji,
- PLC δ , regulowana przez Ca^{2+} ,
- PLC ϵ , regulowana przez GPCR za pośrednictwem podjednostek $G_{\alpha_{12/13}}$ (z udziałem Rho), G_{α_s} (z udziałem cykazy adenylanowej i Rap), $G_{\beta\gamma}$ oraz receptory o aktywności kinazy tyrozynowej RTK (z udziałem Ras),
- PLC ζ .

Istnienie tak wielu rodzajów PLC podlegających zróżnicowanej kontroli powoduje, że za powstanie sygnału aktywowującego RasGRP może odpowiadać wiele czynników.

Naśladując endogenne DAG, zdolność aktywacji RasGRP posiadają także estry forbolu [12-14]. Związki te, do których należy m.in. octan 12-O-tetradekanoilforbolu (TPA), wykorzystywane są w celu wywołania fazy promocji w procesie wieloetapowej indukcji kancerogenezy [22]. Aktywacja białek RasGRP przez estry forbolu przebiega prawdopodobnie poprzez ułożenie cząsteczki związku w szczelinie pomiędzy arkuszami β domeny C1 i utworzenie hydrofobowej powierzchni z wyeksponowanym łańcuchem acylowym, zaangażowanym w kotwiczeniu białka w błonie lipidowej [12].

Obok aktywacji przez wiązanie ligandu, w odniesieniu do RasGRP3 wykazano także możliwość aktywacji tego białka na drodze fosforylacji, zachodzącej za pośrednictwem PKC [4,23,24]. Jako potencjalne miejsca fosforylacji wskazano zachowane w ewolucji reszty aminokwasowe: Thr-133, Ser-139, Ser-167, leżące w obrębie domeny katalitycznej oraz resztę Ser-601. Fosforylacja RasGRP3 korelowała z aktywnością Ras. W jednym z badań wykazano także możliwość fosforylacji RasGRP3 przez kinazę c-Src, pośredniczącą w transmisji sygnału od EGFR [25]. Obserwacje te wskazują na udział zarówno RasGRP, jak i PKC w precyzyjnej regulacji dróg sygnałowych zależnych od Ras oraz występowanie złożonego powiązania (ang. *cross-talk*) między białkami wiążącymi DAG i estry forbolu.

PRZEMIESZCZANIE

Przemieszczenie białek RasGRP w obrębie komórki jest kolejnym procesem związanym z przyłączeniem ligandu. Translokacja RasGRP1 i RasGRP3 następuje wraz z ich aktywnością i koreluje ze zmianami aktywności szlaków sygnałowych.

wych kontrolowanych przez te białka [3,11,26-31]. Elementem strukturalnym białek, odpowiedzialnym za ten proces, jest domena C1 [11,32]. Związanie przez nią ligandu prowadzi do migracji białek w kierunku błony plazmatycznej, a także do wewnątrzkomórkowych struktur błonowych: aparatu Golgiego, siateczki śródplazmatycznej i przestrzeni okołojądrowej. Aparat Golgiego wskazywany jest przy tym jako szczególne miejsce lokalizacji i działania RasGRP1 i RasGRP3 [3,26,27,30,32]. Przemieszczanie tych białek w kierunku wewnątrzkomórkowych struktur błonowych może wynikać z większego powinowactwa ich domeny C1 do cząsteczek DAG podstawionych resztami nasyconych kwasów tłuszczowych (np. DOG, 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol) obecnych w błonach wewnętrznych [3,33]. Dla RasGRP3 zaobserwowano ponadto wpływ stężenia aktywatora na miejsce lokalizacji białka: mniejsze stężenie TPA wywołuje migrację w kierunku błony komórkowej, większe do błon wewnętrznych [3]. Rozmieszczenie RasGRP3 w komórce jest także wynikiem oddziaływania białka z lekkim łańcuchem dyneiny [34]. Przemieszczanie do frakcji błonowej zaobserwowano również dla RasGRP4 [9].

Dane na temat przemieszczania białka RasGRP2/CalDAG-GEF I nie są jednoznaczne. Izoforma RasGRP2 zawiera w N-końcowym odcinku miejsce potranslacyjnej modyfikacji przez mirystylację/palmitylację, warunkującą lokalizację białka przy błonie plazmatycznej. Z kolei izoforma CalDAG-GEF I, pozbawiona tej sekwencji, pozostaje w cytosolu [6,12,27]. Obserwowany brak przemieszczenia białka RasGRP2 w kierunku wewnątrzkomórkowych struktur błonowych tłumaczony jest obecnością powierzchniowo eksponowanej seryny w 506. pozycji, w obrębie domeny C1. Białka RasGRP1 i RasGRP3 zawierają w tym miejscu resztę tyrozynową. Różnice w subkomórkowym rozmieszczeniu czynników RasGRP, mogą więc wynikać z różnic w strukturze domeny C1 [32]. Dodatkowo, dla RasGRP2 zaobserwowano zjawisko przemieszczania związane z czynnością cytoszkieletu – oddziaływanie i wspólną lokalizację białka z aktywną F [35].

Przemieszczanie białek RasGRP w kierunku struktur błonowych komórki najprawdopodobniej związana jest z lokalizacją głównego efektorów tych czynników GEF – białka Ras, które, dzięki farnezytacji, występuje właśnie w tych regionach.

INAKTYWACJA

Hamowanie aktywności białek RasGRP odbywa się na drodze pośredniej z udziałem kinaz diacyloglicerolu (DGK). Dotychczas poznano 9 izoform tego enzymu (α - τ), sklasyfikowanych w 5 podtypów (I-V) [36]. DGK katalizuje reakcję fosforylacji DAG do kwasu fosfatydowego (PA), będącego także przekazywaczem sygnałów. Prowadzi to do zmniejszenia stężenia DAG i, w konsekwencji, obniżenia aktywności białek zależnych od DAG (m.in. RasGRP), a tym samym do zahamowania aktywacji dalszych etapów kaskady sygnalizacyjnej. Estrы forbolu nie są substratami DGK i hamują ich działanie. Do wykazanych zależności między DGK a RasGRP należą: korelacja ekspresji DGK α i ζ z obniżeniem aktywności ścieżki sygnalizacyjnej receptor-Ras, kontrolowanej przez RasGRP [29,37-39], migracja DGK α i RasGRP

w kierunku błony ze zbliżoną kinetyką [29] oraz asocjacja i podobne rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe DGK ζ i RasGRP [38]. Zaskakującą obserwacją dotyczącą DGK τ jest jej zdolność do aktywowania elementów kaskady Ras, m.in. białka ERK [40]. DGK τ tworzy kompleks z RasGRP3, oddziaływującym z Rap1, co prowadzi do inaktywacji tych białek przy niezmienionej aktywności Ras. W konsekwencji zapobiega to powstawaniu bezproduktywnego kompleksu Rap1-Raf-1 i nasila aktywność kaskady Ras/Raf-1/ERK. Potwierdzeniem powyższego zjawiska może być zmniejszona ilość guzów nowotworowych wywołanych mutacjami Ras u myszy pozbawionych genu kodującego DGK τ [40].

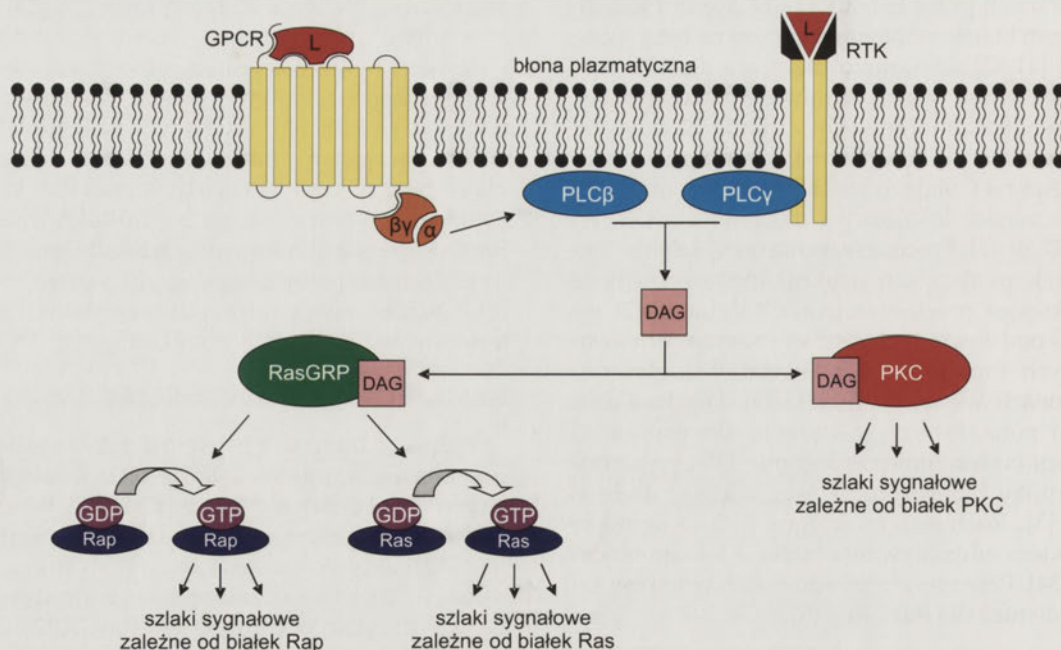
NASTĘPSTWA AKTYWACJI BIAŁEK RASGRP

Bezpośrednim następstwem działania białek RasGRP jest pobudzenie wymiany GDP na GTP w małych białkach G, co prowadzi do ich aktywacji [12-14,27]. Różne rodzaje RasGRP aktywują określone formy Ras i/lub Rap [12,27]. Białko RasGRP1 aktywuje przede wszystkim H-Ras, a także białka R-Ras, TC21 i M-Ras należące do podrodziny Ras [7,8,41]. Głównym celem oddziaływania RasGRP2 i CalDAG-GEF I są białka Rap1 i Rap2 [6,41], przy czym dłuższa izoforma RasGRP2 może również aktywować N-Ras i K-Ras [6], a krótsza CalDAG-GEF I także R-Ras i TC21 [8,41]. Natomiast RasGRP3 działa zarówno na H-Ras i białka Rap oraz na R-Ras, TC21 i M-Ras [8,41]. Mniej przebadane pod względem specyficzności substratowej, RasGRP4 funkcjonuje podobnie do RasGRP1, aktywując tylko białka Ras [9].

Aktywacja białka Ras prowadzi do uruchomienia szeregu szlaków sygnałowych zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórek [1,42,43]. Jedną z najlepiej poznanych ścieżek przekazywania sygnału zależnych od Ras jest kaskada kinaz serynowo-treoninowych MAP (MAPK). Drugą kaskadą sygnalizacyjną związaną z aktywnością Ras jest ścieżka PI-3K/Akt, odgrywająca ważną rolę w kontroli przeżycia komórki. Aktywacja PI-3K i, wynikająca z niej, synteza fosfatydyloinozytoli prowadzi do uruchomienia kinaz PDK-1 i -2 aktywujących Akt, czego efektem jest m.in. hamowanie apoptozy. Trzecią ścieżką sygnalizacyjną pozostającą pod wpływem Ras jest kaskada RalGEF/Ral. Aktywacja czynników GEF dla Ral (np. RalGDS) prowadzi do uruchomienia RalBP, służącego jako czynnik GAP dla białek Rho (CDC42 i Rac) zaangażowanych w rearanżację cytoszkieletu. Działanie Ras powiązane jest także, poprzez cyklinę D1, z kontrolą cyklu komórkowego [43]. Aktywowane przez niektóre czynniki RasGRP białko Rap1 może działać poprzez kaskadę B-Raf/MEK/ERK lub niektóre czynniki RalGEF [42]. Wskazuje się także na rolę wiążącego Rap1 białka RapL w zjawisku adhezji zależnym od integryn. Niektórzy autorzy sugerują ponadto możliwość antagonistycznego działania Rap1 względem Ras [2,42].

TKANKOWE ROZMIESZCZENIE I FUNKCJA BIAŁEK RASGRP

Funkcja białek RasGRP nierozzerwalnie wiąże się z miejscem ich ekspresji oraz charakterystycznym położeniem w sieci sygnalizacyjnej (Ryc. 2). Ekspresja białek RasGRP jest wysoka w mózgu i układzie krwiotwórczym [11,26,43,44].



Rycina 2. Miejsce RasGRP w komórkowej sieci sygnalizacyjnej. Związanie ligandu (L) przez receptory sprzężone z białkiem G (GPCR) i receptory o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej (RTK) prowadzi do pobudzenia PLC- β i - γ . Powstający DAG aktywuje białka RasGRP i w konsekwencji Ras oraz Rap, które wraz z PKC uczestniczą w dalszym rozprzestrzenianiu sygnału.

Transkrypty RasGRP wykrywano także w innych narządach. Przy zróżnicowanym wzorze ekspresji tkankowej, szczególnie miejscem występowania białek RasGRP są komórki krwi, w których silnie zaznacza się powiązanie roli białka i funkcji komórki.

RASGRP1

Białko RasGRP1 występuje w wielu liniach komórek T człowieka i myszy, gdzie pośredniczy w przekazywaniu sygnału między PLC- γ 1 a ścieżką Ras-ERK1/2 w odpowiedzi na pobudzenie receptora limfocytów T (TCR) [45,46]. Wpływ kaskady TCR- PLC- γ 1-DAG na aktywność ERK1/2, jak wskazują wyniki badań Puente i wsp. [47], może być dwufazowy: RasGRP1 odgrywa istotną rolę zwłaszcza we wczesnej fazie aktywacji ERK1/2, podczas gdy faza późniejsza zależna jest od PKC. Uczestnictwo RasGRP1 w procesie sygnalizacji związanym z czynnością TCR ma znaczenie dla podstawowych funkcji limfocytów T – odgrywa istotną rolę w rozwoju tych komórek i regulacji odpowiedzi autoimmunologicznych [48]. Wykazano, że ulegające ekspresji w grasicy RasGRP1 [11], wymagane jest w późnej fazie różnicowania tymocytów – w procesie pozytywnej selekcji – przy przejściu komórek ze stadium DP (podwójnie dodatnich) do SP (pojedynczo dodatnich), związanym z ekspresją powierzchniowych cząsteczek CD4 lub CD8 [49]. Świadczy o tym, zaobserwowane u myszy pozbawionych genu kodującego RasGRP1, obniżenie liczby tymocytów oraz zaburzenie ich różnicowania, prowadzące do znacznej redukcji liczby dojrzałych, pojedynczo dodatnich (SP) komórek T. Mutacja hamowała także aktywację Ras/ERK w odpowiedzi na ester forbolu, TPA i proliferację komórek w odpowiedzi na pobudzenie TCR [50]. Białko nie ma natomiast znaczenia dla procesu negatywnej selekcji tymocytów [49].

Obok kaskady sygnalizacyjnej TCR, wykazano także powiązanie czynnika RasGRP1 z receptorem limfocytów B (BCR) [51]. W komórkach DT40 białko RasGRP1 łączy kaskady Vav/Rac1 i Ras, uczestnicząc w przekazywaniu sygnału płynącego od BCR [52]. Z kolei ekspresja RasGRP1 w komórkach WEHI-231 prowadzi do apoptozy następującej w wyniku pobudzenia BCR. Proces wiąże się ze zwiększeniem poziomu inhibitora I κ B α i, w konsekwencji, zmniejszeniem aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [53].

RasGRP1 ulega ponadto ekspresji w mysich keratynocytach, gdzie wykazano jego udział w aktywacji kaskady Ras/ERK w odpowiedzi na TPA [26]. Ulegające ekspresji w komórkach nerwowych mózgu [5,8] białko RasGRP1, może uczestniczyć w regulacji aktywności Ras w odpowiedzi na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia DAG, a tym samym odgrywać rolę w procesach kontrolowanych przez Ras w układzie nerwowym [54-57]. Występowanie białka RasGRP1 stwierdzono także w nerce [8], śledzionie i szpiku [11].

RASGRP2/CALDAG-GEF I

Funkcja białka CalDAG-GEF I, krótszej izoformy RasGRP2, związana jest z białkiem Rap1, postrzeganym jako centralny regulator adhezji zależnej od integrzyn [27]. Znajduje to swoje odbicie w funkcjonowaniu megakariocytów [58] i wywodzących się z nich płytek krwi [59], w których ekspresji ulega izoforma CalDAG-GEF I. Białko to uczestniczy w procesie agregacji płytek, związanym z aktywacją kaskady Rap1-RapL-integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$. U myszy pozbawionych genu kodującego ten czynnik GEF obserwuje się znaczne zaburzenia agregacji płytek i, wynikające z tego, wydłużenie czasu krzepnięcia krwi [59]. Zaobserwowano ponadto, że ekspresja CalDAG-GEF I w megakariocytach prowadzi

za pośrednictwem Rap1b do zwiększonego wiązania fibrynogenu przez integrynę $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ w odpowiedzi na łączne pobudzenie ADP, epinefryną i peptydem AYPGFK [58].

Białko CalDAG-GEF I odgrywa także rolę w funkcjonowaniu limfocytów. Wykazano ekspresję tego białka w komórkach Jurkat, w których z udziałem PLC- γ 1 pośredniczy w aktywacji Rap1 przez TCR. Rap1, poprzez białko efektorowe RapL, reguluje aktywność leukocytarnej integryny LFA-1 i jej wiązanie z immunoglobulinopodobną cząsteczką adhezji międzykomórkowej ICAM-1. Oddziaływanie LFA-1/ICAM-1 ma zasadnicze znaczenie dla oddziaływania limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen-1 [60].

Gen *CalDAG-GEF 1* zidentyfikowano jako proonkogen w ostrej białaczce szpikowej. Jego ekspresja w komórkach szpiku wiąże się z aktywacją Rap1 i może promować ich proliferację oraz zwiększać adhezję [18]. Udział CalDAG-GEF I wykazano także w innych zjawiskach niż adhezja. W komórkach PC12 czynnik ten aktywuje kaskadę sygnalizacyjną Rap1/B-Raf/ERK w odpowiedzi na pobudzenie muskarynowego receptora acetylocholiną [61]. Zaobserwowany proces wskazuje na udział czynników RasGRP w sprzęganiu receptorów białek G z kaskadą MAPK. Białko CalDAG-GEF I, ulegające ekspresji w neuronach mózgu, może odpowiadać za regulację aktywności czynnika Rap1, związaną ze zmianami wewnątrzkomórkowego poziomu DAG w tej tkance [55]. Czynniki CalDAG-GEF I wykryto ponadto w sercu, płucach, śledzionie, wątrobie, nerce [18]. W organach tych ekspresji ulega także izoforma RasGRP2, którą zidentyfikowano również w mięśniach szkieletowych, łożysku i trzustce [6].

RASGRP3

Analogicznie do udziału RasGRP1 w kaskadzie sygnalizacyjnej TCR, białko RasGRP3, ulegające ekspresji w limfocytach B, pośredniczy w transdukcji sygnału między PLC- γ 2 a Ras w odpowiedzi na pobudzenie receptora BCR w komórkach DT40 (subpopulacja limfocytów B) [28]. RasGRP3 w komórkach B odpowiada za utrzymanie podstawowej aktywności Ras w niepobudzonych komórkach, a także, wraz z RasGRP1, za aktywację Ras i proliferację komórek w wyniku pobudzenia BCR [51]. U myszy pozbawionych genu kodującego RasGRP3 nie zaobserwowano zaburzeń rozwoju limfocytów B, jednakże wykazano hipogammaglobulinemię. Co ciekawe, w badaniach McLeod i wsp. [62] prowadzonych jeszcze przed odkryciem pierwszego czynnika RasGRP, w komórkach WEHI-231 zaobserwowano aktywację Rap1, wywołaną pobudzeniem BCR i zależną od PLC- γ i DAG. Badania prowadzone na komórkach PC12 wykazały również udział RasGRP3 w procesie egzocytozy indukowanej estrami forbolu, lecz niezależnej od PKC [44].

Interesującym odkryciem, ze względu na powiązania szlaków przekazywania sygnału, wydaje się być zjawisko aktywacji PLC- ϵ w wyniku pobudzenia receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). RasGRP3 odgrywa w tej wielostopniowej sygnalizacyjnej sieci kluczową rolę: EGFR poprzez PLC- γ 1 i c-Src może aktywować RasGRP3, co za pośrednictwem Rap2B prowadzi do aktywacji PLC- ϵ [25].

Badania Roberts'a i wsp. [63] wykazały udział białka RasGRP3 w procesie angiogenezy. Gen kodujący RasGRP3 ulega, regulowanej przez naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), ekspresji w tworzących się naczyniach krwionośnych zarodka. U osobników dorosłych jego ekspresję obserwuje się np. w trakcie ciąży oraz w angiogenezie towarzyszącej nowotworom. Syntezę białka RasGRP3 stwierdzono także w mózgu, nerce, wątrobie, mięśniach szkieletowych, sercu, płucach, śledzionie, łożysku oraz w tkankach wewnątrzwydzielniczych – przysadce, gruczołach nadnerczowych, jądrach i wyspach trzustkowych [3,8,44].

RASGRP4

Dotychczas poznane funkcje białka RasGRP4 wiążą się przede wszystkim z czynnością komórek tłuszcznych [64], choć zostało ono wykryte również w wątrobie, mięśniach szkieletowych, sercu, płucach, śledzionie i łożysku [9]. Ulegający w komórkach tłuszcznych ekspresji gen kodujący białko RasGRP4, wywołuje wzmożoną syntezę syntazy prostaglandyny PGD₂, w konsekwencji, produkcję PGD₂, towarzyszącą astmie i zmianom zapalnym [19]. W komórkach tłuszcznych pacjentów z astmą zidentyfikowano ponadto nieprawidłowe warianty transkrypcyjne RasGRP4 [10]. Wariant pierwszy posiada 117-nukleotydową insercję i koduje nieaktywne 170-aminokwasowe białko. Wariant drugi, w związku z delecją odcinka złożonego z 42-nukleotydów, koduje białko uboższe o 14-aminokwasowy odcinek łączący domeny zaangażowane w interakcje z białkiem Ras. Oba warianty powstały w wyniku nieprawidłowego usunięcia 5. intronu. Wariant drugi obecny jest także u pacjentów z mastocytozą. W komórkach HMC-1, pochodzących od pacjentów z białaczką wywodzącą się z komórek tłuszcznych, wykryto także wariant trzeci RasGRP4, kodujący nieaktywną formę białka, powstały przez nieprawidłowe usunięcie intronu 3. i 5. [10]. Inny nieprawidłowy transkrypt RasGRP4, pozbawiony 22-nukleotydowej sekwencji w wyniku jego różnicowego cięcia i składowania w środku 15. eksonu, zidentyfikowano w komórkach tłuszcznych myszy C3H/HeJ, charakteryzujących się obniżoną wrażliwością dróg oddechowych na metacholinę. Kodowane przez ten wariant białko, złożone z 578 aminokwasów, pozbawione jest domeny C1 i dlatego nie jest podatne na działanie DAG i estrów forbolu [65].

Niezależnie od powyższych obserwacji, RasGRP4 wyizolowano i zidentyfikowano jako czynnik transformujący, ulegający ekspresji w leukocytach pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Mimo występującej mutacji punktowej (E620K) nie zaobserwowano różnic w aktywacji Ras i przemieszczeniu w kierunku błony w porównaniu z „normalnym” RasGRP4 [9].

BIAŁKA RASGRP A TRANSFORMACJA NOWOTWOROWA

Niezależnie od wielu różnorodnych funkcji pełnionych przez białka RasGRP w prawidłowych komórkach, czynniki te mogą wywoływać także transformację nowotworową. Z podwyższoną ekspresją RasGRP1 i RasGRP3 wiązano transformację komórek Rat1A i NIH 3T3 oraz różnicowanie neuronalne komórek PC12 [8,11], a w przypadku RasGRP1

także transformację fibroblastów [5]. RasGRP2 przypisywano przyspieszony wzrost komórek NIH 3T3 [6], natomiast izoforma CalDAG-GEF I wywoływała transformację komórek Swiss 3T3 [18]. RasGRP4 może powodować transformację komórek szpiku i Rat1 [9]. Interesującym spostrzeżeniem, wynikającym z powyższych badań, jest różnica aktywności transformującej białek RasGRP, korelująca ze zdolnością do aktywacji kaskady Ras-ERK1/2. RasGRP1 i RasGRP3 działające na Ras wykazują silniejszą aktywność transformującą niż RasGRP2, którego głównymi efektorami są białka Rap. Z kolei zdolność wywoływania transformacji przez RasGRP3 jest obniżona w porównaniu z RasGRP1, co wynikać może z antagonistycznej zależności między białkami Ras i Rap1, aktywowanymi przez RasGRP3 [8].

Zdolność wywołania transformacji wydaje się mieć szczególne znaczenie w zrozumieniu niektórych aspektów kancerogenezy. Ten wieloetapowy proces jest wynikiem zakłócenia homeostazy komórkowej wskutek onkogennych mutacji i mechanizmów epigenetycznych. Analog DAG, ester forbolu TPA, stosowany jest jako klasyczny promotor w modelu skórnej kancerogenezy u myszy [22]. Jego wielokrotne nakładanie na skórę grzbietową myszy prowadzi do klonalnego rozrostu zainicjowanych w wyniku mutacji, np. w genie *H-Ras*, keratynocytów. Chociaż estry forbolu są prototypami promotorów raka skóry w tym modelu doświadczalnym, mechanizm ich oddziaływania z drogą sygnałową Ras nie jest wyjaśniony. Dotychczas, za główne białka wiążące estry forbolu, a jednocześnie mediatory wywołanych przez nie efektów, uznawano kinazy białkowe C. Badania z zastosowaniem myszy transgenicznymi wykazały, że izoformy PKC mogą w różny sposób oddziaływać na proces promocji nowotworów wywołany działaniem TPA. Nadekspresja PKC δ w naskórku indukuje oporność na promocyjne działanie TPA [66], natomiast PKC ϵ , który wydaje się być onkogenem w wielu typach komórek, powoduje zmniejszenie ilości brodawczaków (łagodne guzy), ale zwiększa ich zmianę w złośliwe formy rakowe [67-69]. Wykazanie nadekspresji RasGRP1 w mysich keratynocytach, zwiększającej się pod wpływem TPA równoległe ze wzrostem poziomu aktywnej formy Ras, dostarczyło dowodu, że RasGRP1 jest dodatkowym celem oddziaływania estrów forbolu, który może uczestniczyć w promocji guzów w naskórku myszy. Estry forbolu promują rozwój nowotworów poprzez pobudzenie wzrostu populacji keratynocytów ze zmutowaną, w wyniku działania kancerogenu, formą Ras.

W jaki sposób RasGRP1 współdziała ze zmutowanymi formami Ras, które na ogół nie są podatne na czynniki wymiany w zainicjowanych komórkach, nie jest jeszcze wyjaśnione. Być może RasGRP1 uczestniczą w przekazywaniu sygnału pochodzącego od TPA tylko w populacji prawidłowych keratynocytów, otaczających zainicjowane komórki.

Ta sugestia może wynikać z faktu, że pewne efekty oddziaływania estrów forbolu na proliferację zainicjowanych kancerogenem komórek przypisuje się hamowaniu wzrostu otaczających je prawidłowych keratynocytów [70]. Dalsze badania, z zastosowaniem np. myszy transgenicznymi pozbawionych RasGRP1, powinny przyczynić się do wyjaśnienia roli RasGRP1 w zachodzącej pod wpływem TPA promocji nowotworów.

PODSUMOWANIE

Białka RasGRP, aktywowane związaniem cząsteczki DAG czynniki o aktywności GEF wobec białek G z rodziny Ras, łączą przebieg ważnych dla funkcjonowania komórki kaskad sygnalizacyjnych. Chociaż dokładne znaczenie czynników RasGRP w wielu tkankach nadal pozostaje nieznane, analiza mechanizmów przekazywania sygnałów, jak również badania funkcji i aktywności transformującej tych białek w niektórych liniach komórkowych sugeruje, iż mogą one odgrywać ważną rolę w procesach przekazywania sygnałów pochodzących z różnych układów receptorowych do jądra komórkowego. Zdolność generowania odpowiedzi w wyniku związania estrów forbolu stwarza również konieczność zrewidowania roli PKC jako głównego białka wiążącego te związki, zwłaszcza w odniesieniu do procesu wieloetapowej kancerogenezy. Ponadto, niezbędne dla dalszego poznania białek RasGRP wydają się być poszukiwania związków selektywnie aktywujących tę klasę czynników.

PIŚMIENNICTWO

1. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208
2. Bokoch GM (1993) Biology of the Rap proteins, members of the ras superfamily of GTP-binding proteins. *Biochem J* 289: 17-24
3. Lorenzo PS, Kung JW, Borttorff DA, Garfield SH, Stone JC, Blumberg PM (2001) Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3. *Cancer Res* 61: 943-949
4. Teixeira C, Stang SL, Zheng Y, Beswick NS, Stone JC (2003) Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102: 1414-1420
5. Ebinu JO, Borttorff DA, Chan EYW, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280: 1082-1086
6. Clyde-Smith J, Silins G, Gartside M, Grimmond S, Etheridge M, Apolloni A, Hayward N, Hancock JF (2000) Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol Chem* 275: 32260-32267
7. Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13278-13283
8. Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M (2000) CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275: 25488-25493
9. Reuther GW, Lambert QT, Rebhun JF, Caligiuri MA, Quilliam LA, Der CJ (2002) RasGRP4 is a novel ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 277: 30508-30514
10. Yang Y, Li L, Wong GW, Krilis SA, Madhusudhan MS, Šali A, Stevens RL (2002) RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *J Biol Chem* 277: 25756-25774
11. Tognon CE, Kirk HE, Passmore LA, Whitehead IP, Der CJ, Kay RJ (1998) Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* 18: 6995-7008
12. Kazanietz MG (2002) Novel "Nonkinase" phorbol ester receptors: The C1 domain connection. *Mol Pharmacol* 61: 759-767
13. Ron D, Kazanietz MG (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J* 13: 1658-1676
14. Brose N, Rosenmund C (2002) Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci* 115: 4399-4411

15. Rong SB, Enyedy IJ, Qiao L, Zhao L, Ma D, Pearce LL, Lorenzo PS, Stone JC, Blumberg PM, Wang S, Kozikowski AP (2002) Structural basis of RasGRP binding to high-affinity PKC ligands. *J Med Chem* 45: 853-860
16. Lorenzo PS, Beheshti M, Pettit GR, Stone JC, Blumberg PM (2000) The Guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high-affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol Pharmacol* 57: 840-846
17. Irie K, Masuda A, Shindo M, Nakagawa Y, Ohigashi H (2004) Tumor promoter binding of the protein kinase C C1 homology domain peptides of RasGRPs, chimaerins, and Unc13s. *Bioorg Med Chem* 17: 4575-4583
18. Dupuy AJ, Morgan K, von Lintig FC, Shen H, Acar H, Hasz DE, Jenkins NA, Copeland NG, Boss GR, Largaespada DA (2001) Activation of the Rap1 guanine nucleotide exchange gene, *CalDAG-GEF 1*, in BXH-2 murine myeloid leukemia. *J Biol Chem* 276: 11804-11811
19. Li L, Yang Y, Stevens RL (2003) RasGRP4 regulates the expression of prostaglandin D2 in human and rat mast cell lines. *J Biol Chem* 278: 4725-4729
20. Madani S, Hichami A, Charkaoui-Malki M, Khan NA (2004) Diacylglycerols containing omega 3 and omega 6 fatty acids bind to RasGRP and modulate MAP kinase activation. *J Biol Chem* 279: 1176-1183
21. Wing MR, Bourdon DM, Harden TK (2003) PLC- ϵ : A Shared effector protein in Ras-, Rho-, and G $\alpha\beta\gamma$ -mediated signaling. *Mol Interv* 5: 273-280
22. Baer-Dubowska W (1997) Mouse skin model as a reliable short-term carcinogenesis assay. *Acta Pol Toxicol* 5: 9-23
23. Aiba Y, Oh-hora M, Kiyonaka S, Kimura Y, Hijikata A, Mori Y, Kurosaki T (2004) Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16612-16617
24. Brodie C, Steinhart R, Kazimirsky G, Rubinfeld H, Hyman T, Ayres JN, Hur GM, Toth A, Yang D, Garfield SH, Stone JC, Blumberg PM (2004) PKC δ associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters. *Mol Pharmacol* 66: 76-84
25. Stope MB, vom Dorp F, Szatkowski D, Böhm A, Keiper M, Nolte J, Oude Weermink PA, Roskopf D, Evellin S, Jakobs KH, Schmidt M (2004) Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C- ϵ by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol Cell Biol* 24: 4664-4676
26. Rambaratsingh RA, Stone JC, Blumberg PM, Lorenzo PS (2003) RasGRP1 represents a novel non-protein kinase C phorbol ester signaling pathway in mouse epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 278: 52792-52801
27. Springett GM, Kawasaki H, Spriggs DR (2004) Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *Bioessays* 26: 730-738
28. Oh-hora M, Johmura S, Hashimoto A, Hikida M, Kurosaki T (2003) Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C- γ 2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med* 198: 1841-1851
29. Sanjuán MA, Pradet-Balade B, Jones DR, Martínez-A C, Stone JC, Garcia-Sanz JA, Mérida I (2003) T cell activation *in vivo* targets diacylglycerol kinase α to the Membrane: A novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* 173: 2877-2883
30. de Castro IP, Bivona TG, Philips MR, Pellicer A (2004) Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 24: 3485-3496
31. Braun DC, Cao Y, Wang S, Garfield SH, Hur GM, Blumberg PM (2005) Role of phorbol ester localization in determining protein kinase C or RasGRP3 translocation: real-time analysis using fluorescent ligands and proteins. *Mol Cancer Ther* 4: 141-150
32. Caloca MJ, Zugaza JL, Bustelo XR (2003) Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. *J Biol Chem* 278: 33465-33473
33. Carrasco S, Merida I (2004) Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 15: 2932-2942
34. Okamura SM, Oki-Idouchi CE, Lorenzo PS (2006) The exchange factor and diacylglycerol receptor RasGRP3 interacts with dynein light chain 1 through its C-terminal domain. *J Biol Chem* 281: 36132-36139
35. Caloca MJ, Zugaza JL, Vicente-Manzanares M, Francisco Sánchez-Madrid F, Bustelo XR (2004) F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2. *J Biol Chem* 279: 20435-20446
36. Topham MK, Prescott SM (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem* 274: 11447-11450
37. Zhong XP, Hainey EA, Olenchock BA, Zhao H, Topham MK, Kretzky GA (2002) Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase ζ . *J Biol Chem* 277: 31089-31098
38. Topham MK, Prescott SM (2001) Diacylglycerol kinase ζ regulates Ras activation by a novel mechanism. *J Cell Biol* 152: 1135-1143
39. Jones DR, Sanjuán MA, Stone JC, Mérida I (2002) Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase α induces sustained signaling through RasGRP1. *FASEB J* 16: 595-597
40. Regier DS, Higbee J, Lund KM, Sakane F, Prescott SM, Topham MK (2005) Diacylglycerol kinase ι regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7595-7600
41. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275: 20020-20026
42. Bos JL (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J* 17: 6776-6782
43. Pérez-Sala D, Rebollo A (1999) Novel aspects of Ras proteins biology: regulation and implications. *Cell Death Differ* 6: 722-728
44. Ozaki N, Miura Y, Yamada T, Kato Y, Oiso Y (2005) RasGRP3 mediates phorbol ester-induced, protein kinase C-independent exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 765-771
45. Ebinu JO, Stang SL, Teixeira C, Botorff DA, Hooton J, Blumberg PM, Barry M, Bleakley RC, Ostergaard HL, Stone JC (2000) RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95: 3199-3203
46. Leo A, Wienands J, Baier G, Horejsi V, Schraven B (2002) Adapters in lymphocyte signaling. *J Clin Invest* 109: 301-309
47. Puente LG, Stone JC, Ostergaard HL (2000) Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: Potential role of additional diacylglycerol binding proteins. *J Immunol* 165: 6865-6871
48. Alberola-Ila J, Hernández-Hoyos G (2003) The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol Rev* 191: 79-96
49. Priatel JJ, Teh SJ, Dower NA, Stone JC, Teh HS (2002) RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17: 617-627
50. Dower NA, Stang SL, Botorff DA, Ebinu JO, Dickie P, Ostergaard HL, Stone JC (2000) RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 4: 317-321
51. Coughlin JJ, Stang SL, Dower NA, Stone JC (2005) RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol* 175: 7179-7184
52. Caloca MJ, Zugaza JL, Matallanas D, Crespo P, Bustelo XR (2003) Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* 22: 3326-3336
53. Guilbault B, Kay RJ (2004) RasGRP1 Sensitizes an immature B cell line to antigen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279: 19523-19530
54. Pierret P, Dunn RJ, Djordjevic B, Stone JC, Richardson PM (2000) Distribution of ras guanyl releasing protein (RasGRP) mRNA in the adult rat central nervous system. *J Neurocytol* 29: 485-497
55. Toki S, Kawasaki H, Tashiro N, Housman DE, Graybiel AM (2001) Guanine nucleotide exchange factors CalDAG-GEF1 and CalDAG-GEF2 are colocalized in striatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437: 398-407
56. Pierret P, Vallee A, Mechawar N, Dower NA, Stone JC, Richardson PM, Dunn RJ (2001) Cellular and subcellular localization of Ras guanyl nucleotide-releasing protein in the rat hippocampus. *Neuroscience* 108: 381-390

57. Pierret P, Mechawar N, Vallee A, Patel J, Priestley JV, Dunn RJ, Dower NA, Stone JC, Richardson PM (2002) Presence of Ras guanyl nucleotide-releasing protein in striosomes of the mature and developing rat. *Neuroscience* 111: 83-94
58. Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ (2002) Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12819-12824
59. Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM (2004) CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* 10: 982-986
60. Katagiri K, Shimonaka M, Kinashi T (2004) Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem* 279: 11875-11881
61. Guo F, Kumahara E, Saffen D (2001) A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M₁ muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J Biol Chem* 276: 25568-25581
62. McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurosaki T, Gold MR (1998) Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor. *J Biol Chem* 273: 29218-29223
63. Roberts DM, Anderson AL, Hidaka M, Swetenburg RL, Patterson C, Stanford WL, Bautch VL (2004) A vascular gene trap screen defines RasGRP3 as an angiogenesis-regulated gene required for the endothelial response to phorbol esters. *Mol Cell Biol* 24: 10515-10528
64. Li L, Yang Y, Stevens RL (2002) Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors. *Mol Immunol* 38: 1283-1288
65. Li L, Yang Y, Wong GW, Stevens RL (2003) Mast cells in airway hyper-responsive C3H/HeJ mice express a unique isoform of the signaling protein Ras guanine nucleotide releasing protein 4 that is unresponsive to diacylglycerol and phorbol esters. *J Immunol* 171: 390-397
66. Wang HQ, Smart RC (1999) Overexpression of protein kinase C- α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- α expression but not tumor promotion. *J Cell Sci* 112: 3497-3506
67. Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D, Weinstein IB (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8: 2095-2104
68. Perletti GP, Folini M, Lin HC, Mischak H, Piccinini F, Tashjian AH Jr. (1996) Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 12: 847-854
69. Reddig PJ, Dreckschmidt NE, Zou J, Bourguignon SE, Oberley TD, Verma AK (2000) Transgenic mice overexpressing protein kinase C ϵ in their epidermis exhibit reduced papilloma burden but enhanced carcinoma formation after tumor promotion. *Cancer Res* 60: 595-602
70. Karen J, Wang Y, Javaherian A, Vaccariello M, Fusenig NE, Garlick JA (1999) 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induces clonal expansion of potentially malignant keratinocytes in a tissue model of early neoplastic progression. *Cancer Res* 59: 474-481

RasGRP proteins – Ras-activating factors

Mateusz Szamałek, Wanda Baer-Dubowska 

Department of Pharmaceutical Biochemistry, University of Medical Sciences, 4 Swieczkiego St., 60-780 Poznań, Poland

 e-mail: baerw@amp.edu.pl

Key words: Ras guanyl-nucleotide releasing protein (RasGRP), guanine nucleotide exchange factor (GEF), Ras, Rap, phorbol esters, diacylglycerol

ABSTRACT

The Ras proteins, members of small GTP-binding protein family, are regulated through the exchange of GTP/GDP nucleotide. The activity of the Ras proteins is controlled by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTP-ase activating proteins (GAPs), which activate and inactivate G proteins respectively. Beside other, well known Ras-activating GEFs, the new class of such factors was recently described. RasGRP family, known also as CalDAG-GEF, consists of four members. C1 domain, allows them to bind diacylglycerol as well as DAG-analogs like phorbol esters. Binding of the ligand leads to activation of RasGRPs and in consequence to the activation of Ras and Rap proteins by the exchange of bounded guanine nucleotides. The signal transmitted by RasGRP is terminated as a result of DAG phosphorylation catalyzed by diacylglycerol kinase (DGK). Location of RasGRP proteins on the crossing of signaling cascades and broad tissue expression pattern involve them in many events essential for the cell function. RasGRP proteins play roles in such phenomena as: T cells maturation and functioning, B cells response, platelet aggregation, mast cells activity regulation, transformation and many other. In this review, structure and function of RasGRP proteins, as well as their role in neoplastic transformation are described.

Szlaki przekazywania sygnału w reakcji roślin na zranienie

STRESZCZENIE

Wyniki badań ostatnich lat przyczyniły się do znacznego postępu w poznaniu i zrozumieniu szlaków przekazywania sygnałów zranienia u roślin. Szczególną rolę w wyjaśnieniu tych procesów odegrała charakterystyka mutantów wykazujących zaburzenia w biosyntezie i percepcji kwasu jasmonowego oraz mutantu z zaburzoną funkcją peptydu – systeminy. Rośliny reagują na zranienie zarówno w miejscu zranienia (odpowiedź lokalna), jak i w miejscach odległych od niego (odpowiedź systemowa). W odpowiedzi systemowej główną rolę odgrywają jasmonidy, syntetyzowane w szlaku oktadekainowym, a wśród nich najlepiej poznany – kwas jasmonowy. Jasmonidy jako „długodystansowe” cząsteczki sygnałowe przenoszą informację o zranieniu do odległych, niezranionych miejsc i wywołują odpowiedź obronną. Systemina, odkryta u niektórych roślin psiankowatych, działa natomiast w miejscu zranienia, gdzie zwiększa poziom kwasu jasmonowego. Zidentyfikowano i częściowo scharakteryzowano szlaki zależne i niezależne od kwasu jasmonowego. Szlaki zależne od kwasu jasmonowego pełnią funkcję w odpowiedzi systemowej, natomiast szlaki niezależne od tego kwasu, indukowane w miejscu zranienia, pełnią funkcję naprawczą miejsc zranionych, dodatkowo chronią przed atakiem patogenu.

WPROWADZENIE

Osiadły tryb życia wymusił u roślin wykształcenie wyrafinowanych mechanizmów obronnych przed zranieniem mechanicznym (np. wiatr, deszcz, grad) oraz zranieniem wywołanym atakiem drapieżników, głównie owadów i ich larw. Po zranieniu rośliny uruchamiają złożoną kaskadę reakcji prowadzących do aktywacji mechanizmów obronnych, nie tylko w miejscu zranienia (odpowiedź lokalna), ale i w całej roślinie (odpowiedź systemowa). Reakcja rośliny ujawnia się już po kilku minutach od zranienia i obejmuje tworzenie cząsteczek sygnałowych, ich percepcję i przemieszczanie oraz aktywację genów obrony. Geny obrony kodują białka pełniące funkcje w szlakach przekazywania sygnałów, naprawie uszkodzonych tkanek oraz produkcji białek i komponentów odstraszających roślinożerców, ograniczających ich żerowanie i rozwój. W szlakach sygnałowych zranienia ważną rolę odgrywają: jasmonidy, systemina, oligogalakuronidy (OGA), kwas abscysynowy (ABA) i etylen. Częściowo zostały poznane szlaki sygnałowe zranienia zależne i niezależne od kwasu jasmonowego (JA). W szlakach tych uczestniczą procesy odwracalnej fosforylacji, wtórne przekaźniki sygnału (jony wapnia i kwas fosfatydowy), tlenek azotu (NO) i reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [1]. O złożoności tych mechanizmów może świadczyć fakt, że spośród 8200 genów rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), ekspresja około 8% z nich była zmieniona pod wpływem zranienia [2]. Badania ekspresji tych genów dostarczyły informacji dotyczących oddziaływań pomiędzy zranieniem a stresami abiotycznymi, hormonami roślinnymi i atakiem patogenów. Wykazano, że po zranieniu wzrasta poziom transkryptu genów kodujących białka, które odgrywają rolę w odpowiedzi roślin na patogen, stres osmotyczny i wysoką temperaturę. Zranienie indukuje również transkrypcję genów związanych ze szlakami etylenu, JA i ABA, natomiast hamuje ekspresję genów indukowanych przez auksyny. Jednymi z genów odpowiedzi roślin na zranienie są geny kodujące inhibitory proteaz PI (ang. *proteinase inhibitors*), które zakłócając aktywność enzymów trawiennych w przewodzie pokarmowym roślinożerców, hamują ich wzrost i rozmnażanie [3]. Dlatego też, geny PI są genami markerowymi w badaniach szlaków sygnałowych i mechanizmów obronnych wywołanych przez zranienie. Należą do genów tzw. odpowiedzi systemowej, której funkcją jest obrona rośliny przed dalszym atakiem roślinożerco. Natomiast zasadniczą funkcją genów odpowiedzi lokalnej jest naprawa zniszczonych tkanek, ochrona przed utratą wody i przed inwazją patogenów.

O ile odpowiedzi obronne roślin na mechaniczne zranienie zostały dosyć dobrze poznane, to całkiem niedawno zaczęto dostrzegać i doceniać unikalny charakter odpowiedzi obronnych przeciwko roślinożercom. Aktywowanie tych

Jadwiga Szczegieliak[✉]

Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

[✉]Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel.: (022) 592 57 17, e-mail: jaga@ibb.waw.pl

Artykuł otrzymano 16 sierpnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 19 grudnia 2006 r.

Słowa kluczowe: zranienie, mutanty szlaku zranienia, odpowiedź lokalna i systemowa, kwas jasmonowy, systemina, roślinożerca

Wykaz skrótów: ABA – kwas abscysynowy; ACX – oksydaza acylo-CoA; AOC – cyklaza tlenu allenu; AOS – syntaza tlenu allenu; COI1 – białko wchodzące w skład kompleksu ligazy ubikwitynowej E3; FAC (ang. *fatty acid-amino acid conjugates*) – koniugaty kwasów tłuszczowych z aminokwasami, elicytory; FAD- ω -3 – desaturaza kwasów tłuszczowych ω -3; GLV (ang. *green leaf volatiles*) – lotne związki organiczne o innej budowie niż VOC; JA – kwas jasmonowy; LA – kwas linolenowy (18:3); LOX – lipoksygenaza; MeJA – ester metylowy JA; OGA – oligogalakuronidy; OPDA – kwas 12-ketofitodienowy; PI (ang. *proteinase inhibitors*) – inhibitory proteaz; PLA – fosfolipaza A; PLD – fosfolipaza D; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; VOC (ang. *volatile organic compounds*) – lotne związki organiczne

Podziękowania: Autorka składa serdeczne podziękowania Pani Profesor Grażynie Muszyńskiej za inspirację do napisania niniejszej pracy oraz wszelkie krytyczne uwagi podczas jej pisanie. Autorka dziękuje również Pani Docent Grażynie Dobrowolskiej za krytyczne uwagi. Praca powstała w trakcie realizacji projektów: KBN nr 3PO6A 008 25 i PBZ-KBN-110/PO4/21

odpowiedzi jest efektem nie tylko zranienia mechanicznego, które zawsze towarzyszy atakowi roślinożercy, ale także elicitorów zawartych w ślinie roślinożercy. Najlepiej poznaną odpowiedzią fizjologiczną roślin na atak roślinożercy jest synteza *de novo* lotnych związków organicznych VOC (ang. *volatile organic compounds*), które następnie są uwalniane do atmosfery i pełnią rolę przynęt (atraktantów) dla naturalnych wrogów roślinożerców oraz „odstraszaczy” (repelentów). U wielu gatunków roślin, w tym kukurydzy, bawełny i tytoniu, wykazano, że żerujące owady indukują emisję VOC [4]. Coraz więcej danych wskazuje na istniejące różnice pomiędzy mechanizmami obronnymi wywołanymi mechanicznym zranieniem a zranieniem spowodowanym atakiem roślinożercy. Badania z zastosowaniem mikromacierzy cDNA ujawniły, że profil transkrypcji genów indukowanych przez zranienie mechaniczne jest znacznie bardziej podobny do profilu stresu wodnego niż do profilu uzyskanego w wyniku uszkodzeń spowodowanych atakiem roślinożercy [5].

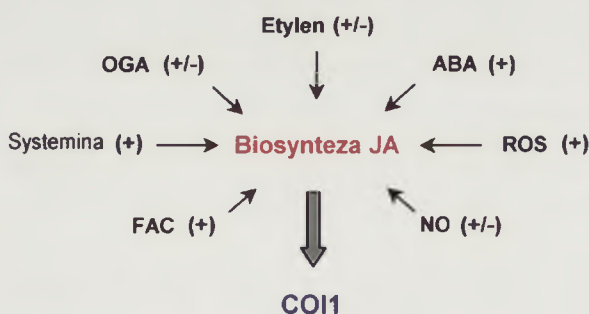
CZĄSTECZKI SYGNAŁOWE PEŁNIĄCE ROLĘ W SZLAKACH PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU ZRANIENIA

W reakcji roślin na zranienie uczestniczy wiele cząsteczek regulatorowych, które pośrednio lub bezpośrednio regulują także szlak biosyntezy JA (Ryc. 1). Do nich zalicza się: systeminę, jasmonidy (JA i jego pochodne), OGA, elicitory zawarte w ślinie owadów FAC (ang. *fatty acid-amino acid conjugates*), NO, ROS oraz etylen i ABA [1,6].

SYSTEMINA

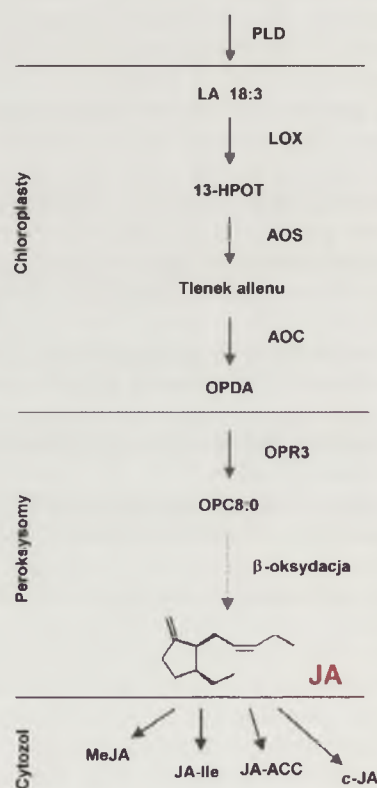
Systemina jest 18-aminokwasowym peptydem bogatym w prolinę, wytworzonym z prekursorowego 200-aminokwasowego białka, zwanego prosysteminą [7]. Systeminę zidentyfikowano początkowo w liściach pomidora, a następnie u ziemniaka, papryki i wilczej jagody. Natomiast u tytoniu odkryto peptydy przypominające budową i funkcją systeminę. Są to dwa 18-aminokwasowe glikopeptydy bogate w hydroksyprolinę, zwane TobHypSys I i II. Peptydy te, podobnie jak systemina, pochodzą z większego, prekur-

sorowego białka i bardzo silnie indukują ekspresję genów PI, co wskazuje na ich rolę w szlaku przekazywania sygnału zranienia [8]. Podobne peptydy odkryto również u pomidora. Są to trzy 20-, 18- i 16-aminokwasowe glikopeptydy bogate w hydroksyprolinę, zwane TomHypSys I, II i III [8]. Brak jest homologu systeminy u *Arabidopsis thaliana*. Początkowo wiele danych sugerowało, że systemina pełni funkcję cząsteczki sygnałowej „długodystansowej” i jest odpowiedzialna za wywołanie odpowiedzi systemowej. Wykazano np., że u mutantów pomidora o podwyższonym poziomie prosysteminy zachodzi konstytutywna ekspresja genów odpowiedzi na zranienie, jak gdyby roślina była permanentnie raniona [7]. Natomiast u roślin z wyciszonym genem prosysteminy, obserwowano zmniejszoną ekspresję genów PI w odpowiedzi systemowej, jak również obniżoną odporność na szkodniki [7]. Ponadto, wykazano, że systemina jest cząsteczką mobilną i może przemieszczać się przez floem. Według najnowszych danych systemina odgrywa rolę przy produkcji i amplifikacji cząsteczki sygnałowej (JA) w miejscu zranienia, ale sama nie jest transportowana na duże odległości.



Rycina 1. Regulacja biosyntezy JA przez cząsteczki sygnałowe wytwarzane w reakcji na zranienie. Wiele cząsteczek sygnałowych uczestniczących w szlakach odpowiedzi roślin na zranienie, reguluje szlak biosyntezy JA. W zależności od gatunku rośliny cząsteczki te mogą indukować (+) lub hamować (-) biosyntezę JA lub późniejsze wydarzenia w szlaku sygnałowym. Sam JA również reguluje syntezę lub działanie tych cząsteczek. Niezbędnym elementem szlaku JA jest białko COII. Na podstawie pracy [9].

Zranienie, atak roślinożercy



Rycina 2. Schemat szlaku oktadekainowego u roślin. Używane skróty związków i enzymów uczestniczących w szlaku biosyntezy JA: PLD – fosfolipaza D; LA – kwas linolenowy; LOX – lipoksygenaza; 13-HPOT – kwas 13-hydroperoksylinolenowy; AOS – syntaza tlenu allenu; AOC – cyklaza tlenu allenu; OPDA – kwas 12-ketofitodienowy; OPR3 – reduktaza OPDA; OPC8:0 – kwas 3-okso-2(2'(Z)-pentylo)-cyklopentano-1-oktanowy; JA – kwas jasmonowy; MeJA – metylowa pochodna JA; JA-Ile – koniugat JA z izoleucyną; JA-ACC – koniugat JA z prekursorem etylenu, kwasem 1-aminocyklopropano-1-karboksylovym; cJA – cis-jasmon. Na rysunku nie przedstawiono enzymów katalizujących β -oksydację OPC8:0: ACX – oksydaza acylo-CoA, MFP – wielofunkcjonalne białko i KAT – tiolaza 3-ketoacylo-CoA. Szczegółowe informacje o szlaku sygnałowym jasmonidów dostępne są na stronie internetowej http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm/CMP_7361. Na podstawie prac [1,11].

Jasmonidy mają strukturę cyklopentanu i pochodzą z utlenionych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Są produkowane, w dobrze poznanym u roślin, szlaku oktadekainowym [9] (Ryc. 2). Terminem jasmonidy określa się nie tylko JA i jego ester metylowy (MeJA), ale również aktywne biologicznie, spokrewnione z JA związki, włączając jego prekursorzy i koniugaty. Jasmonidy regulują procesy wzrostu i rozwoju, starzenia się roślin oraz reakcje obronne na stresy. Na początku lat 90-tych po raz pierwszy wykazano, że indukcja ekspresji genów PI przez JA i MeJA jest częścią odpowiedzi obronnej rośliny zaatakowanej przez owady roślinożerne [10]. Wiele późniejszych prac potwierdziło rolę jasmonidów w regulacji odpowiedzi obronnych przeciwko atakom roślinożerców i infekcjom przez niektóre patogeny. JA i jego pochodne odgrywają również rolę w odpowiedzi obronnej na mechaniczne zranienie, które zawsze towarzyszy atakom roślinożerców.

Ze względu na swoje pleiotropowe działanie, JA indukuje ekspresję genów związanych z wieloma procesami fizjologicznymi. Oprócz wspomnianych wcześniej genów PI, JA indukuje ekspresję genów kodujących białka antybakteryjne: defensynę (PDF1.2) i tioninę (THI2.1) – enzymy biorące udział w biosyntezie wtórnych metabolitów, np. alkaloidów, terpenoidów, flawonoidów, antrachinonów i glikozynolanów. Metabolity te pełnią funkcje obronne przeciwko bakteriom i zwierzętom roślinożernym. MeJA indukuje transkrypcję genów związanych z powstawaniem ROS i programowaną śmiercią komórki oraz genów szlaku biosyntezy JA/MeJA, np. *LOX2*, *AOS*, *OPR3*, *JMT* i *AOC* [11]. JA/MeJA indukuje również ekspresję genów związanych np. z metabolizmem cukrów i aminokwasów oraz procesami starzenia się [11]. Biosynteza i metabolizm JA ma miejsce w trzech przedziałach komórki. Rozpoczyna się uwolnieniem LA z błon chloroplastów. W chloroplastach zlokalizowane są enzymy: *LOX*, *AOS* i *AOC* syntetyzujące OPDA – prekursor JA. Następnie OPDA transportowany jest do peroksysomów, gdzie znajdują się enzymy przekształcające OPDA w JA: reduktaza OPDA oraz enzymy katalizujące β -oksydację OPC8:0. W peroksysomach syntetyzowany jest JA, który następnie transportowany jest do cytosolu. O ile znany jest transporter OPDA z chloroplastów do peroksysomów (białko CTS), to jak dotychczas, nie poznano molekularnego mechanizmu transportu JA [12]. W cytosolu JA ulega różnym modyfikacjom. Pochodne JA mogą powstawać przez metylację, glikozylację, hydroksylację, dekarboksylację i koniugację z aminokwasami. Najprawdopodobniej, metabolity JA, wpływając na transport i stabilność JA, regulują szlaki sygnałowe zależne od JA. Wykazano, że MeJA oraz koniugat JA z resztą izoleucyny (JA-Ile), podobnie jak sam JA, są cząsteczkami aktywnymi biologicznie [3]. U mutantu *Arabidopsis jar1* (ang. *jasmonate resistant1*) z niefunkcyjnym genem *JAR1* (*JAR1* katalizuje koniugację JA z Ile) nie obserwuje się efektu hamowania wzrostu korzeni przez MeJA, ale obserwuje się efekt hamowania przez JA-Ile. Świadczy to o tym, że JA-Ile odgrywa rolę w niektórych odpowiedziach zależnych od szlaku JA [13]. Metylacja JA katalizowana jest przez metylotransferazę karboksylową – *JMT* (ang. *jasmonic acid carboxyl methyltransferase*). Transgeniczne ro-

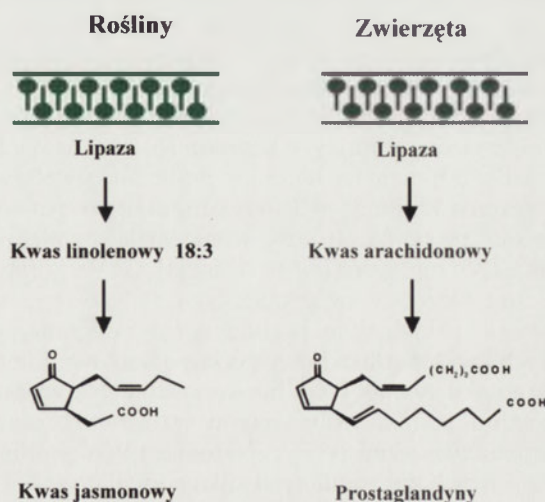
śliny *Arabidopsis*, o podwyższonym poziomie JMT, wykazują wzrost ekspresji genów indukowanych przez JA oraz wzrost odporności na patogen pochodzący z grzybów [3]. Natomiast dekarboksylowana pochodna JA – cJA wpływa na zachowanie się owadów, odstrasza pewne gatunki roślinożerców, jak również wabi ich drapieżników [10].

Analiza mutantu *opr3* (ang. *12-OPDA reductase3*), syntetyzującego OPDA, ale nie JA, wykazała, że OPDA funkcjonuje u *Arabidopsis* jako samodzielna cząsteczka sygnałowa, niezależnie od JA i COI1 [14]. Potwierdziła to analiza genów indukowanych przez JA, MeJA i OPDA. Spośród 21 500 genów *Arabidopsis*, przebadanych za pomocą mikromacierzy, wiele jest regulowanych przez wymienione jasmonidy. Natomiast pewna pula genów jest regulowana specyficznie tylko przez OPDA, a 50% spośród genów indukowanych przez OPDA, indukowana jest przez zranienie. Natomiast analiza mutantu pomidora *acx1* (ang. *acyl-CoA oxidase1*), który ma fenotyp podobny do mutantu *Arabidopsis opr3*, wykazała brak funkcji OPDA, jako niezależnej cząsteczki sygnałowej w odpowiedzi na zranienie [15].

Szlak oktadekainowy u roślin jest zaskakująco podobny do systemu immunologicznego u ssaków, w którym główną rolę odrywają cyklopentanowe kwasy tłuszczowe (prostaglandyny). Strukturalnie podobne do JA, prostaglandyny odgrywają rolę regulatorową w różnych procesach fizjologicznych, włączając odpowiedź immunologiczną. U zwierząt szlak syntezy prostaglandyn rozpoczyna się uwalnianiem kwasu arachidonowego (20:4) z błon komórkowych, podobnie jak u roślin biosynteza jasmonidów rozpoczyna się uwalnianiem LA (Ryc. 3).

OLIGOGALAKTURONIDY

Oligogalakturonidy (OGA), uwalniane z uszkodzonych ścian komórkowych, indukują u pomidora ekspresję genów PI. Niewykluczone, że OGA mogą być produkowane także endogennie, ponieważ po zranieniu lub potraktowaniu roślin systeminą zaobserwowano indukcję ekspresji genu poligalakturonazy, która uczestniczy w syntezie OGA [6].



Rycina 3. Porównanie struktury kwasu jasmonowego pochodzącego z kwasu linolenowego i prostaglandyny pochodzących z kwasu arachidonowego.

Uważa się, że OGA, ze względu na małą ruchliwość, pełni funkcję w odpowiedzi lokalnej rośliny na zranienie. Jednakże, biorąc pod uwagę fakt, że systemina indukuje aktywność poligalakturonazy w liściach nie zranionych [6], nie wyklucza się również istnienia odpowiedzi systemowych, zależnych od OGA.

TLENEK AZOTU I REAKTYWNE FORMY TLENU

Istnieje wiele dowodów wskazujących na udział tlenu azotu (NO) w zależnej od JA odpowiedzi roślin na zranienie. Zranienie oraz JA indukują syntezę NO u buraka cukrowego i *Arabidopsis* [1,16]. Egzogenny NO u *Arabidopsis* indukuje transkrypcje genów szlaku biosyntezy JA, ale nie ma to wpływu na wzrost stężenia JA [16]. Natomiast u psiankowatych NO hamuje, indukowaną przez zranienie, syntezę H₂O₂ i ekspresję genów indukowanych przez JA [17].

Zranione rośliny produkują przejściowo reaktywne formy tlenu (ROS) – zaobserwowano wzrost stężenia H₂O₂ zarówno w tkankach zranionych, jak i nie zranionych [17]. H₂O₂ jest również wytwarzany w liściach traktowanych systeminą, co sugeruje udział H₂O₂ w szlaku sygnałowym zależnym od systeminy i JA. Uważa się, że H₂O₂ pełni funkcję wtórnego przekaźnika sygnałów w indukcji ekspresji genów u pomidora w odpowiedzi na zranienie [17]. Niestety, wzajemne korelacje pomiędzy szlakiem NO, ROS a szlakami sygnałowymi w reakcji na zranienie, jak dotychczas, są niewyjaśnione.

LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE

Wyizolowane ze śliny owada koniugaty kwasów tłuszczowych z aminokwasami FAC wykazują właściwości elicitora. FAC indukują odpowiedzi obronne przeciwko roślinożercom. Kwasy tłuszczowe wchodzące w skład FAC pochodzą z roślin, natomiast reszty aminokwasowe pochodzą z organizmu owada [18]. Pierwszym scharakteryzowanym owadzim elicitorem była wolicytyna (N-(17-hydroksy-linolenolyl)-L-glutamina). Zastosowanie w miejscu zranienia wolicytyny lub innych FAC wywołuje systemowe uwalnianie lotnych związków organicznych (VOC), które są odpowiedzialne za tzw. odpowiedzi obronne pośrednie przeciwko roślinożercom, polegające między innymi na wabieniu ich naturalnych wrogów. W skład VOC wchodzi lotne związki organiczne, biosyntetyzowane w szlakach np. terpenów, izoprenoidów i szlaku szikimowym. Oprócz indukcji odpowiedzi obronnych pośrednich, FAC wywołują bezpośrednio odpowiedzi obronne. Powodują gwałtowny wzrost stężenia JA (ang. *JA burst*) i indukują odpowiedzi obronne zależne od JA [4]. FAC wzmacniają również wydzielanie GLV (ang. *green leaf volatiles*) [4]. GLV są, innymi od VOC, organicznymi związkami lotnymi. Są 6-węglowymi alkoholami i aldehydami pochodzącymi z degradacji 18-węglowych kwasów tłuszczowych (kwas linolowy i linolenowy) w szlaku sygnałowym lipoksygenazy. Natychmiast po zranieniu lub ataku roślinożerców wzrasta przejściowo w miejscu zranienia emisja GLV. Natomiast VOC emitowane są w miejscach nie zranionych kilka godzin po ataku roślinożercy [19]. GLV, podobnie jak VOC, pełni funkcję w odstraszeniu roślinożerców, przywabianiu ich naturalnych wrogów, jak również obniżają płodność mszyc [4]. Orga-

niczne związki lotne, opisane w pracach przeglądowych [4,20], odgrywają skomplikowane role w oddziaływaniach pomiędzy roślinami i ich roślinożercami. Oprócz FAC ze śliny owadów zostały wyizolowane enzymy o właściwościach elicatorów. Należą do nich np. oksydaza glukozy, β-glukozydaza i alkaliczna fosfataza [21]. Złożone oddziaływania pomiędzy roślinami a ich szkodnikami są nie do końca poznane. Wykazano np., że oksydaza glukozy, w przeciwieństwie do FAC, może być również inhibitorem pewnych odpowiedzi obronnych roślin przeciwko roślinożercom [22].

SZLAKI SYGNAŁOWE W REAKCJI NA ZRANIENIE

ROLA KWASU JASMONOWEGO JAKO CZĄSTECZKI SYGNAŁOWEJ „DŁUGODYSTANSOWEJ” W ODPOWIEDZI SYSTEMOWEJ

Do poznania i zrozumienia szlaków przekazywania sygnałów w reakcji na zranienie w znacznym stopniu przyczyniło się wyselekcjonowanie i scharakteryzowanie mutantów szlaku zranienia u *Solanaceae* i *Arabidopsis thaliana*. Mutanty szlaku zranienia można sklasyfikować jako mutanty, u których jest: 1) zahamowana biosynteza JA; 2) zaburzona percepcja JA oraz 3) zaburzone funkcjonowanie systeminy. Mutanty te charakteryzują się brakiem odpowiedzi systemowej na zranienie oraz zmniejszoną odpornością na szkodniki [23]. Szczególnie utrata przez mutanty odporności na szkodniki i patogeny świadczy o tym, że geny związane z biosyntezą i percepcją JA oraz systemina są niezbędne dla rośliny, aby mogła bronić się przed szkodnikami [10]. Wyniki wielu badań wskazywały, że JA może pełnić funkcję sygnału „długodystansowego” (ang. *long-distance signal*) w wywołaniu odpowiedzi systemowej w reakcji na zranienie. Zaobserwowano np. wzrost transkryptu genów PI (markery zranienia) zarówno w liściach traktowanych JA, jak i nie traktowanych [10]. Podobne wyniki uzyskano, traktując liście koronatyną, toksyną produkowaną przez *Pseudomonas syringae*, która budową i działaniem naśladuje JA [24]. Koronatyna indukowała ekspresję genów PI w liściach nie traktowanych, w sposób zależny od COI1, ale niezależny od JA. Wyniki te świadczyły o transporcie koronatyny do nietraktowanych liści, ponieważ rośliny nie produkują koronatyny, oraz sugerowały, że podobnie może być transportowany JA. Badania z zastosowaniem JA znakowanego ¹⁴C wykazały, że JA transportowany jest przez floem [10]. Zaobserwowano wzrost stężenia tego hormonu w liściach niezranionych, jednakże wzrost ten nigdy nie przekraczał 10% wzrostu stężenia w liściach zranionych [3].

Jednakże, przełomem w poznaniu roli JA w szlaku przekazywania sygnału zranienia były badania, przeprowadzone przez grupę Gregga Howe'a, z zastosowaniem klasycznej techniki szczepień (ang. *grafting experiments*) [25,26]. Szczepiono typ dziki pomidora z mutantami szlaku zranienia w różnych kombinacjach (Ryc. 4). Doświadczenia przeprowadzone z mutantami: *jai1* (niewrażliwy na JA), *acx1* (nie produkujący JA) i *35S-Prosys* (o podwyższonym poziomie prosysteminy) wykazały, że biosynteza JA w liściach zranionych jest niezbędna do przekazywania sygnału o zranieniu i wywoływaniu odpowiedzi systemowej w liściach nie zranionych, jak również, że biosynteza *de novo* JA w liściach nie zranionych nie jest konieczna do wywołania odpowie-

dzi systemowej, natomiast jest wymagana percepcja JA. Wyniki tych badań wskazują, że odpowiedź systemowa na zranienie zależy od biosyntezy JA w miejscu zranienia i od percepcji JA w miejscu niezranionym.

Rolę JA jako „długodystansowej” cząsteczki sygnałowej, przekazującej informacje o zranieniu do odległych, niezranionych miejsc, potwierdza lokalizacja enzymów biosyntezy JA w wiązkach przewodzących (Ryc. 5A). W komórkach towarzyszących i rurek sitowych wiązek przewodzących zlokalizowano enzymy biosyntezy JA: LOX, AOS, AOC i enzymy katalizujące β -oksydację OPC8:0 [1]. Podczas, gdy białko AOC zlokalizowano zarówno w komórkach towarzyszących, jak i w rurek sitowych, to mRNA AOC wykryto tylko w komórkach towarzyszących. Najprawdopodobniej enzym AOC jest syntetyzowany tylko w komórkach towarzyszących, a następnie transportowany przez plazmodesmy do rurek sitowych. Natomiast JA zlokalizowano w wiązkach przewodzących babki zwyczajnej (*Plantago major*) [1] oraz w nerwie głównym liścia pomidora (gdzie również zlokalizowano OPDA) [27], co było kolejnym potwierdzeniem roli JA jako mobilnej cząsteczki sygnałowej. Co więcej, warunkiem wystąpienia odpowiedzi systemowej w reakcji na zranienie jest nieuszkodzony floem [1].

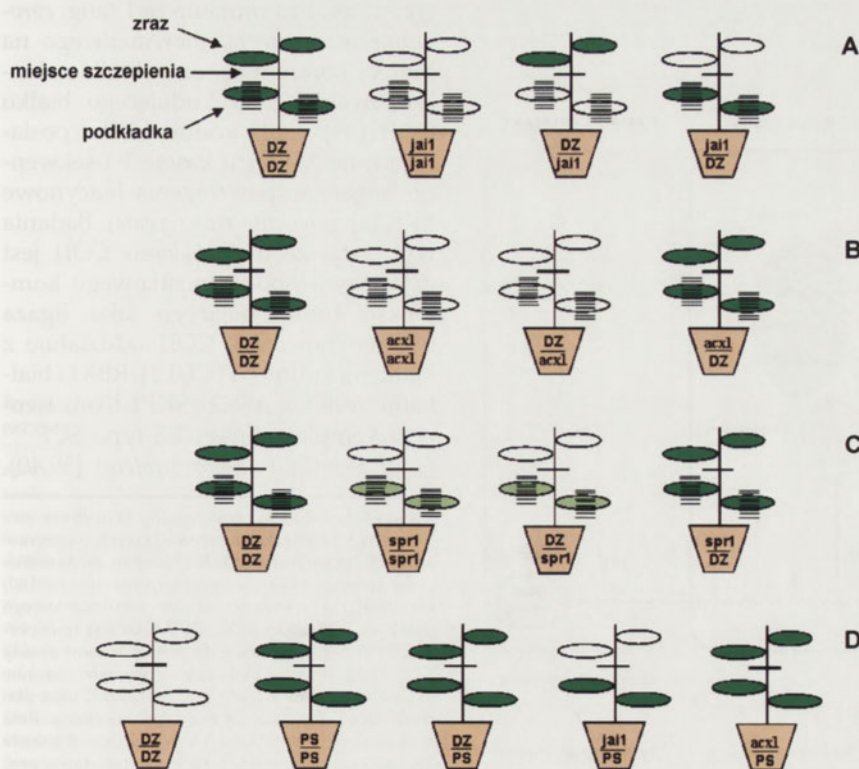
ROLA SYSTEMINY W ODPOWIEDZI SYSTEMOWEJ NA ZRANIENIE

Do wyjaśnienia roli systeminy w szlaku przekazywania sygnału zranienia przyczyniły się prace z mutantem pomidora *spr1* (ang. *suppressed in prosystemin-mediated responses1*) [9,25]. Mutant ten jest niewrażliwy na systeminę i nieznana jest mutacja odpowiedzialna za jego fenotyp. Prawdopodobnie, białko SPR1 występuje na szlaku pomiędzy receptorem systeminy a występującym później szlakiem biosyntezy JA. U mutantu *spr1* obserwuje się brak wzrostu stężenia JA w

odpowiedzi na egzogenną systeminę oraz znacznie zredukowany poziom JA w odpowiedzi na zranienie. Mutant *spr1* swoim fenotypem przypomina mutant z wyciszonym genem prosysteminy, u którego poziom ekspresji genów PI, w reakcji na zranienie, jest obniżony głównie w odpowiedzi systemowej. Cechy mutantu *spr1* wskazywały, że systemina jest ważnym elementem szlaku przekazywania sygnału zranienia związanego z odpowiedzią systemową. Sugerowała to także lokalizacja transkryptu prosysteminy w wiązkach przewodzących nerwu głównego, nerwów bocznych liścia, w ogonkach liściowych i łodydze [28]. Badania immunochemiczne i hybrydyzacja *in situ* potwierdziły lokalizację prosysteminy w komórkach miękiszowych wiązek przewodzących floemu oraz wykazały, że ekspresja transkryptu prosysteminy w tych tkankach wzrasta w odpowiedzi na zranienie i traktowanie JA [29]. Jednak dopiero badania na szczepionych roślinach z mutantem *spr1* wykazały, że systemina pełni funkcję w miejscu zranienia w produkcji i amplifikacji JA (Ryc. 4). Jest to zgodne z wynikami badań na szczepionych roślinach z wykorzystaniem mutantów biosyntezy JA, które wskazują, że odpowiedź na zranienie, w liściach zranionych i niezranionych, zależy od produkcji JA w liściach zranionych (Ryc. 4).

Wyniki badań wskazują, że systemina i JA w szlaku sygnałowym w reakcji na zranienie oddziałują wzajemnie na siebie poprzez dodatnie sprzężenie zwrotne. Po zranieniu systemina indukuje biosyntezę JA poprzez aktywację enzymów szlaku oktadekainowego. Jest to możliwe, ponieważ w niezranionych liściach pomidora istnieje niska, konstytutywna ekspresja genów biosyntezy JA, dzięki której rośliny w odpowiedzi na zranienie mogą efektywnie syntetyzować JA [27,28]. Oprócz aktywacji enzymów, systemina indukuje ekspresję ich genów, np. genu AOC [27]. W konsekwencji, wytwarzany JA indukuje z kolei ekspresję genów: prosysteminy, receptora systeminy oraz enzymów uczestniczących w jego biosyntezie [28,30].

W tak działającym dodatnim sprzężeniu zwrotnym pomiędzy systeminą a biosyntezą JA, produkowany jest i akumulowany JA (Ryc. 5B). To sprzężenie zwrotne jest istotne do akumulacji JA i jego działania w odpowiedzi na długotrwałe zranienie powodowane przez roślinożerców. W procesie tym także odgrywają rolę substraty biosyntezy JA; np. w ciągu pierwszej godziny po zranieniu, przejściowy wzrost



Rycina 4. Schemat doświadczeń z zastosowaniem szczepień roślin pomidora do badań roli systeminy i JA w odpowiedzi systemowej wywołanej przez zranienie. Szczepiono rośliny pomidora mające różne genotypy: DZ – typ dziki pomidora; *jai1* – mutant z niefunkcyjnym genem *COI1*, niewrażliwy na JA; *acx1* – mutant z niefunkcyjnym genem *ACX*, brak biosyntezy JA; *spr1* – mutant niewrażliwy na systeminę; PS – mutant 35S-*Prosyls* o podwyższonym poziomie prosysteminy. W doświadczeniach A, B, i C raniono liście podkładki (zaznaczono poziomymi liniami), po 8 godz. badano poziom ekspresji genów PI zarówno w liściach zranionych (podkładki), jak i niezranionych (zrazu). Poziom ekspresji genów PI na rysunku oznaczono kolorami: brak lub niską ekspresję – kolorem białym; wysoką ekspresję – kolorem zielonym; pośrednią ekspresję w zranionych liściach mutantu *spr1* – kolorem jasnozielonym. Na podstawie prac [3,9].

stężenia JA zależy od indukcji syntezy LA, ponieważ u roślin o podwyższonym poziomie enzymów biosyntezy JA, AOS lub AOC, dopiero po zranieniu i uwolnieniu z błon LA wzrasta stężenie JA [27,31].

SZLAKI ZALEŻNE OD KWASU JASMONOWEGO

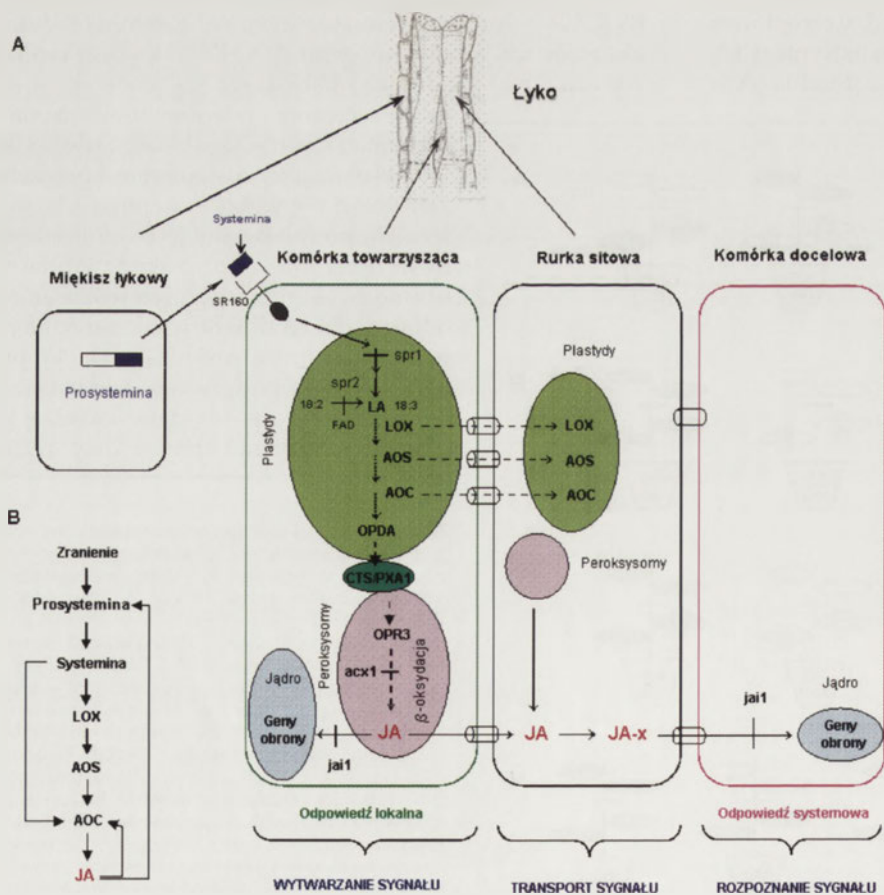
Na Ryc. 6 przedstawiono hipotetyczny model szlaków uczestniczących w przekazywaniu sygnału zranienia. Do tej pory nie wiadomo, co jest początkowym sygnałem zranienia, który uruchamia całą kaskadę wydarzeń prowadzących do indukcji odpowiedzi obronnych. Wyniki badań na mutancie *Arabidopsis cev1* (ang. *constitutive expression of vsp1 (vegetative storage proteins)*), charakteryzującym się konstytutywną lub wzmoczoną odpowiedzią na JA, wskazują na udział ściany komórkowej we wczesnej odpowiedzi roślin na stresi ponieważ zidentyfikowany gen *cev1* koduje syntazę celulozy [32]. Jednymi z najwcześniejszych wydarzeń zachodzących w komórce po zranieniu lub zastosowaniu elicitorów zranienia są: depolaryzacja błony komórkowej, aktywacja ATPazy protonowej, alkalizacja środowiska zewnątrzkomórkowego, wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, aktywacja kinaz białkowych, produkcja ROS oraz aktywacja szlaku oktadekainowego [7]. Obecnie uważa się, że szlak oktadekainowy pełni centralną funkcję w szlaku przekazywania sygnału zranienia we wszystkich roślinach zarówno jedno-, jak i dwuliściennych, włączając drzewa [10]. Według obecnego stanu wiedzy istnieje przynajmniej kilka szlaków sygnałowych w reakcji na zranienie. Najlepiej poznanym jest szlak zależny od JA, który u pomidora aktywowany

jest przez OGA i systeminę. W komórkach miększu tykowego systemina powstająca z prosysteminy uwalniana jest do apoplastu. Następnie wiąże się do swojego receptora SR160 znajdującego się w błonie komórek towarzyszących łyka [30,33] (Ryc. 5 i 6) i aktywuje szlak oktadekainowy. Nie jest znany początkowy etap tego szlaku, aczkolwiek wiele danych wskazuje na udział lipaz w uwalnianiu z błon LA – prekursora JA. Zaobserwowano wzrost aktywności fosfolipazy A (PLA) w liściach pomidora w odpowiedzi na zranienie, systeminę lub OGA [34]. Wiele dowodów wskazuje, że w przewodzeniu sygnału zranienia u *Arabidopsis* i pomidora uczestniczy również fosfolipaza D (PLD). PLD, katalizując reakcję wytwarzania wtórnego przekaźnika sygnałowego, kwasu fosfatydowego (PA), może wpływać stymulująco na hydrolizę lipidów przez inne lipazy [35]. U mutantów *Arabidopsis* z wyciszonym genem *PLD*, po zranieniu, hamowana jest synteza PA, JA oraz ekspresja genów indukowanych przez JA np. *AtLOX2*, który koduje kluczowy enzym szlaku biosyntezy JA [36]. Ekspresja pozostałych genów szlaku biosyntezy JA pozostaje niezmienną w tym mutancie. Świadczy to o tym, że PLD funkcjonuje w szlaku wcześniej od *AtLOX2*. Wyniki wielu badań genetycznych wykazały, że szlak zależny od JA pełni kluczową funkcję w obronie rośliny przed roślinożercami i niektórymi patogenami bakteryjnymi [10].

REGULACJA ODPOWIEDZI NA JA POPRZEZ KOMPLEKS LIGAZY E3 TYPU SCF^{COI1} I KOMPLEKS SYGNAŁOWY COP9 (CSN)

Wszystkie znane do tej pory odpowiedzi zależne od JA u *Arabidopsis* i pomidora wymagają białka COI1 [23,37], które w szlaku sygnałowym w reakcji na zranienie funkcjonuje później od szlaku biosyntezy JA (Ryc. 5, 6). Genetyczna analiza mutanta *coi1* (ang. *coronatine insensitive1*), niewrażliwego na MeJA i koronatinę, umożliwiła zidentyfikowanie genu kodującego białko COI1 [38]. *COI1* koduje białko posiadające na N-końcu kasetę F i sekwencje bogate w powtórzenia leucynowe LRR (ang. *leucine-rich repeats*). Badania wykazały, że u *Arabidopsis* COI1 jest częścią wielopodjednostkowego kompleksu funkcjonującego jako ligaza ubikwitynowa E3. COI1 oddziałuje z białkami kuliny (ATCUL1), RBX1 i białkami ASK1 i ASK2 (SKP1-like), tworząc kompleks ligazy E3 typu SCF^{COI1} (ang. *Skp-Cullin-F-box protein*) [39,40].

Rycina 5. Lokalizacja prosysteminy i enzymów biosyntezy JA w wiązkach przewodzących (naczyniowych) liści pomidora (A). Na rysunku zaznaczono: prosysteminę, systeminę, receptor systeminy (SR160) oraz związki i enzymy szlaku oktadekainowego (FAD- ω 3, LOX, AOS, AOC, OPDA, OPR3), transporter OPDA z chloroplastów do peroksisomów zwany CTS/PXA1, mutacje blokujące odpowiedzi obronne rośliny na zranienie (*spr1*, *spr2*, *jai1*, *acx1*) oraz plazmodesmy – połączenia między komórkami. Rola systeminy w amplifikacji JA w miejscu zranienia (B). Szczegóły opisano w tekście. Na podstawie prac [1,3].

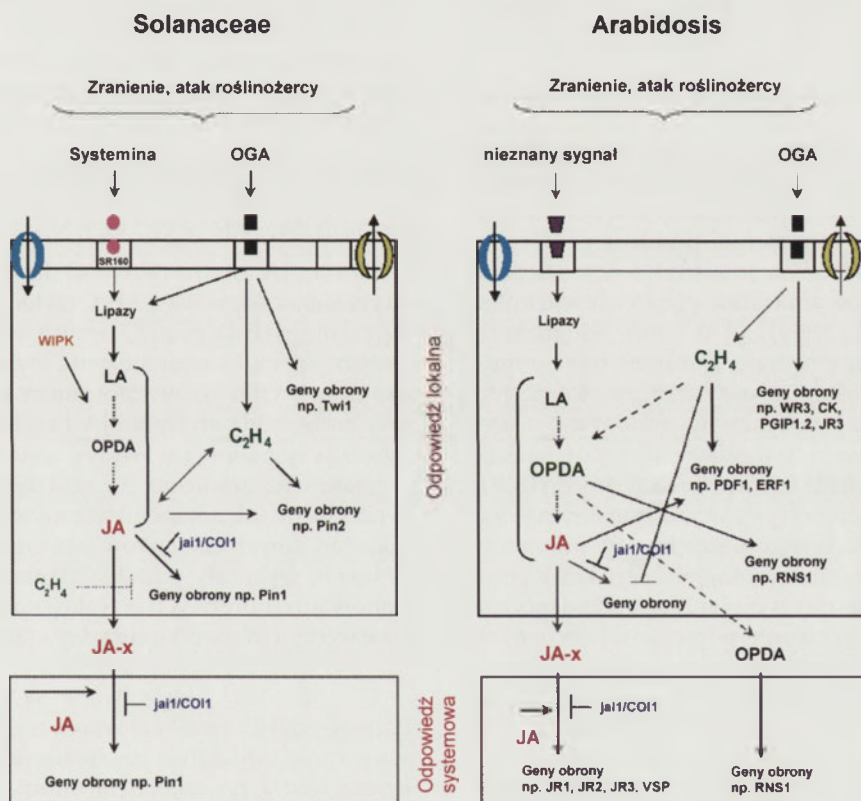


SCF^{COI1} wspólnie z enzymem aktywującym (E1), enzymem koniugującym (E2) poprzez domenę LRR w COI1 przenosi ubikwitynę na substrat, który jest degradowany przez proteosom 26S [41]. We wszystkich organizmach eukariotycznych białka z kasetą F wraz z innymi białkami kompleksu ligazy E3 przyłączają wybiórczo białka regulatorowe przeznaczone do degradacji zależnej od ubikwityny [41].

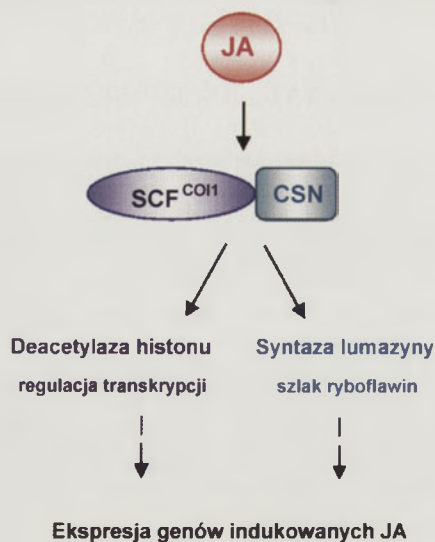
Mutant pomidora *jai1* (ang. *jasmonic acid-insensitive1*) wykazuje fenotyp podobny do mutantu *Arabidopsis coi1* – jest niewrażliwy na MeJA i koronatinę oraz jest podatny na wirulentny szczep *Pseudomonas syringae* [23,24]. Za fenotyp mutantu *jai1* odpowiedzialna jest mutacja w genie *LeCOI1*, który koduje białko identyczne w 78% z COI1 *Arabidopsis* i w 57% z homologicznym białkiem ryżu [23]. Biorąc pod uwagę podobieństwo w fenotypach mutantów *Arabidopsis coi1* i pomidora *jai1*, najprawdopodobniej COI1 pełni podobną funkcję w szlaku JA w obu organizmach. Istnienie ortologu genu *COI1* w roślinach

jednoliściennych sugeruje, że szlak zranienia zależny od JA, jest ewolucyjnie zachowany we wszystkich roślinach wyższych.

Z kompleksem ligazy E3 typu SCF^{COI1} oddziałuje kompleks sygnałowy COP9 (określany akronimem CSN). CSN jest jądrowym, wielopodjednostkowym, zachowanym w ewolucji kompleksem białkowym. Po raz pierwszy został zidentyfikowany jako represor ekspresji genów regulowanych przez światło. CSN odgrywa rolę w fotomorfogenezie, odpowiedzi na auksyny i regulacji degradacji białek zależnej od ubikwityny. Mutanty *Arabidopsis* pozbawione funkcji CSN charakteryzują się fenotypem podobnym do uprzednio opisanego mutantu *coi1*, między innymi brakiem ekspresji genów indukowanych przez JA. Indukcja ekspresji genów zależnych od szlaku JA/COI1 jest również zależna od funkcji CSN. Wykazano, że zarówno COI1, jak i CSN odgrywają rolę w regulacji większości szlaków komórkowych zależnych od JA [40,41].



Rycina 6. Porównanie szlaków przekazywania sygnału zranienia u *Solanaceae* i *Arabidopsis thaliana*. U *Solanaceae* w zranionych liściach peptyd systemina i/lub OGA aktywują szlak biosyntezy JA, wzrasta stężenie JA i etylenu. JA i etylen wzajemnie indukują swoją syntezę oraz ich działanie jest konieczne do indukcji ekspresji genów obronnych (np. *Pin2* – inhibitor proteaz u pomidora). JA jest transportowany z miejsca zranienia do odległych, niezranionych miejsc i tam wywołuje odpowiedź systemową zarówno u *Solanaceae*, jak i *Arabidopsis*. U *Solanaceae* istnieje kilka szlaków sygnałowych, w których indukowane są specyficzne geny. I tak np. w szlaku niezależnym od JA, systeminy i etylenu, w odpowiedzi lokalnej, indukowana jest ekspresja genu *Twi1* (glukozylotransferaza). Natomiast w szlaku zależnym od systeminy i JA, indukowana jest ekspresja genu *Pin1* (inhibitor proteaz u pomidora, inny niż *Pin2*) zarówno w odpowiedzi lokalnej, jak i systemowej, przy czym indukcja ta jest hamowana przez etylen w odpowiedzi lokalnej. W szlaku zależnym od JA występuje białko COI1, które kieruje białka regulatorowe tego szlaku do proteolizy zależnej od ubikwityny (także u *Arabidopsis*). Aktywowana jest również w sposób niezależny od systeminy i JA kinaza WIPK. Sama WIPK indukuje szlak biosyntezy JA. U *Arabidopsis* istnieją co najmniej dwa szlaki sygnałowe, które, wzajemnie na siebie oddziałując, determinują odpowiedź lokalną i systemową, przy czym indukcja ta jest hamowana przez etylen w miejscu zranienia (w odpowiedzi lokalnej) indukuje ekspresję genów *WR3*, *CK* i *PGIP1.2*, w sposób niezależny od JA i etylenu. W szlaku OGA produkowany jest etylen, niezależnie od JA. Etylen, u *Arabidopsis* blokuje w odpowiedzi lokalnej ekspresję genów zależnych od JA. Ekspresja genów zależnych od JA, np. *JR1*, *JR2* i *VSP*, jest indukowana głównie w tkankach niezranionych (w odpowiedzi systemowej). Ekspresja genu *JR3* indukowana jest w szlaku zależnym od OGA (w odpowiedzi lokalnej) i zależnym od JA (w odpowiedzi systemowej). Ekspresja genów *PDF1.2* i *ERF1* indukowana jest jednocześnie przez JA i etylen. Natomiast ekspresja genu *RNS1* kodującego RNazę jest indukowana niezależnie od OGA i JA w miejscu zranienia, jak i w miejscach niezranionych, najprawdopodobniej w sposób zależny od OPDA. Geny aktywowane w różnych szlakach sygnałowych zranienia: *WR3* (nieznana funkcja), *CK* (kinaza choliny) i *PGIP1* (białko hamujące aktywność poligalakturonazy), *VSP* (białko zapasowe organów wegetatywnych), *JR1* i *JR2* (nieznana funkcja), *JR3* (aminohydrolaza), *PDF1.2* (defensyna) i *ERF1* (czynniki transkrypcyjny). Inne informacje znajdują się w tekście. Na podstawie prac [6,9,45].



Rycina 7. Kompleks ligazy ubikwitynowej E3 typu SCF^{COI1} i kompleks sygnałowy COP9 (CSN) działają wspólnie, regulując szlak sygnałowy JA. Substratami SCF^{COI1} i CSN są białka: deacetylaza histonu (RPDb3), syntaza lumazyny i mała podjednostka RUBISKO (nie pokazana na rysunku).

Obecnie znane są trzy białka, które są potencjalnymi substratami kompleksu ligazy E3 typu SCF^{COI1} (Ryc. 7). Dwa z nich – deacetylaza histonu (RPD3b) oraz mała podjednostka RUBISKO oddziałują w systemie dwuhybrydowym z COI1 [39]. Acetylacja i deacetylacja histonów jest ważnym mechanizmem regulatorowym transkrypcji genów u eukariotów [42]. Uważa się, że acetylacja histonów, katalizowana przez acetylotransferazę histonu, indukuje transkrypcję poprzez umożliwienie dostępu maszynie transkrypcyjnej do (określonego odcinka) chromatyny, natomiast deacetylacja (katalizowana przez deacetylazę histonu) hamuje transkrypcję. Degradacja RPD3b w sposób zależny od COI1, byłaby więc mechanizmem aktywującym transkrypcję zależną od JA. Poprzez poszukiwania supresorów mutantów *coi1* odkryto mutant *cos1* (ang. *coi1 suppressor1*), który przywraca mutantowi *coi1* pewne cechy fenotypu dzikiego, np. wrażliwość na JA i występowanie odpowiedzi obronnych w reakcji na zranienie. W mutantcie *cos1* odpowiedzialna za fenotyp jest mutacja w genie kodującym syntazę lumazyny, kluczowy enzym szlaku ryboflawin, który jest trzecim potencjalnym substratem kompleksu ligazy E3 typu SCF^{COI1} [43]. Obecnie nie wiadomo jaką rolę odgrywa szlak ryboflawin w szlaku sygnałowym zależnym od JA.

SZLAKI NIEZALEŻNE OD KWASU JASMONOWEGO

Badania szlaków sygnałowych w reakcji na zranienie na mutantach pomidora i rzodkiewnika wykazały, oprócz szlaków zależnych od JA, istnienie szlaków niezależnych od tego fitohormonu [3,10,44,45]. Identyfikacja coraz większej liczby genów indukowanych przez zranienie w sposób niezależny od JA, potwierdza istnienie długodystansowych szlaków zranienia, niezależnych od JA [3,10,44,45]. Szlaki te są uruchamiane bardzo szybko zarówno w miejscu zranienia, jak i w miejscach niezranionych. Przypuszcza się, że w tych szlakach pełni funkcję sygnał elektryczny bądź hydrauliczny, który powstaje w odpowiedzi na pewnego rodzaju

zranienia [10,46]. W szlakach niezależnych od JA, pełnią funkcję kinazy MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*). Aktywację jednej z nich, kinazy WIPK (ang. *wound-induced protein kinase*) i akumulację jej transkryptu obserwuje się kilka minut po zranieniu zarówno w odpowiedzi lokalnej, jak i systemowej [47]. Akumulacja mRNA WIPK jest niezależna od systeminy i JA [25], natomiast sama WIPK indukuje szlak biosyntezy JA [36]. Równie szybko aktywowana jest po zranieniu kinaza MBPK (ang. *myelin basic protein kinase*), należąca, podobnie jak WIPK, do rodziny kinaz MAPK. Wykazano, że w tak szybkiej aktywacji MBPK w odpowiedzi systemowej odgrywają rolę nieznane cząsteczki sygnałowe przenoszone w ksylemie [1].

Znaczenie fizjologiczne szlaku zranienia niezależnego od JA pozostaje wciąż słabo poznane. Wiele genów indukowanych w tym szlaku bierze udział w odpowiedzi lokalnej na zranienie, np. gen kodujący peroksydazę, która uczestniczy w naprawie uszkodzonych tkanek naczyniowych u tytoniu [48]. U *Arabidopsis*, w odpowiedzi lokalnej wywołanej przez OGA, indukowane są geny, których białka także odgrywają rolę w naprawianiu uszkodzonych miejsc oraz pełnią funkcję obronną przed inwazją patogenu. Ekspresja tych genów jest regulowana poprzez oddziaływania pomiędzy szlakiem zależnym i niezależnym od JA [6,10,45].

ROLA KWASU ABCYSYNOWEGO, ETYLENU I KWASU SALICYLOWEGO W SZLAKACH SYGNAŁOWYCH W REAKCJI NA ZRANIE

Oprócz JA, istotną rolę w szlakach przekazywania sygnału zranienia odgrywają ABA, etylen i kwas salicylowy (SA). W zranionych tkankach, oprócz wzrostu stężenia JA, ma miejsce szybki wzrost stężenia etylenu oraz wzrost poziomu transkryptu genów biosyntezy etylenu [45]. Wykazano wzajemne oddziaływanie JA i etylenu w szlakach przekazywania sygnałów i wywoływaniu odpowiedzi obronnych w reakcji na zranienie. Te oddziaływania mają charakter synergiczny lub antagonistyczny w zależności od rośliny, a także od innych czynników, np. od szkodnika. Wyniki wielu badań wykazały współdziałanie etylenu i JA w indukcji odpowiedzi obronnych w reakcji na zranienie u roślin psiankowatych, a także u kukurydzy i fasoli limerńskiej [45].

U *Arabidopsis* aktywowane są przynajmniej dwa oddzielne szlaki przekazywania sygnału zranienia, które wzajemnie oddziałują na siebie (ang. *cross-talk*). To wzajemne oddziaływanie determinuje odpowiedź lokalną i systemową. Rolę regulatora tych oddziaływań odgrywa etylen. W odpowiedzi lokalnej (w miejscu zranienia) etylen jest wytwarzany w szlaku zależnym od OGA i hamuje szlak zależny od JA. Natomiast w odpowiedzi systemowej etylen nie jest produkowany i szlak zależny od JA jest w pełni aktywny [45] (Ryc. 6). Z drugiej strony, etylen indukuje ekspresję genu biosyntezy JA – AOS u *Arabidopsis*, podobnie zresztą, jak i u pomidora [36]. Najprawdopodobniej etylen reguluje szlak zranienia zależny od JA na dwóch poziomach. Antagonistyczny efekt JA i etylenu na ekspresję genów obrony ma wpływ na odporność rośliny na roślinożercę. Np. odporność *Arabidopsis* na *Spodoptera littoralis* wzrasta u mutantu niewrażliwego na etylen i jest obniżona po traktowaniu roślin etefonem, związkiem uwalniającym etylen [45].

Składnikami integrującymi szlaki sygnałowe JA i etylenu są czynniki transkrypcyjne; np. transkrypt *ERF1* jest indukowany zarówno przez JA, jak i etylen lub poprzez działanie obydwóch hormonów [49]. *ERF1* indukuje ekspresję genów odpowiedzi na patogen, a hamuje ekspresję genów odpowiedzi na zranienie. Natomiast czynnik transkrypcyjny *AtMYC2* odwrotnie – hamuje ekspresję genów odpowiedzi na patogen, a indukuje ekspresję genów odpowiedzi na zranienie [50].

Rola ABA w szlakach sygnałowych w reakcji na zranienie jest jeszcze bardziej kontrowersyjna. Zaobserwowano wzrost stężenia ABA w pobliżu zranionych miejsc, ale nie jest wiadomo, który etap biosyntezy ABA jest aktywowany przez zranienie [6]. Uważa się, że u pomidora ABA nie pełni funkcji początkowej cząsteczki sygnałowej zranienia, aczkolwiek u mutantów pomidora i ziemniaka z zaburzoną funkcją ABA brak jest indukcji ekspresji genów PI w odpowiedzi na zranienie i systeminę [45]. Utrata funkcji ABA wydaje się zakłócać szlak sygnałowy zranienia poprzez blokowanie syntezy JA [6].

Kwas salicylowy jest inhibitorem odpowiedzi obronnych zależnych od JA. W zranionych roślinach dzikich SA nie jest syntetyzowany i nie pełni bezpośredniej roli w szlakach sygnałowych w reakcji na zranienie. SA akumulowany jest w odpowiedzi na infekcję patogenu i indukuje ekspresję genów kodujących białka PR (ang. *pathogenesis related proteins*). Wzajemne oddziaływania szlaków sygnałowych JA i SA regulują mechanizmy obronne przeciwko patogenom i roślinożercom, w których istotną rolę odgrywa białko NPR1. Białko to oddziałuje z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TGA i indukuje w sposób zależny od SA ekspresję genów kodujących białka PR, natomiast hamuje szlak sygnałowy JA [51]. Innym elementem wzajemnych oddziaływań pomiędzy JA a SA jest czynnik transkrypcyjny WRKY70, który podobnie jak NPR1 jest aktywatorem genów odpowiedzi na SA i jednocześnie represorem genów odpowiedzi na JA [44]. W regulacji oddziaływań pomiędzy JA a SA zaangażowana jest również kinaza MPK4 należąca do kinaz MAPK, która hamując biosyntezę SA, jednocześnie indukuje ekspresję genów odpowiedzi na JA [44].

RÓŻNICE W SZLAKACH ZRANIENIA POMIĘDZY ROŚLINAMI PSIANKOWATYMI A *ARABIDOPSIS THALIANA*

Pomimo wielu podobieństw w szlakach przekazywania sygnału zranienia istnieją ewidentne różnice pomiędzy roślinami psiankowatymi a *Arabidopsis thaliana*. U pomidora JA i etylen wzajemnie aktywują swoją syntezę, natomiast u *Arabidopsis* etylen indukuje syntezę JA, ale JA nie indukuje syntezy etylenu [36]. U *Arabidopsis* brak jest genu kodującego prosysteminę, a traktowanie roślin systeminą nie wywołuje ekspresji genów indukowanych przez zranienie. Natomiast fakt, że w tytoniu istnieją inne peptydy pełniące rolę w szlaku zranienia, sugeruje możliwość istnienia również u *Arabidopsis* funkcjonalnych homologów systeminy [8]. U pomidora, OGA oraz chitosan (oligosacharyd pochodzenia grzybowego) indukują syntezę JA i etylenu oraz ekspresję genów *Pin2* (inhibitory proteaz u pomidora)

[6]. U *Arabidopsis* chitosan indukuje syntezę etylenu, ale nie JA [6]. Nie wiadomo jaki wpływ mają OGA na syntezę JA u *Arabidopsis*. Istnieją sugestie, że OGA mogą regulować syntezę JA, gdyż indukują ekspresję genu *AOS*, kodującego enzym szlaku biosyntezy JA [52]. Jednakże, nieznaną są wzajemne oddziaływania OGA i JA w odpowiedzi lokalnej u *Arabidopsis*. OGA pełnią funkcję w szlakach zranienia związanych z odpowiedzią lokalną, natomiast JA jest cząsteczką sygnałową „długodystansową” i odgrywa rolę w odległych od zranienia miejscach, gdzie OGA nie występują. W szlakach sygnałowych w reakcji na zranienie pomiędzy roślinami psiankowatymi a *Arabidopsis thaliana* istnieją inne różnice. U *Arabidopsis* OPDA pełni funkcję cząsteczki sygnałowej, niezależnej od JA/COI1 [14], natomiast u pomidora OPDA nie pełni tej funkcji [14]. Zarówno mutanty pomidora, jak i *Arabidopsis*, niewrażliwe na JA lub niesyntetyzujące JA, wykazują wadliwe odpowiedzi obronne na zranienie. Jednakże, mutanty *Arabidopsis* są męskosterylne [37,53], podczas gdy mutanty pomidora – męskopłodne [10].

ROLA ODWRACALNEJ FOSFORYLACJI W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁU ZRANIENIA

U wszystkich organizmów eukariotycznych powszechnie występującym mechanizmem regulatorowym szlaków sygnałowych jest odwracalna fosforylacja białek. U tytoniu, kinazy MAPK: SIPK (ang. *SA-induced protein kinase*) i wspomniana wcześniej WIPK pełnią funkcję w szlakach przekazywania sygnału zranienia. U tytoniu z wyciszonym genem WIPK, zranienie hamuje biosyntezę JA i MeJA oraz powoduje wzrost poziomu SA i transkryptów białek PR1, natomiast u tytoniu dzikiego – zranienie powoduje akumulację JA i MeJA [54]. Równie szybko po zranieniu aktywowana jest u *Arabidopsis* MAPK, zwana *AtMPK4* [55]. U mutantu *mpk4* z wyciszonym genem *ATMPK4* nie obserwuje się wzrostu poziomu transkryptu genów *PDF1.2* i *THI2.1*, indukowanych przez JA. Sugeruje to, że *AtMPK4* funkcjonuje w szlaku zależnym od JA, który reguluje ekspresję genów *PDF1.2* i *THI2.1* [56]. Indukcja poziomu transkryptu kinazy MAPK u pomidora zachodzi pod wpływem awirulentnych szczepów bakterii *Xanthomonas campestris*, elicitora grzybowego i zranienia, natomiast JA i etylen nie wpływają na poziom transkryptu tej kinazy [57]. W 30 minucie po zranieniu wzrasta również poziom transkryptów genów dwóch kinaz MAPK u ryżu: *OsMSRMK2* [58] i *OsBWMPK1* [59]. Ponadto, w odpowiedzi na zranienie uczestniczą receptorowe kinazy białkowe, o czym świadczy podwyższony poziom mRNA kodującego receptory błonowe o aktywnościach kinaz serynowo-treoninowych. Przykładem jest transkrypt *PnLPK* (ang. *Populus nigra lecitin-like protein kinase*) u topoli [60] oraz transkrypt *PERK1* (ang. *proline extensin-like receptor kinase1*) [61]. W szlakach sygnałowych, wywoływanych przez stres biotyczny i abiotyczny, uczestniczą również kinazy zależne od wapnia, CDPK (ang. *calcium-dependent protein kinases*). CDPK są kinazami typowymi dla roślin (występują także u niektórych pierwotniaków). U *Arabidopsis* istnieją 34 izoformy CDPK [62]. CDPK uczestniczą w szlakach przekazywania sygnału zranienia i w odpowiedziach obronnych przeciwko roślinożercom [63]. Np. w zranionych liściach pomidora wzrasta poziom transkryptu kinazy *LeCDPK1* [64]. U tytoniu, transkrypt kinazy *NtCDPK1*, oprócz zranie-

nia jest indukowany przez MeJA, elicitor grzybowy, chitosan i NaCl [65]. U ziemniaka, JA hamuje aktywność CDPK i ekspresję transkrypty tej kinazy [66]. Natomiast w zranionych liściach kukurydzy aktywowana jest izoforma CDPK, nazwana ZmCPK11, a ekspresja genu *ZmCPK11* wzrasta zarówno w liściach zranionych, jak i niezranionych, co sugeruje rolę tej kinazy w odpowiedzi lokalnej i systemowej rośliny na ten stres [67].

Ponadto, u *Arabidopsis* odwracalna fosforylacja białek reguluje szlak sygnałowy w reakcji na zranienie zarówno zależny, jak i niezależny od JA. Kinaza białkowa wrażliwa na staurosporynę hamuje szlak zależny od JA, a indukuje szlak niezależny od JA, natomiast fosfataza białkowa odwrotnie – indukuje szlak zależny od JA, a hamuje szlak niezależny od JA [68]. Także u *Arabidopsis*, odwracalna fosforylacja wpływa na ekspresję genu desaturazy plastydowej kwasów tłuszczowych ω -3 (*FAD7*), przekształcającej kwas linolowy w kwas linolenowy, prekursor biosyntezy JA [54]. Procesy odwracalnej fosforylacji są również powszechnym mechanizmem regulującym czynniki transkrypcyjne w odpowiedzi na różne sygnały [69,70]. Przykładem indukcji ekspresji genów przez JA poprzez procesy fosforylacji jest indukcja ekspresji genu *STR*. Ekspresja genu *STR* jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny ORCA3, którego gen należy do genów wczesnej odpowiedzi na JA. W szlaku zależnym od JA czynnik transkrypcyjny ORCA3 z *Catharanthus roseus* najprawdopodobniej jest aktywowany przez fosforylację, po czym wiąże się do sekwencji regulatorowej *cis* JERE w promotorze genu *STR* i indukuje jego ekspresję [11].

PODSUMOWANIE

Pomimo znacznego postępu w poznaniu szlaków przekazywania sygnału zranienia, wciąż jest wiele niejasnych i niezrozumiałych mechanizmów przekazywania sygnałów. Jak dotychczas, nic nie wiadomo o najwcześniejszych wydarzeniach, które łączą zranienie z produkcją początkowych cząsteczek sygnałowych, takich jak systemina i OGA. Nieznane są również wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe mechanizmy transportu JA. Ostatnio wykazano, że białka LTP (ang. *lipid transfer proteins*) mogą być zaangażowane w transport JA, ponieważ JA wiąże się z białkami LTP i kompleks ten wpływa na wzrost odporności tytoniu na *Phytophthora parasitica* (71). Dalszych wyjaśnień wymaga również regulacja biosyntezy i metabolizmu JA w odpowiedzi na zranienie oraz jak inne cząsteczki sygnałowe takie, jak ROS, NO, fitohormony, elicitory pochodzące od roślinożercy, oddziałują ze szlakami sygnałowymi w reakcji na zranienia. Dalszych badań wymagają szlaki przekazywania sygnałów przez zranienie (zależne i niezależne od JA) oraz szlaki biosyntezy metabolitów wtórnych aktywowanych przez zranienie.

PIŚMIENNICTWO

1. Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O (2006) The wound response in tomato – role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* 163: 297-306
2. Cheong YH, Chang H-S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 661-677

3. Schilmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* 8: 369-377
4. Halitschke R, Baldwin IT (2005) Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *J Plant Growth Regul* 23: 238-245
5. Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-720
6. Leon J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52: 1-9
7. de Bruxelles GL, Roberts MR (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit Rev Plant Sci* 20: 487-521
8. Pearce G, Ryan CA (2003) Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J Biol Chem* 278: 30044-30050
9. Schaller F, Schaller A, Stintzi A (2005) Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul* 23: 179-199
10. Howe GA (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* 23: 223-237
11. Pauw B, Memelink J (2005) Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regul* 23: 200-210
12. Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR, Graham IA (2005) Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* 137: 835-840
13. Staswick PE, Tiryaki I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2117-2127
14. Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Aina T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 1268-1283
15. Li C, Schilmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA (2005) Role of β -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in Tomato. *Plant Cell* 17: 971-986
16. Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 938-946
17. Oronzo-Cárdenas M L, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* 130: 487-493
18. Tumlinson JH, Lait CG (2005) Biosynthesis of fatty acid amide elicitors of plant volatiles by insect herbivores. *Arch Insect Biochem Physiol* 58: 54-68
19. Turlings TCJ, Lengwiler UB, Bernasconi ML, Wechsler D (1998) Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* 207: 146-152
20. Korth KL (2003) Profiling the response of plants to herbivorous insects. *Genome Biol* 4: 221
21. Truitt CL, Wei H-X, Paré PW (2004) A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell* 16: 523-532
22. Musser RO, Cipollini DF, Hum-Musser SM, Williams SA, Brown JK, Felton GW (2005) Evidence that the caterpillar salivary enzyme glucose oxidase provides herbivore offense in solanaceous plants. *Arch Insect Biochem Physiol* 58: 128-137
23. Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA (2004) The *Tomato* homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126-143
24. Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* 36: 485-499


25. Lee GI, Howe GA (2003) The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J* 33: 567-576
26. Li L, Li C, Lee GI, Howe GA (2002) Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6416-6421
27. Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 895-911
28. Jacinto T, McGurl B, Franceschi V, Delano-Freier J, Ryan CA (1997) Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta* 203: 406-412
29. Narvaez-Vasquez J, Ryan CA (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* 218: 360-369
30. Scheer JM, Ryan CA (1999) A 160-kD systemin receptor on the surface of lycopersicon peruvianum suspension-cultured cells. *Plant Cell* 11: 1525-1536
31. Laudert D, Schaller F, Weiler EW (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* 211: 163-165
32. Ellis C, Turner JG (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 13: 1025-1033
33. Meindl T, Boller T, Felix G (1998) The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 10: 1561-1570
34. Narvaez-Vasquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA (1999) Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11: 2249-2260
35. Ryu SB (2004) Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends Plant Sci* 9: 229-235
36. Arimura G, Kost Ch, Boland W (2005) Herbivore-induced plant defences. *Biochem Biophys Acta* 1734: 91-111
37. Xie D, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094
38. Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002) *COI1* links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 457-66
39. Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1919-1935
40. Kowalczyk S, Hadowska E, Piekarska A (2005) Roślinne układy ubiquitynacji i degradacji białek w proteosomach – kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Postepy Biochem* 51: 171-186
41. Feng S, Ma L, Wang X, Xie D, Dinesh-Kumar SP, Wie N, Deng XW (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{COI1} and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* 15: 1083-1084
42. Lusser A, Kolle D, Loidl P (2001) Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant Sci* 6: 59-65
43. Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W, Xie D (2004) *COS1*: an *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* 16: 1132-1142
44. Pozo MJ, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2005) Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *J Plant Growth Regul* 23: 211-222
45. Rojo E, Solano R, Sánchez-Serrano JJ (2003) Interactions between signaling compounds involved in plant defence. *J Plant Growth Regul* 22: 82-98
46. Herde O, Pena Cortes H, Wasternack L, Fisahn J (1999) Electric signaling and *pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* 119: 213-218
47. Seo S, Sano H, Ohashi Y (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11: 289-298
48. Sasaki K, Hiraga S, Ito H, Seo S, Matsui H, Ohashi Y (2002) A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant Cell Physiol* 43: 108-117
49. Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178
50. Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1938-1950
51. Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770
52. Norman C, Vidal S, Palva ET (1999) Oligogalacturonide-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell-wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 640-644
53. Li L, Li CY, Howe GA (2001) Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiol* 127: 1414-1417
54. Kodama H, Nishiuchi T, Seo S, Ohashi Y, Iba K (2000) Possible involvement of protein phosphorylation in the wound-responsive expression of *Arabidopsis* plastid omega-3 fatty acid desaturase gene. *Plant Sci* 155: 153-160
55. Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases *ATMPK4* and *ATMPK6*. *Plant J* 24: 655-665
56. Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klesig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-1112
57. Mayrose M, Bonshtien A, Sessa G (2004) LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *J Biol Chem* 279: 14819-14827
58. Agrawal GK, Rakwal R, Iwahashi H (2002) Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1009-1016
59. He C, Fong SH, Yang D, Wang GL (1999) *BWMK1*, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 1064-1073
60. Nishiguchi M, Yoshida K, Sumizono T, Tazaki K (2002) A receptor-like protein kinase with a lectin-like domain from lombardy poplar: gene expression in response to wounding and characterization of phosphorylation activity. *Mol Genet Genomics* 267: 506-514
61. Silva NF, Goring DR (2002) The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Mol Biol* 50: 667-85
62. Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol* 129: 469-485
63. Jaworski K, Szmidt-Jaworska A, Kopcewicz J (2005) Plant protein kinases stimulated by calcium. *Postepy Biochem* 51: 188-197
64. Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol* 128: 256-270
65. Yoon GM, Cho HS, Ha HJ, Liu JR, Lee HS (1999) Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol Biol* 39: 991-1001

66. Ulloa RM, Raices M, MacIntosh GC, Maldonado S, Tellez-Inon MT (2002) Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant* 115: 417-427
67. Szczegieliński J, Klimecka M, Liwosz A, Ciesielski A, Kaczanowski S, Dobrowolska G, Harmon AC, Muszyńska G (2005) A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 139: 1970-1983
68. Rojo E, Titarenko E, Leon J, Berger S, Vancanneyt G, Sánchez-Serrano JJ (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 13: 153-165
69. Menke FL, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 119: 1289-9126
70. Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L (2002) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27: 619-627
71. Buhot N, Gomés E, Milat M-L, Ponchet M, Marion D, Lequeu J, Delrot S, Coutos-Thévenot P, Blein J-P (2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell* 15: 5047-5052

Wound signal transduction pathways in plants

Jadwiga Szczegieliński 

Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 5a Pawińskiego St., 02-106 Warszawa, Poland

 e-mail: jaga@ibb.waw.pl

Key words: wounding, wound-response mutants, local and systemic response, jasmonic acid, systemin, herbivory

ABSTRACT

A significant advancement in our knowledge and understanding of wound-signaling pathways in plants has been made recently. Essential role in the explanation of these processes came from the genetic screens and analysis of mutants which are defective in either jasmonic acid (JA) biosynthesis, JA perception or systemin function. Plants equally react to wound in the tissues directly damaged (local response) as well as in the non-wounded areas (systemic response). Jasmonides and in particular the most studied JA, produced by the octadecanoid pathway, are responsible for the systemic response. Jasmonides functioning as long-distance signal particles transmit the information about wound to distant, non-wounded tissues where defense response is invoked. Peptid – systemin, identified in some *Solanaceous* species, acts locally to the wounded area to elicit the production of JA. Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways have been identified and partially characterized. JA-dependent wound signaling pathways are responsible for the activation of systemic responses, whereas JA-independent wound signaling pathways, activated close to wound side, have a role in reparation of damaged tissue and in defense against pathogens.

STRESZCZENIE

Prowadzone w ostatnich latach analizy genomów roślinnych wykazały obecność licznych genów kodujących kinazy receptorowe, tzw. RLK. Są to białka transbłonowe, strukturalnie podobne do występujących u zwierząt kinaz tyrozynowych i serynowo/treoninowych, o zróżnicowanej budowie domeny zewnątrzkomórkowej. Różnice w części zewnątrzkomórkowej, wiążącej różne cząsteczki sygnałowe, są podstawą klasyfikacji RLK roślin na ponad 20 klas. Ogromna większość RLK nie została jeszcze scharakteryzowana, jednak dzięki bliższemu poznaniu kilku białek receptorowych wiadomo, że funkcjonują one w różnorodnych procesach biologicznych obejmujących wzrost i rozwój roślin, samoniezgodność, wiązanie hormonów i oddziaływanie roślin z mikroorganizmami. Mimo że wiedza na temat funkcji kinaz receptorowych roślin szybko poszerza się, to nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Głównymi wyzwaniem w dalszych badaniach są: identyfikacja ligandów aktywujących RLK oraz charakterystyka elementów szlaków sygnałowych działających poniżej receptora.

WPROWADZENIE

Komórki organizmów żywych mają zdolność odbioru i odpowiedzi na sygnały pochodzące ze środowiska oraz od innych komórek. Odbiór sygnału umożliwiają białka receptorowe, które, wiążąc określony ligand, uruchamiają kaskadę zdarzeń, prowadzącą do wywołania swoistej odpowiedzi komórkowej. U zwierząt największą rodzinę receptorów zlokalizowanych w błonie komórkowej stanowią receptory o siedmiu helisach transbłonowych (receptory 7TM), współdziałające z białkami G, tzw. GPCR (ang. *G-protein-coupled receptor*). Genom człowieka zawiera co najmniej 800 genów kodujących GPCR, a ponadto 17 genów G_{α} , 5 genów G_{β} i co najmniej 12 genów G_{γ} heterotrimerycznych białek G [1]. Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera tylko jeden gen *GCR1*, kodujący białko w 20% identyczne z GPCR *Dictyostelium discoideum*, które wydaje się, że bierze udział w sygnalizacji kwasu abscysynowego [2]. Również liczba genów kodujących poszczególne podjednostki białek G u roślin jest niewielka, bowiem genomy *A. thaliana* i ryżu mają po jednym genie G_{α} , jednym genie G_{β} i po dwa geny G_{γ} [1]. Mimo że w piśmiennictwie naukowym można znaleźć szereg danych pośrednio sugerujących funkcjonowanie w roślinach białek GPCR i heterotrimerycznych białek G [3], to jednak bez wątplenia w odbiorze większości sygnałów uczestniczą specyficzne białka błonowe, które wypełniają swoje funkcje receptorowe poprzez aktywację domeny wewnątrzkomórkowej, wykazującej aktywność kinazy białkowej. Z tego względu określa się je mianem receptorowych kinaz białkowych.

Kinazy receptorowe stanowią liczną rodzinę białek transbłonowych rozpoznających różnorodne sygnały zewnątrzkomórkowe. Posiadają one charakterystyczną strukturę, która obejmuje N-kończącą domenę zewnątrzkomórkową, C-kończącą cytoplazmatyczną domenę kinazową oraz pojedynczy hydrofobowy fragment transbłonowy, łączący obie domeny [4]. Rozpoznanie i związanie ligandu przez domenę zewnątrzkomórkową prowadzi do autofosforylacji domeny kinazowej, fosforylacji białka substratowego i przekazania sygnału do wnętrza komórki. Większość receptorowych kinaz białkowych zwierząt to kinazy tyrozynowe, tzw. RTK (ang. *receptor tyrosine kinases*) wykazujące zdolność do autofosforylacji reszt tyrozynowych, choć znane są także przykłady receptorów zawierających motywy charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych [4]. Kinazy receptorowe roślin obejmują dwie odmienne grupy białek. Do pierwszej grupy należą receptory etylenu i cytokinin homologiczne z kinazami histydynowymi bakterii i drożdży, funkcjonującymi w tzw. dwuskładnikowych układach przekazywania sygnału [5]. Drugą grupę kinaz receptorowych stanowią białka posiadające cechy strukturalne podobne do receptorowych kinaz tyrozynowych zwierząt, ale różniące się od nich specyficznością domeny katalitycznej, która wykazuje aktywność kinazy serynowo/treoninowej [6]. Jak dotąd, nie zidentyfikowano u roślin typowej receptorowej kinazy tyrozynowej,

Anna Jakubowska[✉]

Maciej Ostrowski

Stanisław Kowalczyk

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

[✉]Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, tel. 056 611 45 42, e-mail: anjakubo@uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 11 października 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 6 grudnia 2006 r.

Słowa kluczowe: kinazy receptorowe roślin, przekazywanie sygnału

Wykaz skrótów: EGF (ang. *epidermal growth factor*) – epidermalny czynnik wzrostu, LRR (ang. *leucine rich-repeat*) powtórzenie bogate w leucynę, RLK (ang. *receptor-like kinase*) – kinaza podobna do receptora, RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*) – receptorowa kinaza tyrozynowa, TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworu

a jedynie w kilku przypadkach stwierdzono podwójną specyficzność kinazową, polegającą na zdolności fosforylacji reszt seryny/treoniny i tyrozyny [7]. U roślin brakuje także małych białek G z rodziny Ras, które u zwierząt współdziałają z kinazami tyrozynowymi. Na obecnym etapie badań, za kinazy receptorowe można definitywnie uznać tylko nieliczne białka, ponieważ dla większości z nich nie są poznane ligandy. Ze względu na to, że sklasyfikowano je jako receptory na podstawie strukturalnych podobieństw do RTK zwierząt, zostały one określone wspólnym mianem „receptor-like kinases” (RLK).

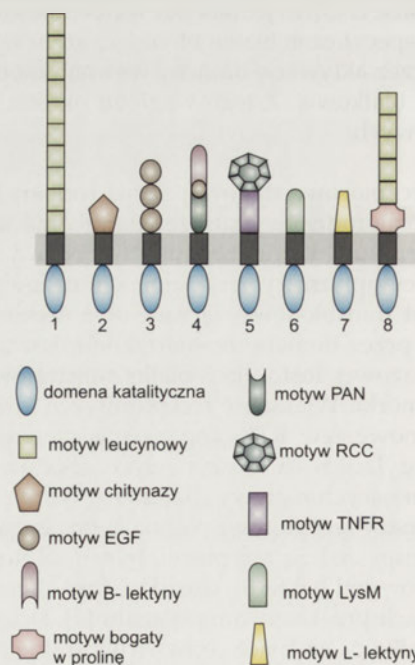
Spośród licznej rodziny RLK roślin poznano funkcje zaledwie kilkunastu białek receptorowych, a ligandy są zidentyfikowane jedynie dla kilku z nich. Jednak nawet tak skromne rezultaty wskazują na udział tych receptorów w różnorodnych procesach sygnałowych, które ogólnie można podzielić na dwie kategorie: kontrola wzrostu i rozwoju oraz oddziaływanie z patogenami i symbiontami. Przykładami kinaz receptorowych z pierwszej kategorii są: BRI1 – funkcjonująca w percepcji brasinosteroidów, CLV1 – kontrolująca rozwój merystemu wierzchołkowego, kinazy SERK – funkcjonujące w embriogenezie czy SRK – uczestnicząca w mechanizmie samoniezgodności sporofitowej. Do drugiej kategorii należą np.: FLS2 – wiążąca flagellinę, Xa21 i SR160 – indukujące reakcje obronne przeciw patogenom oraz SYMRK i NORK, które biorą udział w symbiotycznych oddziaływaniach bakterii i roślin [4,6,8,9].

KLASYFIKACJA KINAZ RECEPTOROWYCH ROŚLIN NA PODSTAWIE BUDOWY DOMENY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

Od czasu, kiedy Walker i Zhang [10] zidentyfikowali w tkankach kukurydzy pierwszą roślinną RLK, sklonowano geny receptorowych kinaz serynowo/treoninowych u ponad 20 gatunków roślin [6]. Na podstawie analizy genomów *A. thaliana* oraz ryżu (*Oryza sativa*) geny kodujące RLK zalicza się do monofiletycznej rodziny RLK/Pelle, która jest jedną z największych rodzin, liczącą u *A. thaliana* co najmniej 610, a u ryżu ponad 1100 członków [11]. Kryterium przynależności do rodziny RLK/Pelle jest obecność w cytoplazmatycznej domenie kinazowej, zachowanej w ewolucji, struktury motywu homologicznego z kinazą Pelle *Drosophila melanogaster* o specyficzności serynowo/treoninowej. Rodzina RLK/Pelle, sklasyfikowana u *A. thaliana* na 44 podrodziny na podstawie filogenezy domen kinazowych i struktury domen zewnątrzkomórkowych, obejmuje poza błonowymi kinazami receptorowymi także, mniej liczne, cytoplazmatyczne kinazy podobne do receptorów [6]. Uderzająca jest ogromna przewaga liczba RLK roślin w porównaniu z receptorowymi kinazami białkowymi zidentyfikowanymi u zwierząt i ludzi [11,12]. Genom *A. thaliana* zawiera 417 genów kodujących RLK, natomiast *Caenorhabditis elegans* ma 43, *Drosophila melanogaster* 25, a genom człowieka 70 genów [8]. Ta zaskakująca ekspansja kinaz receptorowych roślin może odzwierciedlać fakt, że rośliny, poza sygnałami wewnątrzkomórkowymi, muszą odbierać różnorodne bodźce środowiskowe wpływające na wzrost i rozwój rośliny. Niewykluczone, że jest to także rodzaj kompensacji braku receptorów 7TM współdziałających z białkami G.

W przeciwieństwie do cytoplazmatycznych domen kinazowych, które są w wysokim stopniu homologiczne, domeny zewnątrzkomórkowe RLK wykazują duże zróżnicowanie. W obrębie tych domen występują charakterystyczne motywy białkowe, które są podstawą podziału receptorowych kinaz serynowo/treoninowych roślin na ponad 20 klas [6,8,9]. Motywy te są odpowiedzialne za oddziaływania z różnorodnymi cząsteczkami sygnałowymi: peptydami, białkami, glikoproteinami i cukrowcami będącymi składnikami ścian komórkowych roślin i mikroorganizmów. Zupełnie wyjątkowe miejsce w tej klasyfikacji zajmuje motyw wiążący steroidy roślinne. Niektóre motywy, np. LRR (ang. *leucine-rich repeat*), EGF (ang. *epidermal growth factor*), TNFR (ang. *tumor necrosis factor receptor*), LysM (ang. *lysin motif*) czy PAN (ang. *plasminogen/apple/nematode protein domain*) są spotykane w białkach mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Z kolei motyw lektyny L lub DUF26 (ang. *domain of unknown function 26*) występuje tylko w białkach roślin [9]. Ogromna różnorodność kinaz receptorowych w części wiążącej ligand (Ryc. 1) umożliwia komórkom odbiór wielu sygnałów pochodzących zarówno ze środowiska, jak i od innych komórek, co znajduje swoje odbicie w zróżnicowaniu funkcjonalnym RLK.

Największą i najlepiej poznaną klasą RLK są białka zawierające w domenie receptorowej motyw bogaty w leucynę (LRR), które u *A. thaliana* stanowią ponad połowę receptorowych kinaz serynowo/treoninowych [13,14]. Motyw LRR, odpowiedzialny za oddziaływania typu białko-białko, jest spotykany w wielu białkach pełniących różnorodne funkcje, od białek bakterii po białka człowieka, jednak żadne z poznanych białek zwierząt z motywem LRR nie jest receptorową kinazą białkową [6]. Specyficzny dla kinaz receptorowych roślin motyw LRR składa się z 23–25 reszt aminokwasowych zawierających zachowane w ewolucji reszty



Rycina 1. Wybrane przykłady RLK roślin – struktura domen zewnątrzkomórkowych. 1 – BRI1, CLV1, ER, FLS2, Xa21, NORK/SYMRK; 2 – CHRK1; 3 – WAK1; 4 – SRK; 5 – CR4; 6 – NFR1/LYK3, NFR5/SYM10; 7 – LecRK1; 8 – PERK.

leucyny [14]. Liczba tandemowo ułożonych powtórzeń LRR jest zmienna (np. u *A. thaliana* 1–32), a w niektórych białkach występują między nimi sekwencje dodatkowe tworzące tzw. „wstawki”, które mogą mieć kluczowe znaczenie dla wiązania ligandów. Na podstawie różnic w domenie zewnątrzkomórkowej kinazy LRR dzieli się na 13 oddzielnych podrodzin (LRR I–XIII) [6]. Fenotypy mutantów pokazują, że kinazy receptorowe z motywem LRR funkcjonują w różnych procesach biologicznych związanych ze wzrostem i rozwojem roślin oraz w reakcjach obronnych. Stosunkowo dobrze poznanymi przykładami takich receptorów są, wspomniane już, CLV1, kompleks BRI1/BAK1, Xa21 czy FLS2. Ostatnie badania genetyczne i biochemiczne pozwoliły w kilku przypadkach na identyfikację ligandów oraz poznanie mechanizmów rozpoznania ligandu i aktywacji receptorów, jak również identyfikacji dalszych elementów szlaków sygnałowych [13,14].

Drugą pod względem liczebności klasę RLK stanowią kinazy receptorowe zawierające w domenie zewnątrzkomórkowej motyw lektynowy [6]. Zidentyfikowano 3 typy motywów lektynowych charakterystycznych dla kinaz receptorowych z tej grupy. Pierwszy reprezentują L-lektyny typowe dla roślin z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*), które mogą wiązać fukozę, galaktozo-N-acetylo-galaktozaminę oraz chitobiozę i inne cukry złożone. Pokrewieństwo z lektynami roślin motylkowatych sugeruje, że receptory z tej klasy mogą wiązać elicitory oligosacharydowe pochodzące z uszkodzonych podczas infekcji ścian komórkowych zarówno gospodarza, jak i patogenu. Drugi typ to motyw B-lektynowy, nazywany też aglutyninowym, o strukturze podobnej do przeciwciał powodujących aglutynację, specyficznie wiążący α -D-mannozę. Występuje on w około 40 kinazach receptorowych zawierających tzw. domenę S, między innymi w kinazie SRK uczestniczącej w mechanizmie samoniezgodności oraz w pierwszej wyizolowanej z roślin kinazie receptorowej, ZmPK1 z kukurydzy [9]. Znane są także kinazy receptorowe zawierające w domenie zewnątrzkomórkowej motyw lektynowy typu C. Motyw ten zidentyfikowano w białkach pośredniczących we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u ssaków, jednak żadne z tych białek nie jest kinazą receptorową [6]. C-lektyny rozpoznają i wiążą reszty cukrowe występujące na powierzchni obcych komórek. Sugeruje to udział RLKs z tym motywem w rozpoznaniu patogenów i aktywowaniu reakcji obronnych rośliny.

Oprócz motywu lektynowego, w niektórych RLK występują inne motywy wiążące składniki cukrowe pochodzące ze ścian komórkowych bakterii i grzybów, np. motyw LysM zidentyfikowany w kinazach NFR1/LYK3 i NFR5/SYM10 funkcjonujących w symbiozie, spotykany w niektórych eukariotycznych chitynazach i wielu białkach bakteryjnych wiążących peptydoglikany lub chitynę. Znany jest też motyw podobny do chitynazy w receptorowej kinazie CHRK1 czy domena taumatynowa wykazująca *in vitro* aktywność chitynazową, pośrednicząca w oddziaływaniach roślin z grzybami [6].

Mniej liczną klasę, około 40 przedstawicieli u *A. thaliana*, stanowią kinazy receptorowe zawierające domenę S homologiczną z białkiem SLG (ang. *S-locus glycoprotein*) [9]. Do tej grupy należą między innymi: kinaza SRK *Brassica oleracea*,

cea, uczestnicząca w samoniezgodności sporofitowej oraz pierwsza poznana kinaza RLK, wspomniana wcześniej, ZmPK1 z kukurydzy. Domena S jest bogata w reszty cysteiny i dodatkowo zawiera powtórzenia EGF, motyw aglutyninowy zdolny do wiązania α -mannozy oraz motyw PAN, który pośredniczy w oddziaływaniach typu białko-białko i białko-węglowodany [9].

Kolejną klasę kinaz receptorowych roślin stanowią białka, które w domenie zewnątrzkomórkowej mają powtórzenia EGF [6]. Jest to, jak dotąd, jedyny motyw wspólny dla kinaz receptorowych roślin i zwierząt. Motyw ten występuje w kinazach WAK (ang. *wall associated kinase*), które wykazują zdolność do wiązania składników ścian komórkowych roślin [9]. Kinazy WAK posiadają ponadto w domenie wewnętrznej inny charakterystyczny fragment, mianowicie, bogatą w prolinę, sekwencję podobną do ekstensyn, strukturalnego składnika ścian komórkowych [6].

Interesującą grupą RLK roślin jest mała rodzina kinaz podobnych do zidentyfikowanej u kukurydzy CRINKLY4, która uczestniczy w różnicowaniu komórek epidermalnych liścia [9]. Receptory z tej grupy posiadają w domenie zewnątrzkomórkowej dwa charakterystyczne motywy. Jeden to bogaty w cysteinę obszar pokrewny z występującym u ssaków motywem TNFR wiążącym ligand [6], drugi jest podobny do motywu RCC1 (ang. *regulator of chromosome condensation 1*) obecnego w GTPazie aktywującej wiele białek eukariontów [15]. Tworzy ją siedmiokrotnie powtórzona 39-aminokwasowa sekwencja o charakterystycznej strukturze śmigła, przypuszczalnie uczestnicząca w oddziaływaniach typu białko-białko.

Wśród licznej rodziny receptorowych kinaz serynowo/treoninowych znajdują się też białka z innymi, prawdopodobnie specyficznymi tylko dla roślin motywami, ale o nieznanym jeszcze funkcjach, np. u *A. thaliana* zidentyfikowano co najmniej 42 RLK z bogatą w powtórzenia cysteinowe domeną DUF26 [8] oraz, liczącą 15 członków, rodzinę kinaz PERK zawierających motyw bogaty w reszty proliny [9].

FUNKCJE POZNANYCH KINAZ RECEPTOROWYCH ROŚLIN

KINAZY RECEPTOROWE Z POWTÓRZENIAMI BOGATYMI W RESZTY LEUCYNY (LRR)

Kompleks BRI1/BAK1 – receptor brasinosteroidów

Zidentyfikowana przed dziesięcioma laty kinaza BRI1 jest obecnie jedną z najlepiej poznanych receptorowych kinaz białkowych roślin. Kinaza BRI1 razem z inną kinazą BAK1 tworzy kompleks receptorowy wiążący brasinosteroidy (Br), naturalne substancje roślinne przypominające budową chemiczną hormony steroidowe zwierząt. Osiągnięcia w poznawaniu obu kinaz białkowych oraz identyfikowaniu niektórych ogniw łańcucha przekazywania sygnału podsumowano ostatnio w kilku pracach przeglądowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu ogólnosięciowym [16-18].

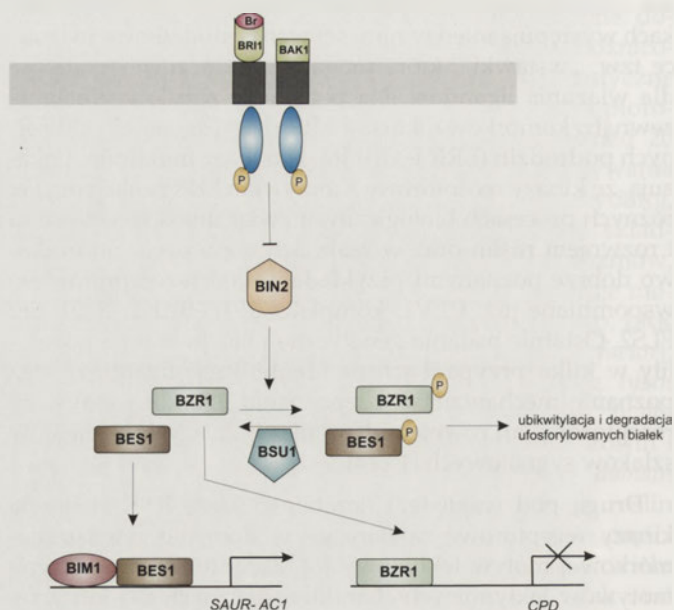
Gen *BRI1* (ang. *brassinosteroid insensitive 1*) zidentyfikowano analizując mutant *A. thaliana* niewrażliwego na 24-

epibrasinolid [16,19]. Koduje on kinazę receptorową, która w domenie zewnątrzkomórkowej ma 24 powtórzenia bogate w leucynę z 70-aminokwasową „wstawką”, wiążącą fitohormony, położoną między 21 a 22 powtórzeniem [20]. W domenie wewnątrzkomórkowej BRI1 ma krótki fragment przybłonowy, 12 subdomen charakterystycznych dla kinaz serynowo/treoninowych oraz krótkie przedłużenie C-końcowe [16]. Homologami genu *BRI1* w *A. thaliana* są trzy inne geny *BRL1-3* (ang. *BRI1-like receptor kinase*), spośród których *BRL1* i *BRL3* kodują kinazy białkowe z 23 powtórzeniami LRR oraz 65-aminokwasową „wstawką” wiążącą Br [21]. Ortologi *BRI1* zidentyfikowano w genomie grochu, ryżu i jęczmienia [18]. W pomidorze gen *tBRI1* koduje kinazę białkową identyczną z poznanym wcześniej białkiem SR160 funkcjonującym jako receptor systeminy, peptydu sygnałowego informującego organizm o zranieniach [22]. Tak więc w pomidorze białko *tBRI1*/SR160 jest kinazą białkową o podwójnej funkcji receptorowej [23].

Koreceptorem BRI1 jest kinaza BAK1 (ang. *BRI1-associated receptor kinase 1*) z pięcioma powtórzeniami LRR [24]. BAK1 oddziałuje z BRI1 *in vivo* oraz *in vitro*, bierze udział we wzajemnej transfosforylacji, a jak pokazały ostatnie badania, odgrywa także ważną rolę w pęcherzykowym transporcie kompleksu receptorowego do endosomów [25]. Wyniki najnowszych badań potwierdziły fosforylację kilku reszt serynowych i treoninowych w regionie przybłonowym BRI1, w tzw. pętli aktywacyjnej, a także w przedłużeniu C-końcowym [26,27]. Fosforylacja reszty treoniny w regionie przybłonowym hamuje aktywność katalityczną, fosforylacja reszt aminokwasowych w pętli aktywacyjnej warunkuje aktywność BRI1, natomiast fosforylacja w przedłużeniu C-końcowym przypuszczalnie znosi autohamowanie aktywności kinazowej [26,27]. Wiązaniu Br towarzyszy fosforylacja czterech reszt seryny i treoniny w BAK1 [26].

Potencjalnymi białkami substratowymi fosforylowanymi przez kompleks receptorowy są TRIP1 i TTL. Białko TRIP1 (ang. *TGFβ Receptor Interacting Protein 1*) jest homologiem białka ssaków oddziałującego z receptorem TGF-β, natomiast TTL (ang. *transthyretin-like protein*) jest podobne do białka uczestniczącego w transporcie hormonów tarczycy [16]. Udział obu tych białek w szlaku przekazywania sygnału Br nie został jeszcze ostatecznie potwierdzony. Elementem szlaku sygnałowego nie budzącym wątpliwości jest cytoplazmatyczna kinaza białkowa BIN2 (ang. *brassinosteroid-insensitive 2*) (Ryc. 2) podobna do kinaz GSK3 ssaków lub kinazy SHAGGY z *D. melanogaster* [28]. Nie sprawdziły się przypuszczenia zakładające, że BIN2 fizycznie oddziałuje z kompleksem BRI1/BAK1 jako białko substratowe receptora, natomiast szereg faktów sugeruje, że jej aktywność może być regulowana przez kinazę kazeinową CK2 [16]. Substratami dla BIN2 są czynniki transkrypcyjne BZR1 (ang. *brassinazole-resistant 1*) i BES1 (ang. *bri1-EMS-suppressor 1*), a przypuszczalnie także białka BEH1-4 (ang. *BES1/BZR1 homolog 1-4*) [17]. Ufosforylowane białka BZR1/BES1 mogą być defosforylowane przez, zlokalizowaną w jądrze, fosfatazę białkową BSU1 (ang. *bri1 SUPPRESOR 1*) [29].

Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że w warunkach braku Br aktywna kinaza BIN2 fosforyluje BZR1 i BES1, kierując je w ten sposób do ubiquitylacji i proteolitycznej

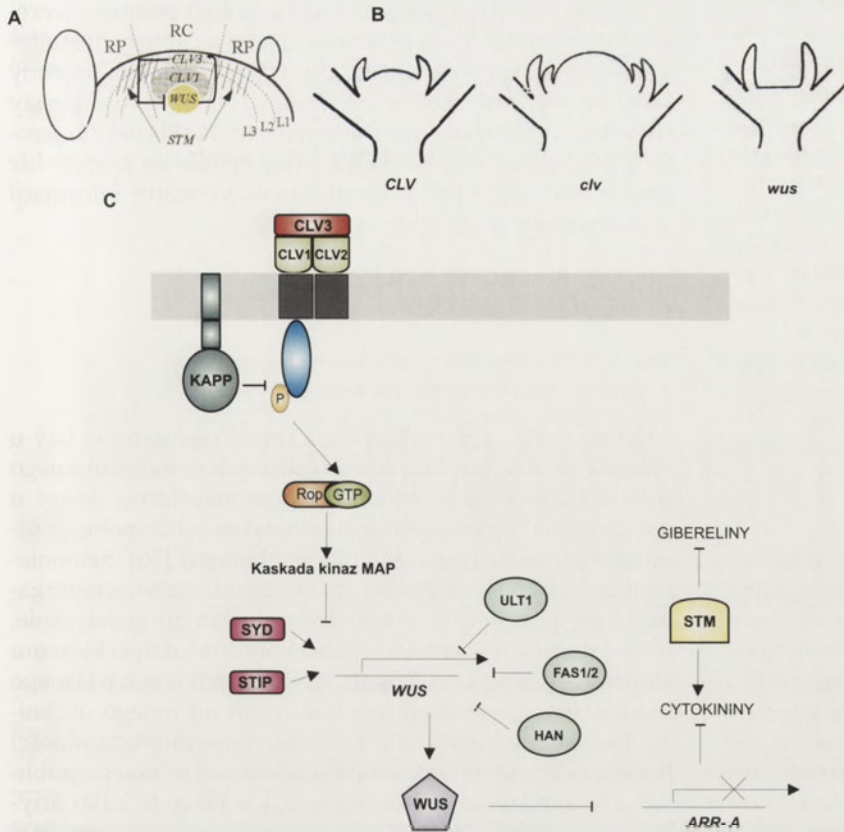


Rycina 2. Kompleks BRI1/BAK1 i funkcjonowanie szlaku sygnałowego Br (szczegółowo w tekście).

degradacji w proteasomach (Ryc. 2) [30]. Aktywacja kompleksu BRI1/BAK1 w wyniku związania Br uruchamia mechanizm, który hamuje kinazę białkową BIN2 lub/ oraz aktywuje fosfatazę BSU1. Związanie Br przez kompleks receptorowy prowadzi więc do wzrostu poziomu nieufosforylowanych, niepodatnych na ubiquitylację białek BZR1/BES1, które przechodząc do jądra regulują ekspresję genów. Białko BES1 oddziałuje z białkiem BIM1 (ang. *BES1-interacting Myc-like*) zawierającym motyw bHLH i wiąże się do specyficznej sekwencji promotorowej genów regulowanych przez Br w tym m. in. genu *SAUR-AC1* (ang. *small auxin up RNA*), którego funkcja wiązana jest ze wzrostem wydłużeniowym [31]. BZR1 jest białkiem represorowym genu *CPD* (ang. *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM*) kodującego jeden z enzymów szlaku biosyntezy brasinosteroidów [32].

Kinaza CLAVATA1 – element mechanizmu regulującego funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego pędu

Kinazę CLAVATA1 (CLV1) poznano u jednego z mutantów *A. thaliana* z charakterystycznym wybujałym rozrostem centralnej części merystemu wierzchołkowego (Ryc. 3B) [22]. Gen *CLV1* koduje polipeptyd, zawierający w części N-końcowej 21 fragmentów LRR z 15 motywami N-X-S/T, które są potencjalnymi miejscami glikozylacji. Ekspresja *CLV1* zachodzi wyłącznie w merystemie wierzchołkowym i w zasadzie ogranicza się tylko do warstwy L3 regionu centralnego (RC) (Ryc. 3A). W tym samym miejscu zidentyfikowano transkrypty genu *CLV2* kodującego białko typu RLP (ang. *receptor-like protein*) z domeną zewnątrzkomórkową, utworzoną przez 21 motywów LRR, krótką sekwencją transbłonową i tylko 27-aminokwasowym fragmentem cytoplazmatycznym [22]. Wyniki nielicznych badań sugerują, że CLV2 współtworzy heterodimeryczny receptor CLV1/CLV2, współuczestnicząc w ten sposób w rozpoznaniu li-



Rycina 3. Szlak sygnałowy CLAVATA. A - ekspresja genów *CLV* i *WUS* w merystemie wierzchołkowym pędu; B - fenotypy mutantów *clv* i *wus*; C - funkcjonowanie szlaku CLAVATA i pętla regulacyjna *CLV*/*WUS* (opracowano na podstawie [22, 37]; szczegóły w tekście).

gandu. Inne doniesienia sugerują, że *CLV2* odgrywa pewną rolę w ochranianiu lub stabilizowaniu kinazy *CLV1*.

Ligandem dla kinazy *CLV1* jest produkt genu *CLV3*, którego transkrypty mRNA identyfikowane są tylko w apikalnych komórkach warstw L1 i L2 regionu centralnego (Ryc. 3A). *CLV3* jest złożonym z 96 reszt aminokwasowych białkiem wydzielniczym, zawierającym na N-końcu odpowiednią sekwencję sygnałową [33]. Wiązanie *CLV3* do kompleksu receptorowego *CLV1/CLV2* potwierdzono technikami immunostrącania, stosując przeciwciała przeciwko *CLV3* [34]. Strącający się wielobiałkowy kompleks o masie cząsteczkowej 450 kDa, oprócz *CLV1*, zawierał jeszcze fosfatę białkową *KAPP* (ang. *kinase-associated protein phosphatase*) oraz białko *Rop* podobne do Rho-GTPazy. Obecność tych białek w izolowanym kompleksie daje podstawy do przypuszczeń, że szlak sygnałowy *CLV3*→*CLV1/CLV2* aktywuje zależną od białka *Rop* kaskadę kinaz MAP [22,35]. Oddziałująca z kompleksem fosfatasa białkowa *KAPP* funkcjonuje *in vivo* jako negatywny regulator, który inaktywuje szlak sygnałowy na skutek defosforylacji *CLV1*.

Wyniki najnowszych badań genetycznych i immunocytochemicznych potwierdziły już jednoznacznie ligandową funkcję polipeptydu *CLV3*, który, syntetyzowany w komórkach apikalnych merystemu, migruje apoplastem w kierunku bocznym oraz w dół, do głębszych warstw komórek rdzenia [36]. Niemal od początku badań związanych z *CLV3* pojawiało się pytanie o to, czy w aktywacji kom-

pleksu receptorowego *CLV1/CLV2* bierze udział cały polipeptyd, czy tylko wycięty z niego krótszy oligopeptyd. Analizując wyniki ostatnich doświadczeń można przypuszczać, że w apoplaste z *CLV3* zostaje wycięty 12-aminokwasowy aktywny oligopeptyd, który jest właściwym ligandem dla kompleksu *CLV1/CLV2* [37].

Fenotypy mutantów *clv1*, *clv2* i *clv3* są podobne i charakteryzują się silnie rozbudowanym regionem centralnym merystemu. Świadczy to o udziale wszystkich trzech białek w aktywacji szlaku sygnałowego funkcjonującego w regulacji proliferacji komórek rdzeniowych merystemu bądź kontrolującego proces różnicowania w komórki regionu peryferycznego (RP). Krańcowo odmienny fenotyp wykazuje mutant *wus*, u którego w miarę rozwoju dochodzi do całkowitego zaniku komórek rdzenia w regionie centralnym merystemu (Ryc. 3B). Gen *WUSCHEL* (*WUS*) koduje czynnik transkrypcyjny, zawierający wszystkie elementy homeodomeny o nieco zmienionej sekwencji [22]. Ekspresja genu *WUS* ograniczona jest do niewielkiej grupy komórek rdzenia tworzących tzw. centrum organizacyjne merystemu (Ryc. 3A), natomiast u mutantów *clv* poziom ekspresji *WUS* jest wyraźnie wyższy. Rośnie także liczba komórek, w których są identyfikowane jego transkrypty mRNA [38]. Obserwacje te świadczą o tym, że aktywny szlak sygnałowy *CLV3*→*CLV1/CLV2* bezpośrednio lub

pośrednio ogranicza ekspresję genu *WUS*. Represyjną funkcję szlaku *CLV* względem *WUS* potwierdzają w pełni wyniki doświadczeń, w których technikami biologii molekularnej manipulowano poziomem transkryptów *CLV3* [39,40].

W ostatnim czasie poznano sekwencje regulatorowe w promotorze genu *WUS*, co ułatwia identyfikowanie czynników regulujących jego ekspresję [41]. Z poznanych dotychczas białek, pozytywnym regulatorem jest oddziałujący z promotorem *WUS*, remodelujący chromatinę czynnik *SYD* z aktywnością ATPazową, a także białko *STIP* zawierające domenę homeotyczną. Represorami *WUS* są czynniki transkrypcyjne *HAN*, *ULT1* i *FAS1/FAS2* (Ryc. 3C) [42,43].

Ekspresja genu *CLV3*, zwłaszcza w fazie rozwoju embrionalnego, jest wyraźnie aktywowana przez *WUS*, natomiast w późniejszym stadium rozwoju w aktywacji musi uczestniczyć także czynnik transkrypcyjny *STM* (ang. *shoot meristemless*) z domeną homeotyczną typu *KNOTTED* [44]. Bezpośredni lub pośredni udział *WUS* w aktywacji genu *CLV3* sugeruje, że w ustalaniu równowagi pomiędzy komórkami pluripotentnymi a komórkami różnicującymi się w regionie peryferycznym kluczową rolę odgrywa pętla regulacyjna *CLV/WUS* (Ryc. 3A) [42,43].

Proponowana pętla regulacyjna stanowi tylko jeden z elementów skomplikowanego mechanizmu regulującego funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego pędu. Obec-

nie wiadomo, że WUS reguluje co najmniej 148 genów, z tego 44 geny są w różnym stopniu hamowane [45]. Represji ulegają m. in. niektóre geny kodujące tzw. regulatory odpowiedzi typu A w dwuskładnikowych systemach transdukcji sygnałów [5]. Wyniki tych badań są o tyle ważne, że wiążą regulację proliferacji komórek merystematycznych na poziomie czynników transkrypcyjnych z regulacją przez cytokininy (Ryc. 3C). Czynniki transkrypcyjne WUS, hamując ekspresję genów ARR typu A kodujących białka hamujące odpowiedzi na cytokininy, odgrywa rolę pozytywnego elementu w cytokininowym szlaku sygnałowym [45]. Z drugiej strony, czynniki transkrypcyjne STM, aktywujący biosyntezę cytokinin i hamujący syntezę giberelin, współdziała z WUS w kontrolowaniu równowagi między komórkami rdzenia a komórkami regionu peryferycznego [46,47].

Inne kinazy receptorowe z motywem LRR występujące u roślin

Oprócz BRI1 i CLV1, dwóch najlepiej poznanych kinaz z rodziny LRR, liczącej u *A. thaliana* ponad 200 białek, znanych jest jeszcze kilka RLK, których funkcja jest dopiero badana. Jedną z lepiej poznanych kinaz z tej rodziny jest ERECTA (ER), która podobnie jak CLV1, funkcjonuje w obrębie merystemu wierzchołkowego, uczestnicząc w regulacji organogenezy [14]. Fenotyp *erecta*, o charakterystycznym zwartym kształcie organów wywodzących się z merystemu wierzchołkowego, jest efektem znacznej redukcji liczby komórek rdzeniowych merystemu decydujących o rozmiarach i kształtach dojrzałych organów. Oprócz genu *ER* w *A. thaliana* zidentyfikowano dwa jego paralogi, *ERL1* i *ERL2* (ang. *ER-like*), które, podobnie jak *ER*, wykazują wysoki poziom ekspresji w rozwijających się tkankach [48].

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano pięć genów *SERK1-5* (ang. *somatic embryogenesis receptor-like kinase*) kodujących białka, które w domenie zewnątrzkomórkowej mają po pięć powtórzeń leucynowych, za którymi położony jest, swoisty dla SERK, motyw bogaty w prolinę SPP. Najnowsze badania pokazują, że SERK1 tworzy duże kompleksy wielobiałkowe, w których oprócz fosfatazy białkowej KAPP i białka 14-3-3 znajdują się także BRI1 oraz BAK/SERK3 [49]. W poszukiwaniach białek substratowych wykazano, że SERK1 oddziałuje fizycznie z białkiem CDC48 i jednym z białek 14-3-3 [50]. Oba białka są fosforylowane przez SERK1 i przypuszczalnie funkcjonują w regulacji cyklu komórkowego.

Dwie inne, częściowo poznane, kinazy z powtórzeniami bogatymi w leucynę funkcjonują w reakcjach obronnych przeciw patogenom. Kinaza Xa 21 z 23 powtórzeniami LRR determinuje oporność ryżu na rdzę wywołaną przez *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, natomiast kinaza FLS2 jest receptorem flagelliny, jednego z najbardziej aktywnych bakteryjnych elicytorów rozpoznawanych zarówno przez zwierzęcy, jak i roślinny wrodzony system odpornościowy [15]. Kinaza FLS2 zawiera 28 powtórzeń LRR z 23-aminkwasową „wstawką”, położoną między szesnastym a siedemnastym powtórzeniem [51]. Najnowsze wyniki badań sugerują udział FLS2 w reakcjach obronnych poprzez hamowanie sygnalizacji auksynowej na drodze represji, odkrytego niedawno, wewnątrzkomórkowego receptora auksyn TIR1 [52].

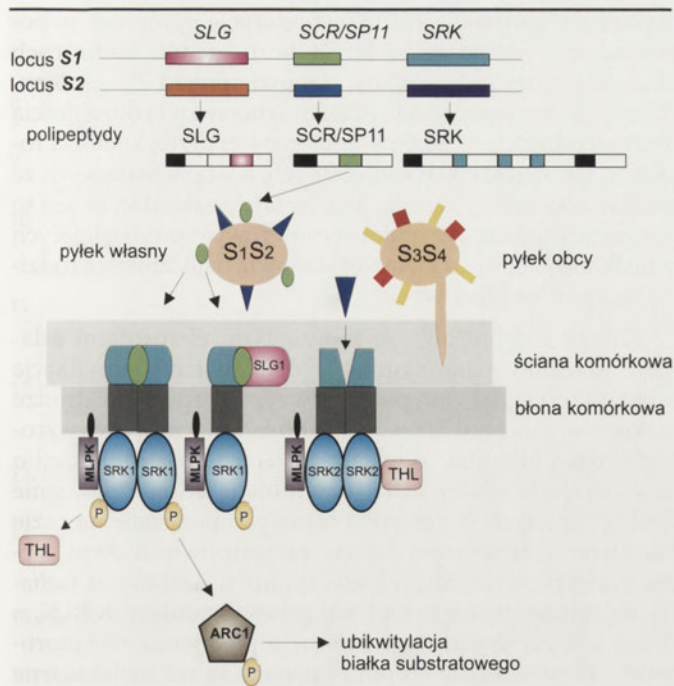
Kinaza PSKR1 *A. thaliana* i jej homologi poznane wcześniej u marchwi i ryżu funkcjonują jako receptory fitosulfoniny- α , pentapeptydu działającego jako czynnik mitogenny i regulującego różnicowanie komórek [14,53]. Z kolei kinazy SYMRK/SYM19 (ang. *symbiosis receptor-like kinase*) z *L. japonicum* i grochu [54] oraz NORK (ang. *nodulation receptor-like kinase*) z *M. sativa* [55] pośredniczą w wymianie informacji w oddziaływaniach symbiotycznych.

KINAZY BIAŁKOWE NALEŻĄCE DO POZOSTAŁYCH KLAS

Kinaza SRK komórek wyrostkowych znamienia – żeńska determinanta samoniezgodności

Kinaza SRK, zidentyfikowana przed piętnastoma laty u *Brassica oleracea*, jest kluczowym elementem molekularnego mechanizmu samoniezgodności homomorficznej, który u większości obupłciowych roślin kwiatowych zapobiega samozapłodnieniu (zapłodnieniu wsobnemu) [56]. Samoniezgodność, określana inaczej jako niezgodność wewnątrzgatunkowa, jest mechanizmem kontrolowanym genetycznie, funkcjonującym w żeńskiej tkance sporofitu, dzięki któremu słupek rozpoznaje czy został zapyłony pyłkiem z własnego kwiatu, czy też pyłkiem pochodzącym od innego osobnika. Podstawowe założenia mechanizmu samoniezgodności homomorficznej zostały omówione szerzej w pracy opublikowanej niedawno w Kosmosie [57], a także w kilku artykułach przeglądowych publikowanych w czasopiśmie o zasięgu ogólnosiwiatowym [58,59]. Zgodnie z ogólnymi założeniami samoniezgodności w reakcji rozpoznania pyłku słupek uczestniczą produkty wieloallelicznych, polimorficznych genów zlokalizowanych w tzw. locus *S* (ang. *self*). W przypadku samoniezgodności sporofitowej, badanej głównie w roślinach z rodziny *Brassicaceae*, żeńską determinantą samoniezgodności jest właśnie, kodowana przez gen SRK (ang. *S-locus receptor kinase*), receptorowa kinaza białkowa zlokalizowana w błonie komórek wyrostkowych (papili) znamienia. Kinaza SRK w domenie zewnątrzkomórkowej ma 12 ewolucyjnie zachowanych reszt cysteinowych oraz kilka miejsc glikozylacji, a także, co szczególnie ważne, trzy fragmenty o dużej zmienności, które odzwierciedlają alleliczne zróżnicowanie genu SRK (Ryc. 4) [56,60].

W obrębie locus *S* położony jest także gen *SLG*, którego produktem jest sekrecyjna glikoproteina, występująca w stosunkowo dużej ilości w ścianie komórek wyrostkowych znamienia. Białko SLG, podobnie jak SRK, ma także 12 zachowanych w ewolucji reszt cysteiny, kilka miejsc *N*-glikozylacji i trzy fragmenty o dużej zmienności, a jego sekwencja aminokwasowa jest identyczna nawet w 98% z sekwencją domeny zewnątrzkomórkowej kinazy SRK kodowanej przez gen tego samego haplotypu [58,59]. Mimo że gen *SLG* kosegreguje z *SRK* i jest aktywny w komórkach wyrostkowych znamienia w czasie poprzedzającym pylenie, to jednak rola jego produktu w samoniezgodności jest ciągle jeszcze niejasna. Niektóre wyniki sugerują, że obecność glikoproteiny SLG jest konieczna do stabilizowania kinazy SRK, bowiem w warunkach śladowej ekspresji genu *SLG* występuje wyraźne osłabienie bądź zanik reakcji samoniezgodności [58,59]. W innych badaniach wykazano, że brak *SLG* ma niewielki lub w ogóle nie ma żadnego wpływu na



Rycina 4. Mechanizm samoniezgodności sporofitowej (opracowano na podstawie [22,57]; szczegóły w tekście).

wystąpienie samoniezgodności [60,61]. Kinaza SRK jest elementem mechanizmu absolutnie koniecznym do wywołania samoniezgodności, chociaż właściwą reakcję zapewnia współdziałanie z kinazą serynowo/ treoninową MLPK (ang. *M locus protein kinase*), zakotwiczoną w błonie komórkowej po stronie cytoplazmatycznej [62]. W warunkach, gdy kompleks receptorowy nie ulega aktywacji, a więc również w sytuacji, gdy na znamieniu osiadzie obcy pyłek, autofosforylacja SRK zapobiega tioredoksynie (THL1 i THL2), wiążąca się z resztą cysteiny położoną w regionie transbłonowym SRK [63,64].

Trzecim istotnym elementem reakcji rozpoznania pyłek-słupek jest specyficzny oligopeptyd SCR/SP11 (ang. *S-locus cysteine-rich protein*) kodowany przez gen położony w locus *S* pomiędzy genami *SRK* i *SLG* (Ryc. 4) [65,66]. Ekspresja genu *SCR/SP11* zachodzi w komórkach tapetum pylnika, gdzie oligopeptyd SCR/SP11 zostaje wbudowany na powierzchnię pyłku (Ryc. 4). Dojrzały, hydrofilowy, złożony z 50-71 reszt aminokwasowych polipeptyd SCR/SP11 zawiera dziewięć zachowanych w ewolucji aminokwasów, w tym osiem reszt cysteiny i jedną resztę glicyny. Fragmenty położone między tymi aminokwasami o wyjątkowo wysokim polimorfizmie umożliwiają swoistość interakcji SCR/SP11 z domeną zewnątrzkomórkową SRK [58]. Tak więc, alleliczne zróżnicowanie genów *SRK* i *SCR/SP11* odzwierciedlają trzy wysoce zróżnicowane regiony położone w domenie zewnątrzkomórkowej kinazy SRK (domena S) oraz jeden polimorficzny region w oligopeptydzie SCR/SP11, które w allelo-specyficznej reakcji umożliwiają swoiste rozpoznanie oligopeptydu SCR/SP11 przez kinazę SRK (Ryc. 4). Domena S kinazy SRK rozpoznaje oligopeptyd SCR/SP11 jako samoniezgodny tylko wówczas, gdy oba białka są produktami genów tego samego haplotypu.

Mimo że podstawowy mechanizm reakcji rozpoznania pyłku przez kinazę SRK w komórkach wyrostkowych znamienia został już stosunkowo dobrze poznany, to wiedza na temat szlaku sygnałowego przekazującego informację z układu receptorowego na układ efektorowy odpowiedzialny za odrzucenie pyłku o „nieodpowiednim” haplocie jest ciągle jeszcze bardzo fragmentaryczna. Dotychczas zidentyfikowano jedynie ligazę ubikwitynową ARC1 (ang. *arm repeat containing 1*), zawierającą domenę U-box, która regionem C-końcowym oddziałuje z domeną wewnątrzkomórkową SRK [67]. Techniki antysensu udało się w komórkach wyrostkowych znacząco obniżyć poziom mRNA kodującego ARC1, co prowadziło do zdecydowanego osłabienia lub całkowitego zaniku reakcji samoniezgodności [67]. Tak więc, ligaza ARC1 w samoniezgodności sporofitowej odgrywa rolę pozytywnego elementu w szlaku aktywowanym w warunkach samozapylenia, a jej fosforylacja przez aktywny kompleks SRK(SLG)-MLPK uruchamia mechanizm zapobiegający kiełkowaniu łagiewki pyłkowej (Ryc. 4). Identyfikacja białka substratowego ubikwitylowanego przez ARC1 powinna w przyszłości pomóc w rozszyfrowaniu mechanizmu zaangażowanego w eliminowanie pyłku o niewłaściwym haplocie.

Kinazy WAK/WAKL — łączniki między ścianą komórkową a cytoplazmą

Genom *A. thaliana* zawiera 26, a ryżu 67 genów WAK/WAKL (ang. *cell wall-associated kinase/WAK-like*) kodujących kinazy białkowe, które w domenie zewnątrzkomórkowej mają powtórzenia podobne do motywu EGF2 i motywu EGF wiążącego jony wapnia (Ca^{2+} -EGF) [68-70]. Motyw EGF obejmuje sześć reszt cysteiny tworzących trzy wiązania dwusiarczkowe. Spośród tej, stosunkowo licznej, rodziny kinaz nieco lepiej są poznane białka WAK kodowane u *A. thaliana* przez pięć genów. Wszystkie kinazy WAK mają w części zewnątrzkomórkowej po jednym motywie EGF2 i Ca^{2+} -EGF [69]. W domenie Ca^{2+} -EGF, podobnie jak w białkach zwierząt z taką domeną, występują miejsca hydroksylacji Asp/Asn, które, jak się przypuszcza, są ważne w tworzeniu wiązań wodorowych podczas oddziaływań typu białko-białko [70]. Takich miejsc hydroksylacji brakuje w kinazach WAKL, co może wskazywać na oddziaływanie kinaz WAK/WAKL z wieloma ligandami lub na zróżnicowaną swoistość względem tego samego ligandu. Niektóre z genów WAKL kodują skrócone białka, które nie zawierają fragmentu transbłonowego. Geny WAK ulegają ekspresji przede wszystkim w tkankach zielonych, natomiast WAKL są aktywne głównie w korzeniach i kwiatach.

W dotychczasowych badaniach nie udało się ustalić jakie ligandy oddziałują z domeną zewnątrzkomórkową poszczególnych kinaz WAK/WAKL. Wydaje się mało prawdopodobne by były to pektyny, z którymi domena zewnątrzkomórkowa WAK1 tworzy stosunkowo trwałe połączenia [71]. Stosując technikę drożdżowego układu dwuhybrydowego oraz metody immunochemiczne wykazano, że WAK1 oddziałuje z białkiem sekrecyjnym GRP-3 (ang. *glycine-rich protein-3*) *A. thaliana* [9]. W strącającym się kompleksie o masie 500 kDa zidentyfikowano także fosfatazę białkową KAPP [9]. Jedynym poznany dotychczas białkowy substratem fosforylowanym przez AtGRP/AtWAK1 jest białko

chloroplastów OEE2 (ang. *oxygen-evolving enhancer protein2*), które w odpowiedzi na infekcję przez *Pseudomonas syringae* generuje aktywne formy tlenu [72]. Fosforylacja OEE2 przez kompleks AtGRP/AtWAK1 być może aktywuje przeniesienie elektronów z PSII na O₂ zamiast na NADP⁺, a powstające aniony ponadtlenkowe uczestniczą w reakcjach obronnych przeciw patogenom.

CRINKLY4 – kinaza kontrolująca różnicowanie komórek

Zidentyfikowany u kukurydzy gen *CRINKLY4* (*CR4*) koduje kinazę receptorową, która funkcjonalnie przypomina receptory czynnika wzrostu u zwierząt [8]. *CR4* kontroluje szereg procesów związanych z morfogenezą i różnicowaniem komórek. Jej funkcjonowanie jest szczególnie istotne dla proliferacji i prawidłowego różnicowania komórek w epidermie liści oraz warstwie aleuronowej bielma. Gen *CR4* ulega ekspresji w rozwijających się tkankach siewki, przy czym najwyższy poziom transkryptu *cr4* stwierdzono w merystemie wierzchołkowym oraz zawiązkach organów bocznych.

CRINKLY4 jest unikalnym białkiem wśród kinaz receptorowych roślin. Jej domena zewnętrzna zawiera dwa charakterystyczne motywy, z których jeden jest regionem bogatym w reszty cysteiny, podobnym do ssaczego motywu TNFR wiążącego ligand, a drugi to tzw. motyw „*crinkly*”, o nieznanym dla RLK funkcjach [8,9]. Obejmuje on siedem 39-aminokwasowych powtórzeń tworzących strukturę śmigła. Podobny motyw występuje w regulatorze kondensacji chromosomu 1 (*RCC1*) i prawdopodobnie uczestniczy w oddziaływaniach typu białko-białko [15].

Analizy *in silico* wykazały, że genomy *A. thaliana* oraz ryżu zawierają po 5 genów kodujących białka homologiczne do *CR4* z kukurydzy. *AtCR4* z *A. thaliana* oraz *OsCR4* z ryżu są ortologami *CR4*, natomiast pozostałe to geny *CRINKLY4-RELATED* (*CRR*) [73]. Bliżej przebadano tylko białka z *A. thaliana* i ustalono, że jedynie *ACR4* jest funkcjonalną kinazą serynowo/treoninową. Może ona fosforylować *AtCRR1* i *AtCRR2*, które nie wykazują aktywności kinazowej [73]. Proponuje się udział tych białek w tworzeniu heterodimerów z *ACR4* lub innymi białkami należącymi do tej rodziny. Natura chemiczna ligandu dla *CRINKLY4*, jak dotąd, jest nieznaną, ale obecność w zewnętrznej domenie receptorowej *CR4* motywu TNFR ssaków sugeruje, że może to być polipeptyd podobny do TNF [8].

PODSUMOWANIE

Procesy związane z odbiorem i przekazywaniem informacji pochodzących ze środowiska, jak również sygnalizacja międzykomórkowa mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Rezultaty badań ostatniego dziesięciolecia pokazały, że rośliny, podobnie jak zwierzęta, wykorzystują w tych procesach receptory zlokalizowane na powierzchni komórek. Jednak w przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, komórki roślinne odbierają sygnały zewnętrzne i komunikują się między sobą przede wszystkim za pośrednictwem receptorowych kinaz białkowych, które fosforylują reszty seryny/treoniny. Intrygującym wynikiem badań nad klonowaniem i sekwencjo-

nowaniem genomów roślin jest odkrycie ogromnej, w porównaniu z genomami zwierząt, liczby genów kodujących RLK, które np. u *A. thaliana* stanowią ponad 2% genomu. Niewątpliwie ma to swoje uzasadnienie w związku z ilością i różnorodnością sygnałów odbieranych przez komórki roślinne, zarówno tych wewnętrznych, jak i pochodzących ze środowiska zewnętrznego. Można także zakładać, że jest to rodzaj rekompensaty braku receptorów współdziałających z białkami G, które u zwierząt stanowią najliczniejszą rodzinę receptorów błonowych.

Kinazy receptorowe są kluczowymi elementami szlaków przekazywania sygnału i dlatego ich identyfikacja i charakterystyka jest podstawowym etapem na drodze poznania mechanizmów kontrolujących procesy wzrostu i rozwoju roślin. W ostatnich latach ilość publikacji o nowych RLK roślin rośnie lawinowo, jednak znaczenie biologiczne tych białek receptorowych pozostaje na razie nieznaną. Problem ten będzie niewątpliwie dużym wyzwaniem dla przyszłych badaczy, np. u *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano ponad 400 genów kodujących RLK, a bliżej scharakteryzowano zaledwie pięć kinaz receptorowych. W niewielkim stopniu poznane są też molekularne mechanizmy funkcjonowania tych cząsteczek. Istotnymi pytaniami, pozostającymi na razie bez odpowiedzi, są pytania o to jak sygnał przekazywany jest do cytoplazmy, jak utrzymywana jest aktywność szlaku w cytoplazmie i jakie białka jądrowe uczestniczą w indukcji odpowiedzi na sygnał. Kilka poznanych do tej pory przykładów funkcjonowania kinaz receptorowych, takich jak *BRI1* czy *CLV1*, wskazuje na podobieństwo do systemów zwierzęcych, np. dimeryzacja białek receptorowych, endocytoza czy odwracalna fosforylacja w regulacji dalszych etapów szlaku sygnałowego. Nie pozwala to jednak na tym etapie na ustalenie ogólnego mechanizmu działania RLK, tym bardziej, że mimo strukturalnych podobieństw cytoplazmatycznych domen tych białek, regulacja szlaku poniżej receptorów wydaje się różnić w zależności od białka receptorowego. Jest niezwykle interesujące czy tak ogromna ekspansja kinaz receptorowych roślin znajduje swoje odbicie w równie licznych szlakach sygnałowych. Jedno jest pewne – imponująca liczba genów kodujących RLK oraz ogromna różnorodność strukturalna i funkcjonalna tych białek gwarantuje, że przekazywanie sygnałów u roślin pozostanie na długo ekscytującym problemem badawczym.

PIŚMIENNICTWO

1. Jones AM, Assmann SM (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Reports* 5: 572-578
2. Pandey S, Assmann SM (2004) The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16: 1616-1632
3. Assmann SM (2005) G proteins go green: a plant G protein signaling FAQ Sheet. *Science* 310: 71-73
4. Shiu S-H, Bleecker AB (2001a) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10763-10768
5. Kowalczyk S, Hetmann A (2003) Roślinne receptorowe kinazy histydynowe i wielostopniowy przepływ fosforanu do regulatorów odpowiedzi. *Postepy Biochem* 49: 298-318
6. Shiu S-H, Bleecker AB (2001b) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci Signal Transduction Knowledge Environ* 113: RE22

7. Rudrabhatla P, Reddy MM, Rajasekharan R (2006) Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* 60: 293-319
8. Becraft PW (2002) Receptor kinase signaling in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 163-192
9. Haffani YZ, Silva NF, Goring DR (2004) Receptor kinase signalling in plants. *Can J Bot* 82: 1-15
10. Walker JC, Zhang R (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature* 345: 743-746
11. Shiu S-H, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y-H, Mayer KFX (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* 16: 1220-1234
12. Shiu S-H, Bleecker AB (2003) Expansion of the receptor-like kinase/pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 530-543
13. Diévert A, Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131: 251-261
14. Torii KU (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 234: 1-46
15. McCarty DR, Chory J (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103: 201-209
16. Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 177-201
17. Li L, Deng XW (2005) It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors. *Trends Plant Sci* 10: 266-268
18. Wang Z-Y, He J-X (2004) Brassinosteroid signal transduction -- choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci* 9: 91-96
19. Kowalczyk S, Jakubowska A (1999) Receptory etylenu, cytokinin i brassinosteroidów -- transmembranowymi kinazami białkowymi? *Post Biol Kom* 26: 3-32
20. Kinoshita T, Caño-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, Chory J (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167-170
21. Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-García S, Cheng J-C, Nam KH, Li J, Chory J (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 131: 5341-5351
22. Kowalczyk S, Maciejewska B (2002) Roślinne peptydy sygnałowe. *Post Biol Kom* 29: 181-201
23. Szekeres M (2003) Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. *Trends Plant Sci* 8: 102-104
24. Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-222
25. Russinova E, Borst J-W, Kwaaitaal M, Caño-Delgado A, Yin Y, Chory J, De Vries S.C (2004) Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16: 3216-3229
26. Wang X, Goeshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* 17: 1685-1703
27. Wang X, Li X, Meisenhelder J, Hunter T, Yoshida S, Asami T, Chory J (2005) Autoregulation and homodimerization are involved in the action of the plant steroid receptor BRI1. *Dev Cell* 8: 855-865
28. Li J, Nam KH (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295: 1299-1301
29. Mora-García S, Vert G, Yin Y, Caño-Delgado A, Cheong H, Chory J (2004) Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18: 448-460
30. Kowalczyk S, Hadowska E, Piekarska A (2005) Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach -- kluczowe elementy hormonalnych szlaków sygnałowych. *Postępy Biochem* 51: 171-187
31. Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J (2005) A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* 120: 249-59
32. He J-X, Gendron JM, Sun Y, Gampala SSL, Gendron N, Sun CQ, Wang Z-Y (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-1638
33. Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914
34. Trotochaud AE, Jeong S, Clark SE (2000) CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* 289: 613-616
35. Carles CC, Fletcher JC (2003) Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci* 8: 394-401
36. Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV, Fletcher JC (2002) CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* 14: 969-977
37. Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H, Sakagami Y (2006) A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313: 845-848
38. Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL gene. *Cell* 100: 635-644
39. Müller R, Borghi L, Kwiatkowska D, Laufs P, Simon R (2006) Dynamic and compensatory responses of *Arabidopsis* shoot and floral meristems to CLV3 signaling. *Plant Cell* 18: 1188-1198
40. Reddy GV, Meyerowitz EM (2005) Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. *Science* 310: 663-667
41. Bäurle I, Laux T (2005) Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 17: 2271-2280
42. Williams L, Fletcher JC (2005) Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 8: 582-586
43. Veit B (2006) Stem cell signalling networks in plants. *Plant Mol Biol* 60: 793-810
44. Brand U, Grünewald M, Hobe M, Simon R (2002) Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 565-575
45. Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172-1175
46. Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* 15: 1560-1565
47. Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* 15: 1566-1571
48. Shpak ED, Berthiaume ChT, Hill EJ, Torii KU (2004) Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* 131: 1491-1501
49. Karlova R, Boern S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, de Vries S (2006) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *Plant Cell* 18: 626-638
50. Rienties IM, Vink J, Borst JW, Russinova E, de Vries SC (2005) The *Arabidopsis* SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 λ and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta* 221: 394-405
51. Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5: 1003-1011

52. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439
53. Matsubayashi Y, Ogawa M, Kihara H, Niwa M, Sakagami Y (2006) Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol* 142: 45-53
54. Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962
55. Endre G, Kereszt A, Kevel Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966
56. Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8816-8820
57. Bednarska E, Lenartowska M (2003) Mechanizmy samoniezgodności u roślin kwiatowych. *Kosmos* 52: 425-443
58. Takayama S, Isogai A (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56: 467-489
59. Hiscock SJ, McInnis SM (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self – incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci* 8: 606-613
60. Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403: 913-916
61. Kusaba M, Dwyer K, Hendershot J, Vrebalov J, Nasrallah IB, Nasrallah ME (2001) Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell* 13: 627-643
62. Murase K, Shiba H, Iwano M, Che F-S, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* 303: 1516-1519
63. Mazzurco M, Sulaman W, Elina H, Cock JM, Goring DR (2001) Further analysis of the interactions between the *Brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 45: 365-376
64. Cabrilla D, Cock JM, Dumas C, Gaude T (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410: 220-223
65. Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391-400
66. Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700
67. Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003) ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15: 885-898
68. Zhang S, Chen C, Li L, Meng L, Singh J, Jiang N, Deng XW, He ZH, Le-maux PG (2005) Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. *Plant Physiol* 139: 1107-1124
69. Verica JA, He ZH (2002) The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol* 129: 455-459
70. Verica JA, Chae L, Tong H, Ingmire P, He ZH (2003) Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1732-1746
71. Decreux A, Messiaen J (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant Cell Physiol* 46: 268-278
72. Yang EJ, Ah Oh Y, Seung Lee E, Ran Park A, Cho SK, Joon Yoo Y, Park OK (2003) Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 862-868
73. Cao X, Li K, Suh SG, Guo T, Becraft PW (2005) Molecular analysis of the CRINKLY4 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 220: 645-657

Plant receptor kinases

Anna Jakubowska[✉], Maciej Ostrowski, Stanisław Kowalczyk

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, Nicolas Copernicus University, 9 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland

[✉]e-mail: anjakubo@uni.torun.pl

Key words: plant receptor kinases, signal transduction

ABSTRACT

Recent plant genome analyses have revealed a large number of genes encoding receptor-like kinases (RLKs) in plants. They are transmembrane proteins structurally related to the animal tyrosine and serine/threonine families with differences in their extracellular domains. There are more than 20 classes of plant RLKs, distinguished according to their extracellular domains, which can potentially bind an array of molecules. Although the majority of these RLKs remains uncharacterized, several members of this family are known to function in a diverse biological processes including plant growth and development, self-incompatibility, hormone perception and plant-microbe interactions. Despite knowledge of RLKs functions is increasing rapidly, yet major challenges remain. These include identifying ligands that activate RLKs and characterizing downstream pathways.

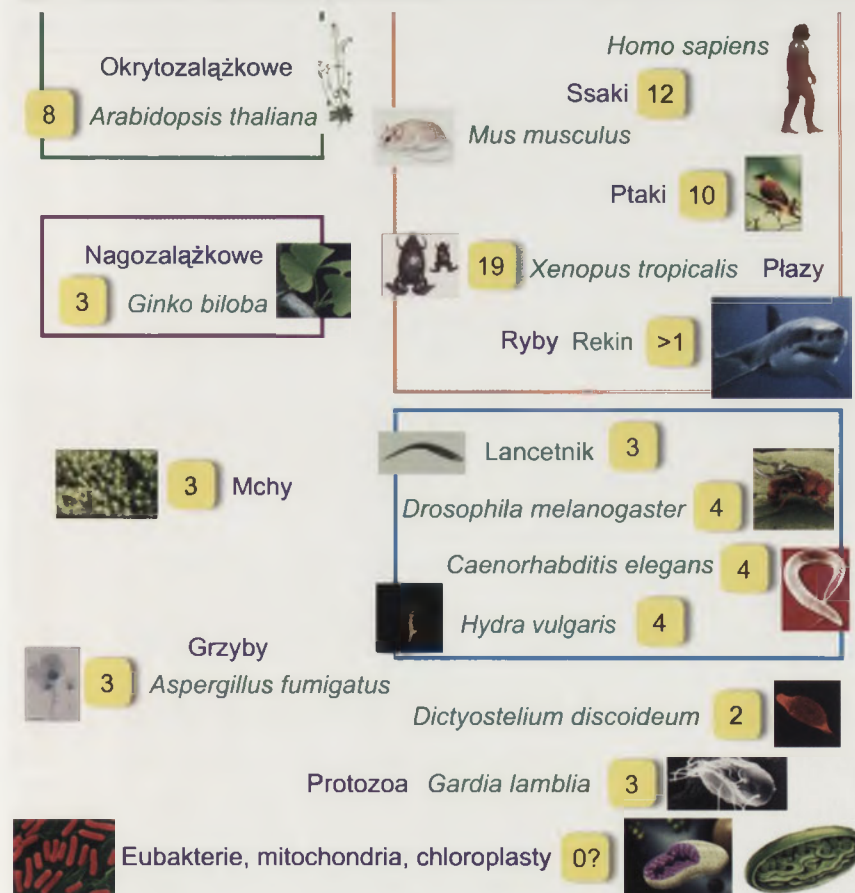
Aneksyny, białka uczestniczące w organizacji i prawidłowym funkcjonowaniu błon biologicznych – od *Arabidopsis thaliana* do *Homo sapiens*

STRESZCZENIE

Wzaprozentowanym na łamach tego numeru „Postępów Biochemii” cyklu pięciu artykułów poświęconych aneksynom pragniemy zwrócić uwagę Czytelników na niektóre aspekty biologii aneksyn, białek wiążących jony wapnia i błony biologiczne, występujących we wszystkich organizmach eukariotycznych, od *Arabidopsis thaliana* do *Homo sapiens*, z wyjątkiem drożdży. O znaczeniu aneksyn mogą świadczyć dwie cechy tej grupy białek, kodowanych u kręgowców przez dwanaście genów, a u roślin naczyniowych przez osiem. Po pierwsze, liczba genów kodujących aneksyny rośnie w trakcie ewolucji organizmów na Ziemi, po drugie w niektórych typach komórek aneksyny stanowią do dwóch procent wszystkich syntetyzowanych białek. W artykule otwierającym niniejszy cykl zostaje sformułowana hipoteza, że powielenie w trakcie ewolucji liczby genów kodujących aneksyny mogło być rodzajem przystosowania organizmów do zmieniających się warunków środowiska. Zaprezentowano także dane doświadczalne świadczące o udziale aneksyn w kluczowych procesach związanych z prawidłowym funkcjonowaniem błon biologicznych, takich jak przekazywanie sygnałów, transport jonów, transport pęcherzykowy i naprawa uszkodzeń błony. W kolejnych artykułach cyklu omówiono udział aneksyn w odpowiedzi organizmu na stres (*Arabidopsis thaliana*), funkcje jakie mogłyby pełnić aneksyny w procesie mineralizacji tkanek (*Gallus gallus*) i w wydzielaniu katecholamin (komórki PC12 ssaków) oraz związek aneksyn z rozwojem niektórych chorób spichrzeniowych, w których zaburzeniom ulega transport i wewnątrzkomórkowe gromadzenie cholesterolu (choroba Niemann-Picka typu C, *Homo sapiens*).

WPROWADZENIE

Aneksyny stanowią starą ewolucyjnie grupę białek występujących powszechnie nawet w odległych filogenetycznie grupach taksonomicznych, z wyjątkiem organizmów prokariotycznych i drożdży (Ryc. 1, Tab. 1) [1,2]. Liczba genów



Rycina 1. Liczba genów kodujących aneksyny w różnych grupach taksonomicznych.

Joanna Bendorowicz-Pikuła ✉

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie

✉Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 47, e-mail: j.bendorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 17 stycznia 2007 r.

Artykuł zaakceptowano 26 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: aneksyny, homeostaza wapniowa, dynamika błon biologicznych

Wykaz skrótów: Anx – aneksyna; PIP₂ – fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforan

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2007-2009, numer projektu N301 049 32/1143

Tabela 1. Aneksyny Eukaryota.

Podrodzina	Przedstawiciele	Organizm
aneksyny A	aneksyny A1-A11, A13	człowiek, kręgowce
aneksyny B	aneksyny B7, B9-B12	bezkęgowce
aneksyny C	aneksyny C1-C5	śluzowce i grzyby (z wyjątkiem drożdży)
aneksyny D	aneksyny D1-D25*	rośliny
aneksyny E	aneksyny E1-E3	<i>Giardia lamblia</i>

*Liczba zidentyfikowanych przedstawicieli nie jest tożsama z liczbą genów kodujących aneksyny, np. w genomie *Arabidopsis thaliana* występuje osiem genów kodujących aneksyny [2].

kodujących aneksyny rośnie wraz z pojawianiem się na arenie ewolucyjnej nowych grup taksonomicznych. Znamienne w tym względzie są dwa zdarzenia, po których liczba genów kodujących aneksyny znacząco wzrosła. Pierwsze to wyjście zwierząt z wody na ląd. U starej ewolucyjnie grupy ryb chrzęstnoszkieletowych liczba genów kodujących aneksyny jest niska, podobnie jak u bezkręgowców i pierwotniaków. Sytuacja ta uległa zmianie u płazów. W genomie niektórych gatunków afrykańskich żab, dzięki duplikacji i poliploidyzacji, liczba genów kodujących aneksyny wynosi 19 [3,4]. Potwierdzeniem tej reguły, jest fakt, że u żyjących współcześnie gatunków ryb kostnoszkieletowych liczba genów kodujących aneksyny jest taka sama jak u płazów i ssaków. Drugim ważnym z punktu widzenia ewolucji życia na Ziemi był moment zmiany sposobu rozmnażania roślin, którym różnią się starsze ewolucyjnie rośliny nagozalążkowe od młodszych, okrytozalążkowych. W tej ostatniej grupie taksonomicznej liczba genów kodujących aneksyny osiągnęła 8, zatem jest znacznie wyższa niż u roślin nagoza-

łążkowych, choć mniejsza niż u ssaków, w tym naczelnych i człowieka, w których genomie zidentyfikowano 12 genów kodujących aneksyny [3-5]. Liczba kodowanych przez te geny białek jest jeszcze większa (Tab. 2).

Czy obecność w genomie ssaków dwunastu genów kodujących aneksyny, to forma przystosowania ssaków do zmieniających się warunków środowiska, zapewniająca tej grupie zwierząt sukces ewolucyjny? Czy aneksyny, mimo zachowanej w ewolucji struktury drugo- i trzeciorzędowej i licznych podobieństw we właściwościach fizyko-chemicznych obserwowanych w trakcie badań prowadzonych w warunkach *in vitro*, różnią się znacznie od siebie pełnionymi w komórce funkcjami? W niniejszym artykule zostanie przedstawiona hipoteza, że wzrost liczby genów, które kodują aneksyny ssaków, będący wynikiem długiej drogi ewolucyjnej, jest korzystnym przystosowaniem tych organizmów do zmian zachodzących w środowisku. Aby w pełni zrozumieć rodzaj przystosowania organizmów do nowych warunków środowiska, polegający na zwiększeniu liczby genów kodujących aneksyny, trzeba przede wszystkim zdefiniować tę grupę białek.

CHARAKTERYSTYKA ANEKSYN

Najpowszechniej aneksyny określa się następująco. Są to białka wiążące jony wapnia i lipidy o zachowanej w ewolucji strukturze drugo- i trzeciorzędowej, w cząsteczkach których obecne są powtarzające się miejsca wiązania jonów wapnia typu 2 (w odróżnieniu od białek takich jak kalmodulina, w której cząsteczce znajdują się miejsca typu 1) [1,6-8]. Ponadto aneksyny obdarzone są zdolnością oddziaływa-

Tabela 2. Aneksyny ssaków.

Gen	Białko	Synonimy	AA	M. cz. (kDa)	pI
ANXA1	aneksyna A1	aneksyna I, lipokortyna I, kalpaktyna II, p35, GIF, lipomodulina, chromobindyna 9, max 3, makrokortyna 1, renokortyna	346	38,7	6,6
ANXA2	aneksyna A2	aneksyna II, lipokortyna II, p36, p33, kalpaktyna I łańcuch ciężki, chromobindyna 8, białko I, PAP-IV	339	38,6	7,8
ANXA3	aneksyna A3	aneksyna III, lipokortyna III, PAP-III, kalcy medy na 35- α , kalfobindyna III	323	36,4	5,5
ANXA4	aneksyna A4	aneksyna IV, lipokortyna IV, kalcy medy na 35- β , p28, max 2, chromobindyna 4, białko II, PAP-II, PAP-IV, PP-4X, endoneksyna I, kalelektryna 32.5	321	36,0	5,7
ANXA5	aneksyna A5	aneksyna V, lipokortyna V, kalcy medy na 35- γ , VAC- α , chromobindyna 5/7, IBC, PAP-I, PP4, endoneksyna II, kalelektryna 35K, CaBP33, kalfobindyna I, CaBP37, anchoryna CII, max 1	320	35,9	4,7
ANXA6	aneksyna A6a aneksyna A6b	aneksyna VI, lipokortyna VI, p68, p70, kalcy medy na 67K, 73K, chromobindyna 20, kalelektryna 67K, kalfobindyna II, białko III, synhybina	673 667	75,9 75,3	5,4 5,4
ANXA7	aneksyna A7a aneksyna A7b	aneksyna VII, lipokortyna VII, syneksyna I, syneksyna II, chromobindyna 11	466 488	50,3 52,7	6,2 5,4
ANXA8	aneksyna A8	aneksyna VIII, lipokortyna VIII, VAC- β	327	36,9	5,4
ANXA9	aneksyna A9	aneksyna XXXIII, A31	338	37,6	5,4
ANXA10	aneksyna A10	-	324	37,2	5,1
ANXA11	aneksyna A11	aneksyna XI, max 4	505	54,4	7,6
ANXA13	aneksyna A13a aneksyna A13b	-	316 357	35,5 -	5,3 -

Skróty użyte w tabeli: AA – liczba reszt aminokwasowych; CaBP (ang. *Ca²⁺-binding protein*) – białko wiążące wapń; GIF (ang. *glycosylation-inhibiting factor*) – czynnik hamujący glikozylację; IBC (ang. *inhibitor of blood coagulation*) – inhibitor koagulacji krwi; max – aneksyna z japońskiej ryby *Oryzias latipes*; PAP (ang. *placenta anticoagulant protein*) – białko zapobiegające powstawaniu skrzepów w łożysku; pI – punkt izoelektryczny; VAC (ang. *vascular anticoagulant*) – białko zapobiegające krzepnięciu krwi.

nia w komórce z wieloma ligandami; począwszy od związków niskocząsteczkowych, takich jak nukleotydy, poprzez kwasy tłuszczowe, fosfolipidy, cholesterol, pektyny, węglowodany, aż do wielu rodzajów białek enzymatycznych, receptorowych, regulatorowych, składników szkieletu błony oraz białek transportujących jony (Tab. 3) [1,7,9-15]. Zachowana w ewolucji część korowa cząsteczki aneksyny, zawie-

rająca miejsca wiązania jonów wapnia, zapewnia białku zdolność oddziaływania z błonami komórkowymi, podczas gdy zróżnicowana część N-końcowa odpowiedzialna jest za wiązanie z aneksyną licznych i różnorodnych chemicznie ligandów [1,7,8].

Po zadziałaniu bodźca, który wywołuje wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie komórek, aneksyny odznaczają się zdol-

Tabela 3. Niektóre białka oddziałujące z aneksynami ssaków.

Aneksyna	Białko	Możliwa funkcja
AnxA1	dysferlina F-aktyna integryna A4 receptor EGF receptor formylowanych peptydów S100A11 selektyna TRPM7 (kanał o aktywności kinazy)	naprawa uszkodzeń błony transport pęcherzykowy angiogeneza proliferaacja komórek procesy zapalne i wydzielnicze transport pęcherzykowy adhezja komórek przeżywalność komórek
AnxA2	angiostatyna CEACAM dysferlina F-aktyna galektyna-13 GLUT-4 kanały chlorkowe aktywowane przez Ca^{2+} kinaza kazeiny I kaweolina-1 progastryna receptor insuliny S100A10 SHP2 (białkowa fosfataza tyrozynowa) tenascyna C t-PA	angiogeneza adhezja komórek naprawa uszkodzeń błony transport pęcherzykowy odpowiedź immunologiczna regulacja lokalizacji GLUT-4 przewodnictwo błon transport pęcherzykowy przekazywanie sygnałów nowotwory układu pokarmowego metabolizm glukozy transport pęcherzykowy przekazywanie sygnałów adhezja komórek angiogeneza
AnxA4	glikoproteina BP-2 lektyny (SP-A) kanały chlorkowe aktywowane przez Ca^{2+}	transport pęcherzykowy adhezja komórek przewodnictwo błon
AnxA5	DNMT I G-aktyna helikaza 2 integryna B5 kinaza białkowa C kolagen typu II MIR NCX1 receptor VGF2 S100A1, S100B synaptofizyna	przeżywalność neuronów szkielet błony przeżywalność neuronów adhezja komórek przekazywanie sygnałów biomineralizacja odpowiedź immunologiczna homeostaza wapnia przekazywanie sygnałów homeostaza wapnia wydzielanie przekaźników nerwowych
AnxA6	chondroityna CRHSP-28 dynamina F-aktyna fodryna/kalspektyna (β -spektryna) kinaza Fyn izoformy kinazy białkowej C NCX1 p120 ^{GAP} proteaza cysteinowa kinaza Pyk2 Raf-1 receptor rianodynowy S100A1, S100A11, S100B UDPaza	adhezja komórek przekazywanie sygnałów przekazywanie sygnałów transport pęcherzykowy transport pęcherzykowy przekazywanie sygnałów przekazywanie sygnałów homeostaza wapnia przekazywanie sygnałów transport cząstek LDL przekazywanie sygnałów transport pęcherzykowy homeostaza wapnia homeostaza wapnia przekazywanie sygnałów
AnxA7	galektyna-3 sorcyyna	ontogeneza fuzja błon
AnxA11	PDCD6 sorcyyna	apoptoza fuzja błon
AnxA13	NEDD4	ubikwitylacja

Informacje umieszczone w tabeli zaczerpnięto z następujących prac [1,7,9-15]

nością zmiany swojej wewnątrzkomórkowej lokalizacji, migrując z cytosolu do błony plazmatycznej lub błon organelli komórkowych, takich jak endosomy, mitochondria i otoczka jądrowa [8,16]. Niskie powinowactwo wyizolowanych z tkanek aneksyn do Ca^{2+} w warunkach doświadczalnych ugruntowały na wiele lat po odkryciu tych białek przekonanie, że rola, jaką aneksyny odgrywają w organizmach ssaków w odpowiedzi komórek na sygnał wapniowy, nie jest aż tak ważna jak białek zawierających domeny „EF hand” i białek C2 [7,9]. Jednak wyniki najnowszych badań prowadzonych nad aneksynami w wielu laboratoriach na świecie, wskazują na udział tych białek nie tylko w regulacji zależnych od zmian stężenia Ca^{2+} procesów zachodzących w komórkach [7,16-18], ale także na wpływ aneksyn na właściwości błon biologicznych określane mianem „dynamiki błon” biologicznych [8,19,20].

Na podstawie wiedzy nagromadzonej na temat aneksyn, można wysunąć przypuszczenie, że aneksyny są zdolne do sprawowania swoistej „opieki” nad określonymi elementami strukturalnymi komórki, szczególnie wrażliwymi na zmiany środowiska i idące za tym zmiany przystosowawcze. W niniejszym artykule zostaną rozważone dwie możliwości. Pierwsza z nich, iż jednym z „czułych” miejsc w komórce jest jądro zapewniające stabilność materiałowi genetycznemu. Druga możliwość, iż elementem tym jest błona plazmatyczna wraz ze szkieletem błony, odpowiedzialna za zachowanie integralności, odrębności, charakterystycznego kształtu i właściwego funkcjonowania komórki. Wiąże się z tym konieczność zapobiegania uszkodzeniom błony plazmatycznej lub włączania w odpowiednim momencie mechanizmów naprawy, jeśli uszkodzenia się zdarzą [21]. A te zdarzają się często i związane są przede wszystkim ze stresem mechanicznym, np. stresem, któremu ulegają komórki mięśniowe w trakcie skurczu lub ze stresem towarzyszącym rozwojowi patologii, na przykład dystrofii mięśniowych [21]. Które z wymienionych miejsc, jądro czy błona plazmatyczna, a może oba, są miejscem, w którym aneksyny funkcjonują w komórce? Odpowiedź na to pytanie wiąże się z odpowiedzią na pytanie, gdzie aneksyny występują w komórce?

Analiza tej rodziny białek wskazuje, że aneksyny są to przede wszystkim białka rozpuszczalne, zlokalizowane w cytosolu, z których tylko pewna część w sposób odwracalny (lub nieodwracalny) wiąże się z błonami i cytoszkieletem [8]. Niewielka część populacji aneksyn w komórce, wydzielana jest na zewnątrz, gdzie białka te wspomagają oddziaływanie pomiędzy składnikami macierzy pozakomórkowej i błoną plazmatyczną. Obecność w cząsteczkach niektórych aneksyn, np. aneksyny A2 (AnxA2), sekwencji kierującej te białka do jądra, otwiera możliwość spojrzenia na funkcje aneksyn z perspektywy ich oddziaływań z genomem [22]. W przypadku AnxA1 podłoże tego zjawiska jest inne niż dla AnxA2. Stwierdzono, że w wyniku stymulacji komórek HEK293 estrami forbolu i aktywacji kinazy białkowej C delta AnxA1 ulega kontrolowanej proteolizie, a jej skrócona forma przemieszcza się z cytosolu do jądra komórkowego, gdzie może uczestniczyć w regulacji proliferacji i różnicowania komórek [23]. Zaobserwowano także, że AnxA1 wykazuje aktywność helikazy oraz w sposób zależny od zmian stężenia jonów wapnia wiąże się z czą-

steczkami RNA *in vitro* [24]. Ponadto wykazano, że AnxA1 bierze udział w organizacji bruzdy podziałowej w telofazie, a zahamowanie syntezy białka z wykorzystaniem techniki siRNA prowadzi do zaniku białek MKLP1 i Aurory B z centrum bruzdy podziałowej, czemu towarzyszą zaburzenia cytokinezy i apoptoza [25]. W przypadku wspomnianej już AnxA2, zidentyfikowano ją jako składnik kompleksu inicjującego transkrypcję i aktywację polimerazy DNA alfa [26]. Należy jednak podkreślić, że mimo zebranych informacji na temat jądrowej lokalizacji niektórych aneksyn i ich zdolności do oddziaływania z kwasami nukleinowymi, większość badaczy uważa, że białka te nie biorą udziału w stabilizacji genomu.

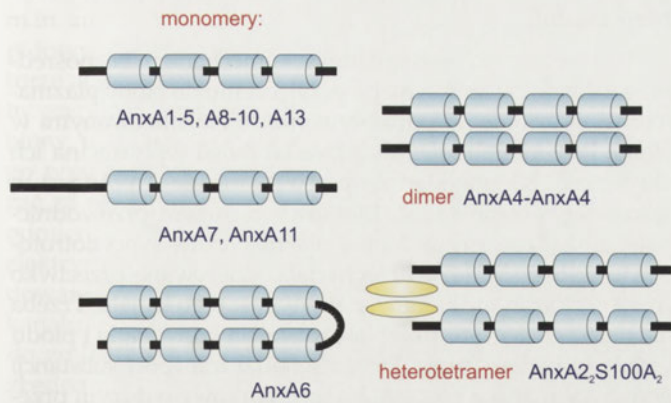
UDZIAŁ ANEKSYN W REGULACJI STRUKTURY BŁONY PLAZMATYCZNEJ

W dalszej części artykułu zostaną przedstawione dane doświadczalne świadczące o tym, że aneksyny wpływają na właściwości błony plazmatycznej i ściśle związanego z błoną cytoszkieletu. Na podstawie zgromadzonych informacji wydaje się, że aneksyny uczestniczą w organizacji strukturalnej błony plazmatycznej, wpływają na przepuszczalność błony dla jonów, uczestniczą w biorących swój początek na błonie plazmatycznej różnorodnych szlakach przekazywania sygnałów i w procesach dynamicznych, takich jak transport pęcherzykowy, reorganizacja szkieletu błony oraz udział w inicjowaniu procesu naprawy błony plazmatycznej uszkodzonej w wyniku zadziałania bodźca mechanicznego.

Wymienione przed chwilą procesy związane z błoną plazmatyczną są najistotniejsze dla zachowania integralności komórki i właściwego przebiegu wszystkich procesów metabolicznych. Można wysunąć przypuszczenie, że rozregulowanie funkcji aneksyn w komórce lub zmiany aktywności genów kodujących te białka, mogą mieć niebezpieczne skutki. Prześledźmy te niebezpieczeństwa na trzech dobrze udokumentowanych przykładach.

Przykład pierwszy to zaburzenia syntezy i transportu aneksyn, np. AnxA5, z cytosolu do błony plazmatycznej, towarzyszące chorobie Hughesa. Charakterystycznym dla tej choroby objawem jest wytwarzanie przeciwciał przeciwko cząsteczkom własnych fosfolipidów i białek, takich np. jak glikoproteina β_2 GPI. W łożysku cząsteczki aneksyn, których zawartość w tym organie osiąga do 2% wszystkich białek, tworzą warstwę ochronną na błonie syncytiotrofoblastów, zapobiegając w ten sposób koagulacji krwi, wywołanej przez kontakt czynników krzepnięcia krwi obecnych w osoczu z cząsteczkami fosfatydyloseryny zlokalizowanymi w błonie syncytiotrofoblastu. Zniszczenie warstwy aneksyn związanych z cząsteczkami fosfatydyloseryny w chorobie Hughesa przez wytwarzane przez organizm matki przeciwciała anty-AnxA5 wywołuje powstawanie skrzepów, prowadzi do nekrozy komórek i w konsekwencji do poronienia lub wchłonięcia embrionu [27,28].

Przykład drugi pokazuje wzrost inwazyjności nowotworu i liczby przerzutów, wynikający ze wzmożonej syntezy AnxA2 w komórkach nowotworowych. AnxA2 występuje w komórkach w trzech formach: monomeru, homodimeru i heterotetrameru (AnxA2₂S100A₂) w kompleksie z białkiem wiążą-



Rycina 2. Domenowa budowa aneksyn ssaków i ich formy spotykane w komórkach. Największą grupę wśród aneksyn tworzą białka monomeryczne o krótkim rejonie N-końcowym i rejonie rdzeniowym składającym się z czterech powtarzających się domen zawierających miejsca wiązania jonów wapnia i fosfolipidów. Drugi typ reprezentują aneksyny (AnxA7 i AnxA11), które mają długi rejon N-końcowy, zaś trzeci izoformy AnxA6, których rejon rdzeniowy zbudowany jest z ośmiu powtarzających się domen. Niektóre aneksyny występują w komórce jako dimery lub heterotetramery w połączeniu z białkami wiążącymi wapń z rodziny S100A.

cym wapń z rodziny S100 (Ryc. 2) [8]. Heterotetramer AnxA₂S100A₂ w pewnych sytuacjach, których mechanizm nie jest do końca wyjaśniony, może być ekspozycyjny na zewnętrznej powierzchni błony komórek nabłonka wyściełającego naczynia krwionośne lub naczyń zbierających mleko w gruczołach mlekowych, gdzie uczestniczy w regulacji przekształcania nieaktywnej formy proteazy – plazminogenu – w formę aktywną – plazminę, uczestniczącą w degradacji macierzy pozakomórkowej [29]. AnxA₂S100A₂ wiąże zarówno tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), jak i plazminogen. Aktywacja tego kompleksu ma kluczowe znaczenie w stymulacji inwazyjności tworzącego się nowotworu, z jednoczesną stymulacją angiogenezy sprzyjającej lepszemu ukrwieniu nowotworu. Dodatkowych argumentów na potwierdzenie znaczenia AnxA₂ dostarczają wyniki doświadczeń z zastosowaniem zwierząt z zablokowaną syntezą AnxA₂ (ANXA2^{-/-}), u których stwierdzono obniżony poziom plazminy i poważne kłopoty z usuwaniem z krwiobiegu tworzących się skrzepów [29,30].

Przykład trzeci to przypadek rozregulowania genomu myszy, u których doświadczalnie zahamowano syntezę AnxA7. Zwierzęta „knock-out” (ANXA7^{-/-}) umierały w 10. dniu życia embrionalnego. Heterozygoty z nieczynnym tylko jednym z alleli genu (ANXA7^{+/-}) kodującego AnxA7 przeżywały, ale charakteryzowały się wzmożoną podatnością na zachorowania na nowotwory. Powstające guzy nowotworowe zawierały bardzo niewiele AnxA7, czemu towarzyszył spadek aktywności innych genów supresorowych [31]. W tym miejscu należy przypomnieć, że produkty genów supresorowych, białka takie jak p53, BCRA1 i pRB, w prawidłowej komórce działają w kierunku ograniczenia proliferacji. Utrata lub inaktywacja obu kopii genu supresorowego powoduje utratę kontroli i ułatwia transformację komórki w komórkę nowotworową. Wiele wskazuje na to, że gen ANXA7 jest także genem supresorowym, którego utrata prowadzi do destabilizacji genomu i do rozwoju nowotworów [31].

Czy wymienione przykłady, mają związek z udziałem aneksyn w regulacji organizacji i funkcji błon komórko-

wych? By odpowiedzieć na to pytanie należy zanalizować mechanizmy biologicznej aktywności aneksyn. Pytanie o funkcje aneksyn w komórce jest zadawane przez badaczy od momentu odkrycia tych białek w 1978 roku [32]. Niemal w trzydzieści lat po tym odkryciu, nasza wiedza na temat funkcji tych białek w komórce jest nadal niewielka, bez względu na optymizm wielu naukowców.

Jedną z najczęściej wyrażanych funkcji jest udział aneksyn w regulacji struktury błony plazmatycznej, ze szczególnym naciskiem na powstawanie i rozpad mikrodomen błony o specyficznym składzie chemicznym, w których współdziałały zarówno integralne białka błony, jak i białka powierzchniowe oraz białka szkieletu błony [33-35]. Wiele wskazuje, że mikrodomeny są platformami sygnałowymi, na których teren są rekrutowane specyficzne białka [36]. Istnieją dane, że mikrodomeny odgrywają główną rolę w procesie endocytozy, a także w odpowiedzi immunologicznej organizmu i w supresji nowotworów. Opublikowane już obserwacje świadczą o udziale aneksyn w powstawaniu mikrodomen, w organizacji wyspecjalizowanych kompleksów sygnałowych zlokalizowanych na terenie domeny określonego typu i w stabilizacji utworzonych mikrodomen.

Badania nad uczestnictwem aneksyn w powstawaniu mikrodomen błony prowadzone są *in vitro* i *ex vivo*. Z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych (ang. *atomic force microscope*), wykazano np., że tetramer AnxA₂S100A₂ w obecności wapnia indukuje w sztucznych błonach lipidowych zbudowanych z fosfatydylocholiny i fosfatydyloseryny powstawanie mikrodomen wzbogaconych w fosfatydyloserynę. Mechanizm formowania domeny polega w tym przypadku na ograniczeniu lateralnego ruchu cząsteczek fosfolipidów (ruchu w płaszczyźnie błony) przez cząsteczki białka [37]. Podobny mechanizm leży prawdopodobnie u podstaw powstawania mikrodomen wzbogaconych w fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforan (PIP₂) i stabilizowanych przez cholesterol; z oboma typami lipidów tetramer AnxA₂S100A₂ wiąże się *in vitro* [38]. W doświadczeniu przeprowadzonym na komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy zaobserwowano powstawanie mikrodomen błony plazmatycznej odpornych na solubilizację detergentem niejonowym, tak zwanych domen DRM (ang. *detergent resistant membrane*) przypominających swoim składem lipidowym „tratwy lipidowe”. Na terenie tych domen współwystępowały AnxA₂ (inaczej określana jako białko p36), białko S100A (inaczej określane jako białko p11) oraz charakterystyczne białka tratw Syt i flotyllina, co sugeruje uczestnictwo aneksyn w tworzeniu specyficznych kompleksów białkowych na terenie mikrodomen [34].

Wydaje się, że aneksyny specyficznie oddziałując z określonymi białkami, uczestniczą w ich rekrutacji na teren mikrodomen i w przestrzennej organizacji powstających kompleksów sygnałowych (sygnałosomów). Przykładami wieloskładnikowych sygnałosomów zlokalizowanych na terenie mikrodomen jest kompleks białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału powstającego w wyniku stymulacji komórek naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF), którego składnikami są białka Raf-1, Ras, p120^{GAP}, PKCα i AnxA6 [39,40]. Niedawno zidentyfikowano także kompleks tetrameru AnxA₂S100A₂ z białkami zonulą occludens-1, okcludyną i kładyną-1, który uczestniczy w organizacji miejsc ścisłego kontaktu pomiędzy komórkami

[41]. Wspomniany tetramer w kompleksie z białkiem AHNAK i aktywną reguluje organizację szkieletu błony [42] lub jest odpowiedzialny za kierowanie kanału potasowego TASK-1 do określonego miejsca na błonie [43]. W tym ostatnim przypadku oddziaływanie tetrameru AnxA₂S100A₂ z białkiem TASK-1 opóźnia transport tego białka z siateczki śródplazmatycznej do błony plazmatycznej, co może mieć znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy jonowej. Inne opisane w literaturze przykłady tworzących się kompleksów wskazują na udział aneksyn w regulacji lokalizacji kinaz białkowych TRPM7 i PKC delta w komórce, a więc ilustrują potencjalne mechanizmy regulacji szlaków sygnałowych, w których wymienione kinazy uczestniczą [44,45].

Aneksyny uczestniczą w tworzeniu mikrodomen błony o określonym składzie lipidowym: domen wzbogaconych w glicerofosfolipidy (jak fosfatydyloseryna lub PIP₂) lub domen przypominających tratwy lipidowe, wzbogaconych w glikosfingolipidy i cholesterol [37,38]. Uczestniczą także w regulacji sortowania białek w komórce i ich rekrutacji na teren wyspecjalizowanych mikrodomen błony plazmatycznej [34]. Jako trzecią możliwość reprezentują wyniki doświadczeń sugerujące udział aneksyn w stabilizacji mikrodomen bogatych w glikosfingolipidy i cholesterol, od których stabilności zależy aktywność 5'-ektonukleotydyazy, enzymu uczestniczącego w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich. 5'-ektonukleotydaza jest enzymem, którego centrum aktywne jest eksponowane na zewnątrz komórki, zakotwiczonym w błonie przez cząsteczkę glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI) i zlokalizowanym na terenie tratwy lipidowej. Enzym ten jest odpowiedzialny za hydrolizę ATP (agonisty skurczu mięśni gładkich) do adenozyliny (antagonisty skurczu). Aktywność 5'-ektonukleotydyazy zależy od stabilności tratw lipidowych, w których enzym jest zakotwiczony. Destabilizacja tratwy wywołuje inaktywację enzymu [46]. W ostatnich latach przedstawiono dobrze udokumentowaną teorię, że aneksyny w komórkach mięśni gładkich, w tym AnxA₂, uczestniczą w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego poprzez przekazywanie zmian wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ na zewnątrz komórki i regulując w ten sposób aktywność 5'-ektonukleotydyazy. Ciąg zdarzeń jest następujący. Stymulacja komórek mięśnia gładkiego powoduje napływ Ca²⁺ do cytosolu i skurcz mięśnia. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ prowadzi do związania się aneksyn z błoną, formowania się tratw lipidowych, ich stabilizacji i aktywacji 5'-ektonukleotydyazy. ATP ulega hydrolizie do adenozyliny, która łączy się ze swoim receptorem na błonie, inicjując kaskadę zdarzeń, w wyniku których stężenie Ca²⁺ w cytosolu spada, aneksyny dysocjują od błony, tratwy lipidowe ulegają destabilizacji, a aktywność 5'-ektonukleotydyazy zostaje zahamowana. Następuje rozkurcz mięśnia [46].

WPŁYW ANEKSYN NA ZMIANY PRZEPUSZCZALNOŚCI BŁONY DLA JONÓW

Aneksyny odznaczają się prawdopodobnie zdolnością do zmiany przepuszczalności błony dla jonów. Opublikowane dotąd wyniki doświadczeń świadczą o regulacji przez aneksyny aktywności kanałów jonowych zlokalizowanych w błonie plazmatycznej (mechanizm pośredni) lub wskazują na możliwość tworzenia przez aneksyny kanałów jono-

wych, po wbudowaniu się tych białek w błonę (mechanizm bezpośredni).

Pierwszy z tych mechanizmów – mechanizm bezpośredni – zakłada, że aneksyny po przyłączeniu do błony plazmatycznej są zdolne do oddziaływania ze zlokalizowanymi w błonie kanałami jonowymi, przez co mogą wpływać na ich aktywność. Na przykład zaobserwowano, że AnxA₆ jest w stanie aktywować kanał chlorkowy o dużym przewodnictwie, zlokalizowany w błonie plazmatycznej syncytiotrofoblastu w łożysku [47]. Przeciwnie, skierowane przeciwko AnxA₆, okazały się hamować aktywność tego kanału. Trzeba pamiętać, że syncytiotrofoblast rozdziela krew matki i płodu i stanowi barierę, przez którą zachodzi transport substancji pomiędzy matką a płodem. Kanał chlorkowy o dużym przewodnictwie, regulowany przez AnxA₆, uczestniczy w wewnątrzkomórkowej homeostazie jonowej i zmianach objętości komórek [47]. Wykazano także, że tetramer AnxA₂S100A₂ moduluje aktywność kanałów wapniowych, TRPV5 i TRPV6, zlokalizowanych w błonie plazmatycznej komórek nabłonka pęcherza moczowego i jelita. Kanały te, pozostające pod kontrolą hormonalną, są odpowiedzialne za odzyskiwanie jonów wapnia z moczu lub z treści jelitowej [48]. Pytanie, w jaki sposób aneksyny modulują aktywność innych systemów transportu jonów, pozostaje niestety bez odpowiedzi. Wielu badaczy przypuszcza, że aneksyny mogą lokalnie zmieniać strukturę błony w pobliżu białka kanałowego. Inni badacze sądzą, że aneksyny oddziałują bezpośrednio z białkiem kanałowym. W przypadku kanałów TRPV5 i TRPV6, tetramer AnxA₂S100A₂ wpływa na ich lokalizację w błonie plazmatycznej [48]. Bezpośrednio oddziaływanie aneksyny z białkiem transportującym jony wykazano w przypadku AnxA₅ oddziałującej z wymiennikiem sód/wapń oraz kaweoliną-3 w komórkach mięśnia serca [49].

Bezpośredni mechanizm zmian przepuszczalności błony dla jonów, zależnych od aneksyn, opiera się na wynikach doświadczeń *in vitro*, przeprowadzonych z zastosowaniem techniki „czarnych błon lipidowych” (ang. *black lipid membranes*), którą wykorzystuje się do pomiaru elektrycznych właściwości błony. Zaobserwowano, że niektóre z aneksyn, takie jak AnxA₆ człowieka, AnxA₅ szczura i AnxB12 *Hydra vulgaris*, są w stanie zmieniać przepuszczalność sztucznej błony lipidowej dla jonów, po zadziałaniu określonego bodźca [50-53]. W przypadku AnxA₆ była to obecność w środowisku pomiarowym GTP. W wyniku dodania GTP obserwowano wbudowanie się AnxA₆ w sztuczną błonę i stwierdzono aktywność białka jako zależnego od potencjału elektrycznego błony kanału jonowego, charakteryzującego się brakiem specyficzności w stosunku do transportowanych kationów. Stosunek liczby jonów wapnia transportowanych na jednostkę czasu do liczby kationów jednowartościowych wyniósł w przypadku kanału utworzonego przez cząsteczkę AnxA₆ 4:1 [50,51]. W przypadku „klasycznych” kanałów wapniowych stosunek ten wynosi co najmniej 1000:1. Podobną aktywność jako kanału jonowego zaobserwowano w przypadku aneksyn AnxA₅ i AnxB12. Bodźcem, który inicjował tworzenie kanału, było obniżenie pH środowiska pomiarowego do wartości poniżej 6,0 [52].

Przedstawione obserwacje i podobne poczynione przez niezależnych badaczy wywołały dyskusję na temat możli-

wych mechanizmów tworzenia przez białka rozpuszczalne, m.in. aneksyny, kanałów jonowych w sztucznych błonach lipidowych. Niektórzy z badaczy uważając, że odcinki o strukturze alfa-helikalne w cząsteczkach aneksyn są zbyt krótkie, by zagwarantować pełną penetrację duwarstwy lipidowej błony przez aneksynę, na podobieństwo białka integralnego typu I, zakładali, że monomery aneksyny można uważać za minielektroporatory, które naładowane elektrycznie, odmiennie od powierzchni błony, wywołują wyładowanie elektryczne, dzięki istniejącej różnicy potencjałów. Wyładowanie to powoduje krótkotrwałe wytworzenie w błonie kanału zdolnego przepuszczać kationy; w tym wypadku do zmiany przepuszczalności błony dla jonów nie jest niezbędna penetracja białka w hydrofobowy rejon błony [54]. Inni badacze uważają, że cząsteczki aneksyn w pierwszym etapie tworzą na powierzchni błony trimery [55], które następnie dalej oligomeryzują przekształcając się w heksamery tworzące „prawdziwy” kanał jonowy w błonie [56,57]. Na podstawie analizy struktury kryształów AnxB12 z *Hydra vulgaris* badacze amerykańscy i niemieccy stworzyli teoretyczny model heksameru białka, z hydrofilowym porem w centrum kompleksu, zdolnym przepuszczać aniony. Model ten zakłada dodatkowo, że oddziaływania pomiędzy monomerami białka i lipidami błony są stabilizowane przez jony wapnia [56]. W oparciu o wyniki doświadczeń polegających na znakowaniu białek sondami fluorescencyjnymi i obserwowaniu zachodzenia zjawiska bezpromienistego przekazywania energii fluorescencji, wspomniani badacze zweryfikowali stworzony teoretycznie model stwierdzając, że AnxB12 ulega przekształceniom w komórkach z formy związanej z powierzchnią błony w pH 7,0 w sposób charakterystyczny dla innych aneksyn, czyli zależny od stężenia jonów wapnia, w formę przypominającą białka integralne błony, kiedy wartość pH lokalnie spadnie poniżej 6,0. W takich warunkach AnxB12 ulega wbudowaniu w błonę w formie monomeru i wykazuje w warunkach *in vitro* aktywność kanału jonowego [57]. Wypada jednak w tym miejscu nadmienić, że jakkolwiek wzrasta liczba obserwacji poczynionych w toku doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro*, że aneksyny po ich wbudowaniu w sztuczne błony lipidowe, mają aktywność podobną do kanałów jonowych, nikt jak dotąd nie zaprezentował bezpośredniego dowodu, że aneksyny są zdolne do tworzenia kanałów jonowych *in vivo*. Wynika to między innymi z faktu, że jak dotąd nie udało się zidentyfikować związków farmakologicznych, które w specyficzny sposób wyłączałyby w komórkach aktywność aneksyn jako kanałów jonowych. Wydaje się, że poznanie mechanizmów modulowania przez aneksyny półprzepuszczalnych właściwości błony plazmatycznej może mieć fundamentalne znaczenie dla zrozumienia udziału aneksyn w utrzymywaniu wewnątrzkomórkowej równowagi jonowej, zarówno w normie, jak i w patologii [57].

UDZIAŁ ANEKSYN W TRANSPORCIE PĘCHERZYKOWYM

Wcześniej wspomniano o zdolności aneksyn do indukcji i stabilizacji mikrodomen błon plazmatycznych. W świetle wyników najnowszych badań, niektóre z typów tych mikrodomen wydają się być prekursorami wyspecjalizowanych pęcherzyków transportujących biorących udział w procesach endo- i egzocytozy. Ma to niewątpliwie zwią-

zek z udziałem aneksyn w transporcie pęcherzykowym niektórych substancji [58].

Udział aneksyn w transporcie cholesterolu ilustruje następujący przykład. Cholesterol w krwiobiegu jest transportowany w formie cząstek lipoprotein o małej gęstości (LDL) w postaci związanej z białkami i innymi lipidami. Cząstki LDL wiążą się ze swoimi receptorami na powierzchni komórki, a powstające kompleksy receptor-LDL dostają się do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Powstające z dołków opłaszczonych szkieletem klatrynowym pęcherzyki transportujące, po usunięciu płaszczka klatrynowego, ulegają fuzji z endosomami, w których panuje niższe niż w cytoplazmie pH. Prowadzi to dysocjacji cząstek LDL od ich receptorów. Receptory powracają w pęcherzykach transportujących na powierzchnię komórki, a cząstki LDL dostają się do lizosomów, gdzie ulegają degradacji do elementów składowych, lipidów i aminokwasów, które są wykorzystywane w komórce m.in. do budowy błon. W procesie endocytozy uczestniczy między innymi płaszcz klatrynowy oraz szkielet spektrynowy. Szkielet ten, przed odpączkowaniem od błony plazmatycznej pęcherzyka transportującego z cząsteczkami LDL, ulega głębokiej reorganizacji, w której uczestniczą proteazy cysteinowe, np. kalpaina. Wykazano, że w niektórych typach komórek, np. w fibroblastach, AnxA6 aktywuje kalpainę, przyczyniając się do częściowej degradacji szkieletu spektrynowego, co prowadzi w konsekwencji do uwolnienia pęcherzyka transportującego. AnxA6 uczestniczy także w dalszych etapach endocytozy cząstek LDL, biorąc udział w przekształceniu wczesnych endosomów w prelizosomy [59-61].

W innym typie transportu pęcherzykowego, w wydzielaniu przekazywanych w procesie egzocytozy, uczestniczy prawdopodobnie inna aneksyna, AnxA4. Komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy wydzielają katecholaminy w odpowiedzi na określony bodziec [62]. Ważną rolę w regulacji wydzielania katecholamin odgrywają jony wapnia. Wydzielanie katecholamin odbywa się na drodze regulowanej egzocytozy, której mechanizm w zasadniczy sposób różni się od wydzielania przekazywanych w komórkach nerwowych, w którym uczestniczą białka SNARE, takie jak SNAP, VAMP, SNAP-25 i syntaksyna. W wypadku komórek chromochłonnych, w badaniach których powszechnie wykorzystywana jest linia komórek PC12 uzyskana z guza rdzenia nadnerczy szczura, stwierdzono, że podstawową rolę w wydzielaniu katecholamin odgrywają kanały wapniowe typu N i L regulowane zmianami potencjału błonowego, odpowiedzialne za napływ wapnia do pobudzonej komórki oraz białka pęcherzyka wydzielniczego - rabfilina i syntaksyna-1. Wykazano, że AnxA4 oddziałuje z domeną C2B rabfiliny, powodując powstawanie funkcjonalnego w procesie endocytozy kompleksu rabfilina-AnxA4-synaptotagmina-1, którego powstawanie i rozpad regulowane są przez zmiany stężenia jonów wapnia w komórce, a czujnikiem wapnia jest właśnie AnxA4 [63].

Ważnym etapem w procesie transportu pęcherzykowego jest agregacja pęcherzyków transportujących i ich zlewianie się ze sobą lub z błoną plazmatyczną, czyli tzw. fuzja błon. Aneksyny są białkami zdolnymi do „katalizowania” wymienionych procesów *in vitro*. AnxA2, zarówno jako monomer, jak i heterotetramer w kompleksie z białkami S100A, w obec-

ności jonów wapnia stymuluje agregację liposomów, tworząc połączenia pomiędzy liposomami [64]. Badacze przypuszczają, że zdolność ta ma znaczenie fizjologiczne. W innym typie doświadczeń badano fuzję pęcherzyków magazynujących związki powierzchniowo czynne z błoną plazmatyczną [65]. Błony pęcherzyków wyizolowanych z komórek alweolarnych typu II z płuc znakowano sondą fluorescencyjną R18. Metoda pomiaru polegała na wykorzystaniu zjawiska samowygaszania fluorescencji sondy ze względu na jej wysokie stężenie w błonie pęcherzyka. Tylko podczas fuzji błony pęcherzyka z błoną plazmatyczną nie wyznakowaną sondą, w wyniku rozcieńczenia sondy, jej fluorescencja wzrastała, świadcząc o zajściu fuzji błon. Wykazano, stosując cytosol z komórek alweolarnych zawierający AnxA2, że białko to stymuluje fuzję błon; użycie w doświadczeniu przeciwciała anti-AnxA2 lub usunięcie AnxA2 z cytosolu z zastosowaniem immunoprecypitacji hamowało ten proces. Dodatkowo, dodanie AnxA2 z powrotem do mieszaniny pomiarowej po 120 lub 300 sekundach przywracało proces fuzji, wykazując, że to właśnie AnxA2 jest białkiem stymulującym fuzję błon [64].

PROCESY NAPRAWY BŁON, W KTÓRYCH UCZESTNICZĄ ANEKSYNY

Ostatnio opublikowano dane świadczące o zaangażowaniu aneksyn w jeszcze jednym procesie związanym z błonami, mianowicie w procesie naprawy błon uszkodzonych w wyniku zadziałania bodźca mechanicznego [21]. Naprawa błon jest kluczowym procesem zachodzącym bez przerwy w komórkach. Błony komórek poddanych stresowi mechanicznemu lub uszkodzone w stanach patologicznych, mogą charakteryzować się obecnością otworów o średnicy przekraczającej jeden mikrometr. W warunkach normy mechanizmy zapobiegające uszkodzeniom i mechanizmy naprawy skutecznie chronią komórki przed utratą integralności. Szczególnie mechanizmy naprawy błon są w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań, w których używane są zwierzęta transgeniczne [21]. Wyniki tych badań wskazują na udział białek SNARE w procesie naprawy błon, w którym można wyróżnić następujące etapy. Od błony komórki poddanej stresowi mechanicznemu odrywają się fragmenty, które w wyniku lokalnego wzrostu stężenia jonów wapnia napływających do komórki ze środowiska zewnętrznego, tworzą pęcherzyki mogące dodatkowo łączyć się ze sobą na drodze fuzji. Powstający większy pęcherzyk na podobieństwo łatki łączy brzegi rozerwanej błony plazmatycznej, ulega z nią fuzji wypełniając w ten sposób otwór i przywracając ciągłość błony. Wśród innych białek, które odgrywają w tym procesie rolę, oprócz białek SNARE wymienia się dysferlinę, która jest białkiem zależnym od stężenia jonów wapnia i która posiada zdolność katalizowania fuzji błon. Myszy mutanty z uszkodzonym genem kodującym dysferlinę nie są w stanie naprawiać uszkodzeń błony plazmatycznej komórek mięśni szkieletowych, komórek szczególnie narażonych na stres mechaniczny. Dodatkowo wykazano, że w komórkach HeLa poddanych stresowi mechanicznemu w warunkach doświadczalnych AnxA1 kolokalizuje z dysferliną, wiąże się w sposób zależny od zmian stężenia jonów wapnia z uszkodzoną błoną i stymuluje fuzję pęcherzyka-łatki z miejscem uszkodzenia. Zastosowanie przeciwciał przeciwko AnxA1 prowadziło do zahamowania procesu naprawy błon w komórkach HeLa. Wydaje się, że opisany mechanizm naprawy błon zachodzi w wielu typach komórek i ma szczególne znaczenie w nagłych

wypadkach, wymagających natychmiastowej akcji ratunkowej (w ciągu 1-2 sekund) [21].

ANEKSYNY SĄ ODPOWIEDZIALNE ZA PRAWIDŁOWE FUNKCJE BŁON

Zaburzenia funkcji aneksyn lub zaburzenia poziomu syntezy tych białek w komórce mają fundamentalne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania błony plazmatycznej, dla zachowania przez komórki integralności i wymiany informacji pomiędzy cytosolem a środowiskiem zewnętrznym, szczególnie w niektórych tkankach i organach, w których poziom aneksyn jest wysoki. Tego rodzaju funkcje ochronne aneksyn są szczególnie dobrze widoczne w procesie mineralizacji tkanek, dzięki któremu tworzy się i jest odnawiany szkielet kostny oraz w procesie skurczu mięśni gładkich, w którym ważną rolę odgrywa domenowa budowa błony plazmatycznej komórki mięśniowej, utrzymywana przez współdziałające ze sobą aneksyny.

Proces biomineralizacji zachodzący w płytce wzrostowej kości, w którym uczestniczą aneksyny, jest jednym z najintensywniej badanych [65]. W płytce wzrostowej zlokalizowane są komórki kompetentne w mineralizacji, na przykład hipertroficzne chondrocyty. Z błony plazmatycznej chondrocytów odłączają się otoczone błoną struktury zwane pęcherzykami macierzy pozakomórkowej. W pęcherzykach macierzy dochodzi do gromadzenia Ca^{2+} i nieorganicznego fosforanu (P), co prowadzi do wytworzenia pierwotnej fazy mineralnej. Temu zjawisku towarzyszy śmierć chondrocytów na drodze apoptozy. Aneksyny obecne w pęcherzykach macierzy pozakomórkowej, przede wszystkim AnxA2, AnxA5 i AnxA6, wydają się uczestniczyć przynajmniej w trzech etapach mineralizacji: i) wewnątrz pęcherzyków macierzy bezpośrednio w tworzeniu fazy mineralnej, wpływając na jakość powstających kryształów hydroksyapatytu; ii) na zewnątrz pęcherzyków macierzy, w oddziaływaniach z włóknami kolagenu typu II i X, które prawdopodobnie regulują napływ jonów wapnia do wnętrza pęcherzyków i iii) w błonie pęcherzyków tworząc kanały jonowe, przez które jony wapnia mogą być transportowane ze środowiska zewnętrznego. Ta ostatnia z wymienionych funkcji została potwierdzona przez zastosowanie niespecyficznego inhibitora kanałów jonowych tworzonych przez aneksyny, pochodnej benzodiazepiny K-201 [65-67].

Inny przykład współdziałania zespołu aneksyn, reprezentuje udział tych białek w organizacji błony plazmatycznej komórki mięśnia gładkiego. Wspomniano wcześniej, że aneksyny uczestniczą w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich, wpływając na aktywność 5'-ektonukleotydazy zlokalizowanej na terenie domeny błony plazmatycznej, kaweoli. Błona plazmatyczna komórki mięśnia gładkiego charakteryzuje się kompleksową budową, na którą składają się połączenia adhezyjne (ang. *adherens junctions*), przenoszące napięcie mięśniowe do otaczającej mięsień tkanki łącznej i rejonny giętkie (ang. *hinge*), w których zlokalizowane są wpuklenia błony plazmatycznej – kaweole. Ich struktura jest dodatkowo wzmocniona rodzajem szkieletu podbłonowego, w którego skład wchodzi kaweolina-1. Błona plazmatyczna komórki mięśnia gładkiego jest dodatkowo podzielona na rejony, w których lipidy występują w postaci ciekło-kryształicznej (rejony bogate w cholesterol i lipidy z resztami nasyconych kwasów

łuszczowych) oraz rejony bardziej płynne, zawierające glicerofosfolipidy z resztami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Określone rejony błony wiążą się z określonymi elementami szkieletu błony. Wykazano, że w mięśni gładkim są syntetyzowane co najmniej cztery aneksyny: AnxA1, AnxA2, AnxA4 i AnxA6. Aneksyny te różnią się od siebie powinowactwem do jonów wapnia i w zależności od tego zdolnością do oddziaływania z błoną plazmatyczną. W stężeniu jonów wapnia poniżej 100 nM aneksyny obecne są w cytosolu. W wyniku wzrostu stężenia jonów wapnia do około 300 nM AnxA2 ulega przemieszczeniu do sarkolemy jako pierwsza, wywołując asocjację kaweoli w superdomeny. W stężeniu jonów wapnia około 600 nM AnxA6 wiąże się z superdomeną, a powyżej 1000 nM stężenia jonów wapnia, dodatkowo do superdomeny przyłączają się AnxA4 i AnxA1 stabilizując ją. W wyniku spadku stężenia jonów wapnia poniżej 100 nM aneksyny dysocjują od błony, a superdomena ulega rozpadowi. W ten właśnie sposób aneksyny uczestniczą w przestrzennym zróżnicowaniu błony plazmatycznej komórki mięśniowej, czyniąc ją zdolną do zróżnicowanej odpowiedzi na bodźce płynące z zewnątrz, co ma znaczenie w regulacji cyklu skurczowo-rokurczowego mięśni gładkich [68].

Wymienione powyżej tkanki charakteryzują się wysokim poziomem aneksyn, ich różnorodnością oraz tym, że aneksyny występujące w tych tkankach są prawdopodobnie zdolne do częściowego zastępowania swoich funkcji, w przypadku niedoboru jednej z nich. Można spodziewać się, że zablokowanie syntezy tylko jednego typu aneksyny, zaskakująco może nie spowodować zauważalnych zmian fenotypu. I tak jest istotnie. Mutanty myszy, u których zablokowano syntezę AnxA5, białka uczestniczącego w mineralizacji tkanek i kościotworzeniu, okazały się w pełni płodne, a ich czas życia nie odbiegał od normy. Ku zaskoczeniu badaczy, rozwój układu kostnego i chrzęstnego tych zwierząt przebiegał prawidłowo, z czego wyciągnięto wniosek, iż albo AnxA5 nie jest niezbędna w procesie mineralizacji, albo inne aneksyny, AnxA2, AnxA6 i AnxA7, których synteza nie jest zaburzona u myszy-mutantów, zastępują ją [69].

Do podobnych wniosków doszli badacze, którzy wychodowali myszy-mutanty niezdolne do syntezy AnxA6. Otrzymane zwierzęta były płodne, a ich mięsień sercowy pozostawał w normie. Zaobserwowano jedynie niegroźne dla życia zwierzęcia niewielkie zmiany częstości skurczu mięśnia. Dodatkowo wykazano, że synteza innych białek ważnych w funkcjonowaniu mięśnia sercowego, takich jak receptory rianodynowe RyR2, Ca²⁺-ATPaza typu SERCA i aktyna, nie uległa zmianie. Wyciągnięto stąd wniosek, że funkcje AnxA6 u myszy-mutantów, takie jak modulowanie aktywności wymiennika sód-wapń lub aktywności Ca²⁺-ATPazy, przejmują inne aneksyny obecne w mięśni sercowym, AnxA5 i AnxA2, których tempo syntezy nie zmieniło się u zwierząt doświadczalnych. Do podobnych wniosków doszli badacze, którzy zaobserwowali brak zmian poziomu syntezy AnxA6 w mięśni sercowym po zawale [70].

PODSUMOWANIE

Wydaje się, że przypuszczenie, iż ewolucja organizmów na naszej planecie doprowadziła do wytworzenia w komórkach ssaków wysokosprawnego systemu składającego się z wielu aneksyn, w świetle naszej wiedzy na temat tych białek, jest

w pełni usprawiedliwione. Mimo postępującej specjalizacji, aneksyny zachowały podobne cechy, warunkujące ich podstawowe zdolności, takie jak wiązanie się z błonami w komórce o różnym składzie chemicznym w sposób zależny od zmian stężenia jonów wapnia. Aneksyny odznaczają się bardzo podobną budową cząsteczki i zdolnością do wiązania tych samych ligandów, szczególnie fosfatydyloseryny, fosforanów fosfatydyloinozytoli, cholesterolu, białek S100 wiążących jony wapnia i F-aktyny. Wykazują także potencjalną zdolność do pełnienia podobnych funkcji, np. tworzenia w błonach kanałów jonowych lub oddziaływania z szkieletem aktynowym. Dzięki tym podobieństwom aneksyny mogą się wzajemnie zastępować. W przypadku problemów z jedną z aneksyn ulega włączeniu mechanizm rekompensujący, np. przejście funkcji brakującej aneksyny przez inną, której tempo syntezy w komórce pozostaje niezakłócone. Potwierdzeniem takiej możliwości jest fakt, że w komórkach, w których płynna regulacja dynamicznej struktury błony i szkieletu komórkowego może być wręcz szkodliwa, tam obecność aneksyn nie jest pożądana. Taka sytuacja ma miejsce w erytrocytach, wyspecjalizowanych komórkach o charakterystycznym kształcie, w których aneksyny prawdopodobnie nie występują.

W 2005 roku w *Nature Reviews (Molecular Cell Biology)* ukazała się praca przeglądowa [16] autorstwa profesorów Volkera Gerke z Uniwersytetu w Münster w Niemczech, prezesa Europejskiego Towarzystwa Wapniowego, Carla E. Creutz z Uniwersytetu w Charlottesville w USA, jednego z odkrywców aneksyn oraz Stephena E. Mossa z Instytutu Oftalmologii w Londynie w Anglii, wybitnego badacza aneksyn i redaktora pierwszej monografii naukowej poświęconej tym białkom [17]. Wspomniani naukowcy w nowatorski sposób podsumowali niemal 30 lat, które upłynęły od momentu odkrycia aneksyn, białek wiążących jony wapnia i lipidy błon biologicznych. Trzej cytowani badacze aneksyn, podając przekonujące argumenty stwierdzili, że z wyników badań nad aneksynami wyłania się coraz bardziej spójny obraz tych białek jako makrocząsteczek wiążących procesy przekazywania sygnału wapniowego w komórce z dynamiką błon biologicznych [16]. To tak ważne miejsce w metabolizmie komórkowym wynika z powszechności występowania aneksyn w organizmach żywych, ich zdolności do reagowania na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺, oddziaływania z wieloma białkami komórki, wiązania lipidów błon biologicznych oraz uczestniczenia w tak istotnych dla całego organizmu procesach, jak transport pęcherzykowy i transport jonów przez błony.

Powielenie liczby genów kodujących aneksyny było formą przystosowania organizmów w trakcie ich ewolucji do zmiennych warunków środowiska, było przystosowaniem ze względów bezpieczeństwa, warunkującym sukces ewolucyjny ssaków. W sytuacjach kryzysowych aneksyny mogą wzajemnie zastępować swoje funkcje. A są to funkcje szczególnej wagi, sprawowanie „opieki” nad strukturą i funkcjonowaniem błony plazmatycznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Moss SE, Morgan RO (2004) The annexins. *Genome Biol* 5: 219.1-219.8
2. Cantero A, Barthakur S, Bushart TJ, Chou S, Morgan RO, Fernandez MP, Clark GB, Roux SJ (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 44: 13-24


3. Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, Gonzalez-Florez MI, Fernandez MP (2004) Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1742: 133-140
4. Morgan RO, Martin-Almedina S, Garcia M, Jhoncon-Kooyip J, Fernandez MP (2006) Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1238-1249
5. Morgan RO, Fernandez MP (1997) Annexin gene structure and molecular evolution genetics. *Cell Mol Life Sci* 53: 508-515
6. Morgan RO, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Balsara BR, Testa JR, Fernandez MP (1999) Novel human and mouse annexin A10 are linked to the genome duplications during early chordate evolution. *Genomics* 60: 40-49
7. Bandorowicz-Pikula J (red) (2003) *The annexins: biological importance and annexin-related pathologies*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY & Landes Bioscience, Georgetown, TX, str. 273
8. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82: 331-371
9. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE (2004) Annexin-actin interactions. *Traffic* 5: 571-576
10. Chang N, Sutherland C, Hesse E, Winkfein R, Wiehler WB, Pho M, Veillette C, Li S, Wilson DP, Kiss E, Walsh MP (2007) Identification of a novel interaction between the Ca²⁺-binding protein S100A11 and the Ca²⁺- and phospholipid-binding protein annexin A6. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1417-C1430
11. John CD, Sahni V, Mehet D, Morris JF, Christian HC, Perretti M, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC (2007) Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. *FASEB J* 21: 1037-1046
12. Penner R, Fleig A (2007) The Mg²⁺ and Mg²⁺-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol* 179: 313-328
13. Singh P, Wu H, Clark C, Owlia A (2007) Annexin II binds progastrin and gastrin-like peptides, and mediates growth factor effects of autocrine and exogenous gastrins on colon cancer and intestinal epithelial cells. *Oncogene* 26: 425-440
14. Syed SP, Martin AM, Haupt HM, Arenas-Elliott CP, Brooks JJ (2007) Angiostatin receptor annexin II in vascular tumors including angiosarcoma. *Hum Pathol* 38: 508-513
15. Yoo JC, Hayman MJ (2007) Annexin II binds to SHP2 and this interaction is regulated by HSP70 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 906-911
16. Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449-461
17. Moss SE (red) (1992) *The annexins*. Portland Press, London and Chapel Hill, str. 173
18. Seaton BA (red) (1996) *Annexins: from molecular structure to cellular function*. RG Landes Company, Austin i Chapman & Hill, New York, Albany, Bonn, Boston, Cincinnati, Detroit, London, Madrid, Melbourne, Mexico City, Pacific Grove, Paris, San Francisco, Singapore, Tokyo, Toronto, Washington, str. 245
19. Kaetzel MA, Dedman JR (1995) Annexins: novel Ca²⁺-dependent regulators of membrane function. *News Physiol Sci* 10: 171-176
20. Gerke V, Moss SE (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357: 129-154
21. McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL (2006) The requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem* 281: 35202-35207
22. Liu J, Rothermund CA, Ayala-Sanmartin J, Vishwanatha JK (2003) Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II. *BMC Biochem* 4: 10
23. Kim YS, Ko J, Kim IS, Jang SW, Sung HJ, Lee HJ, Lee SY, Kim Y, Na DS (2003) PKCdelta-dependent cleavage and nuclear translocation of annexin A1 by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Eur J Biochem* 270: 4089-4094
24. Hirata A, Hirata F (1999) Lipocortin (Annexin) I heterotetramer binds to purine RNA and pyrimidine DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 200-204
25. Tomas A, Futter C, Moss SE (2004) Annexin 11 is required for mid-body formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. *J Cell Biol* 165: 813-822
26. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ (2004) Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 1673: 75-93
27. Rand J, Eerden PV, Wu XX, Chazotte C (2005) Defective annexin A5 crystallization: a mechanism for pregnancy losses in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 115 Suppl 1: 77-81
28. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, Croucher PJ, Nebel A, Bohring A, Todorova A, Schreiber S, Gerke V, Krawczak M, Markoff A (2007) A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet* 16: 573-578
29. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszyński GP, Sharma MC (2006) Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 81: 146-156
30. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH, Hajjar KA (2004) Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis *in vivo*. *J Clin Invest* 113: 38-48
31. Srivastava M, Montagna C, Leighton X, Glasman M, Naga S, Eidelman O, Ried T, Pollard HB (2003) Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7(+/-) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14287-14292
32. Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB (1978) Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem* 253: 2858-2866
33. Bandorowicz-Pikula J (1995) Domeny w błonach biologicznych i ich znaczenie fizjologiczne. *Postepy Biochem* 41: 247-257
34. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16: 1108-1119
35. Babiychuk EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150: 1113-1124
36. Dąbrowska G, Glowacka B (2005) Błona plazmatyczna - porządek czy chaos? *Postepy Biochem* 51: 414-420
37. Menke M, Gerke V, Steinem C (2005) Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44: 15296-15303
38. Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W (2005) Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* 280: 42831-42840
39. Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells L, de Diego I, Kirchhoff MF, Hughes WE, Heeren J, Rye KA, Rinninger F, Daly RJ, Pol A, Enrich C (2005) Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120^{GAP} to modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* 24: 5809-5820
40. Rentero C, Evans R, Wood P, Tebar F, Vila de Muga S, Cubells L, de Diego I, Hayes TE, Hughes WE, Pol A, Rye KA, Enrich C, Grewal T (2006) Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells. *Cell Signal* 18: 1006-1016
41. Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, Kan FW, Hale IL (2004) Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F481-491
42. Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, Baudier J (2004) AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol* 164: 133-144
43. Renigunta V, Yuan H, Zuzarte M, Rinne S, Koch A, Wischmeyer E, Schlichthorl G, Gao Y, Karschin A, Jacob R, Schwappach B, Daut J, Preisig-Muller R (2006) The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* 7: 168-181
44. Dorovkov MV, Ryazanov AG (2004) Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem* 279: 50643-50646
45. Kheifets V, Bright R, Inagaki K, Schechtman D, Mochly-Rosen D (2006) Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required

- step in deltaPKC translocation and function. *J Biol Chem* 281: 23218-23126
46. Babiyuchuk EB, Draeger A (2006) Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity *via* Ca²⁺-dependent, annexin 2-mediated membrane rearrangement? *Biochem Soc Trans* 34: 374-376
 47. Riquelme G, Llanos P, Tischner E, Neil J, Campos B (2004) Annexin 6 modulates the maxi-chloride channel of the apical membrane of syncytiotrophoblast isolated from human placenta. *J Biol Chem* 279: 50601-50608
 48. van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ (2006) Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1295-1302
 49. Camors E, Charue D, Trouve P, Monceau V, Loyer X, Russo-Marie F, Charlemagne D (2006) Association of annexin A5 with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and caveolin-3 in non-failing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 40: 47-55
 50. Kirilenko A, Golczak M, Piłkuła S, Buchet R, Bandorowicz-Pikuła J (2002) GTP-induced membrane binding and ion channel activity of annexin VI. Is annexin VI a GTP biosensor? *Biophys J* 82: 2737-2745
 51. Kirilenko A, Piłkuła S, Bandorowicz-Pikuła J (2006) Effects of mutagenesis of W343 in human annexin A6 isoform 1 on its interaction with GTP: nucleotide-induced oligomer formation and ion channel activity. *Biochemistry* 45: 4965-4973
 52. Isas JM, Cartiailler JP, Sokolov Y, Patel DR, Langen R, Luecke H, Hall JE, Haigler HT (2000) Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels. *Biochemistry* 39: 3015-3022
 53. Fischer T, Lu L, Haigler HT, Langen R (2007) Annexin B12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J Biol Chem* 282: 9996-10004
 54. Neumann E, Siemens PM, Toensing K (2000) Electroporative fast pore-flickering of the annexin V-lipid surface complex, a novel gating concept for ion transport. *Biophys Chem* 86: 203-220
 55. Patel DR, Isas JM, Ladokhin AS, Jao CC, Kim YE, Kirsch T, Langen R, Haigler HT (2005) The conserved core domains of annexins A1, A2, A5, and B12 can be divided into two groups with different Ca²⁺-dependent membrane-binding properties. *Biochemistry* 44: 2833-2844
 56. Luecke H, Chang BT, Mailliard WS, Schlaepfer DD, Haigler HT (1995) Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 378: 512-515
 57. Ladokhin AS, Haigler HT (2005) Reversible transition between the surface trimer and membrane-inserted monomer of annexin 12. *Biochemistry* 44: 3402-3409
 58. Kubista H, Sacre S, Moss SE (2000) Annexins and membrane fusion. *Subcell Biochem* 34: 73-131
 59. Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jackle S, Enrich C (2001) Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 269: 13-22
 60. Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jackle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J Biol Chem* 275: 33806-33813
 61. Grewal T, Enrich C (2006) Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex. *Bioessays* 28: 1211-1220
 62. Willshaw A, Grant K, Yan J, Rockcliffe N, Ambavarapu S, Burdyga G, Varro A, Fukuoka S, Gawler D (2004) Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett* 559: 13-21
 63. Lambert O, Cavusoglu N, Gallay J, Vincent M, Rigaud JL, Henry JP, Ayala-Sanmartin J (2004) Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279: 10872-10882
 64. Falsey RR, Marron MT, Gunaherath GM, Shirahatti N, Mahadevan D, Gunatilaka AA, Whitesell L (2006) Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. *Nat Chem Biol* 2: 33-38
 65. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Piłkuła S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Pikuła J, Buchet R (2003) The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Polon* 50: 1019-1038
 66. Kirsch T (2005) Annexins – their role in cartilage mineralization. *Front Biosci* 10: 576-581
 67. Kirsch T (2006) Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 18: 174-180
 68. Babiyuchuk EB, Draeger A (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem J* 397: 407-416
 69. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C, Poschl E (2003) Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 23: 2907-2913
 70. Song G, Harding SE, Duchon MR, Tunwell R, O'Gara P, Hawkins TE, Moss SE (2002) Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice. *FASEB J* 16: 622-624

Annexins – proteins involved in organization and function of biological membranes – from *Arabidopsis thaliana* to *Homo sapiens*

Joanna Bandorowicz-Pikuła 

Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Key words: annexins, calcium homeostasis, membrane dynamics

ABSTRACT

The mini-review series presented in this issue of *Postępy Biochemii* is focussed on some aspects of biology of calcium- and membrane-binding proteins, annexins, ubiquitous in all eucaryotic organisms (excluding yeasts), from *Arabidopsis thaliana* to *Homo sapiens*. Annexins are encoded by twelve genes in vertebrates and by eight in higher plants. Their physiological significance is underlined by two facts: the number of the annexin genes seems to grow during evolution and in some cell types they comprise up to 2% of total protein. In the present review the hypothesis is discussed suggesting that multiplication of annexin genes in evolution represents mechanism of organism adaptation to changes in environment. In addition, the experimental data are presented suggestive of annexins playing a crucial role in functioning of plasma membrane, such as signal transduction, ion and vesicular transport and membrane repair. The review is then followed by articles dealing in details with participation of annexins in plant response to abiotic stress (*Arabidopsis thaliana*), in tissue mineralization (*Gallus gallus*), in exocytosis of catecholamines by PC12 cells (mammals) and in Niemann-Pick type C disease related to abnormal transport and intracellular storage of cholesterol (*Homo sapiens*).

Czy aneksyna AnnAt1 z *Arabidopsis thaliana* uczestniczy w odpowiedzi organizmu na stres wywołany czynnikami abiotycznymi?

Karolina Maria Górecka¹

Kazimierz Trębacz²

Ryszard Górecki³

Sławomir Pikula^{1,✉}

¹Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

²Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

³Institut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka, Skierniewice

[✉]Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 47, e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 16 października 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 30 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: aneksyna 1 *Arabidopsis thaliana* (AnnAt1), stres abiotyczny

Wykaz skrótów: AnnAt1 – aneksyna 1 *Arabidopsis thaliana*

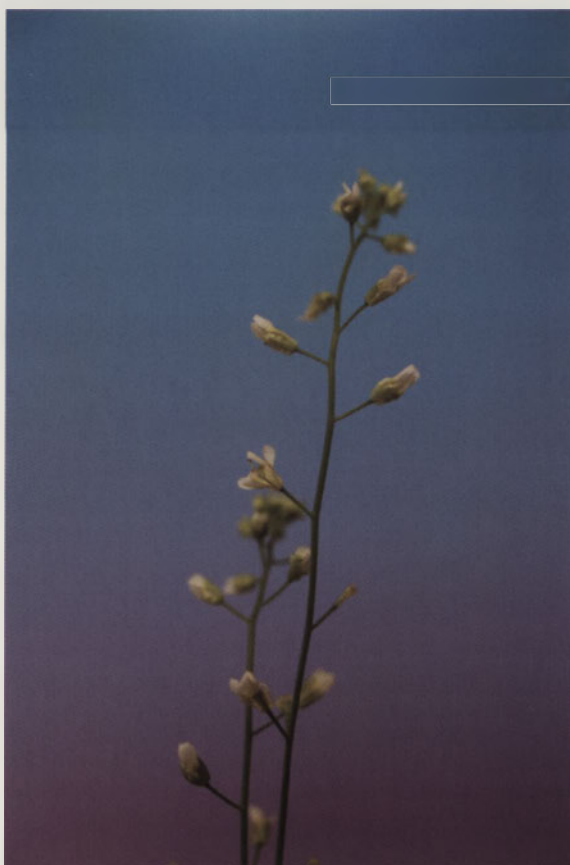
Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2006–2009, numer projektu 2 P06A 007 29

STRESZCZENIE

Aneksyny są białkami wiążącymi w sposób odwracalny jony wapnia i błony biologiczne, występującymi zarówno w organizmach zwierząt jak i roślin. Funkcje aneksyn występujących w organizmach zwierzęcych, które są od ponad dwudziestu pięciu lat intensywnie badane, są stosunkowo dobrze opisane, natomiast o funkcji aneksyn roślin nadal jest mało informacji. Niemniej jednak w świetle dotychczasowych badań wiele wskazuje na to, iż aneksyny mogą odgrywać rolę w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny. Aneksyny rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) są kodowane przez osiem genów (ANNAT1-8). Spośród syntetyzowanych w organizmie rzodkiewnika aneksyn, aneksyna At1 (AnnAt1) jest białkiem dominującym w zielonych organach rośliny. W strukturze pierwszorzędowej aneksyny At1 zidentyfikowano szereg domen o potencjalnym znaczeniu funkcjonalnym, a ich obecność sugeruje, że istotnie białko to może odgrywać znaczącą rolę w odpowiedzi organizmu na stres. Z danych literaturowych wynika, że AnnAt1 wykazuje aktywność peroksydazy, a także tworzy oligomery w sposób zależny od stężenia nadtlenu wodoru, co może mieć istotne znaczenie w usuwaniu skutków stresu oksydacyjnego. AnnAt1 tworzy kanały jonowe w sposób zależny od zmian pH, co może mieć szczególne znaczenie w utrzymaniu homeostazy wapnia w komórce i w odpowiedzi komórek na sygnał wapniowy. AnnAt1 może zatem pełnić różne funkcje w komórce, w tym w regulacji odpowiedzi roślin na stres, co jest szczególnie istotne, gdyż roślina w trakcie wzrostu i rozwoju jest narażona często na różne czynniki stresowe, takie jak susza, brak lub nadmiar składników mineralnych w glebie, niskie lub zbyt wysokie temperatury.

WPROWADZENIE

Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) (Ryc. 1) nie jest rośliną uprawną, jednak od 2001 roku, kiedy genom tej rośliny został w pełni opisany, służy badaczom jako roślina modelowa i jest wykorzystywana do badań nad fizjologią roślin uprawnych. To z kolei może być pomocne w opracowaniu sposobów zwiększania ich odporności na stres wywołany niekorzystnymi warunkami środowiska i poprawić plonowanie.



Rycina 1. *Arabidopsis thaliana* (fot. Harry Turner, NRC Communications and Corporate Relations National Research Council Canada, harry.turner@nrc-cnrc.gc.ca, za zgodą autora).

Aneksyna At1 z rzodkiewnika pospolitego jest przedstawicielem rodziny aneksyn, białek wiążących fosfolipidy w sposób zależny od zmian stężenia jonów wapnia. Dotychczas zebrane informacje świadczą o tym, że aneksyny uczestniczą w procesach organogenezy w trakcie rozwoju roślin i w odpowiedzi roślin na stres, zaś na poziomie komórkowym w homeostazie wapnia i syntezie składników ściany komórkowej. Mimo wielu podobieństw strukturalnych do aneksyn występujących

w organizmach zwierząt, aneksyny roślin pod wieloma względami różnią się od nich, a ich znaczenie w komórce roślinnej jest przedmiotem naukowej debaty. AnnAt1 jest najbardziej rozpowszechnioną spośród ośmiu aneksyn *A. thaliana* [1]. W białku tym zidentyfikowano szereg potencjalnie funkcjonalnych domen, między innymi powtarzające się sekwencje reszt aminokwasowych odpowiedzialne za wiązanie jonów wapnia oraz domenę hemową przypominającą domeny występujące w peroksydazach roślin, której obecność może sugerować, że AnnAt1 jest enzymem – peroksydazą [2].

Podstawowym celem badań nad aneksyną At1 była weryfikacja hipotezy, że białko to może uczestniczyć w likwidacji skutków stresu oksydacyjnego w komórce. W celu przeprowadzenia molekularnej charakterystyki AnnAt1 zbadano zmiany strukturalne w cząsteczce aneksyny AnnAt1 zachodzące w trakcie oligomeryzacji wywołanej przez nadtlenuk wodoru i zmiany pH oraz mechanizmu wbudowywania się aneksyny w błonę jako kanału jonowego. Materiałem badawczym była przede wszystkim rekombinowana AnnAt1 oraz jej mutanty, dzięki którym można zidentyfikować reszty aminokwasowe, odpowiadające za określoną aktywność biologiczną aneksyn.

Zagadnienie to wydaje się być istotne nie tylko w świetle badań podstawowych, ale ma potencjalnie istotne znaczenie aplikacyjne. Z danych literaturowych wynika, że AnnAt1 może być zaangażowana w odpowiedź roślin na stres oksydacyjny i zmniejszanie jego negatywnych skutków. Stwierdzono, że AnnAt1 wykazuje aktywność peroksydazową *in vitro*, reaguje na zmiany potencjału redoks, a pod wpływem wzrastających stężeń nadtlenuku wodoru tworzy oligomery, co może mieć potencjalne znaczenie dla funkcjonowania tego białka w komórce [2]. Ponadto zostało stwierdzone, iż pod wpływem zmian pH z neutralnego na kwaśne w cząsteczce AnnAt1 zachodzą zmiany strukturalne, które prowadzą do oligomeryzacji białka i zmiany w sposobie oddziaływania z błoną, z powierzchniowego wiązania, jakie ma miejsce w pH 7,0, na wbudowywanie się białka w hydrofobowy rejon błony w pH < 6,0 [3]. Z zastosowaniem techniki czarnych błon lipidowych wykazano, że AnnAt1 w sztucznej błonie lipidowej tworzy kanały jonowe zależne od potencjału błonowego. Mechanizm tworzenia tych kanałów oraz ich dokładna charakterystyka wymagają jeszcze dalszej analizy. Nieznana jest również funkcja, jaką kanały te mogłyby odgrywać w homeostazie wapnia, w propagacji sygnału wapniowego w komórkach roślin oraz innych możliwych etapach odpowiedzi na stres [3].

FUNKCJE ANEKSYN ROŚLINNYCH

Wyniki badań przeprowadzonych w różnych laboratoriach sugerują, iż AnnAt1 odgrywa rolę w odpowiedzi roślin na stres [2]. Wydaje się, że aneksyny roślin są wyspecjalizowane i uczestniczą w reakcji roślin na określone czynniki stresowe, zarówno biotyczne, jak i abiotyczne (Ryc. 2). Na przykład synteza aneksyny lucerny siewnej (*Medicago sativa*) ulega aktywacji pod wpływem różnego rodzaju stymulacji, takich jak susza, szok osmotyczny i



Rycina 2. Porównanie roślin zmutowanych (ANNAT1 -/-) z roślinami typu dzikiego. Rośliny zidentyfikowane jako mutanty rozwijały się gorzej niż rośliny typu dzikiego oraz wykazywały trudności z adaptowaniem się do zmiennych warunków środowiska. Na liściach zmutowanych osobników można zaobserwować rozległe plamy nekrotyczne.

podanie kwasu abscysynowego [4]. Aneksyny pszenicy (p39 i p22,5) biorą udział w szlakach przekazywania sygnału indukowanego przez niską temperaturę. W warunkach stresu wiążą się nieodwracalnie z błoną komórkową i tworzą kanały wapniowe, będące prawdopodobnie czujnikami temperatury [5,6]. W przypadku aneksyny p34 pomidora ekspresja genu kodującego to białko wzrasta po infekcji roślin wirulentnym patogenem *Pseudomonas syringae* pv tomato [7]. Istnieją również doniesienia, w których stwierdza się, że ekspresja genu kodującego AnnAt1 w układach heterologicznych zwiększa odporność linii komórkowych na stres oksydacyjny [8,9]. Białko to kompensuje także skutki mutacji Δ OxyR *E. coli* oraz przywraca zdolność mutantów do przeżycia w obecności podwyższonych stężeń nadtlenuku wodoru, co może dowodzić endogennej aktywności peroksydazowej lub wynikać z pośredniego wpływu na bakteryjne systemy antyoksydacyjne [10]. Istnieją również przesłanki, iż aneksyny są zaangażowane w modulowanie reakcji prowadzących do wymiatania/usuwania reaktywnych form tlenu. Zjawisko to leży u podstaw oporności na stesy abiotyczne. Ostatnio opublikowano również wyniki stwierdzające, że AnnAt1 rzodkiewnika jest białkiem biorącym udział w odpowiedzi na stres osmotyczny i zaangażowanym w przekazywanie sygnału wywołowanego kwasem abscysynowym. Ponadto w doświadczeniach, w których rośliny rosły na podłożu zawierającym zwiększone stężenia NaCl rośliny, w których geny kodujące AnnAt1 i AnnAt4 nie ulegały ekspresji były wyraźnie słabsze i kiełkowały wolniej [11].

Dla licznych przedstawicieli aneksyn występujących w organizmach ssaków udokumentowano zdolność tych białek do regulacji przepuszczalności błon komórkowych i tworzenia kanałów jonowych przepuszczalnych dla jonów wapnia [12]. Ponieważ cząsteczki aneksyn roślin wykazują znaczne podobieństwo strukturalne do cząsteczek aneksyn wyizolowanych z organizmów zwierząt wydaje się prawdopodobne, że cząsteczki aneksyn roślin charakteryzują się podobną co aneksyny z organizmów

zwierzęcych zdolnością do tworzenia kanałów jonowych w błonach [13].

POTENCJALNA ROLA ANNAT1 W ODPOWIEDZI ORGANIZMU NA STRES

AnnAt1 została sklonowana i jej sekwencja jest dostępna w bazie danych NCBI (nr dostępu NP_174810), co pozwala na sprawdzenie poprawności klonów używanych w badaniach. W wyniku analiz przeprowadzonych *in silico* w sekwencji AnnAt1 zidentyfikowano, oprócz tzw. motywu „*endonexin fold*”, typowego dla cząsteczek aneksyn i warunkującego zdolność tych białek do oddziaływania z lipidami błon w sposób zależny od zmian stężenia jonów wapnia, także szereg innych motywów o potencjalnie funkcjonalnym znaczeniu. Między innymi motyw przypominający domenę wiążącą hem występujący w cząsteczkach peroksydaz roślin, z zachowaną w ewolucji resztą histydyny (His40), mającą kluczowe znaczenie dla aktywności, oraz tzw. grupę S3, która wydaje się pełnić rolę czujnika zmian potencjału redoks w komórce [2,14].

AnnAt1 jest białkiem o masie cząsteczkowej 37 kDa (składa się z 317 reszt aminokwasowych) i punkcie izoelektrycznym wynoszącym 5,2. Jest ona produktem ekspresji jednego z ośmiu genów *A. thaliana* kodujących aneksyny i stanowi dominującą grupę pośród transkryptów aneksyn w organach nadziemnych rośliny [1,15]. Białko to występuje w komórce przede wszystkim w formie rozpuszczalnej, a także w formie związanej z błonami; niewielka populacja cząsteczek białka pozostaje związana z błoną nawet w obecności bardzo niskich stężeń Ca^{2+} [11,16]. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń świadczą o tym, że znacząca pula białka (około 20%) wiąże się z liposomami zbudowanymi z azolektyny w obecności EGTA, a stężenie jonów wapnia niezbędne do związania AnnAt1 z liposomami z połową wydajności maksymalnej jest bardzo niskie.

W cząsteczce AnnAt1 występuje szereg potencjalnych miejsc fosforylacji i innych modyfikacji potranslacyjnych, które mogą mieć znaczny wpływ na funkcję tego białka i regulować jego aktywność. Ponadto białko to tworzy dimery, zarówno w obecności, jak i nieobecności jonów wapnia, co zostało potwierdzone kilkoma niezależnymi metodami, między innymi wirowaniem w gradiencie stężeń sacharozы oraz z zastosowaniem wysoko rozdzielczej chromatografii cieczowej (FPLC), a także z wykorzystaniem metody sieciowania chemicznego z zastosowaniem glutaraldehydu [2]. Wyniki te pozostają w zgodzie ze strukturą krystaliczną białka, której analiza wykazuje, że białko występuje właśnie w postaci dimeru (nr dostępu PDB 1YCN). Co istotne, ilość oligomerów, zwłaszcza o większej masie cząsteczkowej, wzrasta, gdy w środowisku pojawia się nadtlenek wodoru. To może wskazywać na udział w tym procesie grupy S3 (M107-C111-C239), która jak już wspomniano, może być swoistym czujnikiem potencjału redoks w cząsteczce aneksyny At1 [14].

Dodatkowym dowodem potwierdzającym powyższą hipotezę jest to, że oligomeryzacja jest całkowicie hamowana

w obecności czynników redukujących, takich jak ditiotreitol (30 mM) lub β -merkaptoetanol (20 mM); zastosowanie niższych stężeń tych substancji powoduje zmniejszenie puli białka występującego w formie oligomerów.

AnnAt1 w systemach heterologicznych może pełnić funkcję ochronną przed skutkami stresu oksydacyjnego [8-10]. W doświadczeniach, w których zastosowano białko syntetyzowane w komórkach *E. coli* i dla porównania białko syntetyzowane w *Nicotiana benthamiana* dwoma niezależnymi metodami wykazano, że AnnAt1 *in vitro* jest zdolna do katalizowania reakcji peroksydacji. Stosując metodę pomiaru aktywności z wykorzystaniem luminolu, powszechnie używanego do detekcji kompleksu białko-przeciwcała w metodzie Western blot, uzyskano wynik świadczący o tym, że białko syntetyzowane w *N. benthamiana* wykazuje aktywność peroksydazy, i że aktywność ta jest prawdopodobnie zależna od fosforylacji AnnAt1 [2]. Wyniki potwierdzające tę obserwację uzyskano stosując odczynnik Amplex® Red (10-acetylo-3,7-dihydroxy fenokksazyn). Metoda ta charakteryzuje się znacznie większą czułością od metody z zastosowaniem luminolu. Dzięki temu zaobserwowano aktywność białka syntetyzowanego zarówno w *N. benthamiana*, jak i *E. coli*, jednakże aktywność białka uzyskanego w systemie eukariotycznym była trzykrotnie wyższa niż w systemie prokariotycznym. W obecności alkalicznej fosfatazy, enzymu katalizującego reakcję defosforylacji, wykazano znaczne obniżenie aktywności enzymatycznej białka oczyszczonego z *N. benthamiana*, co świadczy o wpływie fosforylacji AnnAt1 na regulację jej aktywności jako peroksydazy. Ponadto z zastosowaniem AnnAt1 z mutacją His40/Ala wykazano, że białko to traci aktywność.

Innym interesującym zagadnieniem jest oddziaływanie AnnAt1 z błoną plazmatyczną. W przypadku aneksyn ssaków już od lat wiadomo, że tworzą one w błonach biologicznych kanały jonowe [12]. Wiadomo również, iż na przykład aneksyna A6 (AnxA6) człowieka tworzy kanał jonowy w sposób zależny od zmian pH, przy czym istotny wydaje się fakt, że powstawanie kanałów zaobserwowano w pH o wartości poniżej 6,0, które jest niższe od fizjologicznego. Pojawiło się zatem pytanie, czy w warunkach *in vivo* może powstawać kanał tworzony przez cząsteczki aneksyny A6 [17]. W komórkach roślin wartość pH cytosolu w warunkach fizjologicznych wynosi około 7,0, na przykład w komórkach liści pomidora pH cytosolu wynosi około 7,3, a w przedziale apoplastu jest znacznie niższa i osiąga wartość 6,1 [18].

Wartość pH zależy od wielu czynników, między innymi takich jak grawistymulacja lub warunki stresowe [19,20]. Na przykład w komórkach aparatu szparkowego narażonych na działanie nadtlenku wodoru, następuje alkalizacja cytoplazmy i jednoczesne zakwaszenie środowiska wakuoli [21], co wydaje się mieć szczególne znaczenie, ponieważ w błonie wakuoli występują liczne kanały jonowe. Można zatem zaryzykować hipotezę, że lokalne zmiany pH włączają aktywność poszczególnych białek. Ponadto można zaobserwować lokalne zmiany pH w rejonie przybłonowym, gdzie może być obniżone nawet o 1,6 [22].

W toku dalszych doświadczeń sprawdzono jak zmiana pH środowiska wpływa na strukturę AnnAt1 oraz jej oddziaływanie z błoną. Wykazano, że w pH 4,5 następuje agregacja białka. W nieco wyższym pH następuje odwracalna oligomeryzacja białka: powstają dimery, trimery i większe oligomery. Proces ten może być wywołany zmianami w drugorzędowej strukturze białka, która w pH 7,0 składa się przede wszystkim ze struktur α -helikalnych, a w pH 5,5 można zaobserwować wzrastający udział struktur β , co potwierdziły pomiary dichroizmu kołowego oraz doświadczenia przeprowadzone z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni [3]. W celu sprawdzenia, czy AnnAt1 ma właściwości integralnego białka błonowego zastosowano metodę indukowanego zmiany temperatury rozdziału faz w obecności niejonowego detergentu (Triton X-114). Metoda ta pozwala na identyfikację integralnych białek błonowych i oddzielenie ich od białek hydrofilowych – rozpuszczalnych w wodzie [23]. Stwierdzono, że AnnAt1 zachowuje się jak integralne białko błonowe, przy czym proces ten zależy od pH. W pH 7,0 pewna populacja cząsteczek AnnAt1 zachowuje się jak integralne białko błonowe, natomiast poniżej pH 5,6 ponad połowa cząsteczek białka przechodzi do fazy detergentowej, a w pH < 5,0 całe białko zlokalizowane jest w fazie detergentowej i ulega agregacji. Wynik ten można zinterpretować w taki sposób, że obniżenie pH roztworu indukuje zmiany konformacji białka, co sprzyja wbudowywaniu się AnnAt1 w błonę. Ponadto w doświadczeniu z zastosowaniem kontrolowanej proteolizy AnnAt1 w obecności lub przy braku liposomów w środowisku o różnym pH stwierdzono, że białko w pH < 6,0 i w obecności liposomów jest chronione przed działaniem proteazy i występuje w formie oligomerów. Na podstawie doświadczeń z zastosowaniem Tritonu X-114 oraz obserwacji z zastosowaniem liposomów postanowiono sprawdzić, czy AnnAt1 posiada zdolność tworzenia kanałów jonowych. Stosując technikę czarnych błon lipidowych (BLM) wykazano zdolność cząsteczek AnnAt1 do tworzenia zależnych od napięcia kanałów jonowych zarówno w pH 7,0 oraz pH 5,8. Należy jednak zaznaczyć, że w pH 7,0 proces wbudowywania się białka w błonę trwał nawet kilka godzin, a w pH < 6,0 zaledwie 15–20 minut. Ponadto zauważono istotne różnice w przewodnictwie jednostkowym pojedynczego kanału, które wynosiło 32 pS w pH 7,0 i 63 pS w pH 5,8 [3]. Tak duża różnica sugeruje, iż pH jest ważnym czynnikiem wpływającym na funkcję AnnAt1 w komórce.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej informacje świadczą o złożoności i mnogości procesów, w jakich może brać udział AnnAt1 oraz pozwalają stwierdzić w jak skomplikowany i wieloraki sposób aktywność tego białka jest regulowana. Uzyskane do tej pory wyniki badań pozwalają dokonać wstępnej charakterystyki biochemicznej białka oraz przybliżyć problem roli AnnAt1 w odpowiedzi organizmu na stres w komórce, jednak wiele pytań pozostaje nadal bez odpowiedzi.

PIŚMIENNICTWO

- Clark GB, Lee D, Dauwalder M, Roux SJ (2005) Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta* 220: 621-31
- Górecka KM, Konopka-Postupolska D, Hennig J, Buchet R, Pikula S (2005) Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 868-75
- Górecka KM, Thouverey C, Buchet R, Pikula S (2007) Participation of annexin At1 from *Arabidopsis thaliana* in pH-mediated callular response to environmental stimuli. *Plant Cell Physiol*, w druku
- Kovacs I, Ayaydin F, Oberschall A, Ipacs I, Bottka S, Pongor S, Dudits D, Toth EC (1998) Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *Plant J* 15: 185-197
- Ding JP, Pickard BG (1993) Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J* 3: 83-110
- Breton G, Vazquez-Tello A, Danyluk J, Sarhan F (2000) Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature. *Plant Cell Physiol* 41: 177-84
- Xiao F, Tang X, Zhou JM (2001) Expression of 35S::Pto globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiol* 126: 1637-45
- Jänicke RU, Porter AG, Kush A (1998) A novel *Arabidopsis thaliana* protein protects tumor cells from tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1402: 70-78
- Kush A, Sabapathy K (2001) Oxy5, a novel protein from *Arabidopsis thaliana*, protects mammalian cells from oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 591-602
- Gidrol X, Sabelli PA, Fern YS, Kush AK (1996) Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of *Escherichia coli* from H₂O₂ stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11268-11273
- Lee S, Lee EJ, Yang EJ, Lee JE, Park AR, Song WH, Park OK (2004) Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1378-91
- Kourie JL, Wood HB (2000) Biophysical and molecular properties of annexin-formed channels. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 91-134
- Hofmann A, Ruvini S, Hess S, Schantz R, Delmer D, Wlodawer A (2002) Plant annexins form calcium-independent oligomers in solution. *Protein Sci* 11: 2033-2040
- Hofmann A, Delmer DP, Wlodawer A (2003) The crystal structure of annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* reveals an unusual S3 cluster. *Eur J Biochem* 270: 2557-2564
- Clark GB, Sessions A, Eastburn DJ, Roux SJ (2001) Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 1072-1084
- Dabitz N, Hu NJ, Yusof AM, Tranter N, Winter A, Daley M, Zschornig O, Brisson A, Hofmann A (2005) Structural determinants for plant annexin - membrane interactions. *Biochemistry* 44: 16292-16300
- Golczak M, Kicinska A, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R, Pikula S (2001) Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J* 15: 1083-1085
- Oja VV, Savchenko G, Jakob B, Heber U (1999) pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta* 209: 239-249
- Boonsirichai K, Sedbrook JC, Chen R, Gilroy S, Masson PH (2003) Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell* 15: 2612-2625
- Savchenko G, Wiese C, Neimanis S, Hedrich R, Heber U (2000) pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves. *Planta* 211: 246-255

21. Zhang X, Dong FC, Gao JF, Song CP (2001) Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Res* 11: 37-43
22. van der Goot FG, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Pattus F (1991) A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354: 408-410

23. Bordier C (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 25: 1604-1607

Participation of annexin At1 in plant response to abiotic stress

Karolina Maria Górecka¹, Kazimierz Trębacz², Ryszard Górecki³, Sławomir Pikula^{1,✉}

¹Nencki Institute of Experimental Biology Polish Academy of Science, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa, Poland

²Maria Curie-Skłodowska University, Department of Biophysics, Institute of Biology, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

³Research Institute of Vegetable Crops, 1/3 Konstytucji 3 Maja St., 96-100 Skierniewice, Poland

✉e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl

Key words: annexin At1 from *Arabidopsis thaliana* (AnnAt1), abiotic stress

ABSTRACT

Annexins are calcium-dependent phospholipid-binding proteins existing both in animal and plant cells. Mammalian and especially human annexins were examined for many years, and their functions in these organisms are already well known, but it is not the case for plant annexins. On the basis of existing literature and experimental evidence, it can be proposed that plant annexins may have a role in stress response. Annexin At1 of *Arabidopsis thaliana* (AnnAt1) is one of eight proteins of this family in *A. thaliana*. In its sequence many potentially functional domains are found, owing to that this protein can play an important role in stress response of the organism. Considering literature data and our own experiments one can postulate that AnnAt1 has weak peroxidase activity and form oligomers in hydrogen peroxide-dependent manner. This can be important in response to oxidative stress. Also we found that this protein forms ion channel in pH-dependent manner. This phenomenon may have particular significance in maintaining calcium homeostasis in the cell and calcium signaling, therefore AnnAt1 may play different roles in regulating stress response of plant. This is extremely important because plants during growth and development have to cope different stress factors like drought, deficiency or excess of mineral compounds in the soil, as well as low or high temperatures.



**Polska Sieć
Mitochondrialna**
www.mitonet.pl

Rola aneksyn w procesie mineralizacji

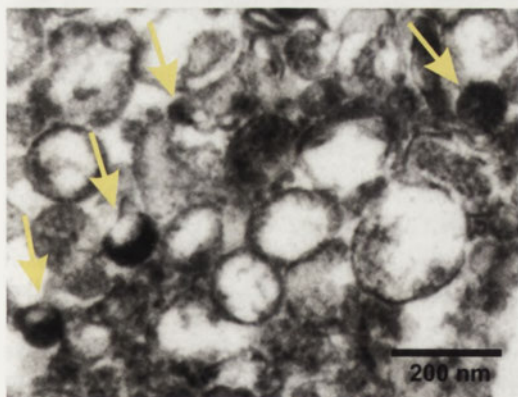
STRESZCZENIE

Mineralizacja kości jest złożonym procesem wymagającym zaangażowania wielu składników, między innymi współdziałania różnych białek. Proces mineralizacji polega na odkładaniu się w kościach fosforanów wapnia, co nadaje kości twardość i wytrzymałość mechaniczną. Białkami niezbędnymi w procesie mineralizacji kości są między innymi aneksyny (Anx). Aneksyny biorą udział zarówno w regulacji funkcji komórek kompetentnych w procesie mineralizacji, jak również bezpośrednio uczestniczą w tworzeniu fazy mineralnej w przestrzeni pozakomórkowej. Możliwość pełnienia odmiennych funkcji w różnych miejscach, wewnątrz komórek i w macierzy pozakomórkowej, aneksyny zawdzięczają przede wszystkim zdolności do wiązania z błonami biologicznymi w sposób zależny od składu chemicznego tych błon i zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. W niniejszej pracy przeglądowej przedyskutowano rolę aneksyn w procesie mineralizacji.

WPROWADZENIE

Najlepiej poznanym procesem mineralizacji tkanek jest proces zachodzący w płytkach wzrostowych kości długich. Wzrost i mineralizacja płytki wzrostowej kości długiej warunkuje jej wydłużanie. Na przekroju podłużnym przez płytkę wzrostową można zaobserwować różnicowanie chondrocytów, postępujące od strefy spoczynkowej, poprzez strefy chondrocytów dzielących się, dojrzałych, aż do strefy komórek hipertroficznymi, odpowiedzialnych za produkcję fazy mineralnej, znajdujących się w pobliżu tkanki kostnej i frontu naczyniowego. Czynnikiem niezbędnym do zainicjowania tworzenia zrębu kości jest obecność pęcherzyków macierzy pozakomórkowej. Te otoczone błoną organelle pochodzą z błony plazmatycznej chondrocytów (głównie tych w pełni zróżnicowanych i obecnych w strefie hipertroficznnej), od której się odrywają. Uwolnione do przestrzeni pozakomórkowej, pęcherzyki macierzy gromadzą Ca^{2+} i nieorganiczny fosforan (P_i), co prowadzi do wysycenia stężeń tych jonów we wnętrzu pęcherzyka i wytworzenia minerału [1,2] (Ryc. 1). Proces ten określany jest w literaturze przedmiotu mianem mineralizacji pierwotnej. Oprócz kościotworzenia śródchrzęstnego, mineralizacja zachodząca w pęcherzykach macierzy pozakomórkowej dotyczy przede wszystkim kości i zębów.

Choć od odkrycia pęcherzyków macierzy minęło ponad 30 lat, poznanie właściwości tych organelli wciąż leży w kręgu zainteresowań wielu badaczy.



Rycina 1. Pęcherzyki macierzy pozakomórkowej oczyszczone z chrząstki 17-dniowych embrionów kurzych. Wewnątrz niektórych pęcherzyków macierzy (zaznaczonych strzałkami), w pobliżu błony widoczny jest elektronowo gęsty materiał będący prawdopodobnie obrazem tworzącej się fazy mineralnej (zdjęcie z mikroskopu elektronowego wykonane przez dr D. Farlay z Uniwersytetu Claude Bernard Lyon 1 w Villeurbanne we Francji).

Wprawdzie określono sekwencję zdarzeń prowadzących do mineralizacji chrząstki płytki wzrostowej i innych tkanek oraz zidentyfikowano enzymy i czynniki regulujące ten proces, nadal wiele pozostaje pytań bez odpowiedzi. Do najbardziej nurtujących obecnie badaczy kwestii dotyczących mineralizacji, zachodzącej w pęcherzykach macierzy pozakomórkowej, należą natura kanałów transportujących jony do wnętrza pęcherzyków macierzy, regulacja i mechanizm tworzenia pęcherzyków macierzy, a także wpływ czynników obecnych w macierzy pozakomórkowej na tworzenie minerału i regulację mineralizacji przez komórki.

Anna Sekrecka^{1,2}

Marcin Balcerzak¹

Cyril Thouverey^{1,3}

Rene Buchet³

Sławomir Pikula^{1,✉}

¹Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

²Zakład Biofizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

³Zakład Chemii-Biochemii, CNRS-UMR 5013, Uniwersytet Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, Francja

✉ Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 47, e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 16 października 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 24 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: aneksyny, mineralizacja, pęcherzyki macierzy

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2007-2009, numer projektu N301 025 32/1120

UDZIAŁ ANEKSYN W TWORZENIU PĘCHERZYKÓW MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Mechanizm tworzenia pęcherzyków macierzy podlega kompleksowej regulacji przez różnorodne czynniki. Istotną grupę stanowią te czynniki, które prowadzą do różnicowania chondrocytów i rozwoju fenotypu hipertroficznego. Chondrocyty płytki wzrostowej szybciej ulegają różnicowaniu się pod wpływem kwasu retinowego. Jednocześnie chondrocyty te produkują duże ilości kompetentnych do mineralizacji pęcherzyków macierzy pozakomórkowej, bogatych w alkaliczną fosfatazę i aneksyny [3,4]. Kwas retinowy, jako agonista jądrowych receptorów RAR i RXR, stymuluje różnicowanie komórek i ich apoptozę, reorganizację macierzy pozakomórkowej i jej mineralizację, wpływając na znaczne obniżenie ekspresji genu kodującego białko Bcl-2, aktywację kaspazy 3, wzrost syntezy metaloproteinaz, zahamowanie produkcji typowego dla chrząstki kolagenu typu II oraz wzrost syntezy kolagenów typu I i X morfogenetycznych białek kości [4-7]. Zmianom tym towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [8]. Podwyższone stężenie jonów wapnia reguluje dojrzewanie chondrocytów i prowadzi do ich apoptotycznej śmierci, dlatego związki wiążące wewnątrzkomórkowy wapń (np. BAPTA-AM) zapobiegają tworzeniu pęcherzyków macierzy pozakomórkowej i mineralizacji [4,9].

Ostatnio szeroko dyskutowany jest przez specjalistów udział kanałów wapniowych tworzonych przez aneksyny (AnxA2, AnxA5, AnxA6) obecne w chondrocytach i pęcherzykach macierzy pozakomórkowej w procesie mineralizacji [3,9]. Wynika to m.in. z obserwacji, że inhibitor kanałów tworzonych przez aneksyny, pochodna 1,4-benzothiazepiny (K-201), wywołuje znaczne obniżenie stężenia jonów wapnia w komórce [3,4,10]. Obecnie prowadzone badania wskazują, że pochodna K-201 działa nie tylko na kanały jonowe tworzone przez cząsteczki aneksyn, lecz także pośrednio stabilizuje zamknięty stan receptora rianodynowego typu 2, kanału wapniowego siateczki śródplazmatycznej, zwiększając powinowactwo kalstabinu-2 (białka wiążącego FK506) do tego receptora [11]. Zaobserwowano także, że zahamowanie ekspresji genu kodującego AnxA5 z zastosowaniem techniki siRNA ma ten sam skutek jak potraktowanie komórek pochodną K-201 [9]. Zaś nadekspresja genu kodującego AnxA5 w chondrocytach jest czynnikiem wystarczającym by wywołać wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, co prowadzi do pełnego zróżnicowania komórek i mineralizacji [9]. W sprzeczności z wynikami tych doświadczeń pozostają obserwacje, że myszy z wyłączonym genem kodującym AnxA5 rozwijają normalny szkielet kostny [12]. Przeciwnieństwa te tłumaczy coraz popularniejsza teza, że aneksyny mogą wzajemnie przejmować swoje funkcje w komórkach. Jakkolwiek opisane sprzeczności pozostawiają pod znakiem zapytania udział aneksyn w tworzeniu i przekazywaniu sygnału wapniowego niezbędnego w procesie różnicowania się chondrocytów i powstawania pęcherzyków macierzy pozakomórkowej.

BUDOWA PĘCHERZYKÓW MACIERZY

Skład białkowo-lipidowy pęcherzyków macierzy pozakomórkowej jest doskonale dopasowany do ich podsta-

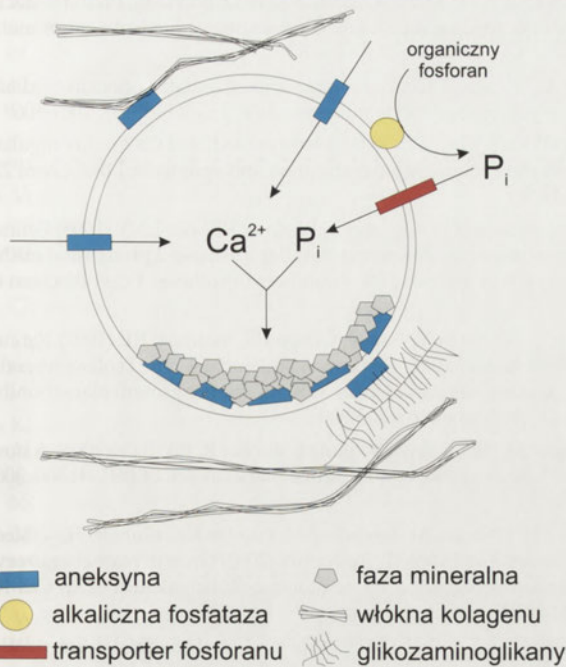
wowej funkcji – zapewnienia właściwego środowiska dla początkowych etapów mineralizacji. Otoczone błoną organelle tworzą środowisko, w którym zachodzi krystalizacja labilnych form minerału, natomiast obecne w błonie pęcherzyków systemy transportu jonów są odpowiedzialne za kontrolę napływu Ca^{2+} i nieorganicznego fosforanu (P_i) do wnętrza pęcherzyka. Skład lipidowy pęcherzyków macierzy różni się od składu błony plazmatycznej, z której pochodzą. Błony pęcherzyków macierzy charakteryzują się wysoką zawartością sfingomieliny i fosfatydyloseryny, jak również wysoką zawartością cholesterolu i glikolipidów w stosunku do fosfolipidów [13,14]. Fosfatydyloseryna mająca wysokie powinowactwo do jonów wapnia, stabilizuje tworzący się minerał. Fosfatydyloseryna jest głównym składnikiem kompleksu wapń-fosfolipid-fosforan obecnego w kości, w chrząstce i w innych tkankach ulegających mineralizacji, zwłaszcza tych bogatych w pęcherzyki macierzy [15,16]. Co najmniej 50% fosfatydyloseryny obecnej w pęcherzykach macierzy związane jest z Ca^{2+} i nieorganicznym fosforanem (P_i) [17], co chroni ten fosfolipid przed degradacją przez fosfolipazy [2,18].

Oddziaływania pomiędzy ujemnie naładowanymi domenami białek, anionowymi fosfolipidami i kompleksami mineralnymi są ważne dla wzrostu fazy mineralnej w świetle pęcherzyka macierzy. Jakkolwiek szczegóły tych zjawisk nie są dokładnie poznane, obecnie przyjmuje się, że tworzenie się kompleksów mineralnych zależy od elektrostatycznych, strukturalnych i stereochemicznych właściwości granicy fazy organicznej i fazy nieorganicznej. Ponadto, proces mineralizacji zachodzący w pęcherzykach macierzy wymaga dynamicznego systemu dostarczającego substraty do mineralizacji, utrzymującego równowagę jonową, eliminującego ze środowiska inhibitory mineralizacji, modyfikującego skład macierzy pozakomórkowej i kontrolującego skład lipidowy błony.

Znamienną cechą pęcherzyków macierzy jest wysoka zawartość białek z rodziny aneksyn. Stanowią one największą pulę białek pęcherzyków macierzy. Głównymi przedstawicielami rodziny aneksyn są aneksyny AnxA5, AnxA2 i AnxA6 (uszeregowane według malejącej zawartości w pęcherzykach macierzy) [19,20] oraz, jak wynika z najnowszych badań prowadzonych w naszej pracowni, AnxA1 i AnxA11. Duża różnorodność aneksyn w pęcherzykach macierzy może sugerować pełnienie przez nie różnych funkcji w procesie mineralizacji (Ryc. 2).

ANEKSYNY ZWIĄZANE Z POWIERZCHNIĄ BŁONY PĘCHERZYKÓW MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Jak dotąd nie jest znany mechanizm zjawiska, w wyniku którego aneksyny transportowane są przez błonę plazmatyczną na zewnątrz komórki. Dzięki temu procesowi pewna pula aneksyn znajduje się na powierzchni pęcherzyków macierzy. Aneksyny związane z zewnętrzną powierzchnią błony oddziałują z białkami macierzy pozakomórkowej, takimi jak kolageny typu I, II i X, prokolagen II [21-23] oraz glikozaminoglikany [24,25]. Oddziaływania te są często charakterystyczne dla określonego przedstawiciela rodziny aneksyn oraz odznaczają się różną wrażliwością na zmiany stężenia Ca^{2+} . Uważa się, że aneksyny mogą pełnić



Rycina 2. Funkcje białek z rodziny aneksyn w trakcie mineralizacji zachodzącej w pęcherzykach macierzy. Pula aneksyn związanych z powierzchnią błony odpowiada za kontakt z cząsteczkami macierzy pozakomórkowej. Aneksyny zaangażowane są także bezpośrednio w tworzenie rdzenia, wokół którego rozpoczyna się odkładanie minerału. Aneksyny, jako kanały jonowe, uczestniczą w dostarczaniu Ca^{2+} do wnętrza pęcherzyka macierzy.

rolę receptorów rozpoznających określone makrocząsteczki macierzy pozakomórkowej. Komórki o niskiej ekspresji genu kodującego AnxA5 nie są zdolne do wiązania kolagenu typu II, co sugeruje, że AnxA5 jest jednym z głównych białek tych komórek odpowiedzialnym za oddziaływanie z macierzą pozakomórkową [26]. Wykazano, że kolageny typu II i X, wiążąc się z AnxA5, mogą regulować napływ jonów wapnia do wnętrza pęcherzyków macierzy. Usunięcie z powierzchni pęcherzyków macierzy kolagenów typu II i X powoduje zmniejszenie napływu wapnia do wnętrza pęcherzyków, co sugeruje, że wiązanie kolagenu z AnxA5 może stymulować aktywność tego białka jako kanału jonowego [21,22].

ANEKSYNY ZLOKALIZOWANE WE WNIĘTRZU PĘCHERZYKÓW MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Inna pula aneksyn, związana tym razem z wewnętrzną powierzchnią błony pęcherzyków macierzy, bierze prawdopodobnie udział w tworzeniu centrów krystalizacji minerału w początkowych fazach mineralizacji. Pierwotna faza mineralna tworząca się w chrząstce zlokalizowana jest tuż przy wewnętrznej powierzchni błony pęcherzyków macierzy. Częściowo, na taką lokalizację wpływa zwiększona zawartość fosfatydyloseryny w wewnętrznym listku dwuwarstwy błony otaczającej pęcherzyk [27]. Wstępnym etapem tworzenia się minerału jest powstanie kompleksu lipid-białko- Ca^{2+} - P_i [14,27]. Głównym lipidowym elementem tego kompleksu jest fosfatydyloseryna, natomiast wśród białek przeważa AnxA5 [28]. Inne białka, które mogą być wyizolowane z powstałej w pęcherzykach macierzy fazy mineralnej to AnxA2, AnxA6 i alkaliczna fosfataza [29]. Ponieważ aneksyny charakteryzują się zwiększonym

powinowactwem do jonów wapnia w obecności anionowych fosfolipidów mogą być odpowiedzialne za wiązanie i utrzymanie minerału wewnątrz pęcherzyków macierzy. Aneksyny wraz z ujemnie naładowaną wewnętrzną stroną błony tworzą miejsca, gdzie bezpostaciowy fosforan wapnia przekształca się w krystaliczny hydroksyapatyt.

ANEKSYNY ZWIĄZANE Z BŁONĄ W SPOSÓB NIEZALEŻNY OD Ca^{2+}

Nie ma wątpliwości, że sposoby oddziaływania aneksyn z błoną determinują pełnione przez białka funkcje. Wiązanie z błoną za pośrednictwem jonów wapnia umożliwia aneksynom udział w procesach zachodzących na powierzchni błony: w oddziaływaniach z macierzą pozakomórkową lub w tworzeniu fazy mineralnej. Istnieją jednak czynniki, które wpływają na właściwości aneksyn, sprzyjając oddziaływaniu aneksyn z błoną w sposób niezależny od stężenia jonów wapnia, a co za tym idzie nadają tym białkom nowe funkcje.

Jak dotąd w pęcherzykach macierzy nie wyjaśniono w bezsporny sposób mechanizmu transportu Ca^{2+} . Hamowanie mineralizacji przez pochodną K-201 i jony cynku [4,30,31] może sugerować, że to aneksyny są odpowiedzialne za transport jonów wapnia do światła pęcherzyków macierzy, bo to jony cynku i pochodna K-201 hamują aktywność aneksyn jako kanałów jonowych *in vitro*. Jednak mechanizm tego procesu nie jest jasny. Aby zrozumieć, jakie potencjalne czynniki mogą regulować transport jonów wapnia przez kanały tworzone w błonie przez aneksyny należy rozważyć działanie kilku czynników mogących istotnie modulować właściwości aneksyn.

W przypadku AnxA5 maksymalny napływ jonów wapnia do proteoliposomów zawierających fluorescencyjną sondę Fura-2 był obserwowany w przypadku, gdy błona zbudowana była z fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w stosunku 9:1 (mol/mol) [32]. Wysoka zawartość fosfatydyloseryny w błonie pęcherzyków macierzy może wynikać z gromadzenia tego fosfolipidu w domenach błony plazmatycznej, z których powstają następnie pęcherzyki macierzy pozakomórkowej. AnxA2 charakteryzuje się zdolnością tworzenia mikrodomen bogatych w fosfatydyloserynę [33]. Zjawiska te nie tłumaczą fenomenu tworzenia przez cząsteczki aneksyn kanałów jonowych w błonie; w cząsteczkach aneksyn nie występują bowiem domeny transbłonowe charakteryzujące typowe kanały jonowe będące integralnymi białkami błon.

Od 25 do 40% aneksyn pęcherzyków macierzy ulega ekstrakcji organicznymi rozpuszczalnikami w środowisku kwaśnym, co może przemawiać za koncepcją, że białka te występują w komórce w formie wbudowanej w hydrofobowy rejon błony [34]. Niskie pH jest czynnikiem powodującym obniżenie powinowactwa aneksyn do jonów wapnia i zmiany w ich strukturze drugorzędowej prowadzące do wbudowania się białka w hydrofobowy rejon błony w warunkach *in vitro* [35-37]. Te właściwości aneksyn wykorzystano w celu ich oczyszczania z pęcherzyków macierzy [34]. Ponadto, zmiany pH są jednym z czynników indukujących aktywność aneksyn jako kanałów jonowych. Biorąc

pod uwagę fakt, że kanały jonowe obserwowane w pęcherzykach macierzy wykazują znaczne podobieństwo do kanałów jonowych tworzonych przez AnxA5 wbudowaną do dwuwarstwy lipidowej w kwaśnym środowisku [38], należy zadać pytanie, czy procesowi mineralizacji towarzyszą zmiany pH?

Udział aneksyn w przekazywaniu sygnału wapniowego w chondrocytach sugeruje, że aneksyny mogą ulegać wbudowaniu w dwuwarstwą błonę plazmatyczną, jeszcze przed wytworzeniem pęcherzyków macierzy. Pomiar wykonany w skrawkach płytki wzrostowej wskazuje, że wewnątrzkomórkowe pH zależy od strefy, z której pochodzą chondrocyty. Najniższe pH zaobserwowano w pobliżu błony plazmatycznej komórek strefy hipertroficzej i tej, która uległa częściowemu zwapnieniu [39]. Lokalne obniżenie pH, może być też związane z wysoką zawartością fosfatydyloseryny w rejonach odpowiedzialnych za tworzenie pęcherzyków macierzy, wydaje się być czynnikiem ułatwiającym tworzenie kanałów jonowych przez aneksyny. Niewiele wiadomo na temat zmian pH zachodzących w pęcherzykach macierzy. Zbyt drastyczne obniżenie pH w trakcie mineralizacji zakłóciłoby tworzenie minerału i jego krystalizację. Z drugiej strony jednak protony są produktem tworzenia się hydroksyapatytu w reakcji $5\text{Ca}^{2+} + 3\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + 4\text{H}^+$. Proces ten może prowadzić do zmian fluktuacji pH w trakcie mineralizacji.

UWAGI KOŃCOWE

Pęcherzyki macierzy pozakomórkowej oprócz tego, że towarzyszą prawidłowemu rozwojowi kości i chrząstki, uczestniczą także w rozwoju zespołów chorobowych takich jak osteoartroza i arterioskleroza. W chrząstce stawowej, która nie ulega zwapnieniu, w przebiegu osteoartrozy można zaobserwować procesy dojrzewania i różnicowania komórek podobne do tych jakie zachodzą w trakcie mineralizacji na podłożu chrzęstnym. W tych warunkach chondrocyty chrząstki stawowej także uwalniają pęcherzyki macierzy, w których zawartość białek z rodziny aneksyn i alkalicznej fosfatazy jest znacznie zwiększona [40-42]. Obecność tak zmienionych pęcherzyków macierzy prowadzi do zwapnienia chrząstki stawowej [43]. Także fibroblasty pod wpływem czynników patogennych mogą różnicować w komórki o fenotypie podobnym do osteoblastów, czemu towarzyszy zdolność do wydzielania zmienionych pęcherzyków macierzy [44]. Odkładanie się złogów wapnia w takich pęcherzykach prowadzi do spadku elastyczności, wytrzymałości oraz przepuszczalności naczyń krwionośnych, a w konsekwencji do groźnych stanów chorobowych [45].

Zważywszy na znaczenie aneksyn w procesie mineralizacji pojawia się pytanie, czy białka te mogą stać się celem interwencji farmakologicznej zmierzającej do zmniejszenia skutków procesów prowadzących do zaburzonej mineralizacji tkanek?

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson HC (2003) Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 5: 222-226

2. Balcerzak M, Radisson J, Azzar G, Farlay D, Boivin G, Pikula S, Buchet R (2007) A comparative analysis of strategies for isolation of matrix vesicles. *Anal Biochem* 361: 176-182

3. Wang W, Kirsch T (2002) Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J Cell Biol* 157: 1061-1069

4. Wang W, Xu J, Kirsch T (2003) Annexin-mediated Ca^{2+} influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278: 3762-3769

5. Nie D, Ishikawa Y, Yoshimori T, Wuthier RE, Wu LNY (1998) Retinoic acid treatment elevates matrix metalloproteinase-2 protein and mRNA levels in avian growth plate chondrocyte cultures. *J Cell Biochem* 68: 90-99

6. Wu LNY, Ishikawa Y, Nie D, Genge BR, Wuthier RE (1997) Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type I collagen synthesis in primary cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 65: 209-230

7. Balcerzak M, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R, Pikula S (2006) A novel retinoid binding property of human annexin A6. *FEBS Lett* 580: 3065-3069

8. Zuscik MJ, D'Souza M, Ionescu AM, Gunter KK, Gunter TE, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN (2002) Growth plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. *Exp Cell Res* 276: 310-319

9. Wang W, Xu J, Kirsch T (2005) Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res* 305: 156-165

10. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Duan D, Wang E, Sturek MS, Edwards JM, Moe SM (2007) Fetuin-A uptake in bovine vascular smooth muscle cells is calcium dependent and mediated by annexins. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F599-F606

11. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, Cheng Z, Deng SX, de Windt LJ, Landry DW, Marks AR (2005) Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9607-9612

12. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C, Poschl E (2003) Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 23: 2907-2913

13. Wuthier RE (1975) Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membrane and matrix vesicles. *Biochim Biophys Acta* 409: 128-143

14. Watkins EL, Stillo JV, Wuthier RE (1980) Subcellular fractionation of epiphyseal cartilage: isolation of matrix vesicles and profiles of enzymes, phospholipids, calcium and phosphate. *Biochim Biophys Acta* 631: 289-304

15. Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, Wuthier RE (1993) Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem* 268: 25084-25094

16. Boskey AL, Posner AS, Lane JM, Goldberg MR, Cordella DM (1980) Distribution of lipids associated with mineralization in the bovine epiphyseal growth plate. *Arch Biochem Biophys* 199: 305-311

17. Wuthier RE, Gore ST (1977) Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane and matrix vesicle fractions: evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes. *Calcif Tissue Res* 24: 163-171

18. Balcerzak M, Pikula S, Buchet R (2006) Phosphorylation-dependent phospholipase D activity of matrix vesicles. *FEBS Lett* 580: 5676-5680

19. Genge BR, Cao X, Wu LN, Buzzi WR, Showman RW, Arsenault AL, Ishikawa Y, Wuthier RE (1992) Establishment of the primary structure of the major lipid-dependent Ca^{2+} binding proteins of chicken growth plate cartilage matrix vesicles: identity with anchorin CII (annexin V) and annexin II. *J Bone Miner Res* 7: 807-819

20. Cao X, Genge BR, Wu LN, Buzzi WR, Showman RM, Wuthier RE (1993) Characterization, cloning and expression of the 67-kDa annexin from chicken growth plate cartilage matrix vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 556-561

21. Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD (2000) The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275: 35577-35583
22. Kirsch T, Pfaffle M (1992) Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett* 310: 143-147
23. Von der Mark K, Mollenhauer J (1997) Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci* 53: 539-545
24. Ishitsuka R, Kojima K, Utsumi H, Ogawa H, Matsumoto I (1998) Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. *J Biol Chem* 273: 9935-9941
25. Takagi H, Asano Y, Yamakawa N, Matsumoto I, Kimata K (2002) Annexin 6 is a putative cell surface receptor for chondroitin sulfate chains. *J Cell Sci* 115: 3309-3318
26. King KB, Chubinskaya S, Reid DL, Madsen LH, Mollenhauer J (1997) Absence of cell-surface annexin V is accompanied by defective collagen matrix binding in the Swarm rat chondrosarcoma. *J Cell Biochem* 65: 131-144
27. Majeska RJ, Holwerda DL, Wuthier RE (1979) Localization of phosphatidylserine in isolated chick epiphyseal cartilage matrix vesicles with trinitrobenzenesulfonate. *Calcif Tissue Int* 27: 41-46
28. Wu LN, Genge BR, Dunkelberger DG, LeGeros RZ, Concannon B, Wuthier RE (1997) Physicochemical characterization of the nucleation core of matrix vesicles. *J Biol Chem* 272: 4404-4411
29. Zhang L, Balcerzak M, Radisson J, Thouverey C, Pikula S, Azzar G, Buchet R (2005) Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca^{2+} and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J Biol Chem* 280: 37289-37296
30. Wu LN, Genge BR, Sauer GR, Wuthier RE (1996) Characterization and reconstitution of the nucleation complex responsible for mineral formation by growth plate cartilage matrix vesicles. *Connect Tissue Res* 35: 309-315
31. Ortlund E, Chai G, Genge B, Wu LN, Wuthier RE, Lebiada L (2004) Crystal structures of chicken annexin A5 in complex with functional modifiers Ca^{2+} and Zn^{2+} reveal Zn^{2+} induced formation of non-planar assemblies. *Annexins* 1: 183-190
32. Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, Pacifici M (1997) Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* 36: 3359-3367
33. Menke M, Gerke V, Steinem C (2005) Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44: 15296-15303
34. Genge BR, Wu LNY, Adkisson IV HD, Wuthier RE (1991) Matrix vesicle annexins exhibit proteolipid-like properties. Selective partitioning into lipophilic solvents under acidic conditions. *J Biol Chem* 266: 10678-10685
35. Isas JM, Cartailleur JP, Sokolov Y, Patel DR, Langen R, Luecke H, Hall JE, Haigler HT (2000) Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels. *Biochemistry* 39: 3015-3022
36. Beermann ofm cap BB, Hinz HJ, Hofmann A, Huber R (1998) Acid induced equilibrium unfolding of annexin V wild type shows two intermediate states. *FEBS Lett* 423: 265-269
37. Golczak M, Kicinska A, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R, Szweczyk A, Pikula S (2001) Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J* 15: 1083-1085
38. Arispe N, Rojas E, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE (1996) Similarity in calcium channel activity of annexin V and matrix vesicles in planar lipid bilayers. *Biophys J* 71: 1764-1775
39. Wu LN, Wuthier MG, Genge BR, Wuthier RE (1997) In situ levels of intracellular Ca^{2+} and pH in avian growth plate cartilage. *Clin Orthop* 335: 310-324
40. Kirsch T, Swoboda B, Nah H (2000) Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 294-302
41. Kouri JB, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, Gonzalez S (2000) Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumatol* 27: 1005-1019
42. Pfander D, Swoboda B, Kirsch T (2001) Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* 159: 1777-1783
43. Howell DS (2002) Articular cartilage calcification and matrix vesicles. *Curr Rheumatol Rep* 4: 265-269
44. Hsu HH, Camacho NP, Sun F, Tawfik O, Aono H (2000) Isolation of calcifiable vesicles from aortas of rabbits fed with high cholesterol diets. *Arteriosclerosis* 153: 337-348
45. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F (2005) Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 525-531

Annexin in mineralization process

Anna Sekrecka^{1,2}, Marcin Balcerzak¹, Cyril Thouverey^{1,3}, Rene Buchet³, Sławomir Pikula^{1,✉}

¹Nencki Institute of Experimental Biology Polish Academy of Science, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa, Poland

²Department of Biophysics, Agricultural University SGGW, 159 Nowoursynowska St., 02-776 Warszawa, Poland

³Universite Claude Bernard Lyon 1, UFR Chimie-Biochimie, CNRS UMR 5013, Bat Chevreul, 43 Bd 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

✉e-mail: s.pikula@nencki.gov.pl

Key words: annexin, mineralization, matrix vesicles

ABSTRACT

Annexins are necessary for mineralization process. They seem to play a major role in regulation of cells competent in mineralization as well as in direct formation of mineral phase in the extracellular matrix. Their ability to accommodate to different functions in different cellular compartments is associated with their property to bind to biological membranes in a lipid- and Ca^{2+} -dependent and independent manners. The aim of this review is to describe potential functions of the annexin family of proteins in a mineralization process with special emphasis to structure-function relationships of annexins.

Udział aneksyn w zależnym od wapnia procesie wydzielania katecholamin

Paulina Podszywałow-Bartnicka¹

Agnieszka Strzelecka-Kiliszek¹

Ludmiła Żylińska²

Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}

¹Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie
²Uniwersytet Medyczny w Łodzi

[✉]Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 47, e-mail: j.bandorowicz-pikuła@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 12 października 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 17 kwietnia 2007 r.

Słowa kluczowe: komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy, komórki PC12, granule chromochłonne, egzocytoza, katecholaminy, aneksyny

Wykaz skrótów: AnxA – aneksyny ssaków; DAG – diacyloglicerol; IP₃ – 1,3,4 – trójfosforan inozytolu; PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza białkowa C; PMCA – Ca²⁺-ATPaza błony komórkowej; PLA₂ – fosfolipaza A₂; PLC – fosfolipaza C; TGN – rejon *trans* aparatu Golgiego; SERCA – Ca²⁺-ATPaza siateczki śródplazmatycznej

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2006-2009, numer projektu N301 049 31-1592

STRESZCZENIE

Wydzielanie katecholamin, głównie adrenaliny i noradrenaliny, przez komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy zachodzi w odpowiedzi na pojawienie się bodźca, takiego jak nikotyna lub depolaryzacja błony komórkowej. Ważną rolę w regulacji wydzielania katecholamin odgrywają jony wapnia, których wewnątrzkomórkowe stężenie wzrasta w odpowiedzi komórki na bodziec i stanowi sygnał do rozpoczęcia procesu wydzielania. Udział aneksyn w tym procesie, białek wiążących jony wapnia i uczestniczących w regulacji dynamiki błon biologicznych jest nadal przedmiotem naukowej debaty. Spośród 12 podrodzin aneksyn (aneksyny A1-A11 i A13), występujących w organizmach ssaków, tylko zaangażowanie aneksyny A2 (AnxA2) i aneksyny A6 (AnxA6) w procesie endocytozy jest dobrze udokumentowane. Zgromadzone dotąd obserwacje pozwalają na wysunięcie hipotezy, że aneksyny mogą pełnić ważne funkcje w zależnym od Ca²⁺ procesie wydzielania katecholamin.

WPROWADZENIE

Do najważniejszych katecholamin wydzielanych przez komórki rdzenia nadnerczy należą adrenalina i noradrenalina. Katecholaminy wpływają na wiele narządów, oddziałując poprzez swoje receptory [1]. Efektem ich działania jest np. skurcz naczyń tętniczych, przyspieszenie pracy serca i zwiększenie siły skurczu mięśnia sercowego, wzrost ciśnienia tętniczego i rozkurcz oskrzeli. Mają one także duży wpływ na procesy metaboliczne organizmu, np. podwyższenie poziomu cukru we krwi (wskutek nasilenia rozpadu glikogenu w wątrobie i mięśniach oraz przez hamowanie wydzielania insuliny w trzustce). Powodują też rozpad tłuszczów czyli lipolizę. Umożliwia to uruchomienie zapasów energetycznych w stanach wymagających dużej mobilizacji organizmu.

Istnieje szereg chorób, u podłoża których leżą zaburzenia regulacji procesów wydzielania katecholamin. Należy do nich guz chromochłonny rdzenia nadnerczy (ang. *pheochromocytoma*), którego cechą charakterystyczną jest nadczynność wydzielania katecholamin, a częstość występowania tego nowotworu jest uwarunkowana genetycznie. W badaniach mechanizmu wydzielania katecholamin oraz sposobu regulacji tego procesu powszechnie wykorzystywana jest linia komórkowa PC12 uzyskana z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura. W komórkach PC12 dobrze poznano przebieg egzocytozy, jednak mechanizmy regulujące poszczególne jej etapy nie zostały jeszcze dokładnie opisane.

MECHANIZM WYDZIELANIA KATECHOLAMIN PRZEZ KOMÓRKI CHROMOCHŁONNE

Wydzielanie katecholamin odbywa się na drodze regulowanej egzocytozy. W komórkach chromochłonnych, nowopowstałe pęcherzyki wydzielnicze są przechowywane na terenie cytoplazmy i w rejonie podbłonowym komórki. Fuzja granul z błoną komórkową następuje jedynie w odpowiedzi na stymulację komórki i wzrost stężenia specyficznych przekaźników drugiego rzędu. Największe znaczenie w tym względzie mają jony wapnia, ATP i GTP, a także białka wiążące jony wapnia i GTP [1].

Poszczególne fazy wydzielania katecholamin przebiegają w obecności różnych stężeń jonów wapnia. Przemieszczanie się granul chromochłonnych z rejonu *trans* aparatu Golgiego (TGN) do błony plazmatycznej i ich oddziaływanie z podbłonową siecią filamentów aktynowych odbywa się w zakresie stężenia jonów wapnia od 0,1 μM do 10 μM. Drugi etap wydzielania, polegający na rozluźnieniu sieci filamentów aktynowych i uwolnieniu granul zachodzi w obecności od 1 μM do 100 μM Ca²⁺. Ostatni etap, w którym błona granul oddziałuje z błoną plazmatyczną i ulega z nią fuzji zachodzi w jeszcze wyższych stężeniach Ca²⁺ (lokalny wzrost stężenia Ca²⁺ może osiągać wartości od 100 μM do 1 mM) [1]. Szeroki zakres stężeń Ca²⁺, w obecności których zachodzi egzocytoza wskazu-

je, że w proces ten zaangażowane mogą być białka wiążące jony wapnia, charakteryzujące się różnym powinowactwem w stosunku do kationu. Postuluje się istnienie zależnych od stężenia Ca^{2+} rejonów w komórce, w których białka kluczowe w procesie wydzielania katecholamin zgromadzone są blisko siebie, umożliwiając sprawne przeprowadzenie całego procesu po stymulacji komórki [2]. Kluczowymi białkami wchodzącymi w skład takich rejonów są kanały wapniowe typu L lub N regulowane potencjałem błonowym, które transportują jony wapnia do wnętrza komórki w odpowiedzi na bodziec. Dodatkowo zaobserwowano, że fuzja granul z błoną komórkową zachodzi w rejonie błony otaczającym te kanały [3]. Wzrost stężenia jonów wapnia oraz poziomu ATP umożliwia rozluźnienie podbłonowej sieci filamentów aktynowych, stanowiącej rodzaj mechanicznej bariery i tym samym pozwala na przemieszczenie się granul w kierunku błony plazmatycznej [4].

Podwyższone stężenie Ca^{2+} w cytosolu, w wyniku stymulacji komórki, po pewnym czasie powraca do stężenia spoczynkowego, dzięki usuwaniu Ca^{2+} na zewnątrz komórki lub do organelli wewnątrzkomórkowych poprzez różne systemy transportu. Jony wapnia są transportowane przez wymienniki $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ znajdujące się w błonie plazmatycznej, granulach chromochłonnych i w błonie mitochondriów oraz Ca^{2+} -ATPazy zlokalizowane w błonie plazmatycznej (PMCA) i siateczce śródplazmatycznej (SERCA), które kosztem energii pochodzącej z hydrolizy ATP aktywnie usuwają Ca^{2+} z cytosolu [5].

Mechanizmy regulacji wydzielania katecholamin nie są dokładnie poznane. Postuluje się, że jony wapnia mogą w sposób pośredni regulować proces egzocytozy, aktywując fosfolipazę A_2 (PLA_2) i fosfolipazę C (PLC). Hydroliza fosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) przez PLC prowadzi do powstania 1,3,4-trójfosforanu inozytolu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG). Diacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C (PKC), zwiększając powinowactwo kinazy w stosunku do Ca^{2+} . PKC fosforyluje białka kompleksu SNARE zaangażowane w proces fuzji granul z błoną komórkową, takie jak Rab3, rabfilina 3A, VAMP, synaptotagmina, α -SNAP, NSF, Munc-18 i SNAP25. Wykazano na przykład, że fosforylacja

białka SNAP25 hamuje tworzenie kompleksu białek SNARE i w efekcie proces egzocytozy, co wskazuje na rolę PKC jako enzymu regulującego proces fuzji granul [1].

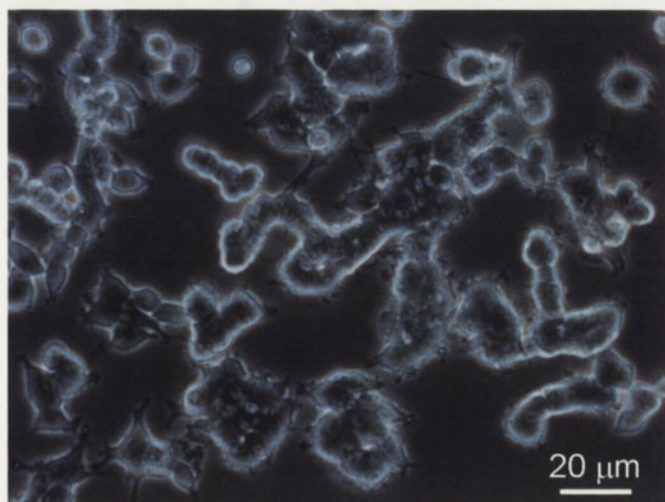
Wydzielanie katecholamin jest stymulowane przez wzrost stężenia cAMP w komórce i aktywację kinazy białkowej A (PKA). Ponadto ważną rolę regulatorową w procesie egzocytozy odgrywają białka wiążące GTP. Przede wszystkim są to białka z rodziny Rab (Rab3 i Rab27) oraz Arf (zwłaszcza Arf6), zaliczane do małych białek G typu Ras. Wykazano, że Rab3 w komórkach PC12 spowalnia tempo egzocytozy granul chromochłonnych [6], w przeciwieństwie do białka Rab27, które stymuluje egzocytozę w tych komórkach [7]. Z kolei białko Arf6 reguluje procesy transportu wewnątrzkomórkowego (zarówno endo- jak i egzocytozy) oraz wpływa na podbłonową sieć filamentów aktynowych [8].

UDZIAŁ ANEKSYN W PROCESIE EGZOCYTOZY

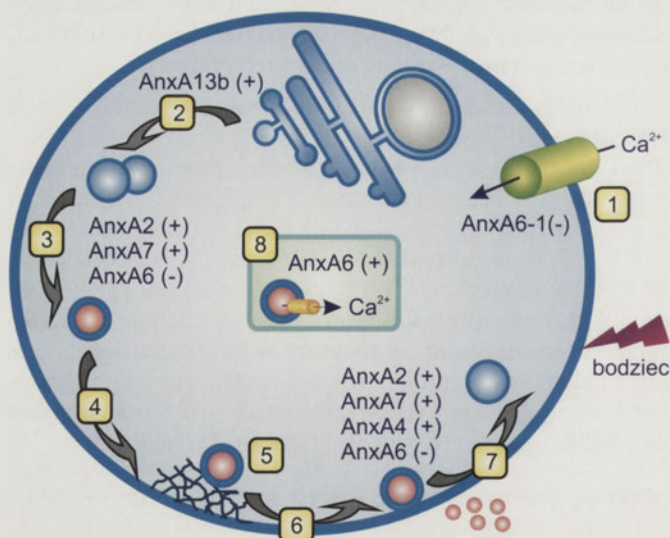
W procesie wydzielania katecholamin ważną rolę odgrywają także oddziaływania białko-białko i białko-lipidy błon biologicznych. W tym drugim typie oddziaływań aneksyny mogą pełnić ważną funkcję białek regulujących ten proces. Biorąc pod uwagę obowiązujące poglądy na temat funkcji aneksyn w komórce, m.in., zaangażowanie tych białek w kontrolę stężenia jonów wapnia w komórce, regulację transportu pęcherzykowego, hamowanie aktywności PLA_2 i PKC, znaczenie aneksyn jako białek regulatorowych w procesie wydzielania katecholamin wydaje się być bardzo prawdopodobne. Stwierdzono m.in. że fosforylacja AnxA2 przez PKC obniża zdolność wiązania się tej aneksyny z błoną granul chromochłonnych [9]. Natomiast AnxA6 może mieć wpływ na lokalizację PKC w komórce, co sugeruje oddziaływanie tych białek ze sobą [10].

Udział aneksyn w procesie transportu pęcherzykowego w komórkach jest od wielu lat intensywnie badany, przede wszystkim w kontekście zaangażowania tych białek w proces endocytozy. Udział AnxA2 w transporcie wczesnych endosomów, oddziaływanie AnxA6 z późnymi endosomami lub udział w procesie powstawania pęcherzyków oplaszczonych klatryną, zostały już dobrze udokumentowane [11]. Wyniki szeregu doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo*, wskazują na zaangażowanie AnxA2, AnxA4, AnxA6 i AnxA7, również w proces wydzielania katecholamin.

Pogląd, iż aneksyny mogą być zaangażowane w proces egzocytozy pojawił się wraz z odkryciem, że granule wydzielnicze wyizolowane z rdzenia nadnerczy mogą ulegać agregacji i następnie fuzji w obecności ekstraktu białek cytoplazmatycznych z komórek chromochłonnych. Doprowadziło to do oczyszczenia w 1978 r. białka o masie 55 kDa nazwanego początkowo syneksyną (a później aneksyną A7) [12], jak również AnxA2 i AnxA6 zaliczonych wtedy, wspólnie z PKC i PLA_2 , do rodziny chromobindyn. Możliwość, że AnxA7, AnxA6 i AnxA2, pełnią funkcje białek regulujących powstawanie połączeń między błonami podczas procesu egzocytozy została zaproponowana na podstawie obserwacji, że białka te ulegają współocyszczeniu z granulami wydzielniczymi. Dodatkowo stwierdzono, w doświadczeniach przeprowadzonych z zastosowaniem wyizolowanych granul, że AnxA6 wiąże się z błoną granul w



Rycina 1. Komórki PC12 w hodowli obserwowane w kontraście interferencyjnym (obraz uzyskany za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego DMI6000B firmy Leica).



Rycina 2. Hipotetyczny udział aneksyn w procesie wydzielania katecholamin regulowanym przez jony wapnia. Proces egzocytozy zachodzi w kilku etapach. 1) Pobudzenie komórki powoduje napływ Ca^{2+} . W komórkach niepobudliwych wykazano, że izoforma 1 aneksyny A6 (AnxA6-1) może hamować aktywność kanałów wapniowych. 2) W odłączeniu niedojrzałych granul wydzielnicych od błon *trans* aparatu Golgiego ważną rolę białka regulacyjnego odgrywa AnxA13b. 3) Fuzję granul wydzielnicych, jaka towarzyszy ich dojrzewaniu, mogą wspomagać AnxA2 i AnxA7; fuzja granul ulega zahamowaniu w obecności AnxA6. 4) Dojrzałe granule chromochłonne przemieszczają się w kierunku błony komórkowej. 5) Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} powoduje rozluźnienie podblonowego szkieletu aktynowego, co umożliwia przemieszczenie się granul wydzielnicych w bezpośrednie sąsiedztwo błony komórkowej. 6) Zakotwiczenie granul w błonie komórkowej. 7) Aktywacja kompleksu białek SNARE i fuzja błony granul wydzielnicych z błoną komórkową; uwolnienie zawartości granul na zewnątrz komórki. W tych dwóch ostatnich etapach aneksyny mogą odgrywać kluczową rolę, umożliwiając połączenie błony granul z błoną komórkową (AnxA2, AnxA4, AnxA7) lub prawdopodobnie zaburzając te oddziaływania (AnxA6). 8) W doświadczeniach *in vitro* przeprowadzonych na oczyszczonych granulach chromochłonnych wykazano, że AnxA6 powoduje wypływ jonów wapnia z wnętrza granul; czy zjawisko to zachodzi *in vivo*, pozostaje kwestią nierozstrzygniętą. Objaśnienia: (+) stymulacja procesu; (-) hamowanie procesu.

sposób zależny od stężenia jonów wapnia i zaburza proces agregacji granul wywołany przez AnxA7 i AnxA2, prawdopodobnie współzawodnicząc z tymi aneksynami o miejsca wiązania na błonie pęcherzyka; AnxA6 nazwano wtedy synhabiną [13]. Wysznięto wówczas przypuszczenie, że jeśli AnxA2 w kompleksie z białkiem p11 (z którym tworzy heterotetramer AnxA2,p11,) umożliwi połączenie błony dwóch pęcherzyków, to AnxA2 może niszczyć powstałe połączenia i konkurować z AnxA6 o miejsca wiązania [13]. W doświadczeniach tych stwierdzono ponadto, że AnxA6 wywołuje wypływ jonów wapnia z wnętrza granul chromochłonnych. Takiego zjawiska nie obserwowano w obecności AnxA2 i AnxA7 [14]. Dziś wiadomo, że AnxA6 może tworzyć kanały jonowe i transportować kationy dwuwartościowe w środowisku o obniżonym pH [15]; takie pH panuje wewnątrz granul chromochłonnych. W pH 7,0 AnxA6 tworzy *in vitro* kanały jonowe dopiero po związaniu GTP [16,17].

Z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego stwierdzono, że AnxA2 występuje zarówno w świetle granul, jak i w formie związanej na powierzchni błony (strona cytosolowa), podczas gdy AnxA6 jest zlokalizowana na błonie granul od strony światła pęcherzyka. W wyniku pobudzenia komórek nikotyną AnxA2 ulega uwalnieniu z komórek do środowiska zewnętrznego, zaś AnxA6 pozostaje nadal związana z błoną [18].

Zwiększone powinowactwo AnxA6 i AnxA2 w stosunku do błony granul wydzielnicych może wynikać z obecności w błonie znacznych ilości cholesterolu i lizofosfatydylocholine. AnxA6 i AnxA2 uczestniczą w tworzeniu mikrodomen lipidowych [19], a zaburzenia w rozmieszczeniu cholesterolu w komórce wywołują zaburzenia lokalizacji AnxA6 [20]. W świetle tych właściwości aneksyn, istotnym wydaje się obecność cholesterolu, mającego kluczowe znaczenie w procesie powstawania pęcherzyków transportowych (uczestniczących zarówno w procesie egzocytozy konstytutywnej, jak i regulowanej) w rejonie *trans* aparatu Golgiego w komórkach neurowydzielnicych (linia komórkowa AtT-20) [21]. Jedną z izoform AnxA13 (AnxA13b) specyficznie wiąże się właśnie z tym rejonem aparatu Golgiego, gdzie odgrywa ważną rolę w procesie odłączania się pęcherzyków od aparatu Golgiego [22]. W doświadczeniach *in vitro* dotyczących wiązania się AnxA6 do liposomów o różnym składzie lipidowym wykazano, że białko to najsilniej wiąże się z liposomami, w których błonie przeważa fosfatydyloseryna, kwas fosfatydowy i cholesterol. Co istotne, kwas fosfatydowy powstaje w wyniku hydrolizy fosfatydylocholine katalizowanej przez fosfolipazę D aktywowaną w wyniku stymulacji procesu egzocytozy [4], co może przyczyniać się do nasilenia oddziaływania AnxA6 z błoną komórkową.

W toku dalszych badań wyizolowano kompleks białkowy regulujący proces fuzji granul chromochłonnych z błoną komórkową, w którego skład wchodziły: rabfilina, synaptotagmina i AnxA4. W kompleksie tym kluczową rolę w regulacji procesu fuzji błon odgrywała AnxA4 [23].

Zaburzenia w poziomie syntezy aneksyn mogą wpływać na proces egzocytozy. W komórkach beta wysepek Langerhansa trzustki stwierdzono wiązanie AnxA1 z pęcherzykami zawierającymi insulinę; zaobserwowano także, że rozwójowi cukrzycy towarzyszyło obniżenie poziomu ekspresji genu *ANXA1* kodującego AnxA1 [24]. W przypadku AnxA2, chociaż wykazano, iż wydzielaniu katecholamin towarzyszy przemieszczenie się AnxA2 do błony komórkowej w odpowiedzi na pobudzenie komórki [25], to jednak zmodyfikowanie ekspresji genu *ANXA2* kodującego AnxA2 w komórkach linii PC12 nie miało wpływu na zależny od zmian stężenia Ca^{2+} proces wydzielania katecholamin [26]. Z drugiej strony zahamowanie ekspresji *ANXA2* z wykorzystaniem techniki siRNA w komórkach śródbłonna spowodowało obniżenie intensywności egzocytozy ciałek Weibel-Palade [27].

AnxA6 występuje w różnych typach komórek, w tym również w nabłonkach wyspecjalizowanych w procesie egzocytozy, takich jak gruczoły potowe lub komórki nabłonkowe gruczołów ślinowych. Poziom ekspresji genu *ANXA6* kodującego to białko wzrasta w trakcie różnicowania się tymocytów do limfocytów, z poziomu uniemożliwiającego detekcję białka w tymocytach, aż do wysokiego w limfocytach krążących we krwi [28]. Pojawienie się AnxA6 jest w tym przypadku skorelowane z nabyciem przez te komórki fenotypu umożliwiającego wydzielanie cytokin. Proces egzocytozy w limfocytach podlega kompleksowej kontroli, stąd obecność potencjalnego czynnika hamującego proces egzocytozy umożliwia bardziej złożoną regulację. Za funk-

cją AnxA6 jako czynnika hamującego proces wydzielania przemawia fakt, iż poziom syntezy tego białka w nabłonku wydzielniczym gruczołów mlecznych piersi w czasie laktacji obniża się do trudno wykrywalnego w skrawkach tkanek. Najprawdopodobniej wydzielana podczas laktacji prolaktyna hamuje ekspresję ANXA6 w tych komórkach, ułatwiając proces wydzielania mleka [28].

RÓŻNICE POMIĘDZY IZOFORMAMI ANXA6

Ze względu na występowanie w komórkach dwóch izoform AnxA6, ważną kwestią, którą należy rozstrzygnąć w toku dalszych badań nad udziałem AnxA6 w procesie egzocytozy, są potencjalne różnice w funkcjonowaniu tych izoform w komórce. Powód istnienia w komórkach dwóch izoform AnxA6 (dłuższej AnxA6-1, i krótszej AnxA6-2) nie jest znany. Izoformy powstają w komórce w procesie różnicowego cięcia i składania pre-mRNA. W wyniku tego procesu usuwany jest ekson 21 kodujący reszty VAAEIL zlokalizowane w rejonie łącznika pomiędzy powtarzającymi się domenami VI i VII w cząsteczce AnxA6. Z doświadczeń *in vitro* wynika, że AnxA6-2 charakteryzuje się wyższym powinowactwem w stosunku do jonów wapnia, większą hydrofobowością i bardziej ujemnym ładunkiem powierzchniowym w porównaniu z izoformą AnxA6-1 [15,29]. Różnice w tych właściwościach mogą wskazywać na odmienną rolę, jaką izoformy AnxA6 mogą odgrywać w komórkach. W doświadczeniach na komórkach nowotworowych linii A431, w których naturalnie nie występuje AnxA6, doświadczenie wywołana nadekspresja genu kodującego izoformy AnxA6 pozwoliła zaobserwować hamujący wpływ dłuższej izoformy na napływ Ca^{2+} do tych komórek [30].

Stwierdzono, że niezależnie od typu tkanki, stosunek zawartości dwóch izoform jest zawsze przesunięty na korzyść izoformy dłuższej (AnxA6-1) [29]. Wskazuje to na możliwość, iż to właśnie AnxA6-2 pełni w komórce ważną funkcję regulatorową. Wykazano ponadto, że stosunek AnxA6-1/AnxA6-2 zmienia się na korzyść mniejszej izoformy w procesie transformacji nowotworowej fibroblastów [31], co może również zachodzić w trakcie powstawania guza rdzenia nadnerczy.

PODSUMOWANIE

Udział aneksyn w regulacji procesów transportu wewnątrzkomórkowego postulowany jest od 80. lat XX wieku, kiedy przypadkowo oczyszczono pierwszą aneksynę izolującą granule chromochłonne z rdzenia nadnerczy; wyizolowano wówczas AnxA7 [12]. Wyniki późniejszych doświadczeń przeprowadzonych na komórkach chromochłonnych wykazały udział w procesie egzocytozy takich aneksyn, jak AnxA1, AnxA2, AnxA4, AnxA6, AnxA7 i AnxA13b. Szczególnie znaczenie AnxA6 w tym procesie pozostaje niejasne. Postuluje się, że białko to pełni rolę regulatora procesu egzocytozy. Zaobserwowano zaburzenie agregacji i fuzji granul chromochłonnych w obecności AnxA6, a także uwalnianie Ca^{2+} z granul chromochłonnych pod wpływem AnxA6. Ze względu na występowanie dwóch izoform AnxA6 w komórkach chromochłonnych, sytuacja ulega komplikacji, bowiem odpowiedzi wymaga pytanie o znaczenie tych izoform w procesie wydzielania katecholamin.

PIŚMIENNICTWO

1. Burgoyne RD, Morgan A (2002) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83: 581-632
2. Ore LO, Artalejo AR (2004) Intracellular Ca^{2+} microdomains-triggered exocytosis in neuroendocrine cells. *Trends Neurosci* 27: 113-115
3. Becherer U, Moser T, Stuhmer W, Oheim M (2003) Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci* 6: 846-853
4. Vitale N (2002) Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor 6 (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* 159: 79-89
5. Żylińska L, Kawecka I, Lachowicz L, Szmraj J (2002) The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump. *Cell Mol Biol Lett* 7: 1037-1045
6. Chung SH, Joberty G, Gelino EA, Macara IG, Holz RW (1999) Comparison of the effects on secretion in chromaffin and PC12 cells of Rab3 family members and mutants. *J Biol Chem* 274: 18113-18120
7. Fucuda M, Kanno E, Saegusa C, Ogata Y, Kuroda TS (2002) Slp4/granuphilin-a regulated dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 277: 39673-39678
8. Fucuda M (2003) Slp4-a/granuphilin-a inhibits dense-core vesicle exocytosis through interaction with the GDP-bound form of Rab27A in PC12 cells. *J Biol Chem* 278: 15390-15396
9. Regnoui F, Sagot I, Delouche B, Devilliers G, Cartaud J, Henry JP, Pradel LA (1995) *In vitro* phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J Biol Chem* 270: 27143-27150
10. Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Walker JH, Biden TJ (1998) Activated protein kinase C associates with annexin VI from skeletal muscle. *Biochem J* 330: 657-681
11. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins in membrane dynamics. *Physiol Rev* 82: 331-371
12. Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB (1979) Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem* 253: 2858-2866
13. Zaks WJ, Creutz CE (1990) Annexin-chromaffin granule membrane interactions: a comparative study of synexin, p32 and p67. *Biochim Biophys Acta* 1029: 149-160
14. Jones PG, Fitzpatrick S, Waisman DM (1994) Chromaffin granules release calcium on contact with annexin VI: implications for exocytosis. *Biochemistry* 33: 8180-8187
15. Golczak M, Kicinska A, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R, Szewczyk A, Pikula S (2001) Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *FASEB J* 15: 1083-1085
16. Kirilenko A, Golczak M, Pikula S, Buchet R, Bandorowicz-Pikula J (2002) GTP-induced membrane binding and ion channel activity of annexin VI: is annexin VI a GTP biosensor? *Biophys J* 82: 2737-2745
17. Bandorowicz-Pikula J, Kirilenko A, van Deursen R, Golczak M, Kuhnel M, Lancelin JM, Pikula S, Buchet R (2003) A putative consensus sequence for nucleotide-binding site of annexin A6. *Biochemistry* 42: 9137-9146
18. Faure AV, Migne C, Devilliers G, Ayala-Sanmartin J (2002) Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp Cell Res* 276: 79-89
19. Babiychuk EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics: Ca^{2+} -regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150: 1113-1123
20. de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 277: 32187-32194
21. Wang Y, Thiele C, Huttner WB (2000) Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 1: 952-962

22. Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K (1998) Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* 142: 1413-1427
23. Willshaw A, Grant K, Yan J, Rockliffe N, Ambavarapu S, Burdya G, Varro A, Fukuoka S, Gawler D (2004) Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Lett* 559: 13-21
24. Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimura T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R, Takahara J (1995) Involvement of annexin I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 136: 2421-2426
25. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 133: 1217-1236
26. Graham ME, Gerke V, Burgoyne RD (1997) Modification of annexin II expression in PC12 cell line does not affect Ca²⁺-dependent exocytosis. *Mol Biol Cell* 8: 431-442
27. Knop M, Aareskjold E, Bode G, Gerke V (2004) Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *EMBO J* 23: 2982-2992
28. Clark DM, Moss SE, Wright NA, Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-callectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B and T lymphocytes. *Histochemistry* 96: 105-112
29. Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR (1994) Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1223: 368-374
30. Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P, Moss SE (1999) Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-specific. *Biochem Biophys Res Comm* 260: 540-546
31. Edwards HC, Moss SE (1995) Functional and genetic analysis of annexin VI. *Mol Cell Biochem* 149-150: 293-299

Participation of annexins in Ca²⁺-regulated secretion of catecholamines

Paulina Podszywałow-Bartnicka¹, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek¹, Ludmiła Żylińska², Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}

¹Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa, Poland

²Medical University of Lodz, 6/8 Mazowiecka Str, 92-215 Lodz, Poland

✉e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Key words: chromaffin cells from adrenal medulla, PC12 cells, chromaffin granules, exocytosis, catecholamine, annexins

ABSTRACT

Secretion of catecholamines by adrenal medulla chromaffin cells occurs after their stimulation by nicotine or depolarization of plasma membrane. Adrenal medulla secretes mostly noradrenaline and adrenaline, both having pleiotropic action in the organism. Central role in regulation of exocytosis of catecholamines play calcium ions. Their intracellular concentration increases as a cell response to stimulus and creates signal to start secretion. Moreover, annexins are known to participate in regulation of biological membrane dynamics during intracellular transport processes, however their participation in secretion is less established than in endocytosis. Among twelve annexin subfamilies (AnxA1-A11 i A13) expressed in mammalian organisms only involvement of AnxA2 and AnxA6 in endocytosis is well documented. Some data suggests that annexins may play important functions also in Ca²⁺-regulated catecholamine secretion.

Aneksyny w chorobie spichrzeniowej Niemann-Picka typu C

STRESZCZENIE

Choroba Niemann-Picka (ang. *Niemann-Pick disease*) jest uwarunkowaną genetycznie chorobą, corocznie dotykającą 1 na 150 000 żywo urodzonych dzieci na świecie (w Polsce 1–5 przypadków). Ta poważna w skutkach choroba, zaliczana do lizosomalnych chorób spichrzeniowych (ang. *lysosomal storage disorders*), jest związana z nieprawidłowym transportem i magazynowaniem lipidów w komórce. W zależności od rodzaju nagromadzonych lipidów i obrazu klinicznego zidentyfikowano trzy typy choroby A-C. Typ C, który jest przedmiotem niniejszego opracowania, charakteryzuje się nagromadzeniem niezestryfikowanego cholesterolu i glikosfingolipidów w przedziale późnych endosomów. Choć podobnie jak komórki pobrane od osób zdrowych, fibroblasty skóry uzyskane od pacjentów obciążonych chorobą Niemann-Picka typu C, charakteryzują się prawidłową syntezą cholesterolu w siateczce śródplazmatycznej (ER). Również internalizacja i hydroliza cząstek lipoprotein o małej gęstości (LDL) zawierających cholesterol zachodzi w tych komórkach prawidłowo. Jednak na skutek mutacji w jednym z dwóch genów, *NPC1* lub *NPC2*, dochodzi do upośledzenia transportu niezestryfikowanego cholesterolu w kierunku błony plazmatycznej i ER, co w konsekwencji objawia się powstaniem w komórce złożeń cholesterolu w organelach przypominających lizosomy (LSO, ang. *lysosome-like storage organelles*). W niniejszej pracy przeglądowej omówiono udział aneksyn w tworzeniu i stabilizacji wzbogaconych w cholesterol mikrodomen błony, jak również przedstawiono hipotezę opartą na wynikach prac różnych badaczy, na temat prawdopodobnego udziału aneksyn w organizacji błon późnych endosomów i gromadzących cholesterol organeli przypominających lizosomy, których funkcje ulegają upośledzeniu w chorobie Niemann-Picka typu C.

WPROWADZENIE

Aneksyny tworzą rodzinę wewnątrzkomórkowych rozpuszczalnych białek zlokalizowanych przede wszystkim w cytoplazmie, jednak w określonych warunkach wiążących się, w odwracalny sposób, z błoną plazmatyczną i błonami rozmaitych organeli komórkowych [1]. Mechanizm wiązania aneksyn z błonami polega na oddziaływaniach białka z ujemnie naładowanymi cząsteczkami anionowych fosfolipidów w sposób zależny od zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [1], z cząsteczkami cholesterolu, w sposób niezależny od jonów wapnia [2] oraz z GTP [3]. W tym ostatnim przypadku, związanie nukleotydu indukuje tworzenie przez cząsteczki aneksyn zależnych od potencjału błonowego kanałów jonowych o niskiej specyficzności w stosunku do transportowanych kationów [3].

Pomimo dobrze scharakteryzowanej struktury i własności biochemicznych aneksyn, liczba obserwacji precyzyjnie określających funkcje aneksyn w komórce jest ograniczona. W związku z tym, że aneksyny wykazują zdolność oddziaływania z błonami komórkowymi, wielu badaczy uważa, że aneksyny odgrywają ważną rolę w procesach związanych z dynamiką błon, takich jak transport pęcherzykowy w szlaku endocytozy, ze szczególnym naciskiem na wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu [1].

Cholesterol stanowi jeden z podstawowych elementów budulcowych błon komórkowych ssaków. Jako najbardziej rozpowszechniony ze steroli, buduje błony takich organeli komórkowych jak endosomy, lizosomy i aparat Golgiego (ang. *Golgi apparatus*), jednak przede wszystkim wchodzi w skład błony plazmatycznej komórek, gdzie stanowi 35–45% wszystkich lipidów [4]. Należy podkreślić, że pula cholesterolu w błonie plazmatycznej nie jest statyczna, lecz podlega ciągłemu transportowi do wnętrza komórki i z powrotem ku jej powierzchni [5]. Ponadto cholesterol jest ważnym składnikiem mikrodomen w błonach biologicznych, takich jak tratwy (ang. *rafts*, bogate również w glikosfingolipidy) i kaweole (ang. *caveolae*) o podobnym składzie lipidowym co tratwy [6]. Mikrodomeny stanowią wyspecjalizowane rejony błony, na których teren ulegają rekrutacji białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów i biorące udział w wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzykowym [7,8]. Na terenie mikrodomen stwierdzono obecność wielu komplek-

Małgorzata Eliza Buszewska¹

Agnieszka Strzelecka-Kiliszek¹

Anna Tylki-Szymańska²

Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}

¹Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie
²Klinika Chorób Metabolicznych, Endokrynologii i Diabetologii, Instytut "Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka" w Warszawie

[✉]Institut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (022) 589 23 47; e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 12 marca 2007 r.
Artykuł zaakceptowano 5 kwietnia 2007 r.

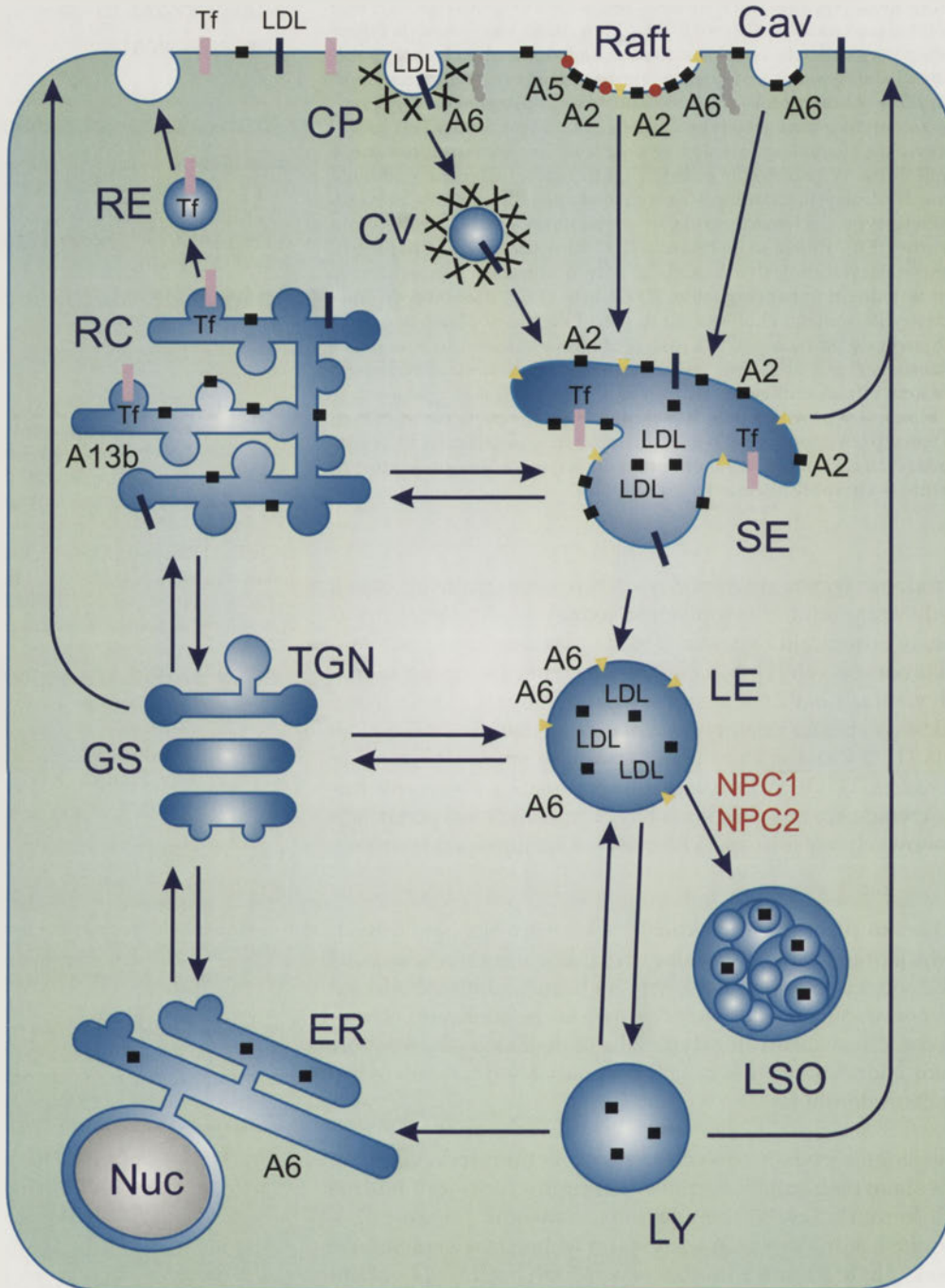
Słowa kluczowe: aneksyny; cholesterol; jony wapnia; mikrodomeny błony; choroba Niemann-Picka typu C

Wykaz skrótów: AnxA – aneksyny kręgowców; ER – siateczka śródplazmatyczna; LDL – lipoproteiny o małej gęstości; LSO – organelum przypominające lizosom magazynujące niezestryfikowany cholesterol; NPC1 lub 2 – białko Niemann-Picka typu C 1 lub 2

Podziękowanie: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w latach 2007-2009, numer projektu N401 049 32-1143

sów białek. Na podkreślenie zasługuje fakt występowania w mikrodomenach szeregu przedstawicieli rodziny aneksyn, takich jak aneksyna A2 (AnxA2), aneksyna A5 (AnxA5), aneksyna A6 (AnxA6) i izoformy aneksyny A13 (AnxA13) [9-11].

Komórki ssaków uzyskują cholesterol z dwóch podstawowych źródeł: syntetyzują go na terenie siateczki śródplazmatycznej i transportują do błony plazmatycznej drogą niezależną od pęcherzyków aparatu Golgiego lub dzięki obecności specyficznych białek receptorowych wiążą i pobierają z osocza na drodze endocytozy receptorowej częst-



Rycina 1. Szlaki transportu pęcherzykowego w fibroblastach. Mutacje w białkach NPC1/NPC2 wpływają na przekształcanie się późnych endosomów (LE) w przypominające lisosomy organelle magazynujące cholesterol (LSO). Na rycinie zaznaczono położenie aneksyn AnxA2, AnxA5, AnxA6, AnxA13b, mogące świadczyć o udziale tych białek w tworzeniu i stabilizowaniu wyspecjalizowanych mikrodomen w błonie (tzw. tratw i kaweoli), jako białek oddziałujących ze szkieletem podbłonowym komórek oraz błonami organelli uczestniczących w endocytozie. W opisie skrótów, w nawiasach, przy nazwie określonego przedziału komórkowego podano wartość pH wewnątrz organelli. Skróty i symbole: A2, A5, A6, A13b – aneksyny A2, A5, A6 i A13b; NPC1/NPC2 – białka Niemann-Picka typu C 1 lub 2; Tf – transferyna; LDL (ang. *low density lipoprotein*) – lipoproteiny o małej gęstości; Cav – kaweole; CP (ang. *coated pit*) – dołek opłaszczony klatryną; CV – pęcherzyk opłaszczony klatryną (pH 7,2–7,4); ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna (pH 7,2–7,4); RC (ang. *recycling compartment*) – przedział, w którym następuje segregacja receptorów do krążących endosomów i powrót receptorów do błony plazmatycznej (pH 6,4–6,5); SE (ang. *sorting endosome*) – sortujący endosom (pH 5,9–6,0); GS – kanaliki równoległe aparatu Golgiego (pH 6,4–6,6); TGN – kanaliki *trans* aparatu Golgiego (pH 5,9–6,2); LE (ang. *late endosome*) – późne endosomy (pH 5,0–6,0); LY – lisosomy (pH 5,0–5,5); LSO (ang. *lysosome-like storage organelles*) – organelum przypominające lisosom magazynujące niezestryfikowany cholesterol (pH nie jest znane); Nuc – jądro; RE (ang. *recycling endosome*) – krążący endosom; ■ – zgrupowania cząsteczek cholesterolu; × – płaszcz klatrynowy, wg. [15].

ki lipoprotein o małej gęstości (LDL, ang. *low density lipoprotein*), będące nośnikami estrów cholesterolu. Proces ten zostaje zapoczątkowany przez związanie cząstek LDL z ich specyficznymi receptorami na błonie plazmatycznej, po czym następuje ich internalizacja do wnętrza komórki. Od błony odłącza się pęcherzyk opłaszczony klatryną i zawierający w swym wnętrzu cząstki LDL, związaną z białkami receptorowymi. Płaszcz klatrynowy wokół pęcherzyka ulega rozpadowi i powstaje endosom, który wędruje do wnętrza komórki, gdzie ulega fuzji z błonami innych endosomów, w których wnętrzu panuje niskie pH (Ryc. 1). W tych warunkach cząstki LDL odłączają się od swoich białek receptorowych, następuje segregacja receptorów i ich powrót do błon. Natomiast rejony endosomów zawierające cząstki LDL, odpączkują od tych struktur, by ulec połączeniu z lizosomami. W lizosomach jest jeszcze niższe pH niż w endosomach i tam zachodzi ostateczny rozpad cząstek LDL do aminokwasów, kwasów tłuszczowych i cholesterolu, które to związki mogą być następnie ponownie wykorzystane przez komórkę [6,12].

ZABURZENIA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO TRANSPORTU CHOLESTEROLU W CHOROBIE NIEMANNA-PICKA TYPU C

Transport cząstek LDL na drodze endocytozy receptorowej często ulega zaburzeniu we wszelkiego rodzaju chorobach spichrzeniowych. Przykładem takiego defektu jest choroba Niemann-Picka (ang. *Niemann-Pick disease*) dziedzicząca się w sposób autosomalny recesywny. W zależności od rodzaju nagromadzonych lipidów i obrazu klinicznego zidentyfikowano następujące typy choroby Niemann-Picka: A, B i C. Typy A i B choroby Niemann-Picka (określane jako typ I) są wynikiem niedoboru aktywności lizosomalnej sfingomielinazy, w wyniku czego następuje nagromadzenie sfingomieliny w komórkach linii makrofagów (w układzie siateczkowo-śródbłonkowym), dochodzi też do uszkodzenia komórek układu nerwowego. Z kolei, choroba Niemann-Picka typu C (typ II) charakteryzuje się akumulacją niezestryfikowanego cholesterolu i glikosfingolipidów w przedziale późnych endosomów. Fibroblasty skóry pobrane od pacjentów obciążonych chorobą Niemann-Picka typu C wykazują prawidłową syntezę cholesterolu w ER. Również internalizacja i hydroliza cząstek LDL zachodzi w tych komórkach prawidłowo. Jednak na skutek mutacji w jednym z dwóch genów, *NPC1* lub *NPC2*, dochodzi do zaburzenia transportu niezestryfikowanego cholesterolu w kierunku błony plazmatycznej i ER, co objawia się powstaniem w komórce złogów cholesterolu w organellach przypominających lizosomy [6,12]. Ponadto w komórkach pacjentów z chorobą Niemann-Picka typu C stwierdzono 90% spadek w produkcji oksysteroli (25- i 27-hydroksycholesterol) w porównaniu z komórkami pobranymi od osób zdrowych. Fakt ten wskazuje na zaburzenie również drogi transportu wolnego cholesterolu z endosomów do wewnętrznej błony mitochondrialnej, miejsca syntezy oksysteroli, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia mechanizmów regulujących homeostazę cholesterolu w komórce [4,13,14].

Większość przypadków choroby Niemann-Picka typu C jest związana z mutacją w genie *NPC1*, znajdującym się na chromosomie 18q11-q12, zaś tylko 5% przypadków ziden-

tyfikowano jako wynik mutacji w genie *NPC2* znajdującym się na chromosomie 14q24.3. Produktem genu *NPC1* jest białko NPC1 (zbudowane z 1247 reszt aminokwasowych), glikoproteina zawierająca 13 transbłonowych domen, zlokalizowana w błonie późnych endosomów oraz czasowo lizosomów i błonach aparatu Golgiego, która wiąże cholesterol dzięki obecności w jej cząsteczce wyspecjalizowanej domeny SSD (ang. *sterol-sensing domain*). Białko NPC2 (zbudowane z 151 reszt aminokwasowych) jest niewielkim rozpuszczalnym białkiem późnych endosomów i lizosomów, mogącym ulegać wydzieleniu na zewnątrz komórki i wiążącym receptor mannozo-6-fosforanu, cholesterol oraz kwasy tłuszczowe [12].

Chociaż choroba Niemann-Picka typu C nosi taki epinim jak klasyczny deficyt kwaśnej sfingomielinazy, to jednak jest to choroba o zupełnie innym patomechanizmie. Klinicznie przypomina nieco klasyczną postać choroby; później okazało się jednak, że obniżona aktywność sfingomielinazy jest zjawiskiem wtórnym, a patogenеза choroby jest zupełnie inna. Objawy choroby Niemann-Picka typu C mogą objawiać się już w okresie niemowlęcym, jak i w wieku dojrzałym. Najczęściej są to powiększenie śledziony i wątroby oraz objawy degeneracyjne układu nerwowego postępujące z różną dynamiką, ale z czasem dominujące nad objawami trzewnymi. Jednym z pierwszych objawów neurologicznych w chorobie Niemann-Picka typu C jest dyskretna apraksja oczna. W fenotypie o późnym początku objawy trzewne mogą nie występować, obserwowane są tylko objawy neurologiczne [16,17].

ROLA ANEKSYNY A6 W HOMEOSTAZIE CHOLESTEROLU

Aneksyna A6 (AnxA6) jako przedstawiciel rodziny aneksyn, jest białkiem które wiąże się z błoną plazmatyczną, błonami organelli komórkowych [18,19] oraz z mikrodomenami występującymi w błonie plazmatycznej [2,20,21], przez co występuje się mu funkcje w transporcie pęcherzykowym w komórce. Już wyniki pierwszych doświadczeń wskazujące na oddziaływanie AnxA6 z cytoszkieletem aktywnym w fibroblastach [22] i w komórkach mięśni gładkich skłoniły badaczy do wysunięcia hipotezy, że AnxA6 odgrywa rolę „czujnika” zmian stężenia jonów wapnia w trakcie endocytozy [23]. Ponadto wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka w hepatocytach szczura [24], w komórkach WIF-B (ang. *rat hepatoma hybrid cell line*) oraz w komórkach NRK (ang. *normal rat kidney cell line*), w których AnxA6 współwystępuje z białkiem lizosomów lgp120 [25] wskazują na prawdopodobny udział AnxA6 w szlakach endocytozy, zarówno komórek spolaryzowanych, takich jak hepatocyty, jak i niespolaryzowanych. Powyższy wniosek wzmacniają również obserwacje wskazujące na udział AnxA6 w początkowych etapach endocytozy cząstek LDL w fibroblastach. Stwierdzono, że AnxA6 aktywuje proteazę cysteinową, która trawi spektrynę, przyczyniając się w ten sposób do przebudowy szkieletu podbłonowego tych komórek. W wyniku tej reorganizacji pęcherzyki opłaszczone klatryną, zawierające cząstki LDL, mogą oderwać się od błony plazmatycznej [26,27]. Podobnie jak inni przedstawiciele rodziny aneksyn, AnxA6 wiąże się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami w sposób zależny od zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Ku

zaskoczeniu badaczy, w komórkach CHO stwierdzono istnienie dwóch puli tego białka. Obok puli cząsteczek AnxA6 (około 70–80%) wiążących się z błoną w sposób zależny od wapnia, zaobserwowano istnienie puli białka reagującego na zmiany stężenia i wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia cholesterolu w różnych przedziałach komórki [2].

Istotnym faktem, który skłania badaczy do przypuszczeń, że AnxA6 uczestniczy w etiologii choroby Niemann-Picka, były wyniki badań nad chorobą Niemann-Picka typu C stwierdzające, że zaburzenia równowagi lipidowej mogą zmieniać właściwości mikrodomen błon. W odróżnieniu od błon wczesnych i krążących endosomów oraz błon pęcherzyków aparatu Golgiego [28], błony późnych endosomów i lizosomów nie wykazują obecności mikrodomen, prawdopodobnie z powodu aktywności hydrolaz sfingolipidów [6]. W przypadku komórek o fenotypie NPC sytuacja jest odmienna. Wysoki poziom cholesterolu i glikosfingolipidów jest przyczyną przesunięcia mikrodomen z wczesnych do późnych endosomów, a wraz z nimi także AnxA6 [2,20,21]. W doświadczeniach, które polegały na indukowaniu w zdrowych komórkach fenotypu NPC, poprzez potraktowanie ich inhibitorem transportu cholesterolu, 3-β-[2-(dietyloamino)etoksy]androst-5-en-17-onem (U18666A), zaobserwowano przemieszczenie AnxA6 w kierunku rejonu okołojądrowego komórki i wiązanie z błonami późnych endosomów. Białko powracało do pierwotnej lokalizacji po zastosowaniu inhibitora syntezy glikolipidów, N-butylodeoksygalaktonojirimycyny (NB-DGJ). Ponadto stwierdzono zmniejszoną zdolność AnxA6 do wiązania z błonami wczesnych i późnych endosomów traktowanymi czynnikami wiążącymi się z cholesterolem (digitoniną, filipiną) lub powodującymi usunięcie cholesterolu (metylo-β-cyklodekstryną) z błon [2].

PRÓBY TERAPII W CHOROBYE NIEMANNA-PICKA TYPU C

Na świecie opracowano już kilka metod jako propozycji przeciwdziałania chorobie Niemann-Picka typu C. Większość tych strategii opiera się na degradowaniu złogów lipidów (terapia genowa, transplantacje komórkami macierzystymi szpiku kostnego i zastępowanie neuronów) lub zastosowanie związków hamujących syntezę glikolipidów [29]. Najbardziej obiecujące wyniki przynosi stosowanie inhibitorów enzymu katalizującego pierwszy etap biosyntezy glikolipidów, syntetazy glikoceramidów, takich jak miglustat (Zavesca®) [30]. Ostatnio pojawiło się kilka nowych związków (np. NP-27), które bezpośrednio aktywują białko NPC1, prowadząc do usuwania cholesterolu z błony [31]. Stosowane są także oksysterole, które powodują, że białka NPC1 i NPC2 nie są dłużej odpowiedzialne za transport wolnego cholesterolu z późnych endosomów i lizosomów do mitochondriów oraz ER i błon aparatu Golgiego; ostatecznie dochodzi do obniżenia poziomu całkowitego cholesterolu w komórce [13]. Obiecujące wyniki daje transfekcja komórek DNA kodującym białka Rab4, Rab7 lub Rab9, co powoduje obniżenie poziomu cholesterolu na skutek jego wzmożonej estryfikacji [12]. Obniżenie liczby receptorów dla cząstek LDL uzyskano także na skutek wstrzykiwania do mózgu białek rekombinowanych, np. białka adenowirusa Ad-NPC1-GFP [32] lub białka wirusa herpes simplex VP22-

Rab9 [33]. Stworzono także zwierzęce odpowiedniki choroby Niemann-Picka (myszy *NPC1(-/-)*, *NPC2(-/-)* i *NPC1: NPC2(-/-)* [12]). Przedstawione powyżej metody, poza próbami leczenia miglustatem, nie mają zastosowania klinicznego w leczeniu chorych.

UWAGI KOŃCOWE

Pomimo zgromadzenia znaczącej wiedzy na temat udziału aneksyn w chorobie Niemann-Picka typu C nadal nie wiadomo, w jaki sposób białka te uczestniczą w etiologii tego schorzenia, przede wszystkim jakiego rodzaju zależności istnieją pomiędzy aneksynami a białkami NPC1/NPC2. Na podstawie opublikowanych dotychczas wyników doświadczeń można wnioskować, że aneksyny wiążąc się ze specyficznymi mikrodomenami (bogatymi między innymi w cholesterol) w sposób zależny i niezależny od jonów wapnia mogą odgrywać ważną rolę nie tylko w ich organizacji i stabilizacji, ale również w regulacji powstawania i aktywności kompleksów przekazujących sygnały w różnych przedziałach komórki. Uzyskanie odpowiedzi na powyżej zadane pytania byłoby w przyszłości użyteczne nie tylko w celu przypisania aneksynom biologicznej funkcji w chorobie Niemann-Picka typu C, ale także w określeniu molekularnych mechanizmów leżących u podstaw wielu innych chorób spichrzeniowych związanych z nieprawidłowym transportem, magazynowaniem i metabolizmem lipidów w komórce.

PIŚMIENNICTWO

1. Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signaling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449-461
2. de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 277: 32187-32194
3. Kirilenko A, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J (2006) Effects of mutagenesis of W343 in human annexin A6 isoform 1 on its interaction with GTP: nucleotide-induced oligomer formation and ion channel activity. *Biochemistry* 45: 4965-4973
4. Soccio RE, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1150-1160
5. Lange Y, Strebel F, Steck TL (1993) Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 268: 13838-13843
6. Simons K, Gruenberg J (2000) Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol* 10: 459-62
7. Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9: 534-542
8. Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136
9. Babiychuk EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺ regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150: 1113-1124
10. Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S (2001) Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J Neurosci Res* 64: 235-241
11. Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K (1998) Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* 142: 1413-1427
12. Chang TY, Reid PC, Sugii S, Ohgami N, Cruz JC, Chang CC (2005) Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 280: 209917-2020

13. Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, Ory DS (2003) NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem* 278: 25517-25525
14. Schneiter R (2005) Intracellular sterol transport in eukaryotes, a connection to mitochondrial function? *Biochimie* 20: 1-5
15. Strzelecka-Kiliszek A, Tyłki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J (2004) Annexins in Niemann-Pick Type C Disease. *Annexins* 1: 206-216
16. Liscum L (2000) Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic* 1: 218-225
17. Pentchev PG, Vanier MT, Suzuki K, Patterson MC (1995) Niemann-Pick disease type C: Cellular cholesterol lipidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed New York: McGraw-Hill 2: 2625-2639
18. Gruenberg J, Emans N (1993) Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol* 3: 224-227
19. Gerke V, Moss SE (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357: 129-154
20. Mayran N, Parton RG, Gruenberg J (2003) Annexin II regulates multi-vesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J* 22: 3242-3253
21. te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, Sillence DJ (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 279: 26167-26175
22. Hosoya H, Kobayashi R, Tszkita S, Matsumura F (1992) Ca²⁺-regulated actin and phospholipids binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. *Cell Motil Cytoskel* 22: 200-210
23. Babiychuk EB, Palstra R-JTS, Schaller J, Kämpfer U, Draeger A (1999) Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274: 35191-35195
24. Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci* 111: 261-269
25. Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S, Enrich C (2000) Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. *Exp Cell Res* 257: 33-47
26. Lin HC, Südhof TC, Anderson RGW (1992) Annexin VI is required for budding of clathrin coated pits. *Cell* 70: 283-291
27. Kamal A, Ying Y, Anderson RGW (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142: 937-947
28. Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J (2000) The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* 11: 2775-91
29. Patterson MC, Platt F (2004) Therapy of Niemann-Pick disease, type C. *Biochim Biophys Acta* 1685: 77-82
30. Cox TM (2005) Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl* 94: 69-75
31. Liscum L, Amio E, Anthony M, Howley A, Sturley SL, Agler M (2002) Identification of a pharmaceutical compound that partially corrects the Niemann-Pick C phenotype in cultured cells. *J Lipid Res* 43: 1708-1717
32. Paul CA, Reid PC, Boegle AK, Karten B, Zhang M, Jiang ZG, Franz D, Lin L, Chang TY, Vance JE, Blanchette-Mackie J, Maue RA (2005) Adenovirus expressing an NPC1-GFP fusion gene corrects neuronal and nonneuronal defects associated with Niemann-Pick type C disease. *J Neurosci Res* 81: 706-19
33. Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, Sharma KD, Holicky EL, Marks DL, Walkley SU, Pagano RE (2005) Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *FASEB J* 19: 1558-1560

Annexins in Niemann-Pick type C disease

Małgorzata Eliza Buszewska¹, Agnieszka Strzelecka-Kiliszek¹, Anna Tyłki-Szymańska², Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}

¹Nencki Institute of Experimental Biology Polish Academy of Science, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa, Poland

²Department of Metabolic Diseases, The Childrens' Memorial Health Institute, 20 Al. Dzieci Polskich, 04-730 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl

Key words: annexins; cholesterol; calcium homeostasis; membrane microdomains; Niemann-Pick type C disease

ABSTRACT

Niemann-Pick disease is a genetic disorder, affecting approximately 1 to 150 000 living births per year; in Poland 1-5 cases. Usually diagnosed in the childhood, Niemann-Pick disease results in death in the teenage years. Niemann-Pick disease is defined as a lysosomal storage disorder and is related to impaired transport and/or accumulation of specific lipids inside the cell. In this report, we provide evidence about potential role of annexins, calcium- and membrane-binding proteins, in the formation and stabilization of cholesterol-rich microdomains and their possible function in organizing the membranes of early and late endosomes, organelles affected in the type C Niemann-Pick disease characterized by abnormal accumulation of cholesterol and glycosphingolipids in lysosomal like organelles.

Występowanie oraz funkcja tokochromanoli u roślin, zwierząt i u człowieka

Renata Szymańska

Jerzy Kruk ✉

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

✉ Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (012) 664 6361, e-mail: jkruk@mol.uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 23 listopada 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 10 stycznia 2007 r.

Słowa kluczowe: tokochromanole, tokoferole, tokotrienole, biosynteza, antyoksydanty, peroksydacja lipidów

Wykaz skrótów: GGPP – pirofosforan geranylogeranylu; HGA – kwas homogentyzynowy; HPP – 4-hydroksyfenylopirogrobian; HPPD – dioksygenaza 4-hydroksyfenylopirogrobianu; JA (ang. *jasmonic acid*) – kwas jasmonowy; MPBQ-MT – metylotransferaza 2-metylo-6-fitylochinolu; PUFA – (ang. *polyunsaturated fatty acids*) wielonienasycone kwasy tłuszczowe; γ -TMT – metylotransferaza γ -tokoferolu; α -TTP (ang. *α -tocopherol transport protein*) – białko transportujące α -tokoferol

Podziękowanie: Praca została sfinansowana ze środków grantu badawczego Nr. N302 049 32

STRESZCZENIE

Tokochochromanole to grupa związków, do których zalicza się tokoferole i tokotrienole, potocznie zwane witaminą E. Oprócz znanych od dawna przeciwutleniających własności tych związków, w ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje na ich dodatkowe funkcje pełnione u człowieka, związane z obniżaniem poziomu cholesterolu we krwi, działaniem przeciwnowotworowym czy neuroprotektynym, szczególnie w przypadku tokotrienoli. W artykule omówiono strukturę tokochochromanoli, ich występowanie oraz biosyntezę u roślin oraz przedstawiono mechanizm działania antyoksydacyjnego tych związków wraz z ich nowo poznanymi funkcjami u roślin i zwierząt, niezwiązanymi z działaniem antyoksydacyjnym.

WPROWADZENIE

Do związków określanymi mianem witaminy E, z chemicznego punktu widzenia określanymi jako tokochochromanole, należą rozpuszczalne w lipidach związki: tokoferole i tokotrienole. Spośród naturalnie występujących substancji tego typu, osiem wykazuje aktywność witaminy E: α -, β -, γ -, δ -tokoferol oraz analogiczne tokotrienole. Termin „tokoferol” został wprowadzony po raz pierwszy przez Evansa i Bishopsa w 1922 roku. Zauważyli oni, że związek ten zapobiega bezpłodności samic u szczurów, a nazwę utworzyli od greckiego słowa *tokos* – poród oraz *phero* – wydać na świat. Końcówka „ol” służy podkreśleniu alkoholowego charakteru tego związku. Tę „pożyteczną” substancję w 1924 Sure określił jako witaminę E [1]. Po raz pierwszy witamina E została wyizolowana z oleju z kielków pszenicy w 1936 roku przez Evansa. Dwa lata później Fernholtz określił strukturę tego związku, a niedługo potem Karrer zsyntetyzował go po raz pierwszy [1]. Od lat 60-tych XX wieku witamina E budziła zainteresowanie ze względu na właściwości przeciwutleniające oraz jako niezbędny składnik, warunkujący prawidłowe funkcjonowanie organizmu człowieka. W 1968 roku została oficjalnie włączona do listy niezbędnych witamin dla człowieka.

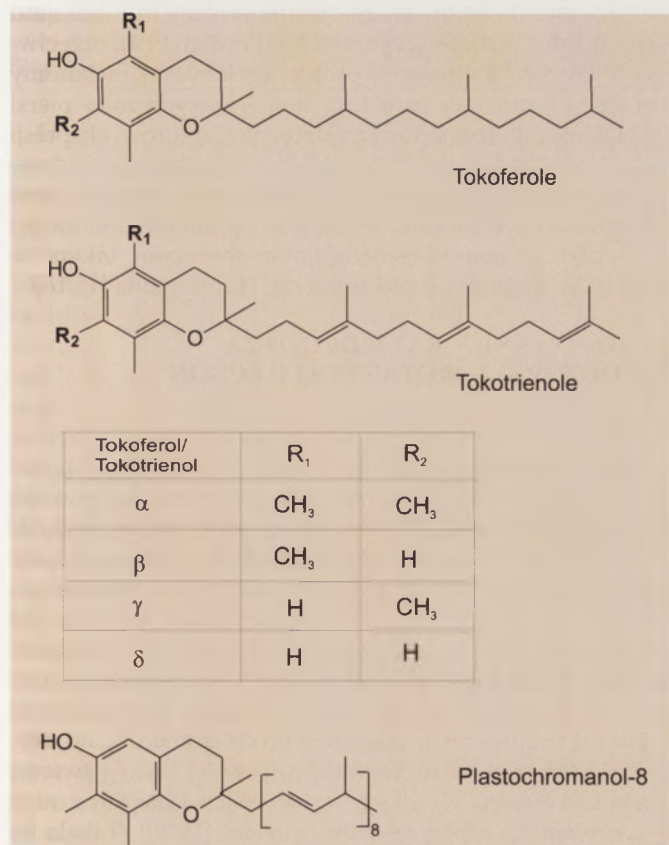
Witamina E jest bardziej antyoksydantem niż typową witaminą. Większość witamin odgrywa rolę kofaktorów w reakcjach enzymatycznych. Ilość witaminokofaktorów odpowiada ilości cząsteczek enzymów, z tego względu nadwyżka tych związków nie przynosi żadnej dodatkowej korzyści. Witamina E nie pełni prawdopodobnie funkcji kofaktora [2]. Wykorzystanie i zapotrzebowanie na witaminę E jest zmienne, ponieważ jest uzależnione od indywidualnego poziomu stresu oksydacyjnego. Stan ten wywołuje koncentracja w tkankach wolnych rodników i innych utleniaczy, a także wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (zapotrzebowanie na witaminę E wzrasta przy wzroście spożycia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych). Niedobór witaminy E nie wywołuje chorób z gwałtownymi symptomami, tak jak w przypadku niedoboru innych witamin np.: szkorbut (brak witaminy C), beri-beri (brak witaminy B₁), pelagra (brak kwasu nikotynowego), krzywica (brak witaminy D₁) i in. U człowieka objawy niedoboru (lub braku) witaminy E mogą być widoczne wówczas, kiedy dochodzi do upośledzenia wchłaniania tłuszczów, gdyż witamina E jest w nich rozpuszczalna, a uwalniana i absorbowana z przewodu pokarmowego podczas trawienia lipidów. Skutki niedostatecznego poziomu witaminy E zwykle rozwijają się bardzo powoli, sumując się przez lata, prowadząc do chorób degeneracyjnych, takich jak: nowotwory, choroby serca, miażdżycy.

Ze względu na to, że organizm człowieka nie potrafi syntetyzować witaminy E, konieczne jest dostarczanie jej wraz z pożywieniem. Zalecana dzienna dawka witaminy E dla niemowląt wynosi 3–4 mg, dla dzieci 6–7 mg i około 10 mg dla dorosłych [2]. Najbogatszym, naturalnym źródłem witaminy E są oleje roślinne, orzechy, pełne ziarna i kielki pszenicy [3,4]. Produkty pochodzenia zwierzęcego charakteryzują się na ogół niewielką zawartością witaminy E [4]. Wiele badań wskazuje, że podczas obróbki środków spożywczych zawartość witaminy E

w nich maleje. Jest ona degradowana przy udziale tlenu, a proces ten jest przyspieszany przez podwyższoną temperaturę, światło, jak również zamrażanie [4].

BUDOWA CHEMICZNA

Związki zaliczane do kompleksu witaminy E (tokoferole i tokotrienole) zbudowane są z aromatycznego pierścienia i, dołączonego do niego, izoprenyloвого łańcucha, który tworzy w wyniku cyklizacji dodatkowo, heterocykliczny pierścień, zawierający tlen (Ryc. 1). Sam dwupierścieniowy układ nosi nazwę chromanu, natomiast dzięki dodatkowej obecności grupy hydroksylowej, powstaje układ zwany chromanolem. Tokoferole różnią się od tokotrienoli stopniem nasycenia łańcucha bocznego. Tokoferole posiadają nasycony 16-węglowy łańcuch izoprenylovy, podczas gdy tokotrienole mają w tym łańcuchu trzy wiązania podwójne w pozycjach 3', 7', 11'. Prenylovy łańcuch boczny tokoferoli posiada większą swobodę rotacji w porównaniu z tokotrienolami, w których obecność podwójnych wiązań w łańcuchu ogranicza rotację wokół wiązań C=C. Izomery α , β , γ , δ zarówno tokoferoli jak i tokotrienoli różnią się liczbą i pozycją podstawników metylowych w pierścieniu aromatycznym (Ryc. 1). Związkiem podobnym w strukturze do tokotrienoli jest plastochoromanol-8 (Ryc. 1), który różni się od γ -tokotrienolu dłuższym łańcuchem bocznym. Występuje on w największych ilościach w oleju lnianym i rzepakowym. Stwierdzono, że aktywność przeciwutleniająca plastochoromanolu-8 jest około 1,5 razy większa od aktywności α -tokoferolu [5].



Rycina 1. Struktura chemiczna tokoferoli, tokotrienoli i plastochochromanolu-8.

DZIAŁANIE TOKOFEROLI I TOKOTRIENOLI U ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA

α -TOKOFEROL

Witamina E jest bardzo ważnym naturalnym antyoksydantem zarówno u roślin, jak i u zwierząt. W organizmie człowieka tokoferole są absorbowane przez jelitowe enterocyty i gromadzone w chylomikronach [2]. Za ich pośrednictwem tokoferole są transportowane do tkanek zawierających lipazę lipoproteinową. W nich następuje hydroliza triglicerydów zawartych we wnętrzu chylomikronów. Takie „uszczuplone” chylomikrony wędrują do wątroby, gdzie α -tokoferol jest preferencyjnie wiązany przez obecne w hepatocytach białko transportujące α -tokoferol (α -TTP) i za pomocą lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL) jest rozprowadzany po organizmie [2]. Pomimo że pozostałe izomery tokoferoli także posiadają antyoksydacyjne właściwości, ich działanie jest ograniczone, ponieważ po dostaniu się do wątroby są natychmiast metabolizowane i wydalone z żółcią lub moczem [2]. Witamina E (przede wszystkim izomer α) stanowi pierwszą linię obrony przed peroksydacją wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) zawartych w fosfolipidach błon komórkowych i organelli subkomórkowych [4].

Gdy w organizmie zwierzęcym cząsteczka tokoferolu po wypełnieniu swojej funkcji nie ulegnie regeneracji, musi zostać zastąpiona przez inną. W surowicy oraz błonie mitochondrialnej, gdzie występują dodatkowe lipidowe przeciwutleniacze, takie jak zredukowany ubiquinon (koenzym Q10) i zredukowany α -tokoferolochinon, może następować przy ich udziale regeneracja tokoferolu z rodnika tokoferoksylowego [6]. Przeciwutleniające działanie witaminy E ma szczególne znaczenie dla tkanek o wysokiej zawartości PUFA (mózg i centralny układ nerwowy). Jak już wspomniano, niedobór witaminy E nie prowadzi do chorób z gwałtownymi objawami. Jednakże chorobą, która bezpośrednio jest łączona z jej niedoborem jest ataksja z niedoborem witaminy E (AVED, ang. *ataxia with vitamin E deficiency*) [2,4]. Ta neurodegeneracyjna choroba jest spowodowana mutacją w genie kodującym α -TTP. Objawia się osłabieniem napięcia mięśniowego, ataksją, zezem, osłabieniem odruchów, arytmia serca, zaburzeniami widzenia, a nawet ślepotą [2]. Przeprowadzono szereg badań na zwierzętach oraz ludziach [7,8], w których wykazano wpływ witaminy E na zapobieganie wielu chorobom, np. miażdżycy [4]. Badania prowadzone pod kryptonimem CHAOS polegały na określeniu wpływu długoterminowego podawania α -tokoferolu na częstość występowania zawału serca u osób z chorobą wieńcową. [7]. Badania te wykazały, że przyjmowanie α -tokoferolu przez okres dłuższy niż rok zmniejsza ryzyko zachorowania o 77% [7]. Wykazano także, że α -tokoferol pełni funkcję ochronną w niektórych typach raka piersi, poprzez indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych [9,10]. Dużym zaskoczeniem okazały się wyniki badań „zapobiegania rakowi przez α -tokoferol i β -karoten” [8]. Badania te objęły 29 133 palących mężczyzn w wieku 50–69 lat i polegały na podawaniu przez długi okres (5–8 lat) części z nich α -tokoferolu (50 mg dziennie), części β -karotenu (20 mg dziennie), części obu tych związków, a części placebo. Okazało się, że β -karoten nie tylko nie zmniejsza

zachorowalności na raka – wręcz, w grupie osób przyjmujących ten związek, zauważono większą zachorowalność na raka płuc, prostaty i żołądka. W grupie osób przyjmujących α - tokoferol stwierdzono niższą częstość występowania raka prostaty, jelita grubego i odbyticy, za to zwiększoną zachorowalność na raka żołądka [8]. Liczne badania wskazują także na neuroprotektoryjne działanie α - tokoferolu [11]. Ostatnie doniesienia sugerują, że α - tokoferol zmniejsza częstość ataków epileptycznych indukowanych penicyliną [11]. Powracające napady epileptyczne mogą prowadzić do wzrostu zawartości reaktywnych form tlenu w mózgu, a jak wiadomo witamina E i inne antyoksydanty działają jako ich wygaszacze, co jednocześnie może warunkować ich przeciwepileptyczne właściwości [11].

Tokoferole oprócz działania przeciwutleniającego spełniają także szereg funkcji nie-antyoksydacyjnych. Wykazano na przykład [8], że α - tokoferol hamuje aktywność białkowej kinazy C (PKC) i procesy, które są PKC-zależne. Hamowanie aktywności kinazy białkowej C odbywa się poprzez jej defosforylację, jednak nie przez bezpośrednie oddziaływanie z kinazą czy wpływ na jej ekspresję, lecz przez aktywację odpowiedniej fosfatazy. Osłabienie aktywności kinazy C działa hamująco na takie procesy, jak: agregacja płytek krwi, produkcja NO przez komórki śródbłonna, produkcja nadtlenu przez neutrofile i makrofagi, a także powoduje osłabienie proliferacji komórek mięśni gładkich [8].

Stosowane w medycynie preparaty zawierające witaminę E, zawierają α - tokoferol w formie zestyfikowanej, najczęściej w postaci octanu α - tokoferolu. Ostatnie doniesienia sugerują występowanie naturalnej formy witaminy E, także będącej estrem - fosforanu α - tokoferolu [12], zidentyfikowanego w wątrobie i tkance tłuszczowej szczura. Jest to związek rozpuszczalny w wodzie i odporny na hydrolizę pod wpływem mocnych kwasów i zasad. Postuluje się, że fosforan α - tokoferolu może uczestniczyć w wewnątrzkomórkowym transporcie oraz sygnalizacji komórkowej [12].

γ -TOKOFEROL

Pomimo że z czterech izoform tokoferoli największe znaczenia dla człowieka ma forma α , ze względu na sprawne wchłanianie i transport w organizmie człowieka, niemniej-
sze zasługi są przypisywane formie γ . Zatrzymywanie γ - tokoferolu w tkankach (krwi, tkance tłuszczowej, mięśniach, skórze) jest dużo mniejsze niż α - tokoferolu [13]. Te różnice prawdopodobnie mają swoje źródło w innym mechanizmie metabolicznym pomiędzy tymi formami. Podczas gdy α - tokoferol wraz z lipoproteinami o małej gęstości (VLDL) jest transportowany z wątroby przez krew do tkanek, przeważająca ilość γ - tokoferolu jest przekształcana w wątrobie, w procesie uzależnionym od cytochromu P450, w hydrofilowy związek, 2,7,8-trimetylo-2-(β -karboksyetylo)-6-hydroksychroman (γ -CEHC), który jest wydalany wraz z moczem [13]. γ -Tokoferol nie ma tak silnych właściwości przeciwutleniających, jak α - tokoferol, jednak brak podstawnika metylowego przy C-5 w pierścieniu aromatycznym, czyni z niego doskonały wygaszacz reaktywnych form tlenoazotowych (ditlenek azotu, nadtlenuazotyn) [13]. W wyniku reakcji γ - tokoferolu z tymi rodnikami powstaje 5-nitro- γ - tokoferol, natomiast całkowicie podstawiony pierścień α -

tokoferolu uniemożliwia zajście takiej reakcji. Stwierdzono także, że γ - tokoferol działa przeciwzapalnie, hamując wydzielanie prostaglandyny E_2 syntetyzowanej podczas pobudzenia makrofagów lipopolisacharydem i interleukiną 1β [13]. Ostatnie badania sugerują także, że γ - tokoferol może chronić przed chorobami serca i nowotworem prostaty [13]. Opisano też interesującą zależność pomiędzy zawartością γ - tokoferolu w surowicy a zachorowalnością na raka płuc [14]. Poziom γ - tokoferolu w surowicy w populacji mieszkańców wysp Fidzi jest około dwukrotnie wyższy niż w populacji z wysp Cooka przy podobnym poziomie α - tokoferolu w obu populacjach. Natomiast zachorowalność na raka płuc jest 10-20 razy mniejsza na wyspach Fidzi niż na wyspach Cooka, pomimo podobnej częstości palenia.

TOKOTRIENOLE

Oprócz wielu doniesień o dobroczynnych właściwościach tokoferoli, na uwagę zasługują także znamienne właściwości tokotrienoli. Pomimo że związki te charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwutleniającą, ich biodostępność po doustnym podaniu jest znacznie ograniczona. Tokotrienole nie są rozpoznawane przez α -TTP i w związku z tym mają krótki czas życia [15]. Tokotrienole szybko przenikają w głąb skóry, gdzie zwalczają efekty stresu oksydacyjnego indukowanego przez UV czy ozon [15]. Obiecującym sposobem wykorzystania tokotrienoli, byłyby ich aplikacja bezpośrednio do skóry, przez co uniezależniłyby się od przenośników białkowych i ich potencjał mógłby zostać w pełni wykorzystany. Ponadto wykazano, że tokotrienole obniżają poziom cholesterolu i lipoprotein surowicy, co może zapobiegać chorobom układu krążenia i serca, wykazują działanie przeciwzakrzepowe (hamowanie syntezy tromboksanu B_2 , obniżanie poziomu czynnika płytkowego PF_4), przeciwnowotworowe (hamowanie proliferacji komórek melanomy $B16$, hamowanie wzrostu linii komórkowych raka piersi niezależnie od estrogenowego statusu receptorów, ekspresji wczesnego antygeny wirusa Epsteina-Barr, hepatokarcynogenezy) oraz neuroprotektoryjne (hamowanie śmierci komórek neuronowych, indukowanej przez glutaminian), mogące zapobiegać neurodegeneracyjnym chorobom, takim jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona [15,16].

WYSTĘPOWANIE ORAZ BIOSYNTeza TOKOFEROLI I TOKOTRIENOli U ROŚLIN

WYSTĘPOWANIE

Tokoferole zidentyfikowano u sinic (cyjanobakterii), glonów, roślin i zwierząt, pomimo że zwierzęta nie potrafią ich syntetyzować [3,17]. Związki te wykryto we wszystkich fotosyntetyzujących organizmach, z wyjątkiem sinicy *Anacystis nidulans* [3]. W oparciu o dotychczas zbadane genomy sinic, można przypuszczać, że wiele z nich nie jest zdolnych do syntezy tokoferoli [18]. Tokoferole znaleziono we wszystkich organach roślinnych [3], istnieje jednak duże zróżnicowanie jeśli chodzi o całkowitą zawartość tokoferoli, jak i udziału w nich poszczególnych izomerów, od bardzo niskich w bulwach ziemniaka (poniżej 1 μ g/g świeżej masy), do bardzo wysokich w nasionach i olejach z nich pozyskiwanych (powyżej 1 mg/g oleju) [19,20] (Tabela 1). W większości tkanek przeważa α - tokoferol, z wyjątkiem nasion, gdzie udział γ izomeru jest zwykle największy.

Nietypowym składem tokoferoli charakteryzują się pędy pasożytniczych roślin z rodzaju kaniańka (*Cuscuta*), gdzie w większości gatunków dominuje γ -tokoferol [21]. Na przykład *C. japonica* jest gatunkiem wyjątkowym ze względu na brak α - i β -tokoferolu, za to dominującym izomerem jest δ -tokoferol [21].

Tokotrienole nie występują zazwyczaj w zielonych częściach roślin wyższych, natomiast spotykane są w znacznych ilościach w nasionach niektórych gatunków (jęczmień [22], pszenica, ryż, kukurydza, palma olejowa [19,20], kokos [23], liczi, kasztanowiec chiński, ostróżka ogrodowa [24]) oraz w komórkach wyspecjalizowanych w wytwarzaniu lateksu [3]. Stwierdzono, że w obrębie nasion zbóż rozmieszczenie tokoferoli i tokotrienoli jest nierównomierne: tokoferole występują prawie wyłącznie w zarodku, natomiast tokotrienole w endospermie [22].

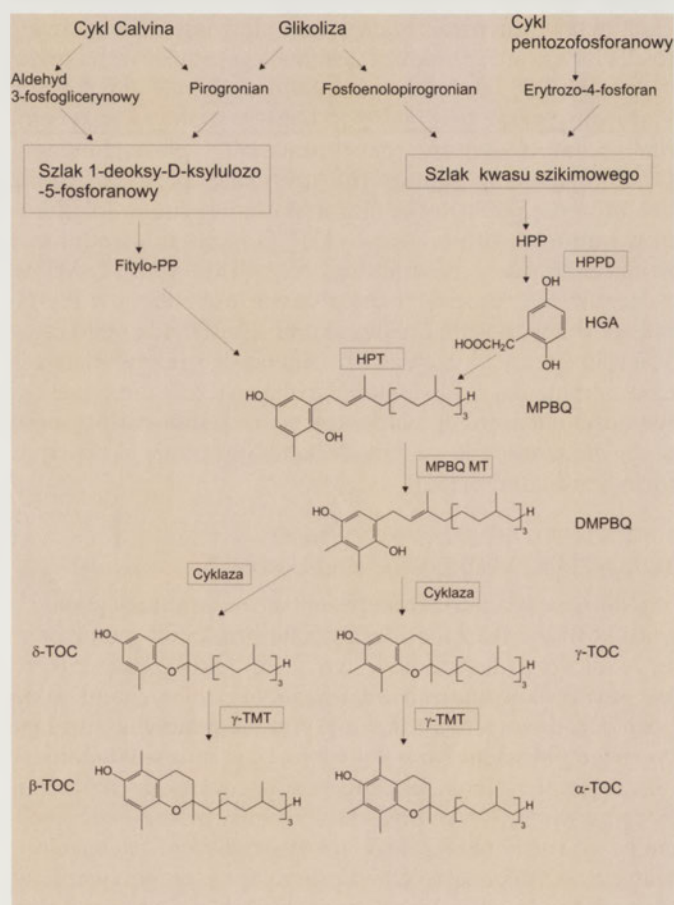
Tokochromanole zidentyfikowano w wielu roślinnych plastydach: amyloplastach nasion i bulw, chloroplastach tkanek fotosyntetyzujących, leukoplastach płatków oraz chromoplastach owoców [25]. Znaleziono je również w wakuoli liści jęczmienia oraz błonach mikrosomalnych korzenia soi [3]. Jednak dane dotyczące pozaplastydowej lokalizacji tokoferoli wymagają weryfikacji. W obrębie chloroplastu, obecność α -tokoferolu została stwierdzona w otoczce plastydowej (miejsce biosyntezy), w plastoglobulach zlokalizowanych w stromie chloroplastu (miejsce przechowywania) oraz w tylakoidach [3,25]. W obrębie błon tokoferole są związane z warstwą lipidową, rzadko z domenami białkowymi. Hydrofobowy „ogon” tokoferoli jest zakotwiczony w warstwie lipidowej błony, natomiast polarna „głowa” znajduje się przy jej powierzchni.

BIOSYNTENZA

U roślin głównym miejscem syntezy lipidów prenylowych (tokoferole, tokotrienole, fitol, filochinon, plastochinon) są plastydy. U roślin synteza tokoferoli, tokotrienoli i plastochinonu jest ze sobą powiązana [26]. Wspólnym prekursorem tych związków jest kwas homogentyzynowy (HGA), syntezowany w cytosolu przez enzym dioksygenazę 4-hydroksyfenylopirogonianu (HPPD) (Ryc. 2). Zablockowanie aktywności tego enzymu przez mutacje w genie *hpd* lub przez specyficzne inhibitory prowadzi do znacznego ograniczenia biosyntezy tokoferoli i plastochinonu u roślin wyższych [27]. Jednakże, jak wykazano u sinicy *Synechocystis*, mutacja w genie *hpd* prowadzi do upośledzenia jedynie biosyntezy tokoferoli, co sugeruje alternatywny szlak biosyntezy plastochinonu u tej sinicy [1,28]. W strukturze chemicznej tokoferoli i tokotrienoli można wyróżnić dwie części składowe: chromanолоwy pierścień oraz prenyłowy łańcuch boczny. Aromatyczna „głowa” syntetyzowana jest w szlaku kwasu szikimowego w cytosolu, natomiast prenyłowy „ogon” w szlaku 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanowym, zachodzącym w stromie chloroplastu. (Ryc. 2). Związkiem prekursorowym do biosyntezy plastydowych izoprenoidów jest 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan, który powstaje z pirogonianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego. W szeregu reakcji, w których biorą udział reduktazy, dehydratazy, kinazy, NADPH i ATP, powstaje pirofosforan izopentenylu (C_5), z którego, w wyniku kondensacji trzech

kolejnych reszt tego związku, tworzy się pirofosforan geranylogeranylu (GGPP) (C_{20}), będący związkiem pośrednim w syntezie m. in. fitolu chlorofilu, karotenoidów, łańcuchów bocznych chinonów, tokoferoli i tokotrienoli. W syntezie tokotrienoli bierze udział GGPP, podczas gdy do wytworzenia tokoferoli konieczny jest pirofosforan fitylu (Ryc. 2). Powstaje on z GGPP w osłonce chloroplastowej w reakcji katalizowanej przez reduktazę geranylogeranylu [29]. Jak wykazano ostatnio, również fitol, uwolniony w czasie degradacji chlorofilu, może służyć jako substrat do syntezy tokoferolu [1].

Synteza pierścienia aromatycznego tokoferoli odbywa się w szlaku kwasu szikimowego (Ryc. 2). Produktem pierwszej reakcji jest 3-deoksy-D-arabinoheptulozo-5-fosforan, który powstaje w wyniku kondensacji fosfoenolpirogonianu i erytrozo-4-fosforanu. Szereg dalszych przemian prowadzi do przekształcenia tego związku w 4-hydroksyfenylopirogonian (HPP), którego bezpośrednim prekursorem jest tyrozyna. Z HPP w reakcji katalizowanej przez HPPD, tworzy się HGA. Pirofosforan fitylu ulega przeniesieniu na HGA, dając 2-metylo-6-fitylochinol (MPBQ). Następnie specyficzna metylotransferaza (MPBQ-MT) katalizuje przemianę tego związku w 2,3-dimetylo-5-fitylochinol (DMPBQ). W wyniku działania cykazy tokoferolowej powstaje γ -tokoferol. Metylotransferaza γ -tokoferolu (γ -TMT) wprowadza grupę metylową do C-6 w pierścieniu i tworzy się α -tokoferol (Ryc. 2). Cyklaza tokoferolu może także katalizować cyklizację MPBQ do δ -tokoferolu, a ten z kolei może być przekształcony przez γ -TMT w β -tokoferol (Ryc. 2).



Rycina 2. Biosynteza tokoferoli u roślin.

W przypadku biosyntezy tokotrienoli, GGPP jest przenoszony bezpośrednio na HGA, dając 2-metylo-6-geranylo-geranylochinol przy udziale specyficznego enzymu. Dalsze etapy biosyntezy tokotrienoli są analogiczne do syntezy odpowiednich tokoferoli i katalizowane przez te same enzymy.

Do niedawna przypuszczano, że wszystkie etapy biosyntezy α -tokoferolu, poczynając od kondensacji HGA i pirofosforanu fitylu, zachodzą w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastu, jednak ostatnio wykazano, że cyklaza tokoferolowa jest zlokalizowana w obrębie plastoglobul [30]. Natomiast nie zidentyfikowano tam γ -TMT, ostatniego enzymu szlaku syntezy α -tokoferolu i lokalizacja tego enzymu pozostaje nieznana.

Narzędzia inżynierii genetycznej umożliwiły dokładne poznanie molekularnego mechanizmu biosyntezy tokochromanoli. Genetyczne i molekularne podstawy tych procesów poznano dzięki dwóm modelowym organizmom: *Arabidopsis thaliana* i *Synechocystis PCC6803*. Ciekawe jest, że z wyjątkiem metylotransferazy 2-metylo-6-fitylochinolu, kluczowe enzymy szlaku biosyntetycznego tokochromanoli roślin i sinic wykazują dużą homologię w sekwencji aminokwasowej [26]. Dzięki dokładnemu rozpracowaniu poszczególnych etapów biosyntezy tokochromanoli możliwe jest wykorzystanie tych informacji do zwiększenia zawartości tokoferoli w roślinach, co z kolei może mieć korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Istnieje kilka „punktów kontrolnych” szlaku biosyntetycznego tokoferoli, które dzięki modyfikacjom genetycznym pozwalają na wpływanie na ich zawartość. Pierwszym „punktem” jest reakcja katalizowana przez enzym HPPD. Jak już wspomniano wcześniej, enzym ten, kodowany przez gen *hpd* (*psd1*), jest wspólnym enzymem dla szlaku biosyntezy tokochromanoli i plastochinonów [27,28] i katalizuje syntezę HGA. Wykazano, że egzogenne dostarczenie HGA powoduje zwiększenie syntezy tokoferolu w kulturach komórkowych [31]. Ponadto udowodniono, że nadeskpresja genów kodujących γ -TMT i MPBQ-MT w nasionach soi znacznie podnosi zawartość witaminy E [31]. Jak wiadomo, nasiona roślin akumulują zwykle mało α -tokoferolu (formy o najwyższym potencjale przeciwutleniającym), gromadzą zaś γ - i δ -tokoferol o znacznie mniejszej aktywności witaminy E. Nadeskpresja tych dwóch enzymów u soi doprowadziła w 95% do zamiany mniej aktywnych form w α -tokoferol [31].

ANTYOKSYDACYJNA AKTYWNOŚĆ TOKOFEROLI I TOKOTRIENOLI U ROŚLIN

Zdolność tokoferoli i tokotrienoli do neutralizacji wolnych rodników wynika z ich zdolności do przekazywania wodoru fenolowego na lipidowe wolne rodniki. Ta właściwość jest uwarunkowana kilkoma szczególnymi cechami jakie posiadają omawiane związki: a) stopniem metylacji aromatycznego pierścienia ($\alpha > \beta = \gamma > \delta$), b) rozmiarem heterocyklicznego pierścienia, c) długością prenylowego łańcucha. Podejrzewa się, że stopień nienasycenia prenylowego łańcucha (co różni tokoferole od tokotrienoli) może determinować ich rozpuszczalność w tłuszczach i zatrzymywanie w błonach lipidowych. Im większy stopień nienasycenia, tym lepsza rozpuszczalność w tłuszczach. Stwierdzono także, że

α -tokotrienol charakteryzuje się znacznie większą aktywnością przeciwutleniającą niż α -tokoferol [15]. Ponadto, aktywność antyoksydacyjna tokoferoli w procesie utleniania lipidów *in vivo* przedstawia się następująco: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, podczas gdy *in vitro* ta zależność jest odwrotna [3].

Wykazano, że u roślin tokoferole i tokotrienole pełnią dwojaką funkcję: usuwają rodnikowe produkty utleniania lipidów oraz wygaszają tlen singletowy 1O_2 i usuwają inne reaktywne formy tlenu [17]. Jako antyoksydanty, tokochromanole neutralizują rodniki nadtlenkowe lipidów, które wywołują łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów [32, 33]. Produkty peroksydacji lipidów modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, co w konsekwencji może prowadzić do utraty integralności błon wewnątrzkomórkowych. Tokoferole i tokotrienole neutralizują, powstające w czasie utleniania PUFA, rodniki nadtlenkowe lipidów, w ten sposób, że oddają atom wodoru, który przyłącza się do rodnika lipidowego. Wytwarzają się przy tym rodniki tokoferoksyłowe lub tokotrienoksyłowe, które są regenerowane do form wyjściowych przez askorbinian [17]. α -Tokoferol jest także efektywnym wygaszczem tlenu singletowego (1O_2). Zdolność do reakcji z 1O_2 zależy od obecności wolnej grupy $-OH$ w pierścieniu. α -Tokoferol może również doprowadzić do usunięcia 1O_2 na drodze reakcji chemicznej [32]. Powstaje wtedy epoksyd tokoferolochinonu oraz α -tokoferolochinon [17]. Ten ostatni związek w postaci zredukowanej także posiada właściwości przeciwutleniające [25].

W żywych komórkach efekt przeciwutleniający jest wypadkową działania poszczególnych przeciwutleniaczy. Mogą one oddziaływać ze sobą w różny sposób:

a) chronią siebie nawzajem przed oksydacją; wykazano kooperację w wygaszaniu tlenu singletowego pomiędzy α -tokoferolem a β -karotenem w błonach lipidowych. β -karoten odgrywa rolę antyoksydanta przy niskich ciśnieniach tlenu, podczas gdy wysokie ciśnienie znosi jego działanie. α -Tokoferol może zastępować β -karoten w ochronie błon lipidowych przed oksydacją [34]. Współzależność pomiędzy α -tokoferolem a β -karotenem w ochronie fotosystemu II wykazano u *Chlamydomonas reinhardtii* po traktowaniu tego glonu herbicydami [35,36]. Ta współpraca w ochronie polega na wygaszaniu tlenu singletowego. Ponadto wykazano, że mutant *npq1 Arabidopsis*, charakteryzujący się brakiem deepoksydazy wiolaksantyny, akumuluje większe ilości α -tokoferolu w czasie aklimacji do warunków silnego oświetlenia. Sugeruje to, że współzależność pomiędzy α -tokoferolem a wysoką zawartością zeaksantyny jest odpowiedzią na stres świetlny u roślin [37].

b) inne antyoksydanty biorą udział w regenerowaniu α -tokoferolu, np.: kwas askorbinowy. Związek ten uczestniczy w redukcji rodnika α -tokoferoksyłowego do α -tokoferolu. Wytworzony w tym czasie monodehydroaskorbinian jest z powrotem przekształcany w kwas askorbinowy przez reduktazę dehydroaskorbinianową oraz glutation [3].

INNE FUNKCJE TOKOFEROLI U ROŚLIN

α -Tokoferol, a przede wszystkim α -tokoferolochinon (produkt utleniania α -tokoferolu) mają wpływ na przepływ elektronów w obrębie fotosystemu II [38]. α -tokoferolochinon jest także efektywnym wygaszczem fluorescencji chlo-

rofilu w fotosystemie II [38]. Wykazano, że cykliczny transport elektronów wokół PSII jest hamowany przez α -tokoferol, a stymulowany przez α -tokoferolochinon, który może utleniać cytochrom b_{559} , co stanowi swoistą fotoprotekcję przed nadmiarem energii świetlnej w tylakoidach [38].

Wykazano także, że α -tokoferol bierze udział w komunikacji międzykomórkowej [3]. Badania sugerują, iż tokoferole regulują ilość kwasu jasmonowego (JA) w liściach, co wpływa z kolei na rozwój roślin i ich odpowiedź na stres. Tokoferole mają pośredni wpływ na akumulację JA przez kontrolowanie szybkości utleniania lipidów w chloroplastach i nagromadzenia się nadtlenków lipidów, które z kolei są wykorzystywane do syntezy JA [39]. JA reguluje ekspresję genów w jądrze – wpływa na fotosyntezę, degradację chlorofilu, metabolizm antocyjanów i antyoksydantów (tokoferolu, glutationu) [39,40]. Indukcja tych genów przez JA, może być podstawą do zwiększenia wytwarzania tokoferoli i tym samym ochrony roślin [39]. Badania prowadzone na kukurydzy i ziemniaku wykazały, że α -tokoferol jest zaangażowany w eksport metabolitów z liści do floemu [1]. Obniżona zawartość tokoferolu u mutantu kukurydzy i w transgenicznym ziemniaku przejawiała się akumulacją w liściach sacharozy, skrobi, antocyjanin oraz nieprawidłowym wykształceniem plazmodesmów [1]. Związana z tym faktem może być obecność tokoferoli u kianianek (*Cuscuta* sp.). U tych pasożytniczych roślin zasadniczą rolę odgrywa transport asymilatów od gospodarza. Uzależnienie funkcjonowania od żywiciela spowodowało u nich redukcję aparatu fotosyntetycznego. Dlatego podejrzewa się, że funkcją tokoferoli u kianianek jest raczej wspomaganie transportu cukrów niż udział w ochronie przed fotooksydacją [18].

ZMIANY ZAWARTOŚCI TOKOFEROLI W TRAKCIE WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN ORAZ WPŁYW WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH NA ICH ZAWARTOŚĆ

Wysoka zawartość tokoferoli w nasionach jest uwarunkowana potrzebą ochrony przed utlenianiem kwasów tłuszczowych olejów w nich zawartych. Ogólna zawartość tokoferoli ulega podwyższeniu także w czasie dojrzewania owoców. W tym czasie stężenie form α i β wzrasta znacznie, natomiast izomer γ wykazuje wzrost zawartości na początku, a w końcowych stadiach dojrzewania obserwuje się spadek jego zawartości. Przykładowo, u papryki (*Capsicum annuum*) zawartość γ -tokoferolu wzrasta, osiągając maksymalne stężenie w czerwonych, soczystych owocach, a potem spada [3]. Innym przykładem jest soja, u której zawartość α -tokoferolu wzrasta na początku kiełkowania, a po 24 godzinach spada, co ma związek z nagromadzeniem się reaktywnych form tlenu, które generuje proces kiełkowania [3]. Ponadto okazało się, że młode liście rzodkiewnika (*Arabidopsis*) wykazują większą tolerancję na obecność tlenu singletowego niż starsze, pomimo że zawartość α -tokoferolu jest taka sama [37]. Sugeruje to, że starzenie się liści jest związane raczej ze zmianą wielu czynników niż ze zmianą stężenia pojedynczego przeciwutleniacza. Wzrost zawartości α -tokoferolu (czasami także γ -tokoferolu) w początkowych stadiach starzenia się liści i późniejszy ich spadek, obserwowany był także u jęczmienia [3]. Prawdopodobnie, tokoferole nie tylko przyczyniają się do podtrzymania inte-

gralności błon w pierwszych etapach starzenia się liści, lecz także mają wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w syntezę genów związanych ze starzeniem.

Wysokie natężenie światła jest jednym z czynników modyfikujących w największym stopniu zawartość tokoferoli w liściach. Wykazano na przykład, że zawartość α -tokoferolu w liściach buka i dębu wyeksponowanych na silne światło jest kilkukrotnie wyższa niż w liściach zacienionych. [41]. Świadczy to o działaniu fotoprotekcyjnym tokoferoli. Taki wniosek potwierdza także wysokie stężenie α -tokoferolu w roślinach wysokogórskich, które są często narażone na działanie silnego światła oraz niskiej temperatury [3]. Stwierdzono także wahania poziomu α -tokoferolu uwarunkowane rytmem dobowym roślin. U alpejskich gatunków maksymalna koncentracja α -tokoferolu występuje w południe, a najniższa jest w okresie nocnym [3]. Natomiast u roślin śródziemnomorskich zawartość α -tokoferolu utrzymuje się na stałym poziomie w ciągu całego dnia [42]. Wzrost zawartości α -tokoferolu u roślin powoduje także: niedobór wody, promieniowanie UV-B, niska temperatura. Wiadomo jednak, że w warunkach stresowych współdziałają ze sobą rozmaite mechanizmy protekcyjne, a niedobór któregoś z nich może być rekompensowany przez podwyższoną aktywność innego mechanizmu. Na przykład, u mutantu *ute1 Arabidopsis thaliana* – całkowicie pozbawionego tokoferoli – zaobserwowano zahamowanie wzrostu o 10–15% oraz niewielki spadek zawartości chlorofilu i kwantowej wydajności fotosyntetycznej przy intensywności światła 850 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [43]. Z kolei mutanty *Synechocystis* pomimo braku tokoferoli, przeżywają zarówno w optymalnych warunkach oświetlenia, jak i w warunkach stresu świetlnego [44]. Dowiedzono także, że w młodych, rozwijających się liściach transgenicznego tytoniu, u którego zredukowana jest aktywność reduktazy geranylogeranylu (mutant *chlP*), selektywnie gromadzą się barwniki cyklu ksantofilowego, co pozwala na przystosowanie do silnego światła i zapobiega fotooksydacyjnym zniszczeniom [45]. Dane te w pełni potwierdzają istnienie alternatywnych form ochrony roślin przy braku lub niedoborze tokoferoli. W sytuacji odwrotnej, tzn. w przypadku osłabienia innych mechanizmów ochronnych, wzrost zawartości tokoferoli przeciwdziała destrukcyjnym zjawiskom. U mutantu *npq1 Arabidopsis*, który charakteryzuje się brakiem deepoksydazy wiolaksantyny, enzymu przekształcającego wiolaksantynę w zeaksantynę przy nadmiarze światła (cykl ksantofilowy), liście akumulują więcej α -tokoferolu podczas fotoaklimacji [37].

Podsumowując, wzrost stężenia tokoferoli jest odpowiedzią na stres, wywołany przez różne czynniki środowiskowe. Jednak odpowiedź ta jest sumą reakcji wielu mechanizmów obronnych funkcjonujących w roślinie, a tokoferol jest jednym z ogniw protekcyjnych. Jedynie rozpatrywanie funkcji tokoferoli w kontekście oddziaływań z innymi czynnikami ma sens i jest w pełni zrozumiałe. Niedobór lub brak któregoś z fotoprotekcyjnych lub antyoksydacyjnych mechanizmów nie prowadzi do śmierci roślin, ponieważ istnieją mechanizmy wyrównawcze, zapobiegające uszkodzeniom komórek i tkanek. Tylko zniszczenie wszystkich tych mechanizmów lub bardzo silny stres może doprowadzić do śmierci rośliny.

Tabela 1. Zawartość tokochromanoli w wybranych roślinach i olejach [19,20].

Rosлина i organ	Całkowita zawartość tokoferoli [μg/g ś.m. lub μg/g oleju]	Procent α-T	Procentowy udział pozostałych izomerów tokochromanoli
Ziemniak – bulwa	0,7	90	10% γ+β-T*
Salata – liść	7	55	45% γ-T
Szpinak – liść	30	63	5% γ-T, 33% δ-T
Kapusta – liść	17	100	-
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	10	95	5% γ-T
Rzodkiewnik – liść	10-20	90	10% γ-T
Rzodkiewnik – nasiona	200-300	0	95% γ-T, 5% δ-T
Pszenica – nasiona	50	20	56% β-T3, 15% β-T, 10% α-T3
Pszenica – olej z kielków	2700	47	25% β-T, 10% γ-T, 7% β-T3
Ryż – białe ziarna	17	18	30% α-T3, 30% γ-T3, 18% γ-T
Kukurydza – nasiona	60	10	75% γ-T, 15% α+γ-T3
Kukurydza – olej z nasion	1000	20	70% γ-T, 7% δ-T
Palma olejowa – liść	300-500	100	-
Palma olejowa- olej z nasion	500	25	30% α-T3, 40% γ-T3,
Soja – olej z nasion	1200	7	70% γ-T, 22% δ-T
Słonecznik – olej z nasion	700	96	4% γ+β-T
Rzepak – olej	500-700	27	73% γ-T

*T: tokoferol, T3: tokotrienol

PIŚMIENNICTWO

- Dörmann P (2007) Functional diversity of tocopherol in plants. *Planta* 225: 269-275
- Eggermont E (2006) Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *Eur J Pediatr* 165: 429-434
- Munne-Bosch S, Alegre L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* 21: 31-57
- Azzi A, Stocker A (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progr Lipid Res* 39: 231-255
- Olejnik D, Gogolewski M, Nogala-Kalucka M (1997) Isolation and some properties of plastochromanol-8. *Nahrung* 41: 101-104
- Neužil J, Witting PK, Stocker R (1997) α-Tocopherol hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7885-7890
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ, Brown MJ (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347: 781-786
- Azzi A (2004) The role of α-tocopherol in preventing disease. *Eur J Nutr* 43: 18-25
- Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Golditz GA, Willett WC, Hunter DJ (2005) Plasma carotenoids, retinol and tocopherols and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 161: 153-160
- Borek C (2004) Dietary antioxidant and human cancer. *Integr Cancer Ther* 3: 333-341
- Ayyildiz M, Yildirim M, Agar E (2006) The effects of vitamin E on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Exp Brain Res* 174: 109-113
- Gianello R, Libinaki R, Azzi A, Gavin PD, Negis Y, Zingg J-M, Holt P, Keah H-H, Griffey A, Smallridge A, West SM, Ogru E (2005) α-Tocopherol phosphate: A novel, natural form of vitamin E. *Free Rad Biol Med* 39: 970-976
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN (2001) γ-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr* 74: 714-722
- Cooney R, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ (1993) γ-Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to α-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1771-1775
- Packer L, Weber S, Rimbach (2001) Molecular aspects of α-tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr* 131: 369S-373S
- Theriault A, Chao J-T, Wang Q, Gapor A, Adeli K (1999) Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clin Biochem* 32: 309-319
- Munne-Bosch S (2005) The role of α-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162: 743-748
- Bachasch N, Schultz-Friedrich R, Appel J (2005) Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Plant Physiol* 162: 758-766
- Grusak M, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 50: 133-161
- DellaPenna D (2005) A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J Plant Physiol* 162: 729-737
- van der Kooij TAW, Krupinska K, Krause K (2005) Tocopherol content and composition in different species of parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *J Plant Physiol* 162: 777-781
- Falk J, Krahnstöver A, van der Kooij TAW, Schlenz M, Krupinska K (2004) Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* 65: 2977-2985
- Chun J, Lee J, Ye L, Exler J, Eitenmiller RR (2006) Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J Food Compos Anal* 19: 196-204
- Matthaus B, Vosmann K, Pham LQ, Aitzetmüller K (2003) FA and tocopherol composition of Vietnamese oilseeds. *J Am Oil Chem Soc* 80: 1013-1020

25. Kruk J, Strzałka K (1995) Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. *J Plant Physiol* 145: 405–409
26. DellaPenna D (2005) Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci* 10: 574–579
27. Norris SR, Barette TR, DellaPenna D (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139–2149
28. Dahnhardt D, Falk J, Appel J, van der Kooij TAW, Schultz-Friedrich R, Krupinska K (2002) The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett* 523: 177–181
29. Keller Y, Bouvier F, D'Harlingue A, Camara B (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis. Evidence for the involvement of multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* 251: 413–417
30. Vidi P-A, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, Kessler F, Bréhélin C (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* 281: 11225–11234
31. Ajjawi I, Shintani D (2004) Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. *Trends Biotechnol* 22: 104–107
32. Kamal-Eldin A, Appelqvist L-A (1990) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671–701
33. Wang X, Quinn PJ (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Progr Lipid Res* 38: 309–336.
34. Burton GW, Ingold KU (1984) β -Carotene: an unusual type of antioxidant. *Science* 224: 569–573
35. Trebst A (2003) Function of β -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch* 58: 609–620
36. Kruk J, Hollander-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J Plant Physiol* 162: 749–757
37. Havaux M, Bonfils J-P, Lütz C, Niyogi KK (2000) Photodamage to the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol* 124: 273–284
38. Kruk J, Schmid GH, Strzałka K (2000) Interaction of alpha-tocopherol quinone, alpha-tocopherol and other prenyllipids with photosystem II. *Plant Physiol Biochem* 38: 271–277
39. Munne-Bosch S, Falk J (2004) New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* 218: 323–326
40. Creelman RA, Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355–381
41. Garcia-Plazaola JL, Artetxe U, Becerril JM (1999) Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Sci* 143: 125–133
42. Munne-Bosch S, Alegre L (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925–931
43. Porfirova S, Bergmüller E, Trof S, Lemke R, Dörmann P (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12495–12500
44. Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and functional analysis of homogenisate phytyltransferase activity from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 1113–1124
45. Haveux M, Lütz C, Grimm B (2003) Chloroplast membrane stability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol* 132: 300–310

Occurrence and function of tocochromanols in plants, animals and men

Renata Szymańska, Jerzy Kruk 

Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St., 30-387 Kraków, Poland

 e-mail: jkruk@mol.uj.edu.pl

Key words: tocochromanols, tocopherols, tocotrienols, biosynthesis, antioxidants, lipid peroxidation

ABSTRACT

Tocochromanols belong to a group of compounds comprising tocopherols and tocotrienols, known as vitamin E. Apart from the well known antioxidant properties of these compounds, there is increasing evidence accumulating for their additional function in men, manifesting in lowering of blood cholesterol level, anticancer and neuroprotective action, especially in the case of tocotrienols. The present article describes the structure of tocochromanols, their occurrence and biosynthesis in plants. The mechanism of antioxidant action of these compounds and recently recognized additional functions in plants and animals are presented.

Nowe aspekty badań nad prionem [PSI+] w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

Takao Ishikawa

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: (022) 554 31 05, e-mail: takao@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 8 grudnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 16 stycznia 2007 r.

Słowa kluczowe: prion, terminacja translacji, ewolucja drożdży, poszukiwanie leków

Wykaz skrótów: PrD – domena wpływająca na przemianę konformacyjną tworzącą prion w komórkach drożdży; PrP – białko występujące u ssaków, tworzące prion; [PSI+] – prion drożdżowy tworzony przez zagregowaną formę Sup35p; [psi-] – fenotyp dzikich pod względem prionu [PSI+] drożdży; Sup35p – czynnik terminacji translacji Sup35 występujący u drożdży *S. cerevisiae*

STRESZCZENIE

Priony charakteryzują się możliwością przyjmowania dwóch alternatywnych, ale stabilnych energetycznie struktur przestrzennych. Obok badanych na szeroką skalę prionów występujących u ssaków, białka o charakterze prionów spotkać można również w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Badania doprowadziły do sformułowania przeciwstawnych hipotez tłumaczących istnienie prionu [PSI+] w komórkach drożdży. Postuluje się udział tego prionu w ewolucji *S. cerevisiae*, jednak istnieją również badania sugerujące szkodliwy wpływ prionów na fizjologię drożdży. W ostatnich latach, ze względu na wspólne cechy ze ssaczymi prionami, drożdżowe priony wykorzystywane są również do szybkiego przeszukiwania bibliotek potencjalnych leków przeciwprionowych. Niniejsza praca prezentuje najnowsze kierunki badań nad drożdżowym prionem [PSI+].

WPROWADZENIE

Termin „prion” po raz pierwszy został użyty do opisania białkowej cząsteczki zakaźnej (ang. *proteinaceous infectious particle*), będącej przyczyną pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (ang. *transmissible spongiform encephalopathies*) [1]. Obecnie wiadomo, że priony stanowią bardzo osobliwą grupę białek, które charakteryzują się możliwością przyjmowania co najmniej dwóch odmiennych, stabilnych konformacji. Białko o niezmienionym kształcie może z różnych przyczyn, przyjmować alternatywną konformację bez najmniejszych zmian w jego sekwencji reszt aminokwasowych. Tego typu białka występują u wielu gatunków ssaków i znane są jako PrP [2], jednak ich funkcje fizjologiczne nie zostały dotąd poznane. Ważną cechą białek o charakterze prionu jest możliwość odwracalnej zmiany ich kształtu. Jednak w przypadku prionów występujących u ssaków jest to możliwe jedynie *in vitro* [3]. W warunkach fizjologicznych przywrócenie pierwotnej konformacji PrP nie jest możliwe i z tego powodu choroby, których przyczyną są priony zawsze są śmiertelne.

Przełom w badaniach nad prionami nastąpił wraz z odkryciem białek wykazujących wyżej wymienione cechy w grzybach, m. in. w drożdżach piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* [4,5], nie wykazują one jednak dużego podobieństwa do PrP występujących u ssaków pod względem sekwencji reszt aminokwasowych, ani struktury przestrzennej. W odróżnieniu od prionów występujących u ssaków, funkcje drożdżowych prionów są stosunkowo dobrze poznane i wiadomo, że biorą one udział w określonych procesach zachodzących w komórce. Stwierdzono również, że zmiana konformacji białka często uniemożliwia jego poprawne funkcjonowanie, a efekty można zaobserwować w postaci zmiany fenotypu. Uważa się, że utrata funkcji białka jest związana również z jego agregacją. Fenotyp, który uległ zmianie w wyniku zmiany konformacji białka tworzącego prion, przekazywany jest komórce potomnej, ponieważ białka o zmienionej konformacji, będące przyczyną tego stanu, również przekazywane są komórce potomnej razem z cytoplazmą.

ODKRYCIE [PSI+]

Jeden z najlepiej poznanych drożdżowych prionów będący przyczyną fenotypu [PSI+], charakteryzujący się pomijaniem kodonów stop, został opisany po raz pierwszy w 1965r. przez Briana Coxa, który prowadził badania nad supresorami mutacji typu *nonsense* [6]. Wykazał on, że częstość pomijania kodonów stop zależy od obecności cytoplazmatycznego czynnika [PSI+], którego natura jeszcze wtedy nie była znana. Następnie wykazano, że fenotyp [PSI+] może być związany z mutacją m.in. w genie *SUP35*, jednak mutacja ta była recesywna i dziedziczona zgodnie z prawem Mendla w stosunku 2:2, natomiast czynnik [PSI+] przekazywany był do wszystkich komórek potomnych. Ponadto wykazano, że przeniesienie cytoplazmy z komórek o fenotypie [PSI+] do komórek [psi-] powoduje u nich zmianę fenotypu [7]. Sugerowało to udział cząsteczek DNA występujących

w cytoplazmie, wykazano jednak, że czynnik ten nie jest związany z DNA mitochondrialnym, plazmidem 2 μ i 20S RNA [7-9]. Odkryto natomiast, że zastosowanie łagodnych czynników denaturujących białka powoduje zmniejszenie wydajności pomijania kodonów stop. Doprowadziło to do wniosku, że czynnik [PSI+] występuje w wielu kopiach, najprawdopodobniej w postaci białka [5].

W połowie lat 90. ubiegłego stulecia zespół Reeda Wicknera zaproponował hipotezę, która zakładała, że czynnik [PSI+] może być formą prionową białka Sup35 [5]. Białko to wchodzi w skład kompleksu terminacji translacji i jest niezbędne do poprawnego zakończenia procesu translacji. Hipoteza zespołu Wicknera, wraz z wynikami prac innych badaczy uzyskanymi do tego czasu, doskonale tłumaczyła pierwsze obserwacje Coxa.

Hipoteza zespołu Wicknera zakładała, że w komórkach [*psi*-] białko Sup35 ma konformację pozwalającą funkcjonować temu białku normalnie (Sup35p^{psi}), podczas gdy w komórkach z fenotypem [PSI+] przeważa forma nadająca charakter prionu temu białku (Sup35p^{PSI+}). Hipoteza przewidywała ponadto zdolność Sup35p^{PSI+} do zmiany konformacji Sup35p^{psi} w formę Sup35p^{PSI+} [5]. Pewnym potwierdzeniem tego zjawiska była obserwacja pojawiających się *de novo* komórek [PSI+] po wyrażeniu dużej liczby cząsteczek Sup35p z plazmidu niosącego gen *SUP35* [10]. Zinterpretowano to jako dowód na przypadkową zmianę struktury białka Sup35, która zachodzi z większym prawdopodobieństwem, gdy istnieje większa liczba cząsteczek, która może poddać się takiej zmianie [5]. Innym ważnym odkryciem, związanym z genem *SUP35*, była jedna z jego mutacji, nazwana PNM2 (ang. *Psi no more*) [11]. Ta dominująca mutacja charakteryzuje się zmianą 58. aminokwasu z glicyny na kwas asparaginowy i powoduje zniesienie fenotypu [PSI+] [12]. Obszar białka, w którym znajduje się ten aminokwas nazwano domeną N, a dziś wiadomo, że domena ta odgrywa kluczową rolę, nadając białku Sup35 cechy charakterystyczne dla prionu, czyli zdolność do przyjmowania dwóch różnych, stosunkowo stabilnych energetycznie, konformacji.

Więcej informacji o prionie [PSI+] u drożdży *S. cerevisiae* można znaleźć w artykule pt. „Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” zamieszczonym poprzednio na łamach „Postępów Biochemii” [13].

ORGANIZACJA Sup35p

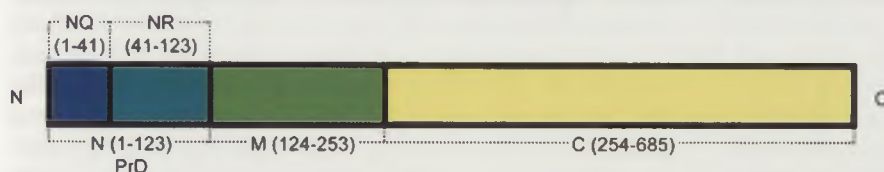
Białko Sup35 jest zbudowane z łańcucha polipeptydowego, składającego się z 685 aminokwasów, w którym można wyodrębnić trzy domeny – N, M i C [14,15]. Zasadniczą część białka stanowi domena C (aminokwasy 254–685), w tym również część odpowiedzialna za zakończenie transla-

cji. Pozostałą część białka dzieli się na dwie części – domenę N (aminokwasy 1–123) i domenę M (aminokwasy 124–253). Domena N nadaje białku Sup35 charakter prionu, umożliwiając zmianę konformacji całego białka. Z tego powodu domena ta nosi także nazwę PrD (ang. *Prion-forming Domain*) [16]. Domena M charakteryzuje się obecnością licznych aminokwasów z grupami bocznymi obdarzonymi ładunkiem elektrycznym, co również może wpływać na Sup35p, nadając mu cechy białek prionowych [17] (Ryc. 1). Warto jednak podkreślić, że domena C, po usunięciu domen N i M, jest w stanie funkcjonować samodzielnie jako czynnik terminacji translacji, co zostało potwierdzone eksperymentalnie [15]. Z tego powodu uważa się, że domeny N i M są odpowiedzialne za nadanie Sup35p charakteru prionu.

CHARAKTERYSTYKA PrD

Domena odpowiedzialna za zmianę konformacji białka Sup35 składa się ze 123 aminokwasów. Funkcję tej domeny badano różnymi sposobami, jednak jej cechy najlepiej obrazują prace, które polegały na doprowadzeniu do nadprodukcji samej domeny N w komórkach drożdży [18-20]. W komórkach z nadmiarem tego fragmentu Sup35p, zaobserwowano pojawienie się agregatów białkowych charakterystycznych dla komórek wykazujących fenotyp [PSI+]. Dalsze badania spowodowały podział tej domeny na kolejne dwie części ze względu na pełnione przez nie funkcje. Rejon NQ (reszty 1-41), szczególnie bogaty w asparaginę i glutaminę (ang. *N domain Q-rich*), odpowiada za zmianę konformacji prionu, natomiast pozostała część PrD, nazwana NR, zawiera pięć powtórzeń oligopeptydowych (ang. *N domain Repeat*), których obecność jest konieczna do stabilnego przekazywania agregatów Sup35p do komórek potomnych [21]. Przyczyna tego zjawiska nie została poznana, jednak wyniki badań sugerują, że rejon ten może być odpowiedzialny za fragmentację agregatu Sup35p, przeprowadzaną przez białko szoku cieplnego Hsp104 [22].

Fizjologiczną funkcją białka Hsp104 jest przywracanie poprawnych konformacji zdenaturowanych i zagregowanych białek przez ich podział na coraz mniejsze agregaty aż, potencjalnie, do pojedynczych cząsteczek białka [23]. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że stężenie tego białka w komórce zapewnia fragmentację agregatu na mniejsze części, które mogą być skutecznie przekazywane komórkom potomnym wraz z cytoplazmą, zapewniając zachowanie fenotypu [PSI+] [24]. Interesującą obserwacją jest to, że zarówno niski poziom ekspresji, jak i nadekspresja Hsp104p prowadzi do przywrócenia fenotypu [*psi*-]. Jeden z zaproponowanych modeli zakłada, że zbyt mała liczba cząsteczek Hsp104p nie jest w stanie podzielić agregatu Sup35p, aby był on „zarodkiem” agregatów dla każdej komórki potomnej, zaś zbyt wysoki poziom ekspresji Hsp104p sprawia, że agregat Sup35p jest bardzo skutecznie dzielony



Rycina 1. Schemat organizacji domen w Sup35p.

ny na mniejsze części, stając się całkowicie rozpuszczalnym w cytoplazmie i nadając komórkom fenotyp [*psi*-]. Mechanizm ten nie jest jednak do końca wyjaśniony, gdyż nadprodukcja białka Hsp104 znosi jedynie priony [PSI+], nie znosi natomiast zmian fenotypów związanych z innymi prionami drożdżowymi [25,26].

ZNACZENIE SEKWENCJI RESZT AMINOKWASOWYCH ZACHOWANEJ W EWOLUCJI

Występowanie PrD w takim białku jak Sup35p może się wydawać bardziej szkodliwe dla komórki niż pożyteczne, ponieważ powoduje, że komórki mogą wykazywać fenotyp prionu [*PSI+*] uniemożliwiający zakończenie translacji w odpowiednim miejscu zapisanym przez kodony stop.

Poszukiwania białek o podobnej sekwencji reszt aminokwasowych u innych gatunków drożdży dostarczyły jednak wyników, które mogą częściowo tłumaczyć ten paradoks. Okazało się bowiem, że w innych gatunkach drożdży także występują białka wykazujące duże podobieństwo pod względem sekwencji reszt aminokwasowych do Sup35p z *S. cerevisiae*, posiadające domeny podobne do PrD na N-końcu białka [27-29]. Porównanie sekwencji reszt aminokwasowych białek homologicznych w stosunku do Sup35 pochodzących z różnych gatunków drożdży wykazało, że u wielu gatunków występuje charakterystyczna domena bogata w asparaginę i glutaminę [30]. Ponadto, doświadczenia wykonane na PrD z *S. cerevisiae* wykazały, że wszystkie mutacje punktowe, uniemożliwiające zmianę konformacji Sup35p, są zlokalizowane w pobliżu tej domeny [31]. Obserwacje te mogą wskazywać na zachowanie PrD w ewolucji i jej stosunkowo ważną funkcję pełnioną w komórce. Tezę tę potwierdzają wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez True i Lindquist [32]. Wykazały one, że drożdże z fenotypem [*PSI+*] mają zwiększoną przeżywalność w obecności niektórych czynników toksycznych, co może potwierdzać sens istnienia prionów w drożdżach.

Analiza PrP występującego w różnych gatunkach ssaków wykazała, że białko to ma sekwencję reszt aminokwasowych w dużym stopniu zachowaną w ewolucji. Nie udało się jednak dotąd ustalić fizjologicznej funkcji tego białka, choć wiele badań wskazuje na możliwość wiązania przez PrP jonów miedzi oraz wpływ na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Poznany został również wpływ stężenia jonów miedzi na ośrodkowy układ nerwowy. Okazało się, że utrzymanie homeostazy tego jonu jest istotne dla poprawnego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Udział PrP w metabolizmie jonów miedzi może więc mieć znaczenie w rozwoju Pasażowalnych Encefalopatii Gąbczastych [33]. Ostatnie badania wskazują również na wpływ PrP na pamięć długotrwałą [34]. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednak określić jednoznacznie roli PrP w komórkach ssaków. Choć wiele badań wskazuje na związek tego białka z funkcjonowaniem układu nerwowego i pamięcią, nie można też wykluczyć, że jest ono jedynie czynnikiem chorobotwórczym kodowanym w genomach ssaków.

Niektóre badania prowadzone na prionach występujących w drożdżach wskazują również na patologiczny aspekt części prionów drożdżowych, w tym prionu [*PSI+*]. Wniosek ten wypływa z badań przeprowadzonych na siedemdziesięciu dzikich szczepach drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. W doświadczeniu tym założono, że skoro priony pojawiają się spontanicznie i nie są szkodliwe dla funkcjonowania drożdży, powinny się one pojawiać z określoną częstością we wszystkich przebadanych szczepach drożdży. Wynik był jednak odmienny. Okazało się, że w jedenastu szcze-

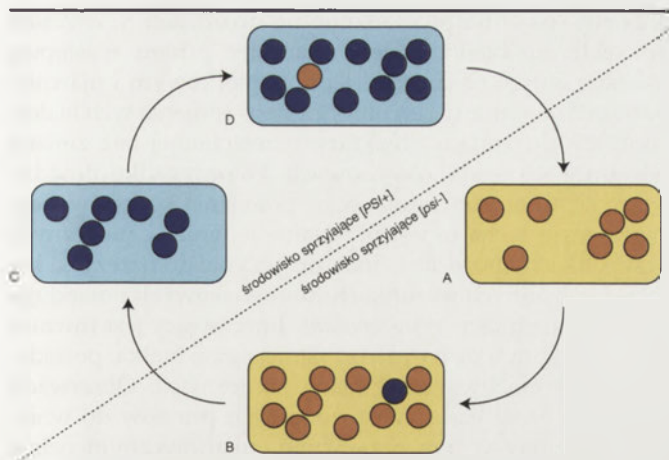
pach drożdży występuje prion [*PIN+*], jednak prion [*PSI+*] nie został zidentyfikowany w żadnym szczepie [35]. Prion [*PIN+*] powstaje w wyniku zmiany konformacji białka kodowanego przez gen *RNQ1*, którego funkcja dotychczas nie została poznana. Usunięcie tego genu, w przeciwieństwie do genu *SUP35*, nie skutkuje wyraźnymi zmianami fenotypu [4], uważa się więc, że nie pełni on tak istotnych funkcji w komórce, jak ma to miejsce w przypadku białka Sup35.

Brak prionu [*PSI+*] w szczepach dzikich może świadczyć o ich szkodliwym wpływie na fizjologię drożdży, zwłaszcza w normalnych warunkach środowiska. Autorzy tej pracy uważają więc, że jest to stan patologiczny drożdży [35]. Poza tym stanowiskiem, istnieje jednak przeciwstawne wytłumaczenie istoty istnienia prionu [*PSI+*], które zostanie przedstawione w dalszej części pracy.

PRION [*PSI+*] A EWOLUCJA DROŻDŻY

Spontaniczne pomijanie kodonu stop, powodowane agregacją Sup35p i zmniejszeniem puli poprawnie funkcjonujących cząsteczek tego białka, skutkuje syntezą dłuższych białek. Zjawisko to może potencjalnie prowadzić do zwiększenia przeżywalności drożdży w toksycznym lub/i zmieniającym się środowisku. True i Lindquist przeprowadzili szereg doświadczeń, w których badali przeżywalność dzikich drożdży *S. cerevisiae* i drożdży z fenotypem [*PSI+*] w pożywkach różniących się np. źródłem węgla albo azotu. Badania te prowadzono przy użyciu ponad dwustu rodzajów podłoża. Okazało się, że w niektórych warunkach środowiska drożdże z fenotypem [*PSI+*] wykazywały zwiększoną przeżywalność w porównaniu z dzikimi szczepami drożdży [32].

Wyżej opisane obserwacje tłumaczone są z punktu widzenia ewolucji tego gatunku drożdży. Normalnie funkcjonująca cząsteczka Sup35p może przyjąć konformację charakterystyczną dla formy prionu w sposób spontaniczny [36]. W zwykłych warunkach środowiska zmiana ta nie przynosi komórce żadnych korzyści, ani wyraźnych szkód. Jednak nagle zmiana warunków środowiska, również zwiększająca prawdopodobieństwo zajścia mutacji w genie, może spowodować, że jedynym sposobem na przeżycie staje się posiadanie czynnika [*PSI+*]. W takich warunkach faworyzowane są komórki z fenotypem [*PSI+*] i, w konsekwencji, zaczynają one dominować w populacji. Spontaniczne pomijanie kodonów stop skutkuje syntezą różnych białek, które przy poprawnie działającym systemie terminacji translacji nie mogą powstać. Zróżnicowana pula białek może, choć nie musi, doprowadzić do powstania fenotypu lepiej przystosowanego do nowych warunków środowiska. Ponadto, jeśli zmiany warunków środowiska spowodowały mutacje w genie, w tym mutacje typu *nonsens*, prion [*PSI+*] umożliwia pominięcie przedwcześnie występujących kodonów stop. Zwiększa to prawdopodobieństwo powstania białka o pełnej długości. Jednak wraz ze wzrostem liczby komórek, zaczynają się pojawiać, w sposób spontaniczny, komórki [*psi-*]. Spontaniczna zmiana konformacji Sup35p zachodzi z częstością 10^{-6} – 10^{-8} [37], a procesy spontaniczne mają większą szansę zajścia wraz ze wzrostem liczby osobników. Komórki z fenotypem [*psi-*] nie są faworyzowane w tych warunkach środowiska, jednak jeśli nastąpi nagły



Rycina 2. Schemat związku między zmianą fenotypu warunkowanego przez Sup35p a ewolucją drożdży. Pomarańczowe koła symbolizują komórki [psi-], zaś granatowe koła komórki [PSI+]. (A) W środowisku sprzyjającym komórkom dzikim [psi-], drożdże dobrze się rozmnażają i dzięki temu liczebność populacji rośnie. (B) Wzrost liczebności komórek zwiększa prawdopodobieństwo zajścia spontanicznej zmiany struktury przestrzennej Sup35p, która zmienia fenotyp komórki na [PSI+]. (C) Jeżeli warunki środowiska ulegną zmianie, istnieje pewna szansa, że komórki z fenotypem [PSI+] będą lepiej dostosowane do środowiska niż drożdże o fenotypie dzikim. W tych warunkach preferencyjnie namnażają się drożdże z fenotypem [PSI+]. (D) Stabilne warunki środowiska doprowadzają do wzrostu liczebności populacji, zwiększa się również prawdopodobieństwo przypadkowej zmiany Sup35p i zmiany fenotypu na [psi-]. Jeżeli warunki środowiska powrócą do wyjściowych, komórki o fenotypie dzikim będą faworyzowane przez dobór naturalny.

powrót warunków środowiska do pierwotnych, komórki pozbawione czynnika [PSI+] stają się znów lepiej przystosowanymi do otaczających warunków. Oczywiście w takiej sytuacji komórki [PSI+] przechodzą do mniejszości [38] (Ryc. 2).

Wyżej opisany mechanizm umożliwia komórkom drożdży szybkie dostosowanie się do zmieniających się warunków środowiska. W przeciwieństwie do trwałych zmian genetycznych, przejście ze stanu [psi-] do stanu [PSI+] zachodzi w krótkim czasie i umożliwia powrót do poprzedniego fenotypu. Można więc stwierdzić, że mechanizm polegający na dostosowaniu fenotypu do warunków środowiska, pozwala komórkom drożdży zminimalizować nie tylko "ryzyko", ale także "koszty" związane z ewolucją.

Istnieje również wcześniej zaproponowana hipoteza uzasadniająca obecność prionów w drożdżach. Według tej hipotezy, fenotyp [PSI+] zapewnia zwiększoną termotolerancję i chemotolerancję komórkom drożdży, choć ma to miejsce jedynie w części przebadanych szczepów *S. cerevisiae* [39].

Jeśli priony w komórkach drożdży rzeczywiście przynoszą pewne korzyści, nie można wykluczyć, że dalsze badania będą dostarczać wiadomości na temat nowych prionów. Fragment genu *SUP35*, kodujący domenę NM, przeniesiony do genu kodującego białko aktywujące transkrypcję, powoduje powstanie białka posiadającego dwie stabilne formy strukturalne [40]. Tego typu badania pokazują, że poprzez rekombinację może, teoretycznie, dochodzić do przenoszenia fragmentu DNA kodującego PrD i powstawania nowych prionów.

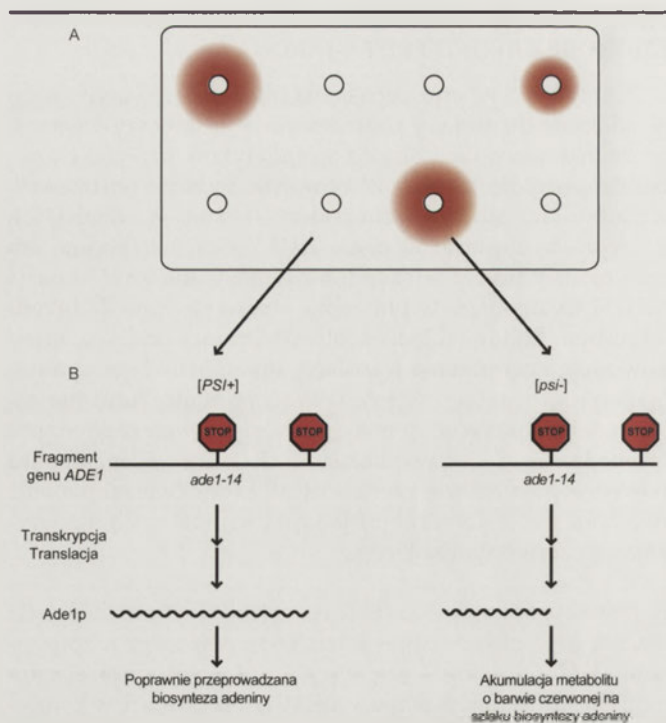
PRION [PSI+] A POSZUKIWANIE LEKÓW NA CHOROBY CREUTZFELDTA-JAKOBA

Fenotyp [PSI+] oraz cecha charakteryzująca każdy prion – zdolność do zmiany konformacji – zostały wykorzystane do badania potencjalnych terapeutyków przeciw chorobie Creutzfeldta-Jakoba. W tym celu badacze postanowili wykorzystać, dobrze scharakteryzowaną w drożdżach *S. cerevisiae*, mutację w genie *ADE1*. Gen ten koduje enzym biorący udział w szlaku biosyntezy adeniny. Mutacja *ade1-14* występująca w tym genie charakteryzuje się przedwczesnym kodonem stop w otwartej ramce odczytu, który powoduje zakończenie translacji, uniemożliwiając syntezę białka Ade1 o pełnej długości. Skrócone białko Ade1 nie posiada pełnej aktywności enzymatycznej, czego efektem jest gromadzenie się w wakuolach tych komórek metabolitu pośredniego o barwie czerwonej. W konsekwencji, kolonie tworzone przez komórki posiadające tę mutację charakteryzują się czerwonym kolorem.

Jednak w komórkach z fenotypem [PSI+] sytuacja wygląda inaczej, gdyż białko odpowiedzialne za poprawne rozpoznawanie kodonów stop – Sup35p – występuje w postaci agregatu i nie funkcjonuje poprawnie. W konsekwencji, w komórkach wykazujących ten fenotyp pomijany jest przedwcześnie występujący kodon stop, co prowadzi z pewnym prawdopodobieństwem, do syntezy Ade1p o pełnej długości. Konsekwencją tego jest przywrócenie białej barwy koloniom stworzonym przez takie drożdże. Zdolność zmiany barwy kolonii wykorzystuje się więc do analizy związków chemicznych mających działanie przeciwprionowe [37] (Ryc. 3).

W oparciu o obserwacje opisane powyżej, został stworzony system pozwalający oceniać właściwości różnych związków chemicznych pod względem przywracania (ang. *cure*) konformacji Sup35p [41]. W tym systemie, na szalkę z wysianymi drożdżami [PSI+], jednocześnie posiadającymi mutację *ade1-14*, nanosi się krążki (stosowane również przy sporządzaniu antybiogramów) nasączone roztworem badanego związku chemicznego. Ze względu na fenotyp [PSI+] drożdże te, pomimo mutacji *ade1-14*, mają kolor biały, co spowodowane jest pominięciem przedwczesnego kodonu stop. Jeśli jednak badany związek wykazuje aktywność przywracającą poprawną strukturę przestrzenną białka Sup35, kompleks białkowy odpowiedzialny za zakończenie translacji zaczyna rozpoznawać poprawnie wszystkie napotkane kodony stop, a wówczas drożdże wykazują barwę czerwoną spowodowaną mutacją *ade1-14*.

Do chwili obecnej poznano kilka związków chemicznych, które przywracają strukturę białka wykazującego charakter prionu – z formy szkodliwej w formę normalnie występującą w komórce. Najlepiej poznany związkiem z tej grupy jest chlorowodorek guanidyny (GuHCl), który ma właściwości denaturujące białka i wydaje się, że powoduje ponowne zwijanie białek, w tym białka Sup35, które przyjęło strukturę prionu [41,42]. Co warto podkreślić, związek ten przywraca poprawną konformację prionów występujących zarówno u ssaków, jak i w drożdżach, a właściwość ta została potwierdzona za pomocą testu opisanego wyżej, choć mechanizm tego zjawiska wciąż jest przedmiotem badań [43].



Rycina 3. Schemat drożdżowego systemu wykorzystywanego do poszukiwania leków przeciwprionowych. (A) Schemat szalki pokrytej komórkami drożdży z mutacją *ade1-14* o fenotypie [PSI⁺]. Okręgi symbolizują krążki bibulowe nasączone badanym związkiem chemicznym, zaś czerwone pola wokół niektórych okręgów symbolizują obszar, w którym drożdże, ze względu na powrót do fenotypu [psi⁻], zmieniły barwę. (B) Schemat procesów zachodzących w obu typach komórek; z lewej komórki o fenotypie [PSI⁺] pomijające niektóre kodony stop, z prawej komórki o fenotypie [psi⁻] kończące translację przy pierwszym napotkaniu kodonu stop.

Związki chemiczne, które posiadają zdolność przywracania poprawnych konformacji *ex vivo* prionom występującym u ssaków – chinakryna i chlorpromazyna – również zostały zweryfikowane pozytywnie za pomocą drożdżowego systemu poszukiwania leków. Natomiast z nowych związków chemicznych obiecujące wydają się cząsteczki z nowo opisanej grupy związków o angielskiej nazwie *kastellpaolinites* oraz fenantrydyna, a zwłaszcza jej pochodna, 6-aminofenantrydyna [44]. Związki te zostały przebadane również za pomocą kilku systemów, w których wykorzystuje się hodowle komórek pobranych od ssaków [45-47].

Zaletą systemu wykorzystującego odpowiedni szczep drożdży jest możliwość badania właściwości różnych potencjalnych leków przeciwprionowych w zwykłych laboratoriach mikrobiologicznych, w przeciwieństwie do badań prowadzonych na białkach PrP pochodzących z komórek ssaków, które wymagają dużego stopnia izolacji ze względu na bezpieczeństwo osób prowadzących badania [41]. Niewątpliwym plusem są również stosunkowo niskie koszty takich badań, przez co stają się one coraz częściej wykorzystywaną metodą do wstępnego przeszukania biblioteki związków chemicznych w poszukiwaniu leków przeciwprionowych.

PODSUMOWANIE

Mimo upływu prawie sześćdziesięciu lat od opisanie choroby Creutzfeldta-Jakoba, wciąż nie są znane funkcje fizjologiczne PrP u człowieka, choć mechanizm powstawania i przekazywania tej choroby został stosunkowo dobrze

poznany. Badania prowadzone na drożdżach *S. cerevisiae* pokazały, że białka mające charakter prionu występują również w tym organizmie jednokomórkowym i ujawniły pewien fizjologiczny i ewolucyjny sens istnienia tych białek, zdolnych do zmiany struktury przestrzennej bez zmiany sekwencji reszt aminokwasowych. W przypadku drożdży wiąże się to np. ze „zdolnością” pomijania kodonów stop. Wprowadzie cecha ta jest przydatna jedynie w nielicznych przypadkach, może się jednak przyczynić do przeżycia komórki w trudnych warunkach środowiskowych powodujących częste mutacje typu *nonsense*. Interesujący jest również fakt, iż w komórkach drożdży istnieją inne białka, posiadające PrD umożliwiającą zmianę konformacji. Obserwacja ta skłania część badaczy drożdżowych prionów do wniosku, że priony w tym organizmie eukariotycznym pełnią określoną funkcję. Inni badacze uważają jednak, że priony u drożdży są jedynie odzwierciedleniem stanu patologicznego. Która hipoteza lepiej opisuje rzeczywistość? Czy uda się ustalić sens istnienia prionów u ssaków? Prowadzone na całym świecie badania powinny z czasem dać odpowiedź na te niezwykle istotne pytania.

PIŚMIENNICTWO

1. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144
2. Prusiner SB (1994) Biology and genetics of prion diseases. *Annu Rev Microbiol* 48: 655-686
3. Callahan MA, Xiong L, Caughey B (2001) Reversibility of scrapie-associated prion protein aggregation. *J Biol Chem* 276: 28022-28028
4. Sondheimer N, Lindquist S (2000) Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* 5: 163-172
5. Wickner RB (1994) [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566-569
6. Cox B (1965) [PSI], a cytoplasmic suppressor of super-suppression in yeast. *Heredity* 20: 505-521
7. Cox B, Tuite MF, McLaughlin CS (1988) The psi factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast* 4: 159-178
8. Tuite MF, Lund PM, Futcher AB, Dobson MJ, Cox BS, McLaughlin CS (1982) Relationship of the [psi] factor with other plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid* 8: 103-111
9. Young CS, Cox BS (1972) Extrachromosomal elements in a super-suppression system of yeast. II. Relations with other extrachromosomal elements. *Heredity* 28: 189-199
10. Chernoff YO, Derkach IL, Inge-Vechtomov SG (1993) Multicopy SUP35 gene induces *de novo* appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 24: 268-270
11. Young CS, Cox BS (1971) Extrachromosomal elements in a super-suppression system of yeast. I. A nuclear gene controlling the inheritance of the extrachromosomal elements. *Heredity* 26: 413-522
12. Doel SM, McCready SJ, Nierras CR, Cox BS (1994) The dominant PNM2- mutation which eliminates the psi factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the SUP35 gene. *Genetics* 137: 659-670
13. Jakubiec M, Boguta M (2002) Prion [PSI] i jego wpływ na terminację translacji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Postepy Biochem* 48: 175-181
14. Kushnirov VV, Ter-Avanasyan MD, Telckov MV, Surguchov AP, Smirnov VN, Inge-Vechtomov SG (1988) Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 66: 45-54
15. Ter-Avanasyan MD, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Didichenko SA, Chernoff YO, Inge-Vechtomov SG, Smirnov VN (1993) Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol Microbiol* 7: 683-692

16. Ter-Avanesyan MD, Dagkesamanskaya AR, Kushnirov VV, Smirnov VN (1994) The *SUP35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi+*] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 671-676
17. Liu JJ, Sondheimer N, Lindquist SL (2002) Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [*PSI+*]. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 Suppl 4:16446-16453
18. Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW (1996) Genesis and variability of [*PSI*] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 1375-1386
19. Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* 273: 622-626
20. Kochneva-Pervukhova NV, Paushkin SV, Kushnirov VV, Cox BS, Tuite MF, Ter-Avanesyan MD (1998) Mechanism of inhibition of Psi+ prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast Sup35 protein. *EMBO J* 17: 5805-5810
21. Hara H, Nakayashiki T, Crist CG, Nakamura Y (2003) Prion domain interaction responsible for species discrimination in yeast [*PSI+*] transmission. *Genes Cells* 8: 925-939
22. Osheroich LZ, Cox BS, Tuite MF, Weissman JS (2004) Dissection and design of yeast prions. *PLoS Biol* 2: 442-451
23. Bosl B, Grimminger V, Walter S (2006) The molecular chaperone Hsp104 - A molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol* 156: 139-148
24. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV (2003) Yeast [*PSI+*] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J Biol Chem* 278: 49636-49643
25. Derkatch IL, Bradley ME, Zhou P, Chernoff YO, Liebman SW (1997) Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the [*PSI+*] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147: 507-519
26. Moriyama H, Edskes HK, Wickner RB (2000) [*URE3*] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol Cell Biol* 20: 8916-8922
27. Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD, Surguchov AP, Smirnov VN, Inge-Vechtomov SG (1987) Localization of possible functional domains in sup2 gene product of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 215: 257-260
28. Nakayashiki T, Ebihara K, Bannai H, Nakamura Y (2001) Yeast [*PSI+*] "prions" that are cross-transmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state. *Mol Cell* 7: 1121-1130
29. Santoso A, Chien P, Osheroich LZ, Weissman JS (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell* 100: 277-288
30. Uptain SM, Lindquist S (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* 56: 703-741
31. DePace AH, Santoso A, Hillner P, Weissman JS (1998) A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion. *Cell* 93: 1241-1252
32. True HL, Lindquist SL (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* 407: 477-483
33. Wechselberger C, Wurm S, Pfarr W, Höglinger O (2002) The physiological functions of prion protein. *Exp Cell Res* 281: 1-8
34. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ (2005) The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet* 14: 2241-2246
35. Nakayashiki T, Kurtzman CP, Edskes HK, Wickner RB (2005) Yeast prions [*URE3*] and [*PSI+*] are diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10575-10580
36. True HL, Berlin I, Lindquist SL (2004) Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* 431: 184-187
37. Liu JJ, Lindquist S (1999) Oligopeptide-repeat expansions modulate „protein-only“ inheritance in yeast. *Nature* 400: 573-576
38. Crist CG, Nakamura Y (2006) Cross-talk between RNA and prions. *J Biochem* 140: 167-173
39. Eaglestone SS, Cox BS, Tuite MF (1999) Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* 18: 1974-1981
40. Li L, Lindquist S (2000) Creating a protein-based element of inheritance. *Science* 287: 661-664
41. Tribouillard D, Bach S, Gug F, Desban N, Beringue V, Andrieu T, Dormont D, Galons H, Laude H, Vilette D, Blondel M (2006) Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnol J* 1: 58-67
42. Tuite MF, Mundy CR, Cox BS (1981) Agents that cause a high frequency of genetic change from [*psi+*] to [*psi-*] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 98: 691-711
43. Eaglestone SS, Ruddock LW, Cox BS, Tuite MF (2000) Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [*PSI(+)*] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 240-244
44. Bach S, Talarek N, Andrieu T, Vierfond JM, Mettey Y, Galons H, Dormont D, Meijer L, Cullin C, Blondel M (2003) Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21: 1075-1081
45. Korth C, May B, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9836-9841
46. Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavet O, Lehmann S (2000) Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol* 74: 320-325
47. Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H (2001) *Ex vivo* propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4055-4059

New aspects of research upon the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI+*] prion

Takao Ishikawa 

Department of Molecular Biology, Institute of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa St., 02-096 Warszawa, Poland

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

Keywords: prion, translation termination, yeast evolution, drug screening

ABSTRACT

One of the key features of prions is the ability to be stable in two alternative conformations. Besides the intensively studied mammalian prions, there are also prion proteins present in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Research in this field has led to opposite hypotheses that explain the sense of presence of [*PSI+*] prion in yeast cells. Some authors postulate the role of the prions in the evolution of *S. cerevisiae*, whereas other investigators point out the negative influence of these particles upon the yeast physiology. In recent years, yeast prions are used for anti-prion drug screening, because of common features with mammalian prions. This work presents the most intensively studied fields of the research carried out on [*PSI+*] prion in yeast.

Białka kotwiczące i ich udział w przekazywaniu sygnałów w zagęszczeniu postsynaptycznym w ośrodkowym układzie nerwowym

Małgorzata Beręsewicz[✉]

Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

[✉]Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; tel.: 22 60 86 487, e-mail: mberesewicz@cmdik.pan.pl

Artykuł otrzymano 18 grudnia 2006 r.
Artykuł zaakceptowano 16 marca 2007 r.

Słowa kluczowe: zagęszczenie postsynaptyczne (PSD), białka kotwiczące, białka MAGUK, białka Shank, białka Homer

Wykaz skrótów: domena GK (ang. *yeast guanylate kinase homology domain*) – domena białkowa wykazująca homologię do drożdżowej kinazy guanylowej, występuje w białkach z rodziny MAGUK; domena PDZ – domena białkowa rozpoznająca wolny, karboksylowy koniec białek charakteryzujących się specyficznym motywem aminokwasowym (-E-T/S-D/E-V-); domena SH3 (ang. *Src homology 3 domain*) – domena białkowa homologiczna do fragmentu białek Src, rozpoznaje obszar bogaty w prolinę o specyficznym motywie aminokwasowym -PXXP-; Homer – rodzina białek kotwiczących, charakterystyczna dla zagęszczenia postsynaptycznego; MAGUK (ang. *membrane-associated guanylyl kinase*) – rodzina kinaz guanylowych związanych z błoną komórkową, charakterystyczna dla zagęszczenia postsynaptycznego; NMDAR (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) – receptor NMDA, jonotropowy receptor glutaminianergiczny; PSD (ang. *postsynaptic density*) – zagęszczenie postsynaptyczne, wielobiałkowa struktura związana z błoną postsynaptyczną synapsy pobudzającej; PSD 95 (ang. *postsynaptic density protein 95 kDa*) – dominujące białko kotwiczące zagęszczenia postsynaptycznego o masie cząsteczkowej 95 kDa, należące do rodziny białek MAGUK; Shank (ang. *SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein*) – rodzina białek kotwiczących, charakterystyczna dla zagęszczenia postsynaptycznego; SynGAP (ang. *synaptic GTPase-activating protein*) – białko synaptyczne aktywujące Ras GTPazę, białko zagęszczenia postsynaptycznego

STRESZCZENIE

Zagęszczenie postsynaptyczne (PSD, ang. *postsynaptic density*) jest wielobiałkową strukturą związaną z błoną postsynaptyczną synaps pobudzających. Skupia ona kilkadziesiąt białek mających zdolność do tworzenia dużych, heteromerycznych i dynamicznie zmieniających się kompleksów białkowych. Sprawne przekazywanie sygnału wewnątrz tej struktury zagwarantowane jest obecnością tzw. białek kotwiczących. Białka te, dzięki wzajemnym oddziaływaniom oraz połączeniom z innymi białkami, w tym między innymi z receptorami, kanałami jonowymi, kinazami białkowymi, fosfatazami czy białkami szkieletu komórkowego, tworzą skomplikowaną przestrzenną sieć, która lokalizuje te białka przy błonie postsynaptycznej w odpowiednie ścieżki sygnałowe. W zagęszczeniu postsynaptycznym wyróżniamy trzy główne rodziny białek kotwiczących: MAGUK (ang. *membrane-associated guanylyl kinase*), Shank (ang. *SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein*) i Homer. Białka te, dzięki bogatemu występowaniu w tej strukturze, twarzą połączeniu z cytoszkieletem komórkowym oraz wielodomenowej strukturze, tworzą stabilne rusztowanie molekularne dla białek związanych z przekazywaniem sygnałów.

WPROWADZENIE

Sprawne przekazywanie sygnału biologicznego z macierzy zewnątrzkomórkowej, przez błonę plazmatyczną, do wnętrza komórki warunkuje prawidłowe funkcjonowanie pojedynczych komórek, narządów, czy całego organizmu w zmieniającym się otoczeniu. Pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych dochodzi do zmiany w ekspresji genów, metabolizmu czy funkcji komórek docelowych. Dlatego proces przekazywania sygnałów musi cechować się odpowiednią specyficznością, niezawodnością i szybkością.

Tradycyjnie przyjmuje się, że na proces przekazywania sygnałów, w którym uczestniczą błony biologiczne, składa się następująca sekwencja wydarzeń: zewnątrzkomórkowy ligand łączy się ze specyficznym dla siebie receptorem błonowym, który ulega zmianie konformacyjnej i przechodzi w stan aktywny. W efekcie, uruchomiona zostaje kaskada reakcji biochemicznych, skutkująca zmianą właściwości zewnątrzkomórkowego białka(ek) – efektora i, związana z tym, specyficzna odpowiedź biologiczna.

Okazuje się jednak, że obok systemu ligand – receptor – efektor, efektywne przekazywanie sygnału wymaga udziału tzw. białek kotwiczących (dokujących, tworzących rusztowanie molekularne, pośredniczących, ang. *scaffold proteins*). Białka te nie mają właściwości enzymatycznych, natomiast przyłączają białka związane z przekazywaniem sygnałów i w ten sposób zapewniają im fizyczny kontakt. Innymi słowy, białka kotwiczące uczestniczą w procesie przekazywania sygnałów poprzez aranżowanie w czasie i przestrzeni spotkania elementów białkowych tego procesu [1,2]. Spełniają funkcje rusztowania molekularnego dzięki temu, że: (i) są w dużych ilościach obecne w obszarze ich działania; (ii) są silnie i trwale umiejscowione w komórce poprzez połączenie ze szkieletem komórkowym oraz (iii) posiadają w swej strukturze wiele różnych domen białkowych umożliwiających jednoczesne tworzenie odwracalnych połączeń z wieloma innymi białkami [3].

W pracy tej zostaną przedstawione dane sugerujące, że białka z rodziny MAGUK, Shank i Homer, które są składnikami tzw. zagęszczenia postsynaptycznego, dzięki właściwościom kotwiczącym, umożliwiają sprawne przekazywanie sygnałów od receptorów glutaminianergicznych w układzie nerwowym.

CO TO JEST ZAGĘSZCZENIE POSTSYNAPTYCZNE?

Zagęszczenie postsynaptyczne (PSD, ang. *postsynaptic density*) jest wielobiałkową strukturą związaną z błoną postsynaptyczną synaps pobudzających w ośrodkowym układzie nerwowym [4]. W latach pięćdziesiątych dwudziestego

wieku obserwacje w mikroskopie elektronowym pozwoliły na odkrycie obszarów elektronowo gęstych w sąsiedztwie błon postsynaptycznych komórek nerwowych [5]. Początkowo ustalono, że są to dyskopodobne struktury osiągające około 40–50 nm grubości oraz dochodzące do 500 nm długości [6], które nazywano pogrubieniem postsynaptycznym albo siecią postsynaptyczną (ang. *postsynaptic thickening*, *postsynaptic web*). Ostatecznie jednak przyjęła się nazwa zagęszczenie postsynaptyczne (ang. *postsynaptic density*) [7].

W następnych latach izolacja frakcji PSD pozwoliła na lepsze scharakteryzowanie odkrytej struktury. W zależności od zastosowanej metody otrzymywania i analizy frakcji PSD, na tę, pozornie nieskomplikowaną, strukturę składa się nawet kilkaset białek [8-10] mających zdolność do tworzenia dużych, heteromerycznych i dynamicznie zmieniających się kompleksów białkowych [11,12]. Białka te, dzięki wzajemnym połączeniom oraz oddziaływaniom z receptorami i kanałami jonowymi, kinazami białkowymi, fosfatazami, małymi białkami G i ich modulatorami oraz białkami szkieletu komórkowego [13], tworzą skomplikowaną przestrzenną sieć, która lokalizuje te białka przy błonie postsynaptycznej w odpowiednie ścieżki sygnałowe.

Na podstawie podobieństwa budowy, wyróżniono trzy główne rodziny białek kotwiczących występujące w obrębie zagęszczenia postsynaptycznego: (i) MAGUK (ang. *membrane-associated guanylyl kinase*), (ii) Shank (ang. *SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein*) (iii) i Homer. Obok wymienionych rodzin, w PSD występuje też wiele innych białek, między innymi białka: GKAP, GRIP, AKAP, które mają zdolność do tworzenia tak zwanego rusztowania molekularnego, jednak nie są one przedmiotem tego artykułu (Tabela 1).

RODZINA BIAŁEK MAGUK

Rodzina MAGUK obejmuje grupę białek typowych dla zagęszczenia postsynaptycznego, które lokalizują się na styku komórka – komórka [52]. Zaliczamy do niej takie białka jak: PSD 95 [53,54], SAP 97/hDlg [19], PSD 93/chapsyn 110 [14,29] oraz SAP 102 [17], p55 [55]. Pierwszym zidentyfikowanym przedstawicielem tej rodziny było białko o masie 95 kDa, stąd jego nazwa PSD 95, pochodząca od pierwszych liter nazwy angielskiej (*postsynaptic density protein 95 kDa*) [53]. Jednocześnie to samo białko odkryła inna grupa ba-

Tabela 1. Ligandy białkowe łączące się z białkami MAGUK, Shank i Homer.

Domena	Ligandy białkowe łączące się z białkami MAGUK	Piśmiennictwo
Domena PDZ	NR2A-D – podjednostki receptora NMDA	[14-18]
	GluR1 – podjednostka receptora AMPA	[19]
	GluR6 – podjednostka receptora kainianowego	[20]
	ErbB4 – receptor tyrozynowy dla neureguliny	[21,22]
	Shaker K ⁺ /Kv1 – kanał potasowy zależny od potencjału błonowego	[23]
	stargazyna – białko kotwiczące receptor AMPA	[24]
	kalirina-7 – białko synaptyczne regulujące aktywność białka Rac	[25]
	SynGAP – białko synaptyczne regulujące aktywność białka Ras	[26,27]
	nNOS – syntaza tlenku azotu	[28,29]
	CRIPT (ang. <i>cysteine-rich interactor of PDZ3</i>) – białko synaptyczne łączące mikrotubule z PSD 95	[30,31]
	neurologina – białko błonowe, łączy się z β-neureksyną	[32]
	sec8 – element kompleksu białkowego transportujący pęcherzyki egzocytarne	[33]
	semaforyny	[34]
	Domena GK	BEGAIN (ang. <i>brain-enriched guanylate kinase-associated protein</i>) – białko łączące się z PSD 95
GKAP (ang. <i>guanylate kinase-associated proteins</i>) – rodzina białek kotwiczących w PSD, łączy PSD 95 z białkiem Shank		[36,37]
MAP1 (ang. <i>microtubule-associated protein 1A</i>) – białko związane z mikrotubulami		[38]
SPAR (ang. <i>spine-associated Rap-GAP</i>) – białko synaptyczne regulujące aktywność białka Rap		[39]
Domena SH3	AKAP79/150 – białko z rodziny AKAP, łączy kinazę A i fosfatazę 1 z białkami MAGUK	[40]
Domena SH3	KA2 – podjednostka receptora kainianowego	[20]
Ligandy białkowe łączące się z białkami Shank		
Domena ANK	fodryna	[41]
Domena SH3	GRIP (ang. <i>glutamate receptor interactin protein</i>) – grupa białek łączących się z receptorami AMPA	[42,43]
Domena PDZ	GKAP (ang. <i>guanylate kinase-associated proteins</i>) – rodzina białek kotwiczących w PSD	[44]
	GluR1 (podjednostka receptora AMPA)	[45]
Region powtórzeń prolinowych	kortaktyna	[46]
	białka kotwiczące z rodziny Homer	[47]
Domena SAM	umożliwia tworzenie homo- i hetero-oligomerów	[4,44]
Ligandy białkowe łączące się z białkami Homer		
Domena EVH1	mGluR1, mGluR5 – receptory metabotropowe grupy pierwszej	[48-50]
	IP ₃ R – receptor 1,4,5-trisfosforanu inozytolu	[50]
	Ryr – receptor rianodynowy	[50]
	białka kotwiczące z rodziny Shank	[47]
Domena CC	umożliwia tworzenie homo- i hetero-oligomerów (dotyczy białek Homer 1b, 1c, 2 i 3)	[51]

daczy [54], która nadała mu nazwę SAP 90 (ang. *synapse associated protein 90 kDa*). W związku z tym w literaturze używane są wymiennie nazwy PSD 95, SAP 90 lub PSD 95/SAP 90.

PSD 95 jest dominującym białkiem kotwiczącym zagęszczenia postsynaptycznego, przewyższa obecnością innych przedstawicieli rodziny MAGUK, jak również inne cząsteczki zaliczane do PSD [56]. Oszacowano, że występowanie PSD 95 dziesięciokrotnie przekracza ilość receptora NMDA i siedmiokrotnie białek Shank [56]. Zapewne, dzięki tak powszechnemu występowaniu, białku PSD 95 przypisuje się najważniejszą rolę w tworzeniu całej struktury zagęszczenia postsynaptycznego.

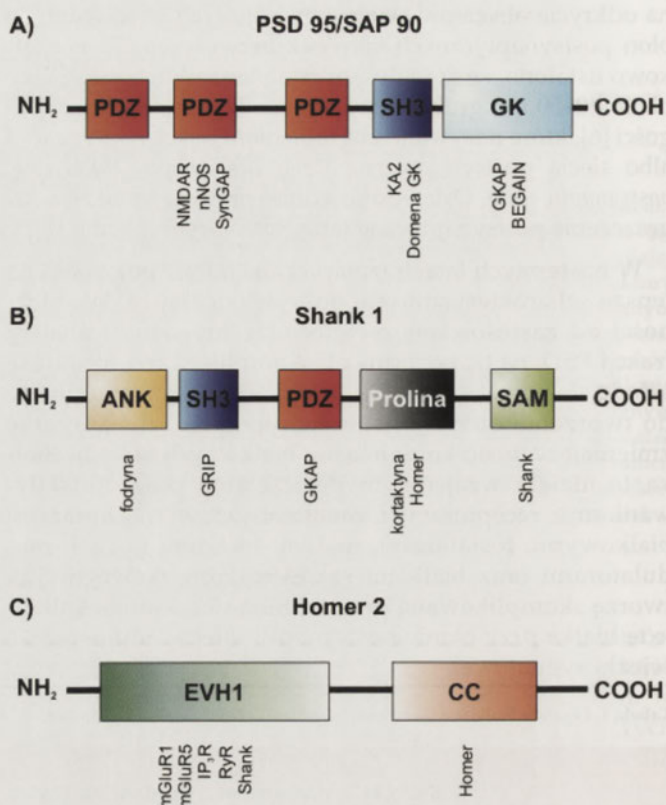
Białka MAGUK prawdopodobnie nie mają aktywności enzymatycznej (o czym mogłaby świadczyć obecność opisanej poniżej domeny GK), a jedynie pośredniczą w przekazywaniu sygnału związanego z aktywacją receptora NMDA. Wiadomo, że białka MAGUK tworzą kompleksy z receptorem NMDA oraz różnymi białkami enzymatycznymi. Umożliwia to ich charakterystyczna struktura [52], w skład której wchodzi trzy rodzaje domen białkowych umożliwiających bogate oddziaływania białko – białko. Począwszy od fragmentu N-końcowego, w białkach MAGUK występują najpierw trzy domeny PDZ, domena SH3 i wreszcie domena GK (Ryc. 1A).

DOMENY PDZ

Największe znaczenie dla utrzymania skomplikowanej sieci międzybiałkowej w zagęszczeniu postsynaptycznym mają domeny PDZ [57,58]. Domenę tę tworzy sekwencja 80–100 aminokwasów, która wykazuje zdolność łączenia się z wolnymi karboksylowymi końcami białek, posiadającymi specyficzny motyw aminokwasowy (-E-T/S-D/E-V). Najczęściej są to cytoplazmatyczne końce transbłonowych receptorów i kanałów jonowych [15,18].

Nazwa PDZ pochodzi od pierwszych liter trzech białek, u których w pierwszej kolejności odkryto te domeny; białko PSD 95, białko Dlg (ang. *Disc large*, białko, którego mutacje prowadzą do nowotworowego przerostu dysku imaginalnego u *Drosophila melanogaster*) oraz białko ZO-1 (ang. *zonula occludens-1*, białko obwódki zamykającej w komórkach nabłonkowych). W literaturze oprócz nazwy domena PDZ pojawiają się inne określenia, takie jak: DHR (ang. *Disc large homology regions*, region homologiczny do fragmentu białka Dlg) i powtórzenia GLGF (od skrótów aminokwasów tworzących domenę PDZ (Gly-Leu-Gly-Phe)) [57]. Więcej szczegółów na temat funkcji i występowania domen PDZ można znaleźć w pracach Milewskiego [59] i Jelenia [60].

Białka MAGUK mają trzy domeny PDZ (PDZ1, PDZ2, PDZ3) różniące się powinowactwem do różnych ligandów, co zwiększa ich zdolność do tworzenia oddziaływań białko-białko. Przy wykorzystaniu drożdżowego systemu dwuhybrydowego wykazano, że białka MAGUK łączą się za pomocą domen PDZ z receptorami NMDA. Cytoplazmatyczne końce podjednostek receptora NMDA posiadają zachowane w ewolucji sekwencje -ESDV- albo -ESEV-, które specyficznie łączą się z PSD 95 [15,18], PSD 93, SAP 97



Rycina 1. Domenowa budowa białek z rodziny MAGUK, Shank i Homer na przykładzie PSD 95, Shank 1 oraz Homer 2. A) Począwszy od N-końca białka PSD 95, wyróżniamy trzy domeny PDZ oraz domeny SH3 i GK. Domeny PDZ uczestniczą głównie w wiązaniu z C-końcem podjednostek receptora NMDA (NMDAR) jak również z innymi białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału od receptora, np. nNOS i SynGAP. Dla regionu SH3 jedynym zidentyfikowanym ligandem jest podjednostka KAZ receptora kainianowego. Wykazano, że domena ta może również oddziaływać z domeną GK w obrębie jednej cząsteczki. Ligandami dla domeny GK, białek MAGUK, są białka z rodziny GKAP (ang. *guanylate kinase-associated proteins*) i BEGAIN (ang. *brain-enriched guanylate kinase-associated protein*). B) Począwszy od N-końca białka Shank 1, wyróżniamy domeny ankirynowe (ANK), domenę SH3, PDZ, skupienia powtórzeń prolinowych (Prolina) i domenę SAM (ang. *sterile alpha motif*). Domena ANK uczestniczy w wiązaniu z fodryną, która z kolei łączy się z aktyną. Domena SH3 łączy się z białkami GRIP (ang. *glutamate receptor interactin protein*), które łączą się z receptorami AMPA. Ligandem domeny PDZ są białka GKAP (ang. *guanylate kinase-associated proteins*), które tworzą kompleksy z receptorami NMDA. Region powtórzeń prolinowych (Prolina) uczestniczy w połączeniach z kortaktyną oraz białkami Homer. Sugeruje się, że połączenie z kortaktyną zapewnia stabilizację białek Shank w komórce przez połączenie z cytoszkieletem. Domena SAM umożliwia tworzenie homo- i heterooligomerów. C) Białko Homer 2 należy do grupy tzw. CC-Homer, zwanych również long-Homer charakteryzujących się obecnością dwóch domen białkowych EVH1 i CC (ang. *coiled-coil*). Dzięki domenie EVH1 białka Homer łączą się między innymi z receptorami metabotropowymi grupy pierwszej (mGluR1, mGluR5), z receptorem 1,4,5-trisfosforanu inozytoli (IP₃R) oraz receptorem rianodynowym (RyR), znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej oraz białkami Shank. Połączenia z wieloma białkami jednocześnie możliwe są dzięki obecności domeny CC. Domena ta ma zdolność tworzenia monomerycznych połączeń typu Homer – Homer i, w związku z tym, uczestniczy w łączeniu receptorów mGluR1 i mGluR5 z receptorami w błonie siateczki śródplazmatycznej.

[18] oraz SAP 102 [16,17]. W przypadku PSD 95 C-końcowy fragment receptora chętniej łączy się z PDZ2 niż PDZ1, natomiast w ogóle nie łączy się z PDZ3 [15,18].

DOMENA SH3

W większości przypadków domena SH3 (ang. *Src homology 3*) wykazuje powinowactwo do obszaru bogatego w reszty proliny, posiadającego specyficzny motyw aminokwasowy -PXXP-. Sekwencja ta charakterystyczna jest dla wielu

białek sygnałowych (zwłaszcza kinaz tyrozynowych) oraz białek związanych z cytoszkieletem komórkowym [61].

W przypadku białek MAGUK domena SH3 obejmuje około 60 reszt aminokwasowych i, jak się okazuje, w związku z nietypową budową strukturalną, do oddziaływań z innymi białkami rzadko wymaga obności specyficznego motywu prolinowego [62]. Jak dotąd, jedynym ligandem białkowym zidentyfikowanym dla domeny SH3 białka PSD 95 jest podjednostka KA2 receptora kainianowego [20]. Wykazano jednak, że w przypadku białek MAGUK domena ta ma również zdolność do łączenia się z domeną GK w obrębie jednej cząsteczki [63].

W związku z małą liczbą zidentyfikowanych ligandów trudno jest jednoznacznie określić funkcje domeny SH3 w białkach MAGUK. Wydaje się, że mogą one mieć znaczenie w lokalizowaniu różnych białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału wokół receptora NMDA, ale również poprzez oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe regulować właściwości kotwiczące białka PSD 95. Sugeruje się, że oddziaływanie pomiędzy domeną SH3 i GK zapobiega przyłączaniu się innych potencjalnych ligandów do obu domen [63].

DOMENA GK

Nazwa regionu GK (ang. *yeast guanylate kinase homology domain*) pochodzi od podobieństwa sekwencji białek MAGUK do drożdżowej kinazy guanulowej (37% homologii w sekwencji aminokwasowej). W drożdżach kinaza przekształca GMP w GDP z udziałem hydrolizy ATP, jednak w białkach MAGUK, pomimo obecności domeny GK, jak dotąd nie wykazano jej aktywności enzymatycznej [64].

Obecnie wiemy, że ligandami dla domeny GK białek zagęszczenia postsynaptycznego są białka z rodziny GKAP (ang. *guanylate kinase-associated protein*) [36], znane także jako rodzina białek SAPAP (ang. *SAP 90/PSD 95 associated protein*) [37] lub DAP (ang. *Discs large associated protein*) [65]. Białka GKAP bogato występują w strukturze zagęszczenia postsynaptycznego i lokalizują się około 20 nm od błony postsynaptycznej [66]. Białka te charakteryzują się obecnością, w N-końcowym fragmencie, pięciu powtórzeń złożonych z 14-tu reszt aminokwasowych, które umożliwiają łączenie się z domeną GK białka PSD 95 [36]. Analiza sekwencji aminokwasowej nie dostarczyła informacji na temat funkcji tych białek [66]. Obecnie można jedynie spekulować, że białka GKAP odpowiedzialne są za łączenie kompleksu PSD 95 z cytoszkieletem i prawdopodobnie z białkami cytoplazmatycznymi tworzącymi ścieżki przekazywania sygnału [36].

Wykazano, że obok PSD 95, białka GKAP łączą się także z SAP 97 i PSD 93 [36], jak również z domeną PDZ białek Shank [66]. Rolę tych ostatnich połączeń omówiono poniżej.

Obok rodziny GKAP, domena GK białek PSD 95 może się łączyć z białkiem BEGAIN (ang. *brain-enriched guanylate kinase-associated protein*) [35]. Jest to białko, jak dotąd mało znane, ale sugeruje się jego udział w podtrzymywaniu i

tworzeniu zwartej struktury wewnątrz zagęszczenia postsynaptycznego.

Na podstawie analizy ligandów łączących się z domeną GK białek MAGUK, przypuszcza się, że region ten odpowiedzialny jest raczej za tworzenie wielobiałkowych kompleksów pomiędzy białkami kotwiczącymi, poprzez tworzenie rodzaju rusztowania molekularnego i wydaje się, że nie bierze udziału w lokalizowaniu innych białek wokół receptora [18,36].

UDZIAŁ BIAŁEK MAGUK W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW POPRZEC RECEPTOR NMDA

Odkrycie kompleksów MAGUK, a szczególnie PSD 95-NMDAR, było przełomem w badaniach nad rolą zagęszczenia postsynaptycznego. Receptor NMDA (N-metylo-D-asparaginowy) jest jednym z trzech głównych rodzajów receptorów glutaminianergicznych obecnych w ośrodkowym układzie nerwowym [67]. Jak większość kanałów jonowych bramkowanych ligandem jest oligomerem zbudowanym z czterech podjednostek. Jak dotąd scharakteryzowano trzy główne rodziny podjednostek określane jako: NR1, NR2 i NR3 [68,69]. Podjednostka NR1 jest białkiem transbłonowym, niezbędnym do funkcjonowania samego kanału. Podjednostki NR2 i NR3 są specyficzne dla receptora NMDA i regulują jego aktywność. Posiadają one długie cytoplazmatyczne fragmenty C-końcowe, które zawierają wiele miejsc fosforylacji (dla kinaz białkowych PKA, PKC, CaMKII, Src, Fyn) oraz miejsc oddziaływań z białkami cytoplazmatycznymi biorącymi udział w przekazywaniu sygnału; tu również znajdują się motywy -ESDV- albo -ESEV-, rozpoznawane przez domeny PDZ białek MAGUK [70].

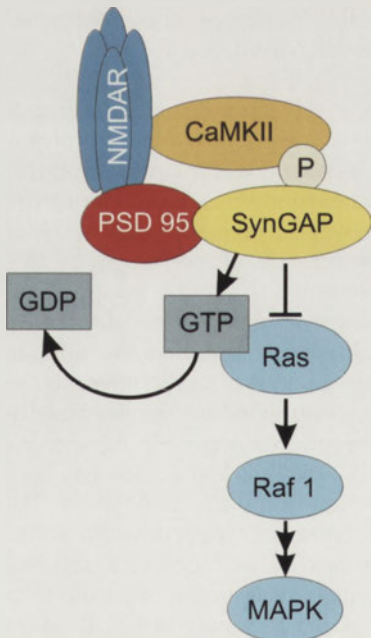
W warunkach fizjologicznych pobudzenie jonotropowych receptorów NMDA wiąże się z powolną neurotransmisją glutamatergiczną, z zapoczątkowaniem długotrwałych zmian w aktywności neuronów, co leży u podstaw plastyczności układu nerwowego i procesów uczenia. Mechanizmy przekazywania informacji od receptorów są złożone i wieloetapowe. Podstawowe znaczenie mają tu jony Ca^{2+} , które bezpośrednio lub pośrednio regulują aktywność szeregu enzymów takich jak: kinazy białkowe, fosfolipaza A2, syntaza tlenu azotu, proteazy. Ważne jest więc, aby w „odpowiednim” momencie, „odpowiednie” białka znajdowały się w sąsiedztwie receptora, zareagowały na sygnał i przekazały go do efektorów. Część białek ma zdolność bezpośredniego łączenia się z receptorem (np. α -aktylina [71], kalmodulina (CaM) [72]), natomiast zdecydowana większość, aby zapewnić sobie to sąsiedztwo łączy się z białkami pośredniczącymi, związanymi z receptorem. Właśnie taką rolę pośrednika odgrywają białka z rodziny MAGUK, które stanowią rusztowanie molekularne dla wielu białek odbierających i przekazujących sygnał do wnętrza komórki.

Przykładem może być oddziaływanie PSD 95-nNOS [28,29]. Jest to szczególnie ciekawy kompleks, ponieważ oba białka łączą się ze sobą za pomocą własnych domen PDZ [73]. Syntaza tlenu azotu (nNOS), łącząc się z PSD 95, zapewnia sobie bliskość receptora NMDA. Jest to o tyle ważne, gdyż nNOS aktywowana jest przez jony wapnia napływające przez receptor NMDA [74]. Dzięki takiej lokalizacji

białko nNOS może bardzo szybko reagować na pobudzenie komórki.

Podobnie jak syntaza tlenu azotu, białko SynGAP (ang. *synaptic GTPase-activating protein* albo *Ras-GTPase activating protein*), łącząc się z PSD 95, gwarantuje sobie bliskość receptora NMDA [26]. C-koniec białka SynGAP charakteryzuje się występowaniem specyficznego motywu tS/TXV, za pomocą którego z równym prawdopodobieństwem może wiązać się do wszystkich trzech domen PDZ białka PSD 95, jak również do PDZ3 białka SAP 102 i podjednostki NR1 receptora NMDA [26].

Dotychczas nie ustalono, jaką rolę odgrywa SynGAP w zagęszczeniu postsynaptycznym, dziś jednak coraz częściej sugeruje się jego udział w przekazywaniu sygnału od receptora NMDA do aktywacji białek szlaku MAP kinaz [27,75]. SynGAP jest białkiem aktywującym Ras GTPazę, które potęguje hydrolizę GTP (połączonego z białkiem Ras) do GDP, tym samym powoduje zahamowanie aktywności białka Ras (Ryc. 2). Można więc powiedzieć, iż białko SynGAP negatywnie reguluje aktywność białka Ras i uniemożliwia aktywację szlaku MAP kinaz [76]. Aktywność SynGAP zależy od stopnia jego ufosforylowania, między innymi przez CaMKII, kinazę białkową, której aktywność zależy od stężenia jonów wapnia i kalmoduliny. Jak się okazuje w cząsteczce SynGAP występuje około 29 potencjalnych miejsc fosforylacji przez CaMKII [27]. Aktywacja receptora NMDA i napływ jonów wapnia do wnętrza komórki aktywuje CaMKII, która ulega



Rycina 2. Regulacja aktywności szlaku MAPK z udziałem białka SynGAP. SynGAP (ang. *synaptic GTPase-activating protein*) aktywuje Ras GTPazę poprzez wzmacnianie hydrolizy GTP (połączonego z białkiem Ras) do GDP. W konsekwencji powoduje to zahamowanie aktywności białka Ras i zmniejszenie aktywacji MAP kinaz. Fosforylacja białka SynGAP (przez kinazę, której aktywność zależy od stężenia wapnia i kalmoduliny, CaMKII) wzmacnia jego aktywność, a tym samym hamowanie białka Ras oraz szlaku MAP kinaz. P- fosforylacja reszt treoninowych białka SynGAP.

ga przemieszczeniu z cytoplazmy do frakcji błonowej, gdzie oddziałuje z białkami zagęszczenia postsynaptycznego [77]. CaMKII, między innymi, łączy się z podjednostkami NR2A-2B receptora NMDA [78,79], gwarantując sobie w ten sposób sąsiedztwo kompleksu PSD 95-SynGAP, również połączonego z receptorem NMDA. Białko PSD 95 stanowi rodzaj mediatora pomiędzy CaMKII a jej substratami, w tym z białkiem SynGAP [80]. CaMKII fosforyluje SynGAP, co powoduje wzrost jego aktywności oraz wzmocnienie hamowania białka Ras, co może skutkować obniżeniem aktywności szlaku MAP kinaz [81,82].

Opisane powyżej oddziaływanie obrazują część zależności w

jakie zaangażowany jest receptor NMDA i białka MAGUK. Dzięki najnowszym technikom proteomiki możliwe było scharakteryzowanie całego kompleksu skupionego wokół receptora NMDA, coraz częściej określanego mianem NRC (ang. *NMDA-receptor multiprotein complexes*). Z najnowszych danych wynika, że obejmuje on około 186 różnych białek [10], wśród których wyróżniamy białka receptorowe, białka rusztowania molekularnego, białka zaangażowane w przekazywanie sygnału oraz białka szkieletu komórkowego [10,83,84].

RODZINA BIAŁEK SHANK

Rodzina Shank (ang. *SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein*), zwana również ProSAP (ang. *proline rich synapse-associated protein*) [58], obejmuje trzy białka nazwane kolejno: Shank 1, Shank 2 oraz Shank 3. Podobnie jak białka MAGUK, są one licznie reprezentowane w zagęszczeniu postsynaptycznym, z tą jednak różnicą, iż lokalizują się raczej w warstwie PSD skierowanej do cytoplazmy, a nie do błony postsynaptycznej [85].

Kluczem do zrozumienia funkcji białek z rodziny Shank jest poznanie ich strukturalnej organizacji. Analiza sekwencji wskazuje, że białka te nie posiadają domen o znaczeniu enzymatycznym lub katalitycznym, natomiast charakteryzują się istnieniem wielu motywów mających znaczenie w łączeniu się z innymi białkami [44]. Począwszy od fragmentu N-końcowego wyróżniamy powtórzenia ankirynowe (ANK), domenę SH3, PDZ, jak również skupienia powtórzeń reszt proliny i domenę SAM [86] (Ryc. 1B).

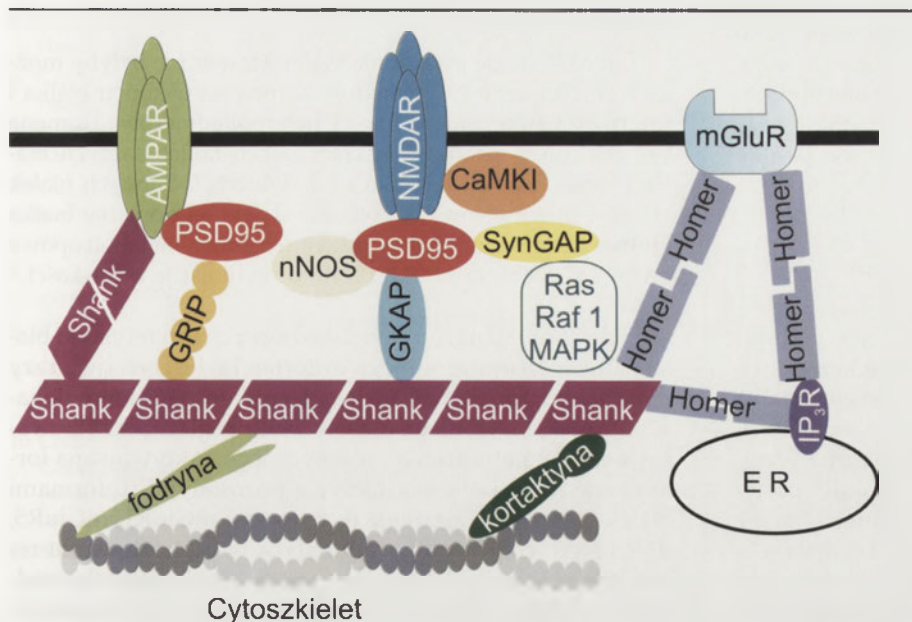
DOMENA ANK

Nazwa domeny ankirynowej pochodzi od białka cytoplazmatycznego zwanego ankiryną, w którym odkryto występowanie powtórzeń 33 aminokwasowego motywu [87]. Ten sam motyw został zidentyfikowany również w innych białkach, między innymi w białkach Shank.

W białkach tych funkcja siedmiu powtórzeń ankirynowych nie jest do końca wyjaśniona, wiadomo natomiast, że są to potencjalne miejsca oddziaływań z innymi białkami. Jak dotąd zidentyfikowano jedno białko wykazujące powinowactwo do tej domeny, zwane fodryną. Ponieważ fodryna łączy się z aktywną przypuszcza się, że odpowiedzialna jest ona za stabilizację lokalizacji białek Shank i ich partnerów w komórce [41] oraz połączenie z cytoszkieletem komórki.

DOMENA SH3

Domena SH3 rodziny Shank łączy się z białkami GRIP (ang. *glutamate receptor interactin protein*), które zgodnie z jedną z hipotez, łączą się z receptorami jonotropowymi AMPA (α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazopropionowy) za pomocą domeny PDZ [88]. W białkach GRIP wyróżniamy siedem domen PDZ i uważa się, że tworząc kompleks z receptorem AMPA, pełnią analogiczną funkcję do białka PSD 95 wiążącego receptor NMDA [43] (Ryc. 3).



Rycina 3. Udział białek Shank w lokalizowaniu w komórce trzech głównych klas receptorów glutaminianergicznych: receptora NMDA (NMDAR) poprzez kompleksy z PSD 95/GKAP, receptora metabotropowego grupy pierwszej (mGluR) poprzez białka Homer oraz receptora AMPA (AMPA). Białka Shank, poprzez połączenie z kortaktyną i fodryną, tworzą stabilną platformę do konstruowania kompleksów wielobiałkowych w zagęszczeniu postsynaptycznym. CaMKII – kinaza, której aktywność zależy od stężenia jonów wapnia i kalmoduliny; ER – siateczka śródplazmatyczna; IP₃R – receptor 1,4,5-trisfosforanu inozytolu; nNOS – syntaza tlenu azotu; Ras – rodzina małych białek G; Raf 1 – kinaza serynowo-treoninowa; MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny.

DOMENA PDZ

Najlepiej scharakteryzowanymi połączeniami, w których biorą udział białka Shank są połączenia z białkami GKAP z udziałem domeny PDZ [44]. Białka GKAP łączą się bezpośrednio z białkami PSD 95, które z kolei tworzą kompleksy z NMDAR [36] (Ryc. 3). W ostatnim czasie, stosując drożdżowy system dwuhybrydowy, wykazano, że Shank 3 łączy się z rejonem C-końcowym GluR1 podjednostki receptora AMPA [45].

REGION POWTÓRZEŃ PROLINOWYCH

W białkach Shank, obok domeny PDZ, znajduje się region obejmujący około 1000 reszt aminokwasowych, bogaty w prolinę i serynę, nazywany regionem powtórzeń prolinowych. Jest to obszar rozpoznawany przez białka posiadające domenę SH3, EVH1 oraz WW (domena WW obejmuje 38–40 aminokwasowy fragment białka tworzący trzy struktury β -kartki [2]). Jak dotąd zidentyfikowano dwa białka wykazujące powinowactwo do bogatego w prolinę regionu białka Shank, są to: kortaktyna [46] oraz białka Homer [47]. Kortaktyna dzięki swojej domenie SH3 przyłącza się do białek Shank i sugeruje się, że podobnie jak fodryna jest odpowiedzialna za stabilizację białek Shank w komórce poprzez połączenie z cytoskieletem [46] (Ryc. 3). Na temat białek Homer i tworzonych przez nie połączeń z receptorami metabotropowymi grupy I (mGluR1 i mGluR5) oraz receptorami znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej (IP₃R i RyR) będzie mowa w dalszej części artykułu.

DOMENA SAM

Największe znaczenie w tworzeniu wysoko zorganizowanej struktury zagęszczenia postsynaptycznego ma domena

SAM (ang. *sterile alpha motif*) znajdująca się na C-końcu białka Shank [44]. Dotychczas wiadomo było, że jest to domena, która umożliwia tworzenie homo- i heterooligomerów, ułatwiając oddziaływania pomiędzy poszczególnymi kompleksami. Dopiero obserwacje w mikroskopie elektronowym oczyszczonych domen SAM białka Shank 3 wykazały istotę owych samoasocjacji. Okazało się, że domeny układają się w zbitą strukturę, składającą się ze skręconych helikalnie włókien [4]. Sugeruje się, że dzięki takiej strukturze białka Shank mogą tworzyć platformę do konstruowania kompleksów białkowych w zagęszczeniu postsynaptycznym. Jest to o tyle ważne, iż białka Shank pośrednio łączą się z trzema głównymi klasami postsynaptycznych receptorów glutaminianergicznych: (i) z receptorem NMDA poprzez kompleksy z PSD 95/GKAP, (ii) z mGluR1 i mGluR5 poprzez białka Homer oraz (iii) z receptorem AMPA (Ryc. 3). Sugeruje się więc, że białka Shank pełnią nadrzędną funkcję wśród białek tworzących rusztowanie molekularne w obrębie zagęszczenia postsynaptycznego

[88]. Zaproponowano również, aby traktować białka Shank jako najważniejsze białka kotwiczące w głębszych warstwach zagęszczenia postsynaptycznego analogicznie do PSD 95 w przybliżonych obszarach tych struktur [4,44].

RODZINA BIAŁEK HOMER

Białka z rodziny Homer, znane również pod nazwą *Vesl* [89] albo *Cupidin* [90], podobnie jak białka Shank, lokalizują się w głębszej, cytoplazmatycznej warstwie zagęszczenia postsynaptycznego. Odpowiedzialne są za kotwiczenie i przestrzenne umiejscowienie w błonie komórkowej receptorów metabotropowych z grupy I (mGluR1, mGluR5) – typowych dla błon postsynaptycznych oraz zapewnianie tym receptorom sąsiedztwa efektorów w postaci wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych umiejscowionych w błonie siateczki śródplazmatycznej (IP₃R i RyR) [91] (Ryc. 3). Oprócz typowych właściwości rusztowania molekularnego, białka Homer posiadają również możliwość aktywnego regulowania połączeń pomiędzy receptorami metabotropowymi a receptorami w błonie siateczki śródplazmatycznej [92], co zostanie omówione w dalszej części tego rozdziału.

Do tej pory zidentyfikowano trzy grupy białek, nazwane kolejno: Homer 1, Homer 2 i Homer 3, które są produktami trzech niezależnych genów [92]. W obrębie grup wyróżnia się izoformy, z których dotychczas najlepiej poznane są: Homer 1a, 1b, 1c oraz Homer 2a i 2b [48]. Ze względu na budowę, ekspresję i funkcję, białka Homer możemy podzielić na dwie grupy. Do pierwszej, często określanej w literaturze angielskiej jako CC-Homer albo long-Homer, zaliczane są białka 1b, 1c, 2 i 3, do drugiej natomiast (short-Homer) – wyróżniająca się izoforma 1a (zwana również Vesl 1S).

Pierwsza grupa, obejmuje białka syntetyzowane konstytutywnie, powszechnie występujące w korze mózgu, mózdzku i hipokampie [48]. Charakteryzują się one obecnością dwóch domen białkowych EVH1 i CC (ang. *coiled-coil*), które umożliwiają im różnorodne oddziaływania białko – białko (Ryc. 1C).

DOMENA EVH1

Domena EVH1 (ang. *Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1*), o zachowanej w ewolucji sekwencji, obejmującej 110 reszt aminokwasowych, wykazuje powinowactwo do regionów bogatych w prolinę. Dzięki tej domenie białka Homer łączą się, między innymi, z receptorami metabotropowymi grupy pierwszej [49] (Ryc. 3). Cytoplazmatyczny fragment C-końcowy receptorów mGluR1 i mGluR5 posiada charakterystyczny motyw -PPXXP- rozpoznawany przez domenę EVH1. Na podstawie badań metodą hybrydyzacji *in situ* wykazano, że istnieje przestrzenna zależność pomiędzy występowaniem podtypów białek Homer i receptorów metabotropowych. Okazało się, że mGluR1 głównie występuje w sąsiedztwie białka Homer 3, natomiast mGluR5 – w sąsiedztwie białka Homer 1b i 1c [48,49,91].

Opisywane połączenia receptorów metabotropowych z grupy I z białkami Homer są o tyle ważne, że Homer, jako białko kotwiczące, ma zdolność łączenia się również z receptorami IP₃R (receptor 1,4,5-trisfosforanu inozytolu) i RyR (receptor rianodynowy), znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej, które są efektorami receptorów metabotropowych [50]. Receptory mGluR1 i mGluR5 związane są ze szlakiem aktywacji fosfolipazy C (PLC), która powoduje hydrolizę błonowego fosfatydyloinozytolu do dwóch ważnych przekazników: diacyloglicerolu (DAG) oraz 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP₃). DAG pozostaje w błonie komórkowej, gdzie odpowiada, między innymi, za aktywację kinazy białkowej C (PKC). IP₃ po uwolnieniu do cytoplazmy łączy się z receptorem IP₃, znajdującym się w błonie siateczki śródplazmatycznej, powodując jego otwarcie i uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych do cytoplazmy [47]. Jednak w komórce IP₃ jest bardzo nietrwały, ulega błyskawicznej defosforylacji do fosforanu inozytolu, a następnie do inozytolu. Dlatego, aby IP₃ mógł być skutecznym aktywatorem musi mieć zagwarantowane bliskie sąsiedztwo efektora, czyli receptora IP₃R. Jest to możliwe dzięki białkom Homer, które za pomocą domeny EVH1 łączą się z charakterystycznym motywem -PPXXP- receptorów IP₃R, spinając dwa receptory, co umożliwia efektywną transmisję sygnału [51].

Partnerami białek Homer są także, omówione już, białka Shank [47] (Ryc. 3). Połączenie to możliwe jest dzięki domenie EVH1, rozpoznawanej przez region bogaty w prolinę białek Shank. Oddziaływanie Homer – Shank sprawia, że dwa duże kompleksy białkowe, skupione wokół tych dwóch białek tworzących rusztowanie, zostają scalone w jeden funkcjonalny kompleks, co znacznie usprawnia komunikację pomiędzy nimi. Przypominając, to połączenie umożliwia kontakt trzech ważnych receptorów: NMDA poprzez kompleks PSD95/GKAP, mGluR 1 i 5 poprzez białka Homer oraz AMPA (Ryc. 3).

DOMENA CC

Tak różnorakie połączenia białek Homer nie byłyby możliwe bez domeny CC. Znajduje się ona na C-końcu białka i umożliwia tworzenie homo- i heterooligomerów. Domena CC ma zatem zdolność łączenia dwóch takich samych białek Homer oraz do łączenia się z domeną CC innych białek Homer. Innymi słowy, to właśnie dzięki tej domenie białka Homer mogą jednocześnie łączyć receptory metabotropowe grupy I z receptorami IP₃R i RyR, utrzymując je w bliskości.

Jak wspomniano, od przedstawionej charakterystyki białek Homer znacznie odbiega izoforma 1a. Jest ona dwa razy mniejsza od pozostałych białek z tej rodziny (186 aminokwasów) i jako jedyna ulega czasowej ekspresji, zapoczątkowanej wskutek pobudzenia synaptycznego. Aktywowana forma zaczyna współzawodniczyć z pozostałymi izoformami białek Homer o wiązanie z receptorami mGluR1, mGluR5, IP₃R i RyR, co powoduje zaburzenia w oddziaływaniu receptorów błonowych z receptorami w błonie siateczki śródplazmatycznej i wpływa na zmiany w przekazywaniu sygnału wapniowego w komórce. Jak wykazano, aktywacja izoformy 1a opóźnia przekazywanie sygnału od receptora do efektora oraz odpowiedź wapniową komórki [47]. Wydaje się, że dzieje się tak dlatego, że izoforma 1a charakteryzuje się obecnością tylko jednej typowej dla białek Homer, domeny EVH1 [48]. Brak domeny CC powoduje, że izoforma ta nie ma możliwości tworzenia monomerycznych połączeń typu Homer-Homer i w związku z tym nie uczestniczy w łączeniu receptorów mGluR1 i mGluR5 z receptorami w błonie siateczki śródplazmatycznej.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, białka z rodziny: MAGUK, Shank i Homer charakteryzują się wielodomenową budową, umożliwiającą liczne połączenia międzybiałkowe. Są to białka licznie występujące w strukturze zagęszczenia postsynaptycznego i, dzięki połączeniom z białkami cytoszkieletowymi, mocno zakotwiczone w komórce. Zaangażowane są w lokalizowanie receptorów w jednym rejonie błony oraz łączenie ich z rekrutowanymi z cytoplazmy białkami, układającymi się w różne ścieżki przekazywania sygnału. Białka MAGUK odpowiedzialne są za łączenie receptorów NMDA, Shank – receptorów AMPA, natomiast rodzina Homer – receptorów metabotropowych z grupy pierwszej. Dzięki oddziaływaniom pomiędzy białkami rusztowania molekularnego, szlaki przekazywania sygnału pochodzące od różnych receptorów sąsiadują ze sobą i tworzą sprawnie działającą strukturę zagęszczenia postsynaptycznego.

PIŚMIENNICTWO

- 1 Pawson T (1995) Protein modules and signaling networks. *Nature* 373: 573-580
- 2 Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080
- 3 Kreienkamp HJ (2002) Organization of G-protein-coupled receptor signaling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol* 2: 581-586
- 4 Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Gundelfinger ED, Bowie JU (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311: 531-535

5. Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 193-202
6. Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* 86: 831-845
7. Cohen RS, Blomberg F, Berzins K, Siekevitz P (1977) The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. *J Cell Biol* 74: 181-203
8. Cotman CW, Banker G, Churchill L, Taylor D (1974) Isolation of postsynaptic densities from rat brain. *J Cell Biol* 63: 441-455
9. Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, Phillips TM, Sheng M, Reese TS (2005) Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11551-11556
10. Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CN, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SG (2006) Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1: 16-23
11. Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298: 776-780
12. Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290: 750-754
13. Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 326: 409-422.
14. Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M (1996) Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 17: 103-113
15. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-1740
16. Lau LF, Mammen A, Ehlers MD, Kindler S, Chung WJ, Garner CC, Huganir RL (1996) Interaction of the N-methyl-aspartate receptor complex with a novel synapse-associated protein, SAP102. *J Biol Chem* 271: 21622-21628
17. Muller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Huganir RL, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes *in vivo*. *Neuron* 17: 255-265
18. Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16: 2157-2163
19. Muller BM, Kistner U, Veh RW, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Garner CC (1995) Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Neurosci* 15: 2354-2366
20. Garcia EP, Mehta S, Blair LA, Wells DG, Shang J, Fukushima T, Fallon JR, Garner CC, Marshall J (1998) SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21: 727-739
21. Garcia RAG, Vasudevan K, Buonanno A (2000) The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3596-3601
22. Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, Du QS, Pelkey KA, Yang DJ, Xiong WC, Salter MW, Mei L (2000) Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26: 443-455
23. Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378: 85-88
24. Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936-943
25. Penzes P, Johnson RC, Sattler R, Zhang X, Huganir RL, Kambampati V, Mains RE, Eipper BA (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron* 29: 229-242
26. Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir RL (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20: 683-691
27. Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB (1998) A synaptic RasGTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20: 895-904
28. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767
29. Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Brecht DS (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16: 7407-7415
30. Passafaro M, Sala C, Niethammer M, Sheng M (1999) Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95. *Nat Neurosci* 2: 1063-1069
31. Niethammer M, Valtschanoff JG, Kapoor TM, Allison DW, Weinberg RJ, Craig AM, Sheng M (1998) CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 20: 693-707
32. Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Sudhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277: 1511-1515
33. Sans N, Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang YX, Racca C, Vicini S, Wenthold RJ (2003) NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 5: 520-530
34. Schultze W, Eulenburg V, Lessmann V, Herrmann L, Dittmar T, Gundelfinger ED, Heumann R, Erdmann KS (2001) Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95. *J Neurochem* 78: 482-489
35. Deguchi M, Hata Y, Takeuchi M, Ide N, Hirao K, Yao I, Irie M, Toyoda A, Takai Y (1998) BEGAIN (brain-enriched guanylate kinase-associated protein), a novel neuronal PSD-95/SAP90-binding protein. *J Biol Chem* 273: 26269-26272
36. Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136: 669-678
37. Takeuchi M, Hata Y, Hirao K, Toyoda A, Irie M, Takai Y (1997) SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem* 272: 11943-11951
38. Brenman JE, Topinka JR, Cooper EC, McGee AW, Rosen J, Milroy T, Ralston HJ, Brecht DS (1998) Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci* 18: 8805-8813
39. Pak DT, Yang S, Rudolph-Correira S, Kim E, Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron* 31: 289-303
40. Colledge M, Dean RA, Scott GK, Langeberg LK, Huganir RL, Scott JD (2000) Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* 27: 107-119
41. Bockers TM, Mameza MG, Kreutz MR, Bockmann J, Weise C, Buck F, Richter D, Gundelfinger ED, Kreienkamp HJ (2001) Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein alpha-fodrin. *J Biol Chem* 276: 40104-40112
42. Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF, Huganir RL (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386: 279-284
43. Dong H, Zhang P, Song I, Petralia RS, Liao D, Huganir RL (1999) Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. *J Neurosci* 19: 6930-6941

44. Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtchanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23: 569-582
45. Uchino S, Wada H, Honda S, Nakamura Y, Ondo Y, Uchiyama T, Tsutsumi M, Suzuki E, Hirasawa T, Kohsaka S (2006) Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J Neurochem* 97: 1203-1214
46. Du Y, Weed SA, Xiong WC, Marshall TD, Parsons JT (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* 18: 5838-5851
47. Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23: 583-592
48. Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF (1998) Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron* 21: 707-716
49. Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL, Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 284-288
50. Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21: 717-726
51. Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca²⁺ homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25: 4587-4592
52. Gomperts SN (1996) Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* 84: 659-662
53. Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9: 929-942
54. Kistner U, Wenzel BM, Veh RW, Cases-Langhoff C, Garner AM, Apeltauer U, Voss B, Gundelfinger ED, Garner CC (1993) SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the Drosophila tumor suppressor gene *dlg-A*. *J Biol Chem* 268: 4580-4583
55. Jing-Ping Z, Tian QB, Sakagami H, Kondo H, Endo S, Suzuki T (2005) p55 protein is a member of PSD scaffold proteins in the rat brain and interacts with various PSD proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 135: 204-216
56. Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M (2004) Semi-quantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *J Biol Chem* 279: 21003-21011
57. Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5: 771-781
58. Boeckers TM, Winter C, Smalla KH, Kreutz MR, Bockmann J, Seidenbecher C, Garner CC, Gundelfinger ED (1999) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 247-252
59. Milewski M (2003) Structure and function in PDZ domains. *Postepy Biochem* 49: 257-267
60. Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J (2003) PDZ domains – common players in the cell signaling. *Acta Biochim Polon* 50: 985-1017
61. Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80: 237-248
62. Funke L, Dakoji S, Brecht DS (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74: 219-245
63. McGee AW, Brecht DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274: 17431-17436
64. Kuhlendahl S, Spangenberg O, Konrad M, Kim E, Garner CC (1998) Functional analysis of the guanylate kinase-like domain in the synapse-associated protein SAP97. *Eur J Biochem* 252: 305-313
65. Satoh K, Yanai H, Senda T, Kohu K, Nakamura T, Okumura N, Matsumine A, Kobayashi S, Toyoshima K, Akiyama T (1997) DAP-1, a novel protein that interacts with the guanylate kinase-like domains of hDLG and PSD-95. *Genes Cells* 2: 415-424
66. Naisbitt S, Kim E, Weinberg RJ, Rao A, Yang FC, Craig AM, Sheng M (1997) Characterization of guanylate kinase-associated protein, a postsynaptic density protein at excitatory synapses that interacts directly with postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90. *J Neurosci* 17: 5687-5696
67. Kennedy MB, Manzerra P (2001) Telling tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12323-12324
68. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-335
69. Cull-Candy SC, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: Re16
70. McIlhinney RA, Philipps E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P (2003) Assembly of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans* 31: 865-868
71. Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, Sheng M (1997) Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385: 439-442
72. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Haganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84: 745-755
73. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274: 27467-27473
74. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284: 1845-1848
75. Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Haganir RL (2006) SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4344-4351
76. Li W, Okano A, Tian QB, Nakayama K, Furihata T, Nawa H, Suzuki T (2001) Characterization of a novel synGAP isoform, synGAP-beta. *J Biol Chem* 276: 21417-21424
77. Strack S, Choi S, Lovinger DM, Colbran RJ (1997) Translocation of Autophosphorylated Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II to the Postsynaptic Density. *J Biol Chem* 272: 13467-13470
78. Gardoni F, Schrama LH, van Dalen JJ, Gispen WH, Cattabeni F, Di Luca M (1999) AlphaCaMKII binding to the C-terminal tail of NMDA receptor subunit NR2A and its modulation by autophosphorylation. *FEBS Lett* 456: 394-398
79. Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273: 20689-20692
80. Yan XB, Song B, Zhang GY (2004) Postsynaptic density protein 95 mediates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-activated serine phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase during brain ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 355: 197-200
81. Oh JS, Manzerra P, Kennedy MB (2004) Regulation of the neuron-specific Ras GTPase activating protein, synGAP, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 279: 17980-17988
82. Rockliffe N, Gawler D (2006) Differential mechanisms of glutamate receptor regulation of SynGAP in cortical neurones. *FEBS Lett* 580: 831-838
83. Yoshimura Y, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Donai H, Takahashi N, Isobe T, Yamauchi T (2004) Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Neurochem* 88: 759-768

84. Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3: 661-669
85. Valtschanoff JG, Weinberg RJ (2001) Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci* 21: 1211-1217
86. Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED (2002) ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem* 81: 903-910
87. Sedgwick SG, Smerdon SJ (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* 24: 311-316
88. Sheng M, Kim E (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* 113: 1851-1856
89. Kato A, Ozawa F, Saitoh Y, Hirai K, Inokuchi K (1997) Vesl, a gene encoding VASP/Ena family related protein, is upregulated during seizure, long-term potentiation and synaptogenesis. *FEBS Lett* 412: 183-189
90. Shiraishi Y, Mizutani A, Bito H, Fujisawa K, Narumiya S, Mikoshiba K, Furuichi T (1999) Cupidin, an isoform of Homer/Vesl, interacts with the actin cytoskeleton and activated rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci* 19: 8389-8400
91. Xiao B, Tu JC, Worley PF (2000) Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol* 10: 370-374
92. Fagni L, Worley PF, Ango F (2002) Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Sci STKE* 2002: RE8

Scaffold proteins (MAGUK, Shank and Homer) in postsynaptic density in the central nervous system

Małgorzata Beręsewicz[✉]

Molecular Biology Unit, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Science, 5 Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: mberesewicz@cmdik.pan.pl

Key words: postsynaptic density (PSD), PSD 95 (postsynaptic density protein 95 kDa), scaffold proteins, MAGUK (membrane-associated guanylyl kinase), Shank (SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein)

ABSTRACT

The postsynaptic density (PSD) is a dynamic multi-protein complex attached to the postsynaptic membrane composed of several hundred proteins such as receptors and channels, scaffolding and adaptor proteins, cell-adhesion proteins, cytoskeletal proteins, G-proteins and their modulators and signaling molecules including kinases and phosphatases. This review focuses on the prominent PSD scaffolds proteins such as members of the MAGUK (membrane-associated guanylyl kinase), Shank (SH3 domain and ankyrin repeat-containing protein) and Homer families. These molecules interact simultaneously with different kinds of receptors and modulate their function by linking the receptors to downstream signaling events. For example PSD 95, a main member of MAGUK family, interacts directly with carboxyl termini of NMDA receptor subunits and clusters them to the postsynaptic membrane. In addition, PSD 95 is involved in binding and organizing proteins connected with NMDAR signaling. Based on the modular character and ability to form multiproteins interactions, MAGUK, Shank and Homer are perfectly suited to act as a major scaffold in postsynaptic density.

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

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

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

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

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

WSKAZÓWKI SZCZEGÓŁOWE:

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

PRZYGOTOWANIE MANUSKRYPTU:

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

ORGANIZACJA MANUSKRYPTU:

Wskazany jest podział artykułu na nienumerowane rozdziały i podrozdziały.

Strona 1 (tytułowa) zawiera tytuł artykułu, imiona i nazwiska Autorów (ze wskazaniem autora korespondującego), tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym, numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej, słowa kluczowe (do 6), wykaz

stosowanych skrótów (do 10) w porządku alfabetycznym (ograniczony do niezbędnego minimum) oraz skrócony tytuł pracy (do 25 znaków).

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

Piśmiennictwo: Należy unikać nadmiernej liczby cytowań 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, zacytowanie się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe [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) w sposób poniżej podane przykłady:

1. Jiang QX, Wang DN, MacKinnon R (2004) Electron microscopic analysis of voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature* 430: 80-84
2. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase in the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 269-292
3. Dołowy K, Szewczyk A, Pikuła S (2003) *Błony biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. Michalak M, Nakamura K, Papp S, Opas M (2000) Calreticulin and the molecular basis of calcium action in biology and medicine. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 191-205
5. Darzynkiewicz E, Jankowska-Anyszka M (2000) *Struktura i funkcja kationów (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. Wymiary tabeli powinny być dostosowane 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 rycin powinna być dostosowana do szerokości jednego łamu (8,5 cm) lub strony (18 cm). Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, posługiwać się skrótami. Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką Arial 8. 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).

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

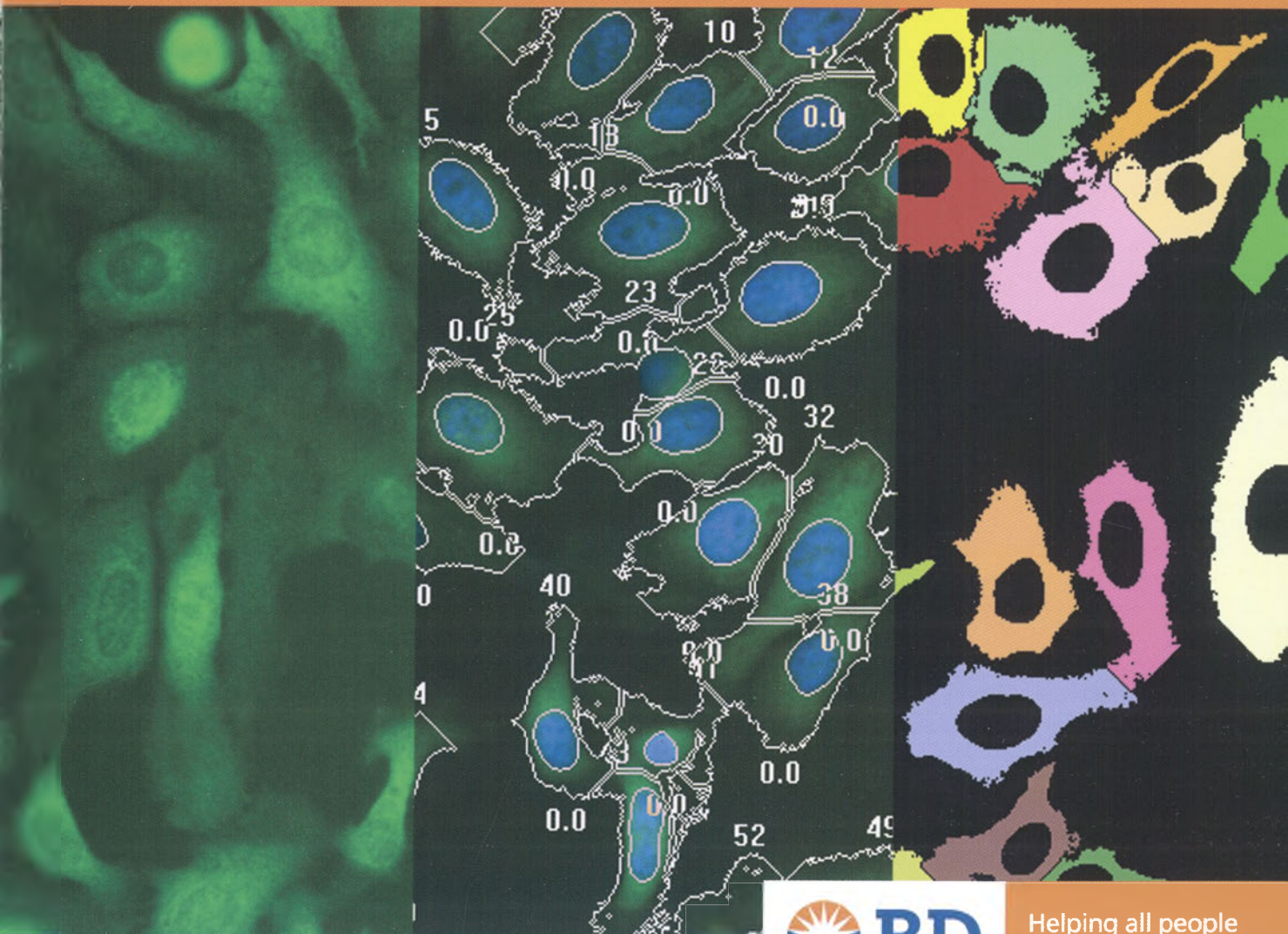
W przypadkach uzasadnionych, np. brakiem odpowiedniego sprzętu gramowania, prosimy o przysyłanie pracy na dyskietce lub płycie zabezpieczonej przed uszkodzeniem w czasie transportu, na adres:

Slawomir Pikuła
redaktor naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
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 wydrukowania artykułu. Oplata za wydrukowanie jednej strony artykułu wynosi 10 zł. Szczegółowe informacje zamieściliśmy pod adresem: www.postepybiochemii.pl/oplaty.htm.

Optymalizuj swoje wyniki

Nowość: Zestawy BD™ Calcium Assay



Helping all people
live healthy lives

Kombinacja Dająca Sukces

- Nowość: Zestawy BD™ Calcium i PBX Calcium Assay: Zwiększony stosunek sygnału do tła w porównaniu do metod standardowych.
- BD ACTOne™ cAMP Assay: Stabilnie transfekowane komórki HEK293 posiadające ekspresję opatentowanego biosensora typu CNG (cyclic nucleotide-gated) i receptorów GPCR połączonych z białkiem Gs lub Gi.

- BD Falcon™ i BD BioCoat™ Viewing Plates do Oznaczeń Fluorescencyjnych: Wybór przygotowanych do hodowli i gotowych do użycia, biologicznie pokrytych powierzchni wzmacniających przyleganie komórek, ich rozprzestrzenianie i wzrost.

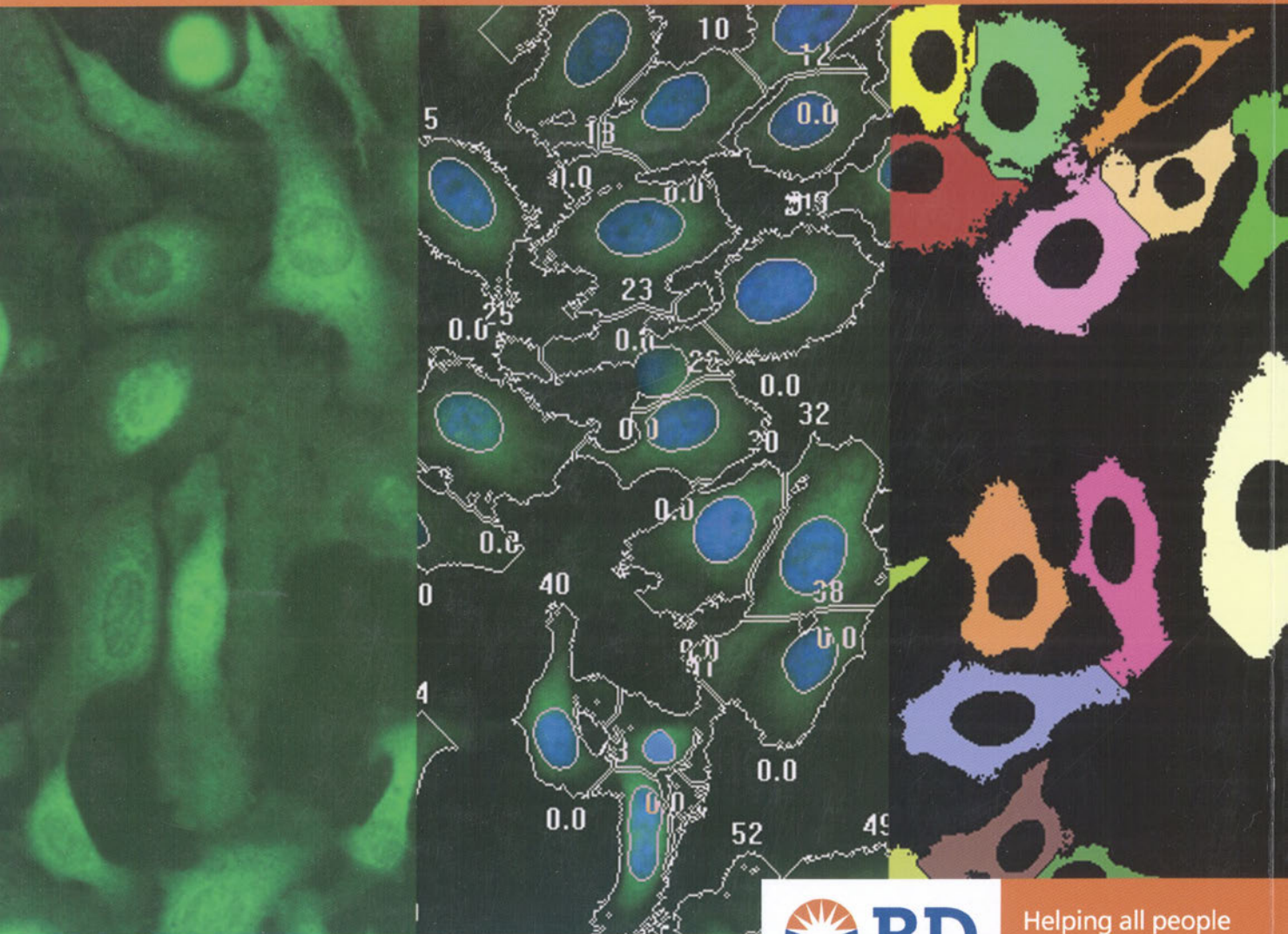
Skontaktuj się z nami aby dowiedzieć się więcej o optymalizacji oznaczeń!

BD Biosciences

Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com

BD Pathway HT™ Bioimager

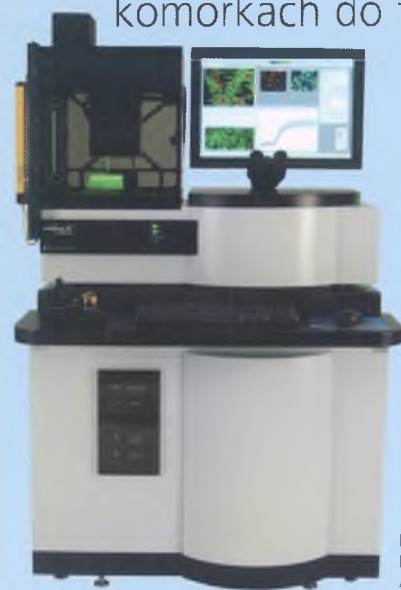
Badania Żywych Komórek Za Pomocą Automatycznego Obrazowania Konfokalnego



BD

Helping all people
live healthy lives

Szybko rozwijane metody oparte na komórkach do tworzenia nowych leków i badań podstawowych



- Pokrycie pełnego spektrum z użyciem 16 filtrów wzbudzenia i 8 filtrów w torze emisji
- Autofokus i automatyczna identyfikacja śledzenia komórki
- Przełączanie pomiędzy trybem konfokalnym i szerokim polem
- Zintegrowana kontrola temperatury i CO₂
- Możliwość obrazowania zarówno komórek jak i tkanek
- Możliwość bezpośredniego oglądania próbki jak w mikroskopie
- Pomiary kinetyki lub punktu końcowego

Skontaktuj się z nami po więcej informacji!

BD Biosciences

Becton Dickinson Polska Sp.z o.o.
ul. Królowej Marysieńki 90,
02-954 Warszawa
tel.: +48 22 651 75 88
faks: +48 22 651 75 89
www.bdbeurope.com

Do Badań Naukowych. Nie używać do diagnostyki lub leczenia
BD, BD Logo i wszystkie inne znaki handlowe są własnością Becton, Dickinson and Company. ©2007 BD
A712-00 <http://reim.org.pl>